

На правах рукописи

Казиева Гуля Хайлядиновна

**ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ
ПРОДУКТОВ ПРИ РЕТРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

06.02.05 - Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена
и ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Научный руководитель

Красникова Екатерина Сергеевна
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Васильев Дмитрий Аркадьевич - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Ларионов Геннадий Анатольевич - доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия»

Ведущее учреждение:

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Защита состоится «17» мая 2018 года в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (420029, г. Казань, ул. Сибирский Тракт, 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Электронный вариант автореферата и текста объявления о защите размещен на официальных сайтах ВАК РФ www.vak.ed.gov.ru; полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя – на официальном сайте ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» - [www.http://казветакадемия.рф](http://казветакадемия.рф).

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года

Учёный секретарь
диссертационного совета

Г.Р. Юсупова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Молоко здоровых коров является важнейшим продуктом питания и сырьем, широко применяемым в пищевой промышленности. Молоко должно подвергаться тщательному контролю по всем основным показателям: органолептическим, физико-химическим, микробиологическим и другим, не только для определения его биологической полноценности и безопасности, но и для выяснения его сырьевой ценности.

Ретровирусные инфекции крупного рогатого скота - энзоотический лейкоз и иммунодефицит, относят к заболеваниям, не поддающимся терапии и специфической профилактике. Возбудители этих заболеваний, РНК-содержащие вирусы семейства *Retroviridae*, паразитируют в клетках иммунной системы. В эндемичных регионах степень инфицирования ретровирусами крупного рогатого скота достигает 67 – 83,9 % (Красникова, 2014; McConnel et al., 2015).

Представители семейства *Retroviridae* имеют уникальную биологическую особенность: однажды инфицировав клетку, вирус становится неотъемлемой частью организма и может долгие годы не проявлять свой патогенный потенциал, делая носителя скрытым источником инфекции, что снижает эффективность серологической диагностики данных заболеваний и способствует их экспансии (Супотницкий, 2009; Климов, 2012).

Ретровирусные инфекции крупного рогатого скота наносят значительный экономический ущерб животноводству, обусловленный снижением племенной ценности и выбраковкой животных, недополучением молодняка и продукции. В частности, удои молочных коров, инфицированных вирусом энзоотического лейкоза, снижаются на 13,3 – 15,5 %, а в ряде случаев на 24,6 %, на фоне ухудшения качества получаемого молока (Семенова, 1975; Yang et al, 2016).

Решение вопроса эпизоотической безопасности в отношении ретровирусных инфекций крупного рогатого скота направленно, в первую очередь, на защиту животных от заражения путем своевременного выявления и удаления инфицированного скота (Гулюкин и Иванова, 2017; Красникова и др, 2013). В большинстве случаев ретровирусная инфекция у крупного рогатого скота протекает в форме коинфекции. Вирусный иммунодефицит сочетано с энзоотическим лейкозом усугубляет тяжесть течения инфекции, затрудняет диагностику заболевания и приводит к увеличению экономических потерь в животноводстве. При этом диагностика лейкоза регламентированными в РФ методами не всегда позволяет выявить всех носителей, а исследованиям на иммунодефицит не уделяется должного внимания (Криворучко и др, 2012; Донник и др, 2015).

Степень разработанности темы. Проблема пищевой ценности и биологической безопасности молока коров при энзоотическом лейкозе не теряет своей актуальности уже много десятилетий. Известно, что количество соматических клеток в молоке инфицированных вирусом лейкоза коров составляет $4,9 - 5,2 \times 10^5 / 1 \text{ см}^3$ (Norby et al, 2016), а бактериальная

обсемененность такого молока, доходит до $2 \times 10^7 \pm 4 \times 10^2$ КОЕ/мл (Красникова и др, 2015). Это связывают со снижением, как общей сопротивляемости у животных, так и резистентности на уровне молочной железы коров (Della Libera et al, 2015). При этом происходит уменьшение количества общего белка в молоке на 16,8 % (Снежков и др, 1991) и количества аминокислот, в том числе незаменимых (Думбур, 1990; Закрепина, 2001).

Согласно ветеринарному законодательству, молоко больных лейкозом коров не допускается в пищу человеку, так как оно содержит обладающие канцерогенными свойствами метаболиты триптофана и других циклических аминокислот. Для питания детей нельзя использовать и молоко, полученное от коров - носителей инфекции. В отношении молока инфицированных вирусом иммунодефицита коров не разработано санитарных норм и правил. В мировой литературе нет сведений о качестве и безопасности молока, полученного от коров с ретровирусной коинфекцией.

Высокая степень распространения ретровирусных инфекций крупного рогатого скота и сложности, возникающие при диагностике этих заболеваний, способствуют тому, что молоко инфицированных коров может попасть на производство. Это обуславливает необходимость изучения санитарно-гигиенических показателей такого молока и его технологических свойств, в том числе при смешивании с молоком интактных животных. А также необходимость совершенствования методов выявления данных патогенов, как у животных, так и в получаемой от них продукции.

Цель и задачи исследования. В связи с выше указанным, **целью** нашей работы явилась оценка ветеринарно-санитарных показателей и технологических свойств молока инфицированных ретровирусами коров.

В соответствии с целью, нами были определены следующие **задачи**:

1. Дать оценку ветеринарно - санитарным показателям молока инфицированных ретровирусами коров и определить эффективность его пастеризации.
2. Осуществить сравнительный анализ белковой ценности молока инфицированных ретровирусами коров и его аминокислотного состава.
3. Оценить технологические свойства молока инфицированных ретровирусами коров и ветеринарно - санитарные показатели выработанных из него кисломолочных продуктов.
4. Разработать методы индикации возбудителей ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в объектах ветеринарного надзора.

Научная новизна. Впервые дана ветеринарно-санитарная оценка и охарактеризованы белковая и аминокислотная ценности молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров, исследована эффективность различных способов его пастеризации. Впервые описаны основные свойства молока инфицированных ретровирусами коров при выработке и хранении полученных из него кисломолочных продуктов, изучено влияние различного количества примеси инфицированного молока на технологические свойства сборного. Разработаны, запатентованы и внедрены в практику два новых

способа эффективного выявления, инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота, а также получаемой от него продукции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Настоящая работа относится к области фундаментальных и прикладных исследований.

Сведения, полученные при сравнительном анализе органолептических, физико-химических и микробиологических показателей, белкового и аминокислотного состава, а также технологических свойств молока, инфицированных ретровирусами коров, восполняют недостающие сведения и формируют теоретическую базу для совершенствования ветеринарно-санитарной экспертизы молока и кисломолочных продуктов.

