

РАЗРАБОТКА УСКОРЕННОЙ СХЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИСТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА L.M 4 УЛГАУ

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 89374545651

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Ключевые слова: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, листерии, листериоз, пищевые патогены, фаг, бактериофаги, бактерии, множественность инфекции, MOI, идентификация

Возбудитель *Listeria monocytogenes* вызывает листериоз-тяжелое заболевание пищевого происхождения, связанное с высокой смертностью. Для обнаружения и идентификации этого патогена в процессе производства пищевых продуктов требуются быстрые и чувствительные методы. В статье представлены результаты исследований по разработке технологических параметров изготовления биопрепарата на основе бактериофага L.m 4 УЛГАУ для ускоренной идентификации бактерий рода *Listeria* с его помощью. Установлено, что для производства фага L.m 4 УЛГАУ с максимальными титрами оптимальными являются параметры: множественность инфекции MOI 1, температура культивирования - 28°C, время инкубирования системы фаг/культура – 6 часов. На основе полученных данных нами предложена технологическая схема изготовления фагового биопрепарата L.m 4 УЛГАУ, включающая этапы: подтверждения биологических свойств индикаторного фага и повышение его титра (при необходимости), проверки и подтверждения биологических свойств индикаторной культуры, изготовление фагового биопрепарата и контроль его показателей. С помощью изготовленного биопрепарат на основе бактериофага L.m 4 УЛГАУ предложена ускоренная схема идентификации листерий. Апробацию схемы проводили на пробах мяса курицы и мясных рубленых полуфабрикатах искусственно контаминированных бактериями *Listeria monocytogenes* в концентрациях 10^1 - 10^5 КОЕ/мл. Установлено, что предложенная схема идентификации листерий позволяет сократить длительность исследований на 84 часа в сравнении с традиционным бактериологическим методом и обнаружить листерии в концентрации 100 КОЕ/мл (г) за 82 часа. Время фагоидентификации на этапе типирования чистой культуры составляет 18 часов.

Введение

Listeria monocytogenes - это условно-патогенный грамположительный микроорганизм, который может вызывать листериоз - тяжелое заболевание пищевого происхождения, характеризующееся высокими показателями смертности (от 20 до 30%) среди детей, беременных женщин и контингента иммунокомпрометированных пациентов [1-3]. Длительные инкубационные периоды инвазивного листериоза до 67 дней крайне затрудняют поиск источников вспышек, связанных с *L. monocytogenes* [4]. Кроме того, листерии обладают устойчивостью к ряду физических и химических факторов: растут при температурах 2-4°C, при низком pH и в присутствии высоких концентраций солей [5-7]. Таким образом, ускоренная идентификация *Listeria spp.* в пищевых продуктах является важной задачей и имеет решающее значение при профилактике заболевания. С этой целью многие страны, в т.ч. и Российская Федерация проводят политику нулевой терпимости в отношении пищевых продуктов, особенно готовых к употреблению продуктов питания (RTE), где листерии не должны присутствовать в 25,0 гр пищевой продукции [8]. На сегодняшний день золотым стандартом для выявления большинства бактериальных патогенов пищевого происхождения являются бак-

териологические методы исследований, но они длительны и трудоемки [9-10], что неблагоприятно сказывается при тестировании продуктов с коротким сроком хранения. Методы и протоколы исследований, основанные на ПЦР, иммунологии или масс-спектрометрии, работают гораздо быстрее, но не могут дифференцировать инактивированные клетки от жизнеспособных, что является важным фактором, особенно при исследовании продуктов готовых к употреблению. Кроме того, эти методы часто требуют квалифицированного персонала, дорогостоящего оборудования и дают ложноположительные либо ложноотрицательные результаты под воздействием большого количества биоматериала в пробе [11].

Бактериофаги - это вирусы бактерий, которые распознают и заражают клетки бактерии-хозяина с беспрецедентной специфичностью, которая может проявляться на уровне рода, вида или даже варианта [12-13]. При этом чувствительность некоторых бактериофагов после короткого предварительного обогащения в селективных средах может достигать 10 КОЕ/г [14].

В связи с этим целью нашей работы стала разработка технологических параметров изготовления биопрепарата на основе бактериофага L.m 4 УЛГАУ и ускоренной схемы идентификации бак-

терий рода *Listeria* с его помощью.

