

УДК 619:614.48

06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки)

**ИЗУЧЕНИЕ ИМУНОФЕРМЕНТНЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ К ЭНТЕРОТОКСИНУ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА НА ОСНОВЕ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК**

Попов Петр Александрович  
Кандидат биологических наук, Ведущий научный сотрудник  
E-mail: [popov.petr18@gmail.com](mailto:popov.petr18@gmail.com)

Осипова Ирина Сергеевна  
Кандидат ветеринарных наук,  
Старший научный сотрудник  
*ВНИИВСГЭ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Звенигородское ш. 5, Москва, 123022, Россия.*

Стафилококковые интоксикации занимают одно из ведущих мест в этиологии пищевых отравлений во многих странах мира и представляют серьезную проблему для здоровья во всем мире. За последние 20-30 лет отмечается повсеместный рост стафилококковых заболеваний. Это связано с увеличением количества штаммов возбудителя, резистентных к антимикробным препаратам, нарастанием числа носителей патогенных стафилококков, нарушением технологических режимов получения сырья, его переработки и другими причинами. Причиной пищевых отравлений человека часто являются энтеротоксины, продуцируемые энтеротоксигенными стафилококками, которые вызывают патологические эффекты у человека, включая диарею, рвоту и шок. Так, до 50% выделяемых *St. aureus*, из пищевых продуктов и от пострадавших при пищевых интоксикациях способны вырабатывать энтеротоксины. Стафилококки, обладающие энтеротоксигенными свойствами, чаще (34,4%) обнаруживаются в молоке коров, больных маститом, и значительно реже (13,6%) в молоке здоровых коров. В настоящее время существует ряд методов по обнаружению энтеротоксинов золотистых стафилококков: реакция иммунодиффузии (РИД), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), латексагглютинации (ЛАГ), радиоиммунологический и иммуноферментный анализы (РИФ и ИФА), позволяющие обнаруживать энтеротоксигенных стафилококков и их энтеротоксины в объектах внешней среды. Широкого применения эти методы не получили в связи с отсутствием реактивов, оборудования, применения радиоактивных изотопов (РИА и ИФА) или низкой

UDC 619:614.48

06.02.02 Veterinary Microbiology, Virology, epizootology, Mycology with mycotoxicology and immunology (veterinary science)

**STUDY OF IMMUNO-ENZYME DIAGNOSTICS FOR STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIN BASED ON HYPERIMMUNE SERA**

Popov Petr Alexandrovich  
Candidate of biology, Leading researcher  
E-mail: [popov.petr18@gmail.com](mailto:popov.petr18@gmail.com)

Osipova Irina Sergeevna  
Candidate of veterinary Sciences, Senior researcher  
*VNIIVSGE is a branch of the K. I. Scriabin and Ya. R. Kovalenko Federal research CENTER of the Russian Academy of SCIENCES, Zvenigorodskoe sh. 5, Moscow, 123022, Russia*

Staphylococcal intoxication occupies one of the leading places in the etiology of food poisoning in many countries of the world and is a serious health problem worldwide. Over the past 20-30 years, there has been a widespread increase in staphylococcal diseases. This is due to an increase in the number of pathogen strains resistant to antimicrobial drugs, an increase in the number of carriers of pathogenic staphylococci, violation of technological regimes for obtaining raw materials, processing them, and other reasons. Human food poisoning is often caused by enterotoxins produced by enterotoxigenic staphylococci, which cause pathological effects in humans, including diarrhea, vomiting, and shock. Thus, up to 50% of *St. aureus* secreted from food products and from victims of food intoxication can produce enterotoxins. Staphylococci with enterotoxigenic properties are more often (34.4%) found in the milk of cows with mastitis, and much less often (13.6%) in the milk of healthy cows. Currently, there are a number of methods for detecting enterotoxins of *Staphylococcus aureus*: immunodiffusion reaction (REID), indirect hemagglutination reaction (rnga), latexagglutination (LAG), radioimmunological and enzyme immunoassays (RIF and ELISA), which allow detecting enterotoxigenic staphylococci and their enterotoxins in environmental objects. These methods were not widely used due to the lack of reagents, equipment, the use of radioactive isotopes (RIA and ELISA) or the low sensitivity of the method (REED, rnga, LAG). This raises the question of the need to develop relatively simple and highly sensitive methods for detecting enterotoxigenic staphylococci and their products