Результаты, полученные при определении ветеринарно-санитарных показателей, а также пищевых и технологических свойств молока, инфицированных ретровирусами коров, имеют большое практическое значение для определения сырьевой ценности такого молока для молокоперерабатывающих предприятий и определения путей его переработки. Использование разработанных и запатентованных способов эффективного выявления, инфицированного ретровирусами крупного рогатого скота и получаемой от него продукции будет способствовать недопущению попадания на молокоперерабатывающие предприятия и в торговую сеть коровьего молока низкого качества.

Методология и методы исследований. Для решения поставленных задач был использован комплекс как общенаучных, так и частнонаучных методов исследования. Методологическая база основывалась на применении совокупности общетеоретических и эмпирических методов исследования, таких как системный подход, статистическая обработка данных, анализ, эксперимент, измерение, сравнение, моделирование, в том числе компьютерное и т.д. Решение поставленных задач реализовывалось по средствам использования эпизоотологических, органолептических, физико-химических, микробиологических, хроматографических, молекулярно-генетических и других методов исследования, выполненных на высокотехнологичном оборудовании научных подразделений ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов).

Положения, выносимые на защиту:

1. Молоко инфицированных ретровирусами коров имеет неудовлетворительные микробиологические характеристики, измененный белково-аминокислотный состав и не соответствующие стандартам технологические свойства.

2. Внедрение разработанных способов ранней диагностики ретровирусных инфекций крупного рогатого скота способствует повышению эффективности производства и улучшению качества продукции молокоперерабатывающих предприятий.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обусловлена значительным объемом экспериментального

материала, полученного с использованием высокоинформативных методов исследования с подтверждением данных математической статистикой.

Основные материалы диссертационной работы представлены, обсуждены и одобрены на межвузовских, международных, межрегиональных, всероссийских научно-практических конференциях (Саратов 2013-2016 г.г.; Ульяновск 2014 г.; Уральск, 2015 г.; Ставрополь 2015 г.; Москва, 2016 г., Кемерово 2016 г.).

Личный вклад соискателя. Все эпизоотологические, молекулярные, генетические, хроматографические, органолептические, физико-химические, санитарно-микробиологические исследования, а также статистическая обработка полученных результатов проведены непосредственно автором.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 16 научных статьях, в том числе в 6 изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. По результатам исследований получены 2 патента РФ на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 121 страницах стандартного компьютерного текста и включает в себя введение, основную часть, заключение и приложения. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 18 рисунками. Список использованной литературы включает в себя 218 источников, в том числе 141 иностранный.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в период с 2014 по 2017 г.г. в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» и в рамках договора о НТС со ФКУЗ РосНИИПЧИ «Микроб».

Аналитическим материалом послужили сведения, предоставленные ветслужбой хозяйств, данные ежегодных отчетов Управления ветеринарии Правительства Саратовской области и результаты собственных исследований. Материалом для витальных исследований явились пробы крови крупного рогатого скота черно-пестрой, голштинской, симментальской, казахской белоголовой пород, а также помесного скота (n=746), как аборигенного, так и завозного, находящегося в фермерской собственности и на частном подворье.

Материалом для определения пищевой ценности и биологической безопасности молока, получаемого от *BLV* и *BIV* инфицированных коров, явились пробы цельного молока (n=54), полученного от молочных коров 3-7 лет, инфицированных вирусом иммунодефицита, энзоотического лейкоза (ЭЛ), коров с *BLV-BIV* коинфекцией и не инфицированных ретровирусами коров.

С целью изучения сырьевой ценности молока инфицированных ретровирусами коров кисломолочный продукт «Снежок» вырабатывали с использованием закваски «Genesis» (Болгария), творог получали с применением закваски БК-Углич-МСТ (Россия), для производства кефира использовали кефирную сухую закваску «Genesis» (Болгария).

Первым этапом научно-исследовательской работы явилось обоснование актуальности выбранного направления исследований. Для выделения и очистки нуклеиновых кислот применяли набор «ДНК Сорб В», для обратной транскрипции использовали набор «РЕВЕРТА-L». Наличие ДНК провирусов *BLV* и *BIV* осуществляли метом полимеразной цепной реакции с применением набора «Лейкоз» (ИЛС, Россия) и по оригинальной методике (Колотвин, 2007) с использованием набора ПЦР-Микс и буфера для нанесения (НПФ «Литех», Россия) и с добавлением праймеров к гену gag *BIV* (синтез ЗАО «Синтол», Россия) на оборудовании BioRad (USA) на базе НИЛ «Геном» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/л этидия бромид при стандартных условиях с фоторегистрацией полученных результатов с применением набора «ЭФ» (ИЛС, Россия).

Вторым этапом исследований было изучение качества и пищевой ценности молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров. Требования к качеству молока определяли согласно техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» ТР ТС 033/2013. Белковый состав коровьего молока исследовали методом ВЭЖХ на системе жидкостной хроматографии «Стайер-Аквилон» (Россия). Анализ аминокислотного состава белковых фракций молока коров выполнялся с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105М» (Россия). В лабораторных условиях воспроизводили три режима пастеризации: длительная (62-65 °С - 30 минут), кратковременная (80-84 °С – 40 секунд) и мгновенная (94-97 °С - мгновенно).

Третьим этапом наших исследований явилось изучение сырьевой ценности молока *BIV* и *BLV* инфицированных коров и влияния ретровирусной инфекции на технологию некоторых кисломолочных продуктов. Требования к вырабатываемым продуктам устанавливали согласно ТР ТС 033/2013. Органолептические, физико-химические и микробиологические свойства определяли согласно ГОСТ 31981-2013, ГОСТ 31454-2012, ГОСТ Р 54669-2011, ГОСТ Р 52054-2003, ГОСТ 32901-2014, ГОСТ 30347-97, ГОСТ 31659-2012, ГОСТ 10444.11-89, ГОСТ 33566-2015, ГОСТ Р 55331-2012, ГОСТ 3626-73.

Четвертым этапом наших исследований стала адаптация и разработка способов молекулярно-генетической детекции ДНК провирусов иммунодефицита и лейкоза крупного рогатого скота. Анализ вирусных геномов и конструирование праймеров осуществляли методами компьютерного моделирования с использованием ресурса NCBI: GENERUNR (UK), OLIGO DNA/RNA primer analysis software, v.5.0 и BLAST (USA). Проведение ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидов осуществляли на амплификаторах «BioRad T 100» (США) и «Rotor-Gene™ 6000» (Австралия).