Задачи исследования:

1. Разработать технологические параметры изготовления и контроля биопрепарата на основе листериозного фага *L.m 4 УлГАУ*

2. Разработать ускоренную схему идентификации листерий с помощью фагового биопрепарата *L.m 4 УлГАУ*

Материалы и методы исследований

Бактериофаг *Listeria spp L.m 4 УлГАУ*. В ходе ранее проведенных исследований нами выделен бактериофаг *L.m 4 УлГАУ* активный в отношении бактерий *Listeria spp* и изучены его биологические свойства [15-16] и молекулярно-генетические характеристики [17]. Установлено, что фаг *L.m 4 УлГАУ* обладает высокой литической активностью 2×10^{10} БОЕ/мл наибольшим спектром литической активности – 86,8%, не активен в отношении бактерий других родов, устойчив к хлороформу и обладает умеренной устойчивостью к термоинактивации. Проведение генетических и протеомных исследований фага *L.m 4 УлГАУ* позволило установить оригинальную природу генетической структуры бактериофага и отсутствие в его геноме локусов патогенности. Все изученные характеристики соответствуют требованиям, предъявляемым к производственным штаммам фагов.

Хранение штамма фага осуществляли в леофильно высушенном состоянии в условиях холодильника, а также поддерживали на индикаторной культуре *Listeria monocytogenes 56* в питательном бульоне при температуре (2-4°C).

Индикаторная культура - *Listeria monocytogenes 56* обладала типичными биологическими свойствами, характерными для бактерий рода *Listeria*. Штамм хранили в полужидком питательном 0,3 % агаре (рН 7,2) при температуре 2-4°C, пересев культуры осуществляли каждые 3-4 месяца.

Тинкториальные и биохимические свойства индикаторной культуры листерий проверяли перед ее использованием для изготовления и контроля бактериофагового препарата согласно действующим МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах» [8]. Повторную проверку проводили не реже одного раза в 6 месяцев. Индикаторная культура обладает чувствительностью к исследуемому фагу.

Питательные среды и реактивы. *Listeria* Oxford Medium Base, Oxford *Listeria* Supplement, Fraser Broth Base, Fraser Supplement, Fraser Selective Supplement, Nutrient Agar, Nutrient Broth. Все среды производства HiMedia Laboratories (Индия). Раствор 0,3% КОН, раствор 5% NaCl, набор для окраски по Граму.

Работа с бактериофагами проводилась по

методикам, ранее апробированным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [15, 17].

Оптимальное значение множественности инфекции (МОИ) [18] определяли с помощью индикаторной культуры *Listeria monocytogenes 56* выращенной в МПБ при 37°C до ранней логарифмической фазы - 10^8 КОЕ/мл. Шесть различных концентраций фага *L.m 4 УлГАУ* (10^{10} – 10^4) были добавлены в среду МПБ для формирования множественности инфекции (МОИ) - 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 БОЕ/КОЕ. После просветления пробирок (6 ч инкубации) при 25°C и 37°C образцы отбирали, а титры фагов определяли серийным разведением и двухслойным методом по Грациа. Все эксперименты проводились трижды.

Оптимальное время культивирования фага *L.m 4 УлГАУ* на индикаторном штамме *Listeria monocytogenes 56* определяли при МОИ 1 и температуре 28°C. Время пассажа подбирали опытным путем, исходя из длительности лаг-фазы у листерий и показателей одиночного цикла развития фага. Изучаемый диапазон составил 2-16 часов. Каждые 2 часа отбирали образец для определения титра фага двухслойным методом по Грациа.

Результаты исследований

При разработке технологии изготовления фагового биопрепарата и последующего применения его в качестве средства ускоренной идентификации листерий необходимо установить такие важные параметры, как оптимальные значения множественности инфекции, времени культивирования системы фаг/бактерия и температуры инкубирования.

Мы изучили МОИ для фага *L.m 4 УлГАУ* в диапазоне от 0,001 до 100, чтобы определить его оптимальные значения для получения максимальных титров фага при 28 и 37°C (рис. 1-2). Результаты показали, что при обеих температурах оптимальное МОИ 1, при котором титр фага при 28°C составил $2,9 \pm 0,2 \times 10^{10}$ БОЕ/мл и был выше, чем при 37°C $2,2 \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл. Эти значения множественности инфекции и температуры культивирования применяли в дальнейших экспериментах.

Изучив титры фага *L.m 4 УлГАУ*, при определении оптимального времени его культивирования с индикаторным штаммом *Listeria monocytogenes 56* установили, что уже при экспозиции 6 часов достигается наивысшая концентрация фага $1,6 \times 10^{10}$ БОЕ/мл (рис.3). Это значение времени пассажа мы использовали в последующей работе.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля бактериофага *L.m 4 УлГАУ*

Опираясь на полученные данные, нами была разработана технология изготовления биопрепарата на основе листериозного бактериофага

L.m 4 УлГАУ. Фаг в титре 10^8 БОЕ/мл в объеме 2 мл вносили в колбу (V-100 мл) содержащую 45 мл стерильного МПБ. В колбу добавляли 2 мл молодой бульонной культуры *Listeria monocytogenes* 56 в концентрации 10^8 КОЕ/мл.