чувствительности метода (РИД, РНГА, ЛАГ). В связи с этим встает вопрос о необходимости разработки относительно простых и высокочувствительных методов обнаружения энтеротоксигенных стафилококков и продуктов их жизнедеятельности

Ключевые слова: СТАФИЛОКОКК, ЭНТЕРОТОКСИНЫ, ДИАГНОСТИКУМЫ, МОЛОКО, МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Keywords: STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ENTEROTOXINS, DIAGNOSTIC PREPARATIONS, MILK, DAIRY PRODUCTS

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-161-008>

## Введение

В 21 веке, в связи с повышением загрязнения окружающей среды важными становятся вопросы гигиены сырого молока, контроль его качества. Органолептические показатели, пищевая ценность и безопасность потребления молока и молочных продуктов становятся приоритетными. Стафилококковые интоксикации занимают одно из ведущих мест в этиологии пищевых отравлений. Это связано с широким распространением во внешней среде стафилококка, относительной его устойчивости к химическим и физическим факторам воздействия. [1,2,3,6,7,9] Термическая обработка продуктов уничтожает стафилококк, но не разрушает его токсины. В России регистрация пищевых отравлений, вызванных стафилококком проводится с 1936 года. Все стафилококковые энтеротоксины представляют собой белки с относительно небольшой молекулярной массой, от 26 900 до 29 600 Да. «Классические» энтеротоксины включают пять основных типов стафилококковых энтеротоксинов, А, В, С, D и E (SEA-SEE), которые, как полагают, отвечают за 95% всех стафилококковых отравлений. Профилактика пищевых отравлений зависит от эффективности их ранней диагностики, т.е. обнаружения энтеротоксигенных стафилококков в молоке, молочных и других пищевых продуктах. Особую опасность при пищевых интоксикациях представляют энтеротоксины, вырабатываемые некоторыми

штаммами золотистого стафилококка, поэтому необходимо прибегать к методам обнаружения самих энтеротоксинов. Большинство известных методов имеют различные недостатки: отсутствие реактивов, оборудования, недостаточную чувствительность, сложность в применении. В последние годы разрабатываются более совершенные методы индикации стафилококковых энтеротоксинов, но исследования противоречивы, в качестве тест-объектов используются, как правило, мясо и мясные продукты, тогда как основное место стафилококковых интоксикаций, связанных с употреблением пищевых продуктов, занимают молочные (молоко, сыры, творог, сметана).[1,2,3,6,7,9,10-16]

В связи с изложенным необходимо уделять особое внимание разработке новых методов обнаружения энтеротоксинов золотистого стафилококка именно в молоке и молочных продуктах. Разработка таких методов позволит повысить контроль за качеством молочных продуктов и профилактировать токсикозы молочного происхождения.[4,5,8]

### **Материалы и методы исследований**

Работа проводилась в лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы ВНИИВСГЭ-филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, образцы молока для исследования брали из молочных ферм московской области

Конъюгация энтеротоксина золотистого стафилококка с бычьим сывороточным альбумином проводилась с помощью глутарового альдегида по двухстадийной модификации общепринятым методом.

Для получения стафилококковых антитоксических сывороток проводили иммунизацию 12 кроликов породы шиншилла весом 2,5-3,0 кг, энтеротоксинами типов А, С, D, Е. Были проведены 3 схемы иммунизации, энтеротоксины вводили внутримышечно и подкожно.

Получение конъюгата пероксидаза-антиэнтеротоксические иммуноглобулины проводили по методу периодатного окисления (Nakane

and Kawaoui, 1974).

