

УДК 616-092:576.8.093:576.8.06:664(043.2)

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *L. MONOCYTOGENES* В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

*Сиснева В. В., студентка 5 курса института ветеринарии,
ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности
Научный руководитель - Нитяга И. М., кандидат
биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
пищевых производств»*

Ключевые слова: *L. monocytogenes*, сырье и пищевые продукты, идентификация, ПЦР, иммуноферментный анализ.

Статья посвящена обзору методов выделения и идентификации L.monocytogenes в сырье и пищевых продуктах. Дана оценка наиболее часто используемым методам исследования возбудителя.

В медицинской и ветеринарной микробиологии при исследовании клинического или свежего патологического материала (кровь и др.) выделение культуры *L. monocytogenes* не вызывает особых затруднений. Для этого используются методы прямого микробиологического посева на обычные питательные среды (мясопептонный бульон или агар и др.)

Наиболее трудной проблемой является выделение возбудителя из пищевых продуктов в связи с массивной контаминацией их сопутствующей микрофлорой. На общем микробном фоне исследуемого субстрата количество листерий бывает, как правило, незначительным, поэтому их прямое культивирование оказывается невозможным, в связи с чем возникает необходимость применения специальных селективных методов обогащения для выделения и идентификации.

В настоящее время наиболее распространенной является схема выявления и идентификации листерий, предусматривающая четыре этапа: предобогащение, обогащение, выявление и подтверждение [1,2].

Значительный рост числа эпидемических вспышек и спорадических случаев у людей в 80-е годы XX века стал серьезным толчком к разработке эффективных методов диагностики листерий с применением селективных агентов и специальных питательных сред. Наибольшее практическое значение получили хлорид лития, акрифлавин, налидиксовая кислота, теллурит калия, акрифлавин, эскулин и др. Применение таких селективных сред как Оксфорд и Палкам агар значительно повысило эффективность выделения листерий и позволило

ограничить число тестов для идентификации выделенных культур. Стандартные селективные среды в настоящее время производят все основные зарубежные фирмы-производители питательных сред: Oxoid (Англия), HiMedia (Индия), BBL (США), Merck (Германия) и др. [2].

На этапе идентификации используют совокупность методов, позволяющих решать две задачи: 1) окончательно подтвердить принадлежность выделенной культуры к роду *Listeria*, 2) установить принадлежность выделенной культуры листерий к патогенному виду *L. monocytogenes*, используя тесты для дифференциации от непатогенных видов листерий. К первой группе можно отнести окраску по Грамму, выявление каталазной активности, определение подвижности культуры при 22 и 37°C, способность к ферментации маннита, реакция восстановления нитратов до нитритов. Вторая группа методов, необходимых для видовой идентификации включает: установление способности к ферментации рамнозы, ксилозы, наличие лецитиназной и β -гемолитической активности, постановку КАМП-теста [1,2,3].

В качестве дополнительных тестов используют серологические методы, тест с листериозным бактериофагом, биопробу на мышах. Однако, эти методы являются либо малоинформативными, либо трудоемкими и неприемлемыми для производственного контроля [2,4].

На этапе идентификации используют совокупность методов. Позволяющих решать две задачи - окончательно подтвердить принадлежность выделенной культуры к *Listeria* spp., и установить принадлежность выделенной культуры к патогенному для человека виду *Listeria monocytogenes*, используя тесты для дифференциации от непатогенных листерий [2].

К первой группе методов можно отнести окраску по Граму, выявление каталазной активности и определение подвижности культуры при 22 °C и 37°C.

Вторая группа методов, необходимой для идентификации, включает восстановление нитратов до нитритов, ферментацию трех углеводов – маннита, ксилозы и рамнозы, определение способности к β -гемолизу. Постановку КАМП-теста, определение лецитиназной активности на средах с активированным углем и без него [2,4].