В качестве контроля использовали пробирку, содержащую 4,5 мл МПБ с добавлением 0,2 мл той же 18-часовой индикаторной бульонной культуры. Смеси инкубировали в течение 6 часов при температуре 28°C. Через указанный промежуток времени среда в колбе становилась прозрачной, а в контрольной пробирке наблюдалась легкая опалесценция. Содержимое колбы пропускали через мембранные фильтры «Millipore» (d= 0,22 мкм).

При необходимости данную технологию можно масштабировать для получения больших объемов.

Для контроля полученного лизата определяли его литическую активность, специфичность, спектр литической активности, стерильность и степень нарастания титра фага.

После получения удовлетворительных результатов контроля фаголизат в объеме 2 мл разливали по стерильным флаконам и закрывали резиновыми пробками и алюминиевыми скобами. На флаконы с фагом наклеивали этикетки с указанием наименования препарата, номера серии, титра, даты укупоривания и срока годности.

В целом технологическая схема изготовления биопрепарата на основе фага L.m 4 УлГАУ состоит из следующих этапов: подтверждение биологических свойств индикаторного фага и повышение его титра (при необходимости), проверка и подтверждение биологических свойств индикаторной культуры, изготовление фагового препарата и контроль его показателей.

Усовершенствование схемы идентификации листерий

Учитывая специфичность изготовленного препарата на основе бактериофага L.m 4 УлГАУ по отношению к листериям, нами была предложена ускоренная схема идентификации данного микроорганизма (рис. 4).

Апробацию схемы проводили на пробах мяса курицы и мясных рубленых полуфабрикатах. Для установления чувствительности метода искусственно контаминировали пробы бактериями *Listeria monocytogenes* 56 в концентрациях 10^1 - 10^5 КОЕ/мл.

Подготовку материалов, проб, а также выделение и идентификацию бактериоло-

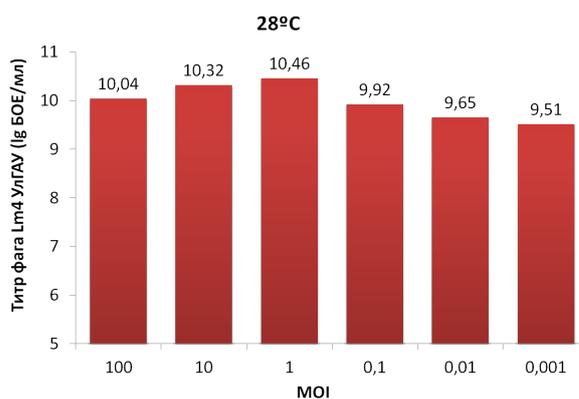


Рис. 1 - Титры фага L.m 4 УлГАУ при различных значениях множественности инфекции MOI (фаг / бактерия = 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001) при температуре 28°C. Результаты представлены как среднее значение

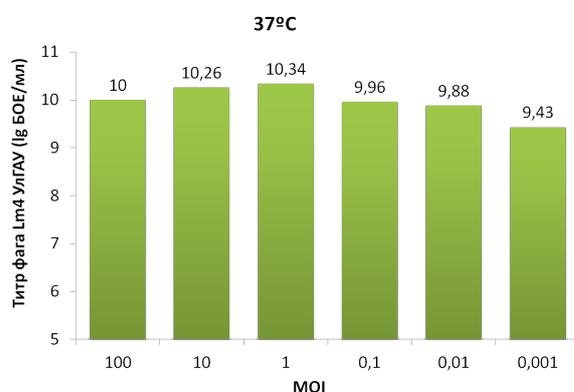


Рис. 2 - Титры фага L.m 4 УлГАУ при различных значениях множественности инфекции MOI (фаг / бактерия = 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001) при температуре 37°C. Результаты представлены как среднее значение

Оптимальное время культивирования фага Lm4 УлГАУ с индикаторной культурой, MOI 1, t=28°C