Определение наличия энтеротоксинов и сравнительного анализа проводили с использованием тест-системы RIDASCREEN®SET A,B,C,D,E.

На первом этапе работы был проведен анализ имеющихся полевых штаммов золотистого стафилококка (10 образцов) и выбран полевой штамм №4, вырабатывающий максимальное количество энтеротоксинов типов А, С, D и Е при посеве на плотную питательную среду (МПА). С целью максимального продуцирования энтеротоксинов в качестве среды накопления была использована модифицированная среда Mueller Hinton Agar, содержащая кислотный гидролизат казеина, дрожжевой экстракт и комплекс витаминов. Культивирование штамма *St. aureus* проводили в чашках Петри с плотной питательной средой на целлофане в течение 48 ч при 37°C, затем микробную массу отмывали фосфатным буфером (рН 7,4) и отделяли центрифугированием в течение 15-ти мин при 4000 об/мин с последующей фильтрацией надосадочной жидкости через стерильную фильтр-насадку. Фильтрат смыва культуры, содержащий энтеротоксины, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин и надосадочную жидкость насыщали сухим сульфатом аммония до 80%, после чего выдерживали в холодильнике в течение 18 ч при 4°C. Образовавшийся осадок снова отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин. Осадок растворяли в дистиллированной воде в 1/10 части от исходного объема, полученный раствор помещали в диализную трубку и диализовали в дистиллированной воде до отрицательной реакции на содержание сульфат ионов (контроль 10%-ным раствором хлористого бария). После этого диализат центрифугировали с целью удаления нерастворимых примесей. Измерение концентрации белка (стафилококковых энтеротоксинов) проводили с помощью спектрофотометра СФ-26. Был использован метод Бредфорда, основанный на взаимодействии анионной формы красителя с белком. К 1,5 мл образца

добавляли 3 мл раствора кумасси ярко-синего G-250, через 20-30 мин измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин в концентрации 2-200 мкг/мл. Штамм продуцировал 150-200 мкг/мл энтеротоксигенного белка.

«Сшивку» энтеротоксина золотистого стафилококка с бычьим сывороточным альбумином (БСА) проводили по двухстадийной модификации общепринятым методом с использованием глутарового альдегида.

Следующим этап - проведение гипериммунизации 12 кроликов породы шиншилла массой 2,5-3 кг конъюгатом энтеротоксин-БСА и культуральным фильтратом золотистого стафилококка, содержащим энтеротоксины с целью получения антитоксических сывороток. Для этого фильтрат смыва культуры центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин и надосадочную жидкость насыщали сухим сульфатом аммония до 60%, после чего выдерживали в холодильнике в течение 18 ч при 40С. Образовавшийся осадок снова отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин. Осадок растворяли в дистиллированной воде в 1/10 части от исходного объема, полученный раствор помещали в диализную трубку и диализовали в в дистиллированной воде до отрицательной реакции на содержание сульфат ионов (контроль 10%-ным раствором хлористого бария). После этого диализат центрифугировали с целью удаления нерастворимых примесей, концентрировали в 50% растворе полиэтиленгликоля с молекулярным весом 20 000 Д и использовали для гипериммунизации. Было изучено 3 различные схемы, концентрация энтеротоксигенного белка для иммунизации 20 мкг/мл.

1-ая схема: конъюгат (энтеротоксин-БСА) вводили по 2 мл трехкратно с интервалом в 7 сут подкожно (4 кролика). 2-ая схема: фильтрат энтеротоксинов смешивали с адьювантом Фрейнда 1:1 и вводили

по 3 мл внутримышечно (3 кролика). 3-ая схема: фильтрат энтеротоксинов вводили подкожно без адьюванта в нарастающих дозах: 1 мл, 2 мл, 4 мл (3 кролика). Схемы иммунизации представлены в табл. 1. Кровь брали через 28 дней после завершения цикла иммунизации. Одно животное было контрольным, которое содержали в аналогичных условиях.