Все показатели вычислялись как среднестатистические в нескольких повторностях. За значимые принимали различия на уровне значимости 95 % ($p < 0,05$). Научно-исследовательская работа выполнялась в соответствии с нижеприведенной схемой:

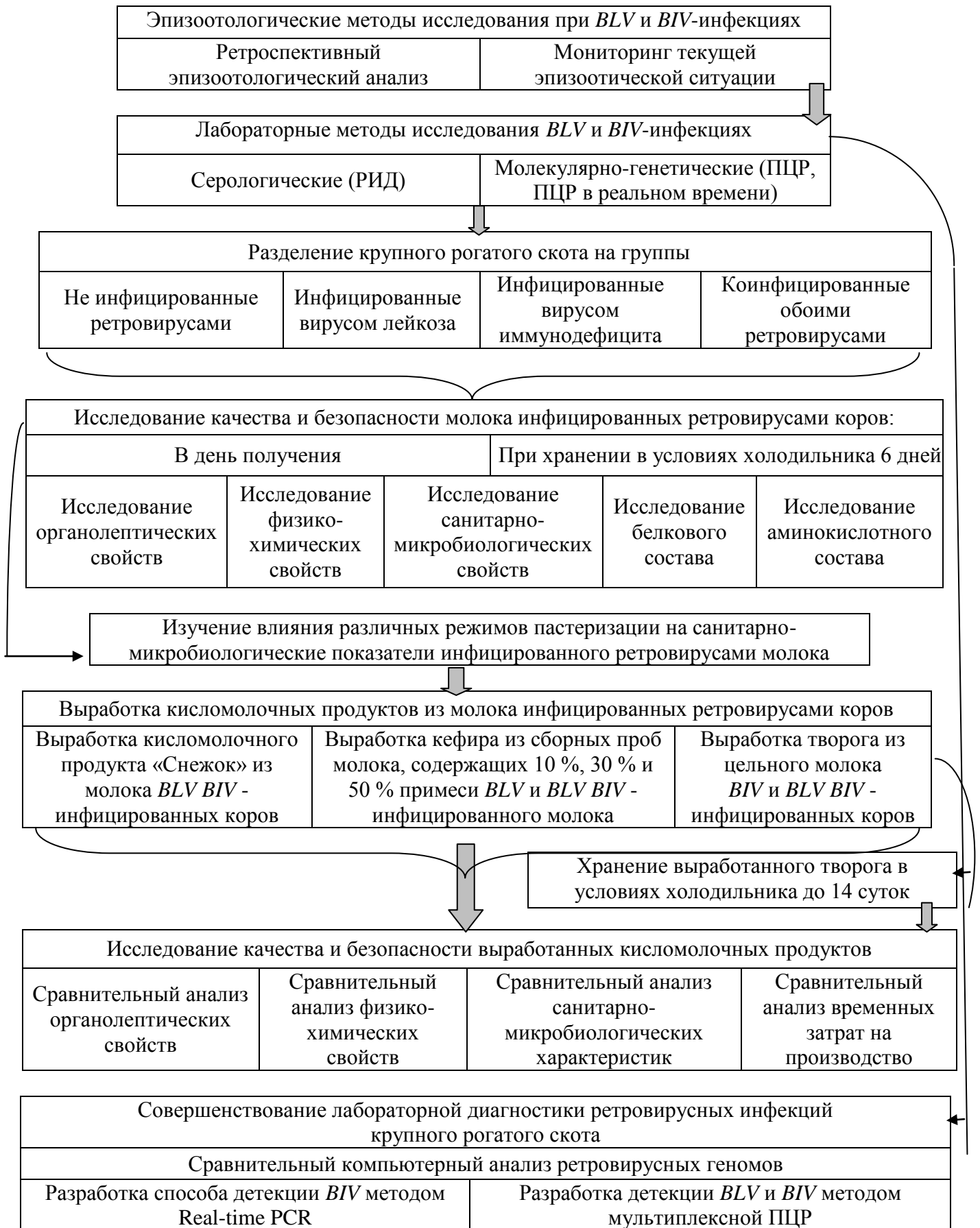


Рисунок 1 - Схема проведения исследований.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Распространение ретровирусных инфекций крупного рогатого скота в Саратовской области

Анализ сведений, полученных из Управления ветеринарии Правительства Саратовской области показал, что на территории области в 2015 году ЭЛ КРС был зарегистрирован в 34 районах из 38. В 2016 году, при выполнении комплекса оздоровительных мероприятий, в 6 районах области было оздоровлено 9 пунктов. В 2017 году оставались действующими 9 очагов ЭЛ КРС. Средней уровень инфицированности составляет 0,9 %, а заболеваемости 0,4 %. Вирусный иммунодефицит крупного рогатого скота (ВИ КРС) не включен в перечень болезней, подлежащих обязательному эпизоотическому контролю. Эпизоотический мониторинг на зараженность животных ВИ КРС в Саратовской области проводился нами в сравнительном аспекте с распространением ЭЛ КРС среди обследуемого поголовья, методом ПЦР.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что даже в благополучном по ЭЛ КРС хозяйстве, методом ПЦР выявляются вирусносители, не показавшие наличие в крови антител при исследовании методом РИД. В нашем исследовании их количество составило 11,8 % от числа исследованных животных. По данным ПЦР-исследований, инфицированность завезенного из Америки (Канада) и Европы (Словакия и Эстония) скота составляла 26,4 % и 33,3 %, соответственно. Коровы, завезенные из неблагополучной по лейкозу территории Казахстана, являлись носителями вируса лейкоза КРС в 69 % случаев. Как следует из полученных нами данных, у животных в индивидуальном владении вирус иммунодефицита крупного рогатого скота был обнаружен в 12,7 % случаев, завезенный из Америки и Европы скот был инфицирован несколько выше – 13,3 %. Самый высокий уровень *BIV*-инфекции был зарегистрирован у КРС неблагополучных по лейкозу хозяйств – 68,7 %. Сравнительный анализ результатов исследования КРС методом ПЦР на наличие *BIV* и *BLV* инфекции свидетельствует, что коинфекция была диагностирована у 34,5 % поголовья завозного скота. У коров неблагополучных по лейкозу хозяйств уровень коинфекции был еще выше – 52,5 %.