Исследования по разработке методов быстрого и точного обнаружения листерий в пищевых продуктах продолжают очень интенсивно. Они включают совершенствование обычных бактериологических способов выделения на основе создания коммерческих модифицированных питательных сред, создание специальных хромогенных сред с новыми

селективными агентами и добавками, применение кондуктометрических анализаторов. Испытываются более эффективные способы обработки и подготовки образцов к анализу, включая стадии гомогенизации, центрифугирования, фильтрации. Для видовой идентификации созданы биохимические тест-системы API-*Listeria* («BioMerieux»), которые намного упрощают и сокращают длительность определения сахаролитической активности выделенной культуры [2,5].

Наиболее перспективными для ускоренного обнаружения и идентификации листерий предлагается ряд методов, существенно ускоряющих процесс по сравнению с рутинно используемым бактериологическим выделением. Среди таких методов иммуноферментный анализ (ИФА), ДНК-ДНК и ДНК-РНК гибридизация, радиоиммунологический метод, ПЦР и другие [6].

Метод иммуноферментного анализа основан на взаимодействии специфических моноклональных антител с антигенами листерий. В настоящее время иностранными фирмами Organon Teknika (США), Transia (Франция), Masbiotec (Италия) и др. разработаны и поставляются тест-системы на основе ИФА и его модификаций. Чаще всего, эти методы используются для быстрого выявления листерий после процедуры обогащения в селективном бульоне, в качестве дополнительного, а не альтернативного способа, так как требуют дальнейшего подтверждения с применением классических бактериологических тестов. В самых современных методах обнаружения листерий в пищевых продуктах используются генные пробы с применением молекулярной гибридизации или ДНК-зондов.[1,6]

ПЦР анализ является более специфичным и чувствительным по сравнению с выше перечисленными методами. В качестве мишени для ПЦР разные авторы использовали различные участки генов листериолизина O hly, фосфолипазы hlc и белка P60 iap. Как вышеперечисленные методы, так и ПЦР-анализ обладают некоторым недостатком, не позволяя, в частности, определить присутствие других видов листерий. Особенно важным представляется выявление в продуктах питания *L.innocua*, которая часто встречается одновременно с *L. monocytogenes*, рассматривается как индикатор возможного присутствия последней. Для преодоления этой проблемы в последние годы разрабатываются системы, позволяющие в ходе одной реакции выявить и дифференцировать листерии. Одна из таких систем основана на межвидовой вариабельности гена iap, кодирующего белок P60 [2].

В многочисленных обзорах и статьях различных исследователей единодушно подчеркивается тот факт, что ни один из имеющихся в на-

стоящее время методов выделения и идентификации не пригоден для стабильного практического использования со всеми видами пищевых продуктов; как правило, следует заключение о необходимости продолжения работ по усовершенствованию методов выделения, повышению точности и воспроизводимости результатов исследований.

Библиографический список:

1. Карликанова Н.Р., Куваева И.Б., Карликанова С.Н. Листерии в молоке и молочных продуктах. Москва-Углич: 1999. – 123 с.
2. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех. 2002. – 195 с.
3. Ahmed J.E. et al. Method for improved recovery of *Listeria monocytogenes* from cheese//Appl. And Environ. Microbiol. – 54 - 1988, P. 2643-2649.
4. ГОСТ Р 51921–2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*».
5. МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления *L. monocytogenes* в пищевых продуктах».
6. Нитяга И.М. Контаминация листериями мясных продуктов и их ускоренная идентификация с применением методов на основе ПЦР//Проблемы ветеринарной санитарии гигиены и экологии. - №1- 2016.- С.17-23.

METHODS OF ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *L. MONOCYTOGENES* IN FOOD PRODUCTS

Sisneva V.V.

Key words: *L. monocytogenes*, raw materials and food products, identification, PCR, enzyme immunoassay.

*The article is devoted to the review of methods of isolation and identification of *L. monocytogenes* in raw materials and food products. The assessment of the most frequently used methods of pathogen investigation is given.*