После взятия крови пробирки выдерживали в холодильнике при 8-100С в течение 12 ч, отделившуюся сыворотку сливали и центрифугировали.

Определение титра антител антитоксической сыворотки проводили путем разведения физиологическим раствором в соотношении 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 и 1:128. Разведенную сыворотку исследовали в реакции преципитации (РДП) в агаровом геле. В качестве антигена применяли полученные энтеротоксины, в качестве контроля использовали сыворотку, полученную от неиммунизированного кролика. Для этого 1,5 г агара Дифко суспендировали в 100 мл 0,85% раствора NaCl и кипятили до полного растворения агара. Расплавленный агар в объеме 3,0 мл наносили на предметные стекла и после затвердения геля специальным штампом в агаровой пластинке вырезали лунки для антигена (периферические) и иммунной сыворотки (в центре). Заполнив лунки соответствующими растворами (антигена и сыворотки) пластинки помещали во влажную камеру. Иммунодиффузию проводили в течение 24 ч. Титр полученных антисывороток в реакции преципитации в агаровом геле составил 1:32 — 3-ая схема иммунизации, 1:64 — 2-ая схема. При проверке антисыворотки, полученной после иммунизации кроликов по 1-ой схеме, четкой полосы преципитата не было выявлено даже при использовании неразведенной сыворотки. В связи с этим было решено использовать для конструирования тест-системы антисыворотки с титром 1:64.

Таблица 1

## Результаты использования различных схем иммунизации кроликов

Номер схемы	Антиген	Кол-во дней / инъекций	Доза однократного введения (мл)	Способ введения	Максимальный титр антител
1	Конъюгат (токсин-БСА)	21/3	2,0	подкожно	Нет
2	Культуральный фильтрат + адьювант Фрейнда 1:1	21/3	3,0	внутримышечно	1:64
3	Культуральный фильтрат	21/3	1,0;2,0;4,0	подкожно	1:32

Дальнейшей задачей исследований было выделение и очистка иммуноглобулинов из сывороток. Для этого иммуноглобулины антиэнтеротоксических сывороток осаждали при комнатной температуре насыщенным раствором сульфата аммония, забуференным до pH 7,3, при конечном насыщении 33% в сыворотке. Образующийся осадок отделяли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 20 мин, затем растворяли с дистиллированной водой и вторично осаждали сульфатом аммония при том же насыщении. Переосаждение повторяли еще один раз, а затем осадок растворяли в физрастворе и удаляли избыток солей путем диализа с помощью целлофановых мешочков против физраствора до отрицательной пробы с хлористым барием, очищенный раствор концентрировали в диализной трубке против 50%-ного раствора полиэтиленгликоля (20000 Д). Титр очищенных иммуноглобулинов при повторном исследовании в РДП составил 1:128. Количество иммуноглобулинов определяли спектрофотометрическим методом при 280 нм (160 мг/мл).

Следующий этап - получение конъюгата пероксидаза-антиэнтеротоксические иммуноглобулины. Для этого использовали метод

периодатного окисления (Nakane and Kawaoi, 1974). 5 мг пероксидазы растворяли в 1 мл свежеприготовленного 0,3М бикарбоната натрия рН 8,1. К раствору добавляли 0,1 мл 1%-ного 1-флюоро-1,4-динитрофторбензола, растворенного в этаноле и перемешивали на магнитной мешалке в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 1 мл 0,06 М периодата натрия, растворенного в дистиллированной воде и перемешивали в темноте в течение 30 мин. К окисленной пероксидазе добавляли 1 мл 0,16 М водного раствора этиленгликоля и продолжали перемешивание еще 60 мин. Активированную пероксидазу переносили в диализную трубку и диализовали против 0,01 М натрий карбонатного буфера рН 9,5 при 40С. К 3 мл диализованного раствора пероксидазы добавляли 5 мг иммуноглобулинов, растворенных в натрий карбонатном буфере рН 9,5 и перемешивали в течение 3 час при комнатной температуре. К полученному конъюгату добавляли 5 мг борогидрида натрия и помещали в холодильник при 40С на 24 час, затем раствор диализовали против физраствора в течение ночи при 40С. Для удаления несвязавшихся с иммуноглобулинами молекул пероксидазы к раствору конъюгата при постоянном помешивании добавляли по каплям равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 20 мин. К осадку добавляли 1 мл физраствора и диализовали против физраствора в течение ночи при 40С. После диализа определяли оптическую плотность конъюгатов на спектрофотометре при 280 нм.