2.2.2.2 Влияние ретровирусных инфекций крупного рогатого скота на качество и безопасность коровьего молока

Органолептические, физико-химические и микробиологические показатели молока коров при ретровирусной инфекции

Молоко инфицированных ретровирусами и интактных коров почти не отличалось по органолептическим свойствам в день получения. Это являет собой опасность при приемке молока на молокозаводах. Результаты сравнительного анализа физико-химических и микробиологических показателей молока *BIV* и *BLV*- инфицированных коров, относительно молока интактных животных, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические и микробиологические показатели молока инфицированных ретровирусами и интактных коров

Показатели молока	Статус животных			
	Интактные коровы	<i>BIV</i> -инфицированные коровы	<i>BLV</i> -инфицированные коровы	<i>BLV-BIV</i> -инфицированные коровы
Кислотность, °Т	17,0±1,0	19,0±1,0*	20,0±1,0*	20,5±2,0*
СОМО, %	8,7±0,2	8,2±0,3*	7,7±0,3*	7,2±0,2*
Плотность, г/см ³	1,033±0,001	1,032±0,001	1,028±0,001	1,027±0,001
Общее содержания белка, %	3,85±0,15	3,15±0,12*	3,04±0,11*	2,81±0,09*
Жирность, %	3,2±0,5	4,0±0,4*	4,3±0,6*	5,1±0,9*
Соматические клетки, г/см ³	3,1x10 ⁴ ±5,4x10 ²	6,4x10 ⁵ ±8,2 x10 ³ *	11,7x10 ⁵ ±2,1x10 ³ *	12,5x10 ⁵ ±2,5x10 ³ *
БГКП в 0,1 мл	отсутствует	присутствует	присутствует	присутствует
КМАФАнМ, КОЕ/мл	4x10 ⁴ ±8 x10 ²	1,5x10 ⁶ ±2 x10 ⁴ *	1x10 ⁷ ±2 x10 ⁵ *	2x10 ⁷ ±3 x10 ⁵ *

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп

Как следует из данных таблицы 1, отмечается заметное повышение жирности молока у инфицированных вирусом лейкоза коров, на фоне снижения его плотности, СОМО и количества общего белка. Кроме того, молоко *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных животных по содержанию соматических клеток не соответствует требованиям ТР ТС 033/2013. У молока *BIV*- и *BLV*-инфицированных коров значительно снижалось время бактерицидной фазы, и оно начинало скисать уже на первые сутки хранения в холодильнике, тогда как молоко здоровых коров в течение 3 суток сохраняло кислотность в пределах нормы, а затем быстро превращалось в простоквашу.

Изучение влияния различных режимов пастеризации на микробиологические показатели молока BLV-BIV-инфицированных коров

Микробиологические показатели молока здоровых и микст-инфицированных ретровирусами коров до и после пастеризации представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Микробиологические показатели молока до и после пастеризации

Показатели	Молоко интактных коров	Молоко <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров
БГКП	отсутствует	присутствует
КМАФАнМ, КОЕ/мл	4x10 ⁴ ±5 x10 ²	2x10 ⁷ ±3 x10 ⁵ *
КМАФАнМ, КОЕ/мл длительная пастеризация	0,8x10 ² ±0,2 x10 ¹	5,8x10 ⁵ ±5x10 ³ *
КМАФАнМ, КОЕ/мл кратковременная пастеризация	1 x10 ¹ ±0,1 x10 ¹	2,5x10 ⁴ ±2x10 ² *
КМАФАнМ, КОЕ/мл мгновенная пастеризация	0,5x10 ¹ ±0,2 x10 ¹	1,7 x10 ² ±1,5x10 ¹ *

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп

Как следует из данных, представленных в таблице 2, эффективность пастеризации для инфицированного молока возрастала прямо пропорционально температуре пастеризации. Однако из-за высокой первоначальной обсемененности секундарной микрофлорой, пастеризация не обеспечивала достаточной микробной чистоты молока. Согласно ТР ТС 033/2013, показатель КМАФАнМ в молоке питьевом пастеризованном не должен превышать 1×10^5 КОЕ/мл. Это может негативно отразиться на сроках хранения молока и эффективности, внесенной в него закваски при производстве кисломолочных продуктов.

Изучение белкового и аминокислотного состава молока BIV и BIV-BLV-инфицированных коров

Анализ белкового состава показал, что в молоке BIV - инфицированных коров на 3 день еще обнаруживались высокомолекулярные белки (иммуноглобулины, казеин) в достаточно большом количестве - до 94,7 %, к 6-му дню в нем уже преобладали низкомолекулярные белки (96,6 %). В молоке коров коинфицированных вирусами иммунодефицита и лейкоза уже на первый день количество низкомолекулярных белков было высоким (до 96,4 %), а полноценные молочные белки в нем практически отсутствовали. И со временем картина усугублялась. Известно, что микробы ферментируют не только белки, но отдельные аминокислоты молока, что приводит к образованию токсичных для человека веществ (H_2S , NH_3 , фенолы). Выявленные признаки деградации молочных белков свидетельствуют, что питательная ценность молока инфицированных ретровирусами коров снижается, и при этом существует вероятность накопления в таком молоке токсичных для человека веществ.

Доказательной базой подобных метаморфоз является изучение аминокислотного состава молока. По нашим данным, в коровьем молоке при BIV и BLV-BIV инфекции, содержание аминокислот в среднем было в 5-20 раз меньше, чем в молоке здоровых коров. Большинство незаменимых аминокислот, таких как метионин, триптофан, аргинин, гистидин, глицин фактически отсутствовали. Значительно изменен был и аминокислотный баланс молока. Так, содержание глутамина, лейцина, лизина, пролина в молоке больных коров в десятки раз ниже, чем в молоке здоровых, в то время как содержание треонина, серина и тирозина близко к норме. Аргинин и гистидин, которые частично производятся организмом человека, находились в значительном дефиците. А тирозин, содержащийся в достаточном количестве, переходил в разряд лимитирующих, так как наблюдался недостаток фенилаланина. Отмечался избыток относительной концентрации треонина и серина.

Изучение стабильности аминокислотного состава молока инфицированных коров в динамике показало достаточно высокую вариабельность относительной концентрации аминокислот. Это свидетельствует об активных биохимических метаморфозах в молоке. Причем очевидно, что изменения относительных концентраций многих аминокислот носили случайный характер.

2.2.2.3 Влияние ретровирусных инфекций крупного рогатого скота на технологические свойства коровьего молока

Ветеринарно-санитарные показатели вырабатываемых из молока продуктов являются важной характеристикой сырьевых свойств молока. На первом этапе было исследовано влияние ретровирусной коинфекции коров на технологию кисломолочного продукта «Снежок». В таблице 3 приведены основные свойства полученного продукта.