Для определения оптимальной концентрации антител и оптимального разведения конъюгата применяли метод шахматного титрования. Для постановки теста использовали полистироловые планшеты вместимостью 0,2 мл.

В экспериментах испытывали различные количества антител в интервале 1-20 мкг/мл (разведения в 0,05 М карбонат-бикарбонатном

буфере рН 9,6 — 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 0,63 мкг/мл). В качестве антигена использовали культуральный фильтрат, содержащий энтеротоксины А, С, D и E (готовили разведения в следующих количествах: 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 250 нг/мл, 125 нг/мл, 63 нг/мл, 32 нг/мл, 12 нг/мл, 8 нг/мл, 4 нг/мл и 2 нг/мл). Конъюгаты разводили фосфатносолевым буфером, содержащим Твин-20 (ФСБ-ТВ) в соотношении 1:200, 1:400, 1:600, 1:800.

В ряды из 12 лунок планшета от А до F вносили 100 мкл глобулиновой фракции в концентрациях от 20 до 0,63 мкг/мл. В два последних ряда (G и H) добавляли иммуноглобулины нормальной кроличьей сыворотки в концентрациях 10 и 20 мкг/мл соответственно. Планшеты помещали во влажную камеру и выдерживали в течение ночи при 40С. Затем лунки планшета промывали раствором ФСБ-ТВ (в каждую лунку добавляли по 100 мкл буфера). Промывку повторяли 4 раза. После промывки в ряды 1-10 добавляли растворы энтеротоксинов в концентрациях от 1000 до 2 нг/мл, в ряды 11 и 12 вносили раствор ФСБ-ТВ. Планшеты выдерживали в течение 12-16 час во влажной камере при комнатной температуре, снова промывали раствором ФСБ-ТВ. Описанным выше способом готовили 4 планшета. После промывки в лунки добавляли конъюгат в количестве 100 мкл. В лунки первого планшета вносили конъюгат в разведении 1:200, в лунки второго — в разведении 1:400, третьего — в разведении 1:600, четвертого — 1:800. Планшеты помещали во влажную камеру и выдерживали 2 часа. После очередной 4-кратной промывки раствором ФСБ-ТВ в каждую лунку добавляли 100 мкл свежеприготовленного раствора субстрата (17 мг орто-фенилендиамина растворяли в 50 мкл 30% перекиси водорода). Планшеты помещали на 30 мин в темноту, останавливали реакцию добавлением 25 мкл 4N серной кислоты. Результаты учитывали визуально и по величине оптической плотности с помощью спектрофотометра при длине волны 492 нм.

В таблице 2 приведены результаты определения оптимальных концентраций иммуноглобулинов, разведения конъюгата и предела чувствительности метода.

Таблица 2

Результат выявления СЭТ(чувствительность)	Оптимальная концентрация иммуноглобулинов	Оптимальное разведение конъюгата
12 нг/мл	10 мкг/мл	1:600

На следующем этапе работы мы сравнили чувствительность полученного иммуноферментного диагностикума с коммерческой тест-системой RIDASCREEN®SET A,B,C,D,E.

Первоначально для обнаружения энтеротоксинов испытали сконструированный диагностикум. Лунки планшета заполняли 100 мкл растворов иммуноглобулинов специфических антисывороток против энтеротоксинов А, С, D и Е в оптимальной концентрации, отработанной в предварительных опытах (10 мкг/мл). Планшеты помещали во влажную камеру на ночь при температуре 40С, затем промывали 3 раза раствором ФСБ-ТВ и добавляли по 100 мкл растворов энтеротоксинов соответствующих разведений: 1 нг/мл, 2 нг/мл, 4 нг/мл, 8 нг/мл, 12 нг/мл, 32 нг/мл, 63 нг/мл, 125 нг/мл). Планшеты выдерживали во влажной камере при комнатной температуре в течение 12-16 час, затем четырежды промывали раствором ФСБ-ТВ и добавляли по 100 мкл соответствующего конъюгата (выдерживали 2 часа). После очередной промывки в каждую лунку вносили по 100 мкл субстрата (ОФД-Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и выдерживали в темноте 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 25 мкл 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Анализ энтеротоксинов с помощью тест-системы RIDASCREEN®SET A,B,C,D,E проводили по прилагаемой инструкции. Сравнительные данные по результатам исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3

Количество энтеротоксинов А, С, D, E, нг/мл	Результат выявления энтеротоксина	
	Сконструированный диагностикум	Тест-система RIDASCREEN®SET A,B,C,D,E
125	+	+
63	+	+
32	+	+
12	+	+
8	-	+
4	-	+
2	-	+
1	-	-
К	-	-

Примечание: + = положительный результат

- = отрицательный результат

К = отрицательный контроль

Полученный диагностикум уступает коммерческой тест-системе как по величине затраченного времени, так и по чувствительности (предел обнаружения энтеротоксинов в тест-системе RIDASCREEN®SET в 6 раз выше).

### Выводы

Был выбран полевой штамм *St. aureus*, вырабатывающий на МПА максимальное количество энтеротоксинов типов А, С, D и E, сконструирована питательная среда для культивирования золотистого стафилококка с целью увеличения выхода энтеротоксинов, получены и очищены стафилококковые энтеротоксины.

Проведена «сшивка» энтеротоксинов золотистого стафилококка с бычьим сывороточным альбумином (БСА) по двухстадийной модификации общепринятым методом с использованием глутарового альдегида с целью получения конъюгата для последующей иммунизации кроликов.

При гипериммунизации кроликов использовали 3 схемы проведения

опытов с использованием как фильтрата энтеротоксинов, так и полученного конъюгата энтеротоксин-БСА. В результате исследований был установлен максимальный титр антисыворотки, который составил 1:64 при иммунизации кроликов внутримышечно фильтратом энтеротоксинов, смешанным с адьювантом Фрейнда 1:1 в дозе 3 см<sup>3</sup>, тогда как при использовании конъюгата СЭТ-БСА даже при использовании неразведенной сыворотки четкой полосы преципитата не было выявлено, так как энтеротоксин обладает большой молекулярной массой, и при получении конъюгата иммуногенные свойства токсина снижаются. После очистки иммуноглобулинов методом высаливания сульфатом аммония титр антител повысился до 1:128.

Был получен конъюгат пероксидаза-антиэнтеротоксические иммуноглобулины методом периодатного окисления. Были определены оптимальные концентрации антител и конъюгатов для постановки иммуноферментного «сэндвич» -метода. Анализ проводили методом «шахматного» титрования с применением полистироловых планшет. Оптимальными оказались следующие величины: концентрация иммуноглобулинов 10 мкг/мл, разведение конъюгата 1:600. Чувствительность метода оказалась 12 нг/мл. Установив оптимальные концентрации реагентов для проведения иммуноферментного анализа, мы использовали этот метод для конструирования диагностикума.

Для сравнения чувствительности полученного иммуноферментного диагностикума в качестве контроля использовали тест-систему RIDASCREEN®SET A, B, C, D, E. При определении концентрации энтеротоксинов коммерческая тест-система оказалась более чувствительной (2 нг/мл) против 12 нг/мл у сконструированного диагностикума.