Таблица 3 - Характеристики выработанного напитка «Снежок»

Показатели	Из молока интактных коров	Из молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров
Кислотность, °Т	85,0±2,0	65,0±2,0*
СОМО, %	10,0±0,3	7,5±0,2*
БГКП в 0,01 мл	отсутствует	присутствует*
<i>Salmonella spp.</i> в 25 мл	отсутствует	отсутствует
<i>S. aureus</i> в 1 мл	отсутствует	отсутствует
Дрожжи (Д), Плесени (П), КОЕ/мл	отсутствуют	10,0±2,0*
Общее количество кисломолочных бактерий, КОЕ/мл	$4 \times 10^7 \pm 8 \times 10^5$	$1 \times 10^5 \pm 2 \times 10^3$ *
Время сквашивания, час.	4,0±0,1	6,0±0,1*

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп

Полученные нами результаты свидетельствуют, что молоко коинфицированных ретровирусами коров не пригодно для производства йогуртного кисломолочного продукта «Снежок». Так как даже при максимальных дозах закваски и сроках сквашивания, после пастеризации в производственном режиме, получается неудовлетворительный по органолептическим и микробиологическим показателям продукт, что, вероятно, является следствием конкурентного действия секундарной микрофлоры.

Затем, в экспериментальных целях нами был получен творог из сборного молока от интактных, *BIV*-инфицированных и *BIV-BLV* инфицированных коров. Свойства готового творога представлены в таблице 4. Полученные нами данные (таблица 4) свидетельствуют, что производство творога из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров экономически не обоснованно, так как временные затраты на выработку продукта увеличиваются на 21,6 и 35,1%, а выход продукции при этом снижается на 27,8 и 44,4%, соответственно. Творог, выработанный из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров, имел неудовлетворительные органолептические, физико-химические и микробиологические показатели, количество молочнокислых микроорганизмов в нем было на 2 - 3 порядка ниже требований ГОСТ 31453-2013, и он содержал меньше кальция на 13,3 % и 30,0 %, соответственно.

Таблица 4 - Свойства полученного творога

Показатели	Творог из молока интактных коров	Творог из молока <i>BIV</i> -инфицированных коров	Творог из молока <i>BIV-BLV</i> инфицированных коров
Время сквашивания, час.	7,0±0,5	8,5±0,5*	10,5±0,5*
Запах	чистый, приятный, слегка кисловатый	недостаточно выраженный кисловатый	слабо выраженный
Цвет	белый	с кремовым оттенком	светло-кремовый
Примеси	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
Зерно	крупное в норме	среднее	не выражено
Выход продукта, %	18,0±2,0	13,0±1,0*	10,0±1,0*
Жир, %	18,0±0,5	23,0±0,5*	29,0±0,5*
Белок, %	15,0±0,5	13,0±0,5*	10,0±0,5*
Влажность, %	65,0±1,0	62,0±1,0*	59,0±1,0*
Кислотность, °Т	160,0±5,0	140,0±5,0*	120,0±5,0*
Количество молочнокислых микроорганизмов, КОЕ/г	$4 \times 10^6 \pm 3 \times 10^4$	$5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$ *	$6 \times 10^3 \pm 8 \times 10^1$ *
КМАФАнМ, КОЕ/г	отсутствует	$1 \times 10^2 \pm 1 \times 10^1$ *	$8 \times 10^3 \pm 9 \times 10^1$ *
БГКП в 0,001 г	отсутствует	отсутствует	присутствует
<i>Salmonella spp.</i> в 25 г	отсутствует	отсутствует	отсутствует
<i>S. aureus</i> в 1 г	отсутствует	отсутствует	отсутствует
Дрожжи (Д), Плесени (П), КОЕ/мл	отсутствуют	5,0±1,0*	10,0±2,0*
Ca, мг/100 г	150±3	130±3*	100±3*

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп

Динамика хранения в условиях холодильника (14 суток) показала, что в твороге, выработанном из молока инфицированных ретровирусами коров, при хранении в холодильнике, кислотность не изменялась, но при этом в нем увеличивалось количество посторонней микрофлоры, в том числе БГКП и микроскопических грибов, в частности высевались плесени. По органолептическим свойствам творог из молока инфицированных коров также был не удовлетворительным: в течение нескольких дней он приобрел мажущую консистенцию и неприятный запах.

Следующей нашей задачей стало выяснение количества примеси молока инфицированных ретровирусами коров в составе сборного, которое будет снижать технологические свойства молочной смеси. Для этого мы приготовили сборные пробы молока, содержащие в своем составе молоко инфицированных вирусом лейкоза или коинфицированных ретровирусами коров, в количестве 10 %, 30 % и 50 %. Все приготовленные пробы сборного молока имели

удовлетворительные органолептические характеристики. Однако с увеличением количества молока инфицированных ретровирусами коров в составе сборного возрастала кислотность проб молока и показатель КМАФАнМ, в то время как количество общего белка в молоке снижалось на фоне увеличения жирности молока.

Затем из каждой пробы сборного молока был выработан кефир с применением закваски «Genesis» (таблица 5).

Таблица 5 – Основные свойства выработанного кефира

Показатель	Из молока интактных коров	10% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров	30% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров	50% молока <i>BLV</i> -инфицированных коров	10% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров	30% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров	50% молока <i>BLV-BIV</i> -инфицированных коров
Кислотность, °Т	86±1	85±1	82±1*	80±1*	84±1	81±1*	76±1*
Молочнокислых микроорганизмов КОЕ/мл	6x10 ⁷ ±1,2x10 ⁶	1x10 ⁷ ±2x10 ⁵ *	6,5x10 ⁵ ±1,3x10 ⁴ *	1x10 ⁵ ±3x10 ³ *	1x10 ⁶ ±3x10 ⁴ *	1x10 ⁵ ±2x10 ³ *	1x10 ⁴ ±3x10 ² *
БГКП: В 0,1 мл В 0,01 мл	- -	- -	- -	- +	- -	- +	+ +
<i>Salmonella</i> spp. в 25 мл	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> в 1 мл	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-
Плесени, КОЕ/г	-	-	30±5*	50±5*	-	50±5*	50±5*

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп
«-» - микроорганизмы отсутствуют; «+» - микроорганизмы присутствуют