### Список литературы

1. Бабунова В.С., Попов П.А., Осипова И.С. Проблема классификации кормовых добавок, используемых в рационе продуктивных животных. // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2020. № 1 (33). С. 30-35.
2. Бугрова В.И. Сравнительные данные о способности *St.aureus* вырабатывать энтеротоксины и другие биологически активные вещества.//Вопр.питания.-1982.-№4.-С.70-72.
3. Бугрова В.И. Стафилококковые энтеротоксины. Обзор.//Вопр. Питания.-1983.-№4.-С.11-15.
4. Бутко М.П., Попов П.А., Лавина С.А., Гуненкова Н.К., Осипова И.С. Биологическая ценность и токсико-биологические показатели продуктов убоя свиней при эхинококкозе и альвеококкозе. // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2019. № 4 (32). С. 364-369.
5. Бутко М.П., Попов П.А., Лавина С.А., Осипова И.С., Семенова Е.А. Методические подходы к ветеринарно-санитарной экспертизе продуктов убоя сельскохозяйственных животных при инвазионных болезнях.//Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2018. № 1 (25). С. 10-17.
6. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.В., Онищенко Д.А. Фальсификация продукции животного происхождения. // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2017. № 3 (23). С. 17-23
7. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.В., Онищенко Д.А., Бахир В.М., Ипатова Л.Г. Современная технология электрохимического синтеза для получения дезинфицирующих средств, их эффективность и перспектива практического применения. Ветеринария. 2016. № 2. С. 45-50.
8. Гречищева Т.С., Ющенко Г.В. Некоторые эпидемиологические особенности стафилококковых гастроэнтеритов.//Пищевые токсикоинфекции.Саратов,1982.-ч.1.-С.51-54.
9. Дерябин П.Н., Каральник В.В. Стафилококковые антителные видоспецифические эритроцитарные диагностикумы // Труды НИИЭМ и инфекционных болезней Казах. МЗ.-1985.-Т.28.-С.146-149.
10. Карплюк И.А. Пищевые отравления микробной природы и их профилактика.//Центральный институт усовершенствования врачей.-М.,1982.-С.9-19.
11. Мкртумян А.В., Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.В., Онищенко Д.А. Математическая модель динамики гибели микроорганизмов под действием поражающих факторов.// Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2017. № 2 (22). С. 59-62.
12. Мкртумян А.В., Бутко М.П., Попов П.А., Фролов В.С., Кудрявцев Е.А. Математическая модель изменения концентрации озона в замкнутом объеме при дезинфекции объектов ветеринарного надзора. // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2014. № 1 (11). С. 61-64.
13. Попов П.А. Остаточные содержания препаратов ветеринарного назначения в молоке в разных странах.// Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2020. № 2 (34). С. 158-165
14. Попов П.А. Применение дезинфицирующего средства Гипонат-БПО для дезинфекции цехов убоя и первичной переработки скота.// Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2020. № 1 (33). С. 30-35
15. Попов П.А. Чувствительность метода определения ингибирующих веществ с использованием тест-культуры *Streptococcus thermophilus* В19 и индикатора резазурина к В-лактамам антибиотикам.// Вестник Башкирского государственного аграрного

университета. 2020. № 2 (54). С. 65-70.

16. Попов П.А., Бабунова В.С., Осипова И.С. Методы ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов убоя животных на остаточные количества лекарственных веществ в составе кормовых добавок. // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2019. № 3. С. 272.

### References

1. Babunova V.S., Popov P.A., Osipova I.S. Problema klassifikacii kormovy`x dobavok, ispol`zuemy`x v racione produktivny`x zhivotny`x. // Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii. 2020. № 1 (33). S. 30-35.

2. Bugrova V.I. Sravnitel`ny`e dannye o sposobnosti St.aureus vy`rabatyvat` e`nterotoksyny` i drugie biologicheski aktivny`e veshhestva.//Vopr.pitaniya.-1982.-№4.-S.70-72.