Оценка органолептических показателей творога показала, что при попадании в молоко здоровых коров 30 % и более молока инфицированных ретровирусами коров, выработанный кефир имел неоднородную консистенцию, хлопьевидный сгусток жирноватой мажущейся консистенции. Результаты исследования физико-химических показателей свидетельствуют, что при увеличении в сборной пробе содержания молока инфицированных ретровирусами коров, выработанный кефир имел более низкую кислотность, даже при увеличении сроков сквашивания. Это может негативно влиять как на вкусовые, так и на лечебные свойства продукта и снижать сроки его хранения. Уже при добавлении 10 % молока микст-инфицированных ретровирусами коров, количество молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте было на один порядок ниже, чем того требуют стандарты, принятые ТР ТС 033/2013. При увеличении количества молока инфицированных коров в составе сборного на 30 % и 50 %, содержание молочнокислых микроорганизмов снижалось на 2 и

3 порядка. При этом прослеживается тенденция: снижение количества молочнокислых бактерий на 1 порядок, сопровождалось снижением кислотности готового продукта на 5 пунктов по шкале Тернера.

Время выработки кефира из молочных смесей, содержащих разное количество молока инфицированных ретровирусами коров, также колебалось в довольно широких пределах (рисунок 2).

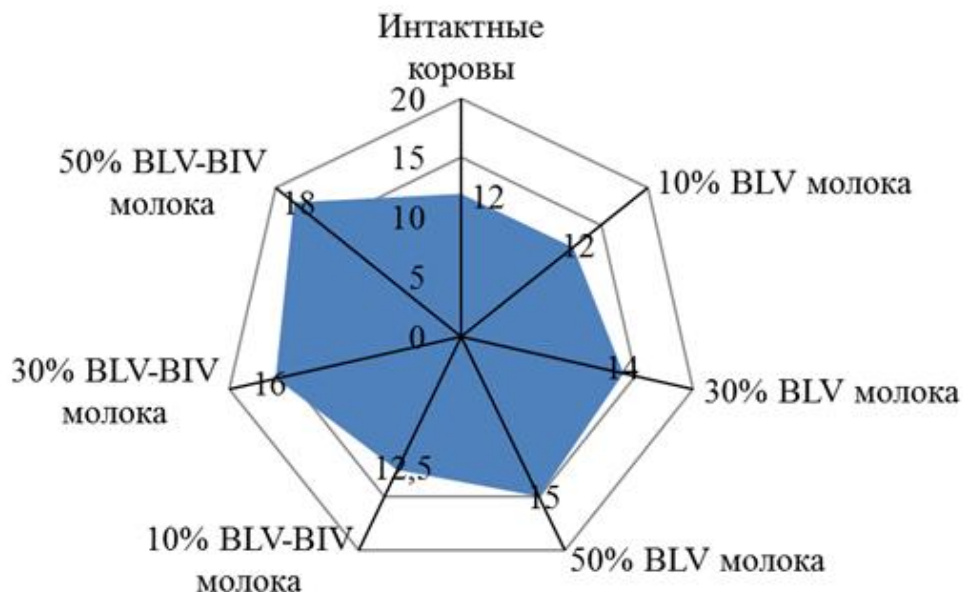


Рисунок 2 – Время ферментации кефира из разных проб молока

Как показано на рисунке 2, при попадании в сборное молоко 10 % молока коинфицированных коров, время приготовления кефира увеличивалось на 4 % относительно времени переработки молока здоровых коров. При повышении содержания молока *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных коров в составе сборного до 30%, время ферментации увеличивалось на 16 % и 33 %, соответственно. Когда же количество молока *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных коров в составе сборного возрастало до 50 %, время приготовления кефира увеличивалось на 25 % и 50 %, соответственно.

Наши исследования показали, что примесь молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров снижает качество молочной смеси. Следовательно, усиление контроля за предотвращением попадания молока от инфицированных ретровирусами животных в торговую сеть и усиление контроля за распространением *BIV* и *BLV* среди крупного рогатого скота является важной задачей, стоящей в настоящее время перед ветеринарной службой.

2.2.2.4. Разработка методов детекции ретровирусов крупного рогатого скота

Использование ПЦР для выявления молока инфицированных ретровирусами коров

Наш опыт использования ПЦР для исследования молока на наличие *BLV*-инфекции показал, что классическая ПЦР не всегда даёт положительный результат при исследовании молока инфицированных лейкозом коров. В частности, при исследовании 6 проб молока от *BLV*-инфицированных коров,

только в 1 пробе ПЦР в классическом ее исполнении показала положительный результат. При том, что все коровы были признаны больными по результатам гематологических исследований. В связи с этим возникает необходимость совершенствовать контроль над продукцией животного происхождения, адаптируя для этого существующие передовые технологии. В результате исследования методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) 43 проб цельного молока от больных лейкозом коров, во всех случаях были получены положительные результаты. Таким образом, модификация ОТ-ПЦР в 5 раз повышает вероятность выявления молока больных лейкозом коров.

Разработка способа детекции ВІV методом ПЦР в реальном времени

Real-time PCR обеспечивает максимальную чувствительность, специфичность и скорость проведения реакции; минимизирует контаминацию образцов, реактивов, помещения и оборудования лаборатории образующимися ампликонами. Разработка способа осуществлялась в семь этапов:

1. Анализ структуры генома ВІV.
2. Конструирование праймеров и зонда.
3. Подбор оптимальной пары праймеров и зонда.
4. Моделирование состава реакционной смеси способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
5. Отработка условий способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
6. Определение чувствительности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.
7. Определение специфичности способа диагностики ВИ КРС с использованием разработанной пары праймеров и зонда.

На основании проведенного компьютерного анализа и экспериментальной работы были подобраны пара праймеров и зонд:

PrmBIVf - TAGGGTAGTGGGATCTCAGAAATC,

PrmBIVr - ACATCCGTAACATCTCCTACCATC – фрагмент 160 п.н.;

zBIV (ROX)GAGGATGGTAGGAGATGTTACGGAT(BHQ2);

ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл при следующем температурно-временном режиме для Rotor-Gene 6000 (Австралия): 95 °С 5 мин. – циклирование 1 [95 °С 20 сек. – 55 °С 20 сек. – 72 °С 20 сек.] 10 повторов - циклирование 2 с детекцией [95 °С 20 сек. – 55 °С 20 сек. – 72 °С 20 сек.] 25 (30) повторов. Флуоресценцию измеряли по каналу Orange при температуре 55 °С на втором циклировании. При учете результата threshold (порог) устанавливали вручную на уровне 30 % от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации.