3. Bugrova V.I. Stafilokokkovy`e e`nterotoksyny`. Obzor.//Vopr. Pitaniya.-1983.-№4.-S.11-15.

4. Butko M.P., Popov P.A., Lavina S.A., Gunenkova N.K., Osipova I.S. Biologicheskaya cennost` i toksiko-biologicheskie pokazateli produktov uboya svinej pri e`xinokokkoze i al`veokokkoze. // Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii. 2019. № 4 (32). S. 364-369.

5. Butko M.P., Popov P.A., Lavina S.A., Osipova I.S., Semenova E.A. Metodicheskie podxody` k veterinarno-sanitarnoj e`kspertize produktov uboya sel`skoxozyajstvenny`x zhivotny`x pri invazionny`x boleznyax.//Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii. 2018. № 1 (25). S. 10-17.

6. Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.V., Onishhenko D.A. Fal`sifikaciya produkcii zhivotnogo proisxozhdeniya. // Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii. 2017. № 3 (23). S. 17-23

7. Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.V., Onishhenko D.A., Baxir V.M., Ipatova L.G. Sovremennaya texnologiya e`lektroximicheskogo sinteza dlya polucheniya dezinficiruyushhix sredstv, ix e`ffektivnost` i perspektiva prakticheskogo primeneniya. Veterinariya. 2016. № 2. S. 45-50.

8. Grechishheva T.S., Yushhenko G.V. Nekotory`e e`pidemiologicheskie osobennosti stafilokokkovy`x gastroe`nteritov.//Pishhevy`e toksikoinfekcii.Saratov,1982.-ch.1.-S.51-54.

9. Deryabin P.N., Karal`nik V.V. Stafilokokkovy`e antitel`ny`e vidospecificheskie e`ritocitarny`e diagnostikumy` // Trudy` NIIE`M i infekcionny`x boleznej Kazax. MZ.-1985.-T.28.-S.146-149.

10. Karplyuk I.A. Pishhevy`e otravleniya mikrobnaj prirody` i ix profilaktika.//Central`ny`j institut usovershenstvovaniya vrachej.-M.,1982.-S.9-19.

11. Mkrtumyan A.V., Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.V., Onishhenko D.A. Matematicheskaya model` dinamiki gibeli mikroorganizmov pod dejstviem porazhayushhix faktorov.// Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii. 2017. № 2 (22). S. 59-62.

12. Mkrtumyan A.V., Butko M.P., Popov P.A., Frolov V.S., Kudryavcev E.A. Matematicheskaya model` izmeneniya koncentracii ozona v zamknutom ob`eme pri dezinfekcii ob`ektov veterinarnogo nadzora. // Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii. 2014. № 1 (11). S. 61-64.

13. Popov P.A. Ostatochny`e sodержaniya preparatov veterinarnogo naznacheniya v moloke v razny`x stranax.// Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigieny` i e`kologii. 2020. № 2 (34). S. 158-165

14. Popov P.A. Primenenie dezinficiruyushhego sredstva Giponat-BPO dlya dezinfekcii cexov uboya i pervichnoj pererabotki skota.// Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj

sanitarii, gigeny` i e`kologii. 2020. № 1 (33). S. 30-35

15. Popov P.A. Chuvstvitel`nost` metoda opredeleniya ingibiruyushhix veshhestv s ispol`zovaniem test-kul`tury` Streptococcus thermophilus V19 i indikatora rezazurina k V-laktamny`m antibiotikam. // Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2020. № 2 (54). S. 65-70.

16. Popov P.A., Babunova V.S., Osipova I.S. Metody` veterinarno-sanitarnoj e`kspertizy` produktov uboya zhivotny`x na ostatochny`e kolichestva lekarstvenny`x veshhestv v sostave kormovy`x dobavok. // Rossijskij zhurnal Problemy` veterinarnoj sanitarii, gigeny` i e`kologii. 2019. № 3. S. 272.