На разработанный способ получен Патент РФ № 2595973.

Разработка способа детекции ВІV и ВLV методом мультиплексной ПЦР

Мультиплексный вариант ПЦР является удачным решением в тех случаях, когда необходимо детектировать два и более показателя. Так как вдвое сокращаются сроки проведения исследования и затраты на диагностику.

Разработка способа единовременной диагностики вирусного иммунодефицита и лейкоза КРС осуществлялись в три этапа:

1. Подбор оптимально сочетающихся между собой двух пар праймеров.
2. Моделирование состава реакционной смеси для разрабатываемой диагностической системы.
3. Подбор условий температурно-временного режима проведения мультиплексной ПЦР.

На основании проведенного литературного поиска и компьютерного анализа были отобраны две пары праймеров: pBLVf и pBLVr (Panei, C.J. et al., 2013); pBIVf и pBIVr (Колотвин, В.В., 2007):

PrmBIVf GTCTTCCCACATCCGTAACATCTCCT,

PrmBIVr CCCAGGTCCCATCAACATTCATCAG – фрагмент 382 п.н.;

PrmBLVf TATTCCACCCTCGCAAGGC,

PrmBLVr GGGCAGTTGATCCAGAGTCGT – фрагмент 609 п.н.

ПЦР проводили в объеме реакционной смеси – 25 мкл при следующем температурно-временном режиме для T100 (BioRad): 95 °С 3 мин. – цикл [95 °С 20 сек. – 58 °С 20 сек. – 72 °С 40 сек.] 35 повторов – 72 °С 5 мин. Учет осуществляли методом горизонтального гельэлектрофореза.

На разработанный способ получен патент РФ № 2615465.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно литературным данным и результатам собственных исследований, ретровирусы широко распространены среди крупного рогатого скота (Suh et al, 2005; Красникова и др, 2012, 2016). В последние годы на территории Российской Федерации в структуре инфекционной патологии крупного рогатого скота лейкоз занимает одно из ведущих мест. Заболевание наносит значительный экономический ущерб. Животные, инфицированные вирусом лейкоза, представляют собой опасность и для определенных категорий людей, так как *BLV* потенциально опасен для человека (Buehring et al, 2003; Климов, 2012), а молоко больных и инфицированных животных обладает пониженной питательной ценностью и содержит опасные для организма человека метаболиты (Гулюкин и Снежова, 1991; Закрепина 2010). Вирусный иммунодефицит крупного рогатого скота является малоизученной инфекцией. В литературе нет сведений о влиянии BIV инфекции на качество и безопасность коровьего молока. Однако вероятность попадания такого молока в товарное не исключена.

В ходе исследования мы провели оценку органолептических, физико-химических, микробиологических, питательных и технологических свойств молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров. Были изучены свойства кисломолочных продуктов, выработанных из такого молока и из сборного молока с различным количеством примеси инфицированного, в том числе способность этих продуктов противостоять порче в условиях холодильника. Дано обоснование нецелесообразности использования молока инфицированных ретровирусами коров и сборного молока, в составе которого оно содержится, в качестве сырья для производства кисломолочных продуктов.

Таким образом, полученные данные позволяют глубже понять сущность изменений и механизм нарушений, влияющих на качество и технологические свойства молока, получаемого от инфицированных ретровирусами коров. Эпизоотический мониторинг выявил тенденции, играющие ключевую роль для совершенствования диагностики ретровирусных инфекций крупного рогатого скота, с целью недопущения попадания молока инфицированных ретровирусами коров в товарное. Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы и представить рекомендации по их практическому использованию.

Выводы:

1. Жирность молока *BIV*-, *BLV*- и *BIV-BLV*- инфицированных коров повышается в среднем на 5,3 %, 13,1 % и 34,2 %, при снижении количества общего белка на 3,1 %, 3,5 % и 11,8 %, а также СОМО на 5,7 %, 11,5 % и

17,2 %, соответственно; в молоке *BLV* и *BLV-BIV*-инфицированных животных превышены нормы содержания соматических клеток.

2. Эффективность пастеризации находится в прямой корреляции с температурой обработки молока, мгновенная пастеризация наиболее эффективна для молока инфицированных ретровирусами коров.

3. В молоке микст-инфицированных ретровирусами коров в первый день хранения высокомолекулярные белки составляют всего 3,4 %, при этом молоко инфицированных ретровирусами коров имеет изменный аминокислотный состав и балланс в сравнении с молоком здоровых коров.

4. Кисломолочный продукт «Снежок», выработанный из молока *BLV-BIV*-инфицированных коров, имеет неоднородную консистенцию и нарушенный сгусток, расслаивается при хранении в холодильнике, содержит 1×10^5 КОЕ/мл молочнокислых бактерий, его кислотность составляет 65 °Т, показатель СОМО снижен на 25 %, а временные затраты при его производстве повышаются на 33,33 %.

5. Творог, выработанный из молока *BIV* и *BIV-BLV* инфицированных коров, имеет жирную мажущую консистенцию, недостаточно оформленное зерно при невыраженном запахе; содержит в своем составе постороннюю микрофлору, в том числе БГКП и микроскопические грибы; количество молочнокислых микроорганизмов в нем составляет 5×10^4 и 6×10^3 КОЕ/мл, при снижении кислотности на 20 и 40 °Т и содержания кальция на 13,3 % и 30,0 %, соответственно; временные затраты на выработку продукта увеличиваются на 21,6 и 35,1%, а выход продукции при этом снижается на 27,8 и 44,4%, соответственно.

6. При хранении в холодильнике творога, выработанного из молока *BIV*- и *BIV-BLV*-инфицированных коров, его кислотность изменяется не значительно, однако в нем увеличивается количество посторонней микрофлоры, в течение нескольких дней он приобретает мажущую консистенцию и неприятный запах.

7. При содержании в сборной пробе молока инфицированных ретровирусами коров, вырабатываемый кефир имеет неоднородную

консистенцию с жирноватыми мажущимися хлопьями; отмечена тенденция снижения кислотности готового продукта и содержания в нем молочнокислых бактерий на фоне присутствия плесневых грибов; при этом время приготовления продукта увеличивается на 4 % - 50 % в зависимости от количества молока инфицированных ретровирусами коров в составе сборного.

Практические предложения:

1. Разработанные способы ПЦР-детекции ретровирусов крупного рогатого скота: патенты РФ на изобретение № 2595973 и № 252615465 рекомендуются специалистам ветеринарных лабораторий для скрининговых исследований животных и получаемой от них продукции с целью повышения качества сырья, поступающего на молокоперерабатывающие предприятия.

2. При закупках на молокоперерабатывающих предприятиях, руководителям и специалистам необходимо владеть информацией об эпизоотической ситуации хозяйств и регионов, из которых осуществляются поставки молока с целью недопущения некачественного сырья в переработку.

3. Руководителям и специалистам предприятий нельзя допускать в переработку молоко инфицированных ретровирусами коров, так как это приводит к снижению качества вырабатываемой продукции.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Утанова, Г.Х.** Применения полимеразной цепной реакции для детекции возбудителя энзоотического лейкоза в молоке коров / Г.Х. Утанова, Е.С. Красникова // Вестник ветеринарии. - № 3(70). - 2014. - С. 27-29.

2. **Утанова, Г.Х.** Влияние генетических детерминант на распространение вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота / Г.Х. Утанова, Т.А. Плютину, А.П. Силаев // Вестник АПК Ставрополья. - № 1. – 2015. - С. 62-66.

3. Анализ инфицированности крупного рогатого скота ретровирусными инфекциями в Саратовской области / А.В.Красников, О.С. Ларионова, **Г.Х. Утанова** // Аграрный научный журнал – 2015. - №2. - С. 15-18.

4. Оценка качества молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров, и определение способов его переработки / Е.С. Красникова, Н.А. Федосов, А.А. Щербаков, **Г.Х. Утанова** // Научное обозрение. - №17. – 2015. - С.10 – 15.

5. Разработка эффективного и высокочувствительного способа детекции вируса иммунодефицита крупного рогатого скота / Красникова Е.С., Ларионова О.С., Красников А.В. **Г.Х. Утанова** // Аграрный научный журнал. - № 4. - 2017. – С. 15 - 19.

6. Красникова Е.С. Влияние ретровирусной инфекции коров на технологию и сроки хранения творога / Е.С. Красникова, В.А. Агольцов, А.В. Красников, **Г.Х. Утанова** // Вестник КрасГАУ. 2017. - №12 (135). – С. 50-59.

Патенты

7. Пат. 2595373 Российская Федерация. МПК С12N15/49, С12Q1/68. Набор для выявления ДНК провируса иммунодефицита крупного рогатого

скота, содержащий пару специфичных праймеров и зонд, и способ диагностики вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Красникова Е.С., Ларионова О.С., Красников А.В., **Утанова Г.Х.**; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. - № 2015124620/10; заявл. 23.06.2015; опубл. 27.08.2016 Бюл. № 24. - 16 с.

8. Пат. 2615465 Российская Федерация. МПК С12N15/49, С12Q1/68. Диагностическая система для выявления ДНК провирусов лейкоза и иммунодефицита крупного рогатого скота методом мультиплексной полимеразной цепной реакции / Красникова Е.С., Ларионова О.С., Красников А.В., **Утанова Г.Х.**, Белякова А.С.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. - № 2115132112/10; заявл. 31.07.2015; опубл. 04.04.2017 Бюл. № 10. – 14 с.

Статьи в других изданиях

9. Неповинных, Н.В. Использование в производстве кисломолочных продуктов пищевых волокон «Цитри – Фай»/ Н.В. Неповинных, **Г.Х. Утанова**// Технология и продукты здорового питания: материалы Международной научно- практической конференции / Под ред. Ф.Я.Рудика – Саратов: Буква, 2013.- С. 132 - 134.

10. Неповинных, Н.В. Производство творога традиционным способом/ Н.В. Неповинных, **Г.Х. Утанова**// Специалисты АПК нового поколения: Материалы Всероссийской научно- практической конференции / Под ред. И.Л. Воротникова. -Саратов: Буква, 2013. - С. 125- 127.

110. Неповинных, Н.В. Современное состояние рынка сладких замороженных продуктов/ Н.В. Неповинных, **Г.Х. Утанова**//Специалисты АПК нового поколения: материалы Всероссийской научно- практической конференции / Под ред. И.Л. Воротникова. - Саратов: Буква, 2014.- С. 253 – 255.

12. **Утанова, Г.Х.** Применения современных молекулярно- генетических технологий с целью выяснения биологической безопасности для человека коровьего молока / Г.Х. Утанова, Т.А. Плютина // Новые материалы и технологии: состояния вопроса и перспективы развития: сборник материалов Всероссийской молодежной научной конференции.- Саратов: ООО «ИЦ Наука», 2014. - С. 195 - 198.

13. **Утанова, Г.Х.** *Bovine leukemia virus*: социальная значимость и стратегии борьбы / Г.Х. Утанова, Т.А. Плютина // Молодежь и наука XXI века: материалы IV Международной научно-практической конференции. - Том I. - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. С. 143 – 146.

14. **Утанова, Г.Х.** Ветеринарно-санитарная оценка молока коров при ВІV-инфекции / Г.Х. Утанова, Н.А. Федосов // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: материалы международной научно – практической конференции молодых ученых и специалистов. – Троицк: ЮУрГАУ, 2015. - С. 237 – 240.

15. Анализ аминокислотного состава молока коров, инфицированных ретровирусами / Е.С. Красникова, А.В. Банникова, А.В. Евтеев, Г.Х. Утанова // Актуальные проблемы ветеринарной хирургии, онкологии и терапии: материалы II Международной студенческой научно - практической конференции. – Саратов: ИЦ «Наука» - 2016. – С. 87 - 92.

16. **Утанова, Г.Х.** Оценка качества творога из молока *BIV* и *BLV* инфицированных коров / Г.Х. Утанова // Современные аспекты сельскохозяйственной микробиологии: материалы Международной конференции к 120-летию создания кафедры микробиологии и к 150-летию профессора Н.Н.Худякова. - Москва: РГАУ МСХ имени К.А. Тиммерязева, 2016. - С. 73 – 74.

17. **Утанова, Г.Х.** Диагностика бычьего иммунодефицита методом Real-Time PCR / Г.Х. Утанова // Современные тенденции сельскохозяйственного производства в мировой экономике: материалы XV Международной научно-практической конференции. – Кемерово: Кемеровский ГСХИ, 2016. – С. 315-320.

18. **Утанова, Г.Х.** Молекулярно-генетическая диагностика вируса бычьего иммунодефицита / Г.Х. Утанова, А.П. Силаев // Молекулярная диагностика 2017: сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - ТОМ II. – МОСКВА, 2017. - С. 407 – 408.