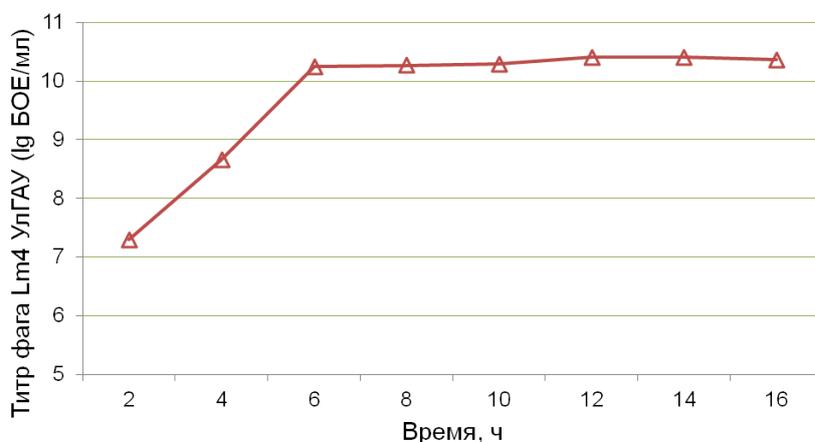


Рис. 3 – График зависимости титров фага L.m 4 УлГАУ при его культивировании с индикаторным штаммом *Listeria monocytogenes* 56 в зависимости от времени (MOI 1, t = 28°C)

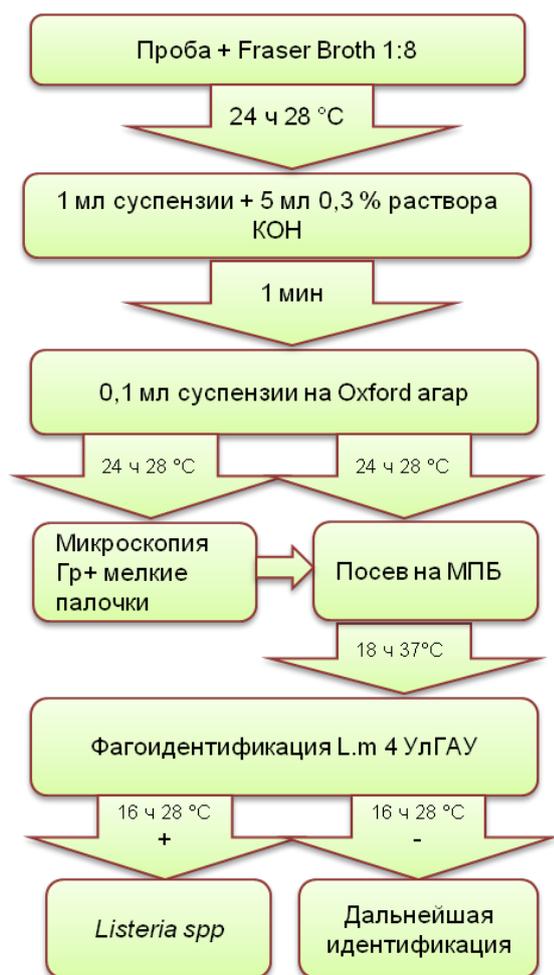


Рис. 4 – Схема выделения и ускоренной идентификации бактерий рода *Listeria* с помощью бактериофагового биопрепарата L.m 4 УлГАУ

гическим методом проводили в соответствии с действующим МУК 4.2.1122–02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах» [8].

Алгоритм исследования: для выделения и идентификации листерий по разработанной ускоренной схеме исследуемую пробу добавляли в Fraser Broth (HiMedia) в соотношении 1:8. Полученную суспензию встряхивали в течение 1 минуты и помещали в термостат при $(28 \pm 3)^\circ\text{C}$ на 24 часа. По истечению суток 1 мл полученной бактериальной суспензии смешивали с 5 мл 0,3 % раствора КОН (растворенного в 5% NaCl), встряхивали и через минуту высевали на дифференциально-диагностическую среду Oxford (HiMedia) 0,1 мл шпателем равномерно распределяя по поверхности питательной среды. Посевы инкубировали при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. В случае обнаружения на Oxford-агаре типичных для листерий колоний (мелкие сероватые с черным ореолом) делили их на 2 части, одну

часть микроскопировали (окраска по Граму) и при обнаружении в мазках однородных мелких грамположительных палочек вторую часть пересеивали в МПБ. После 18 часов инкубирования в термостате при температуре 37°C культуру идентифицировали с помощью биопрепарата. Для этого 0,5 мл полученной суточной культуры добавляли в пробирку с 2,5 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 50°C мясопептонного агара. Содержимое пробирки перемешивали и выливали на чашку Петри с 1,5% МПА. Давали второму слою застыть при комнатной температуре в течении 15-20 минут. Засеянную чашку Петри условно делили на 2 сектора. На поверхность одного сектора наносили 20 мкл фагового биопрепарата L.m 4 УлГАУ, на второй – 20 мкл стерильного МПБ, чашку наклоняли, чтобы обе капли стекли параллельно в одном направлении, затем подсушивали чашки при комнатной температуре еще в течении 10-15 минут и помещали в термостат для инкубирования при 28°C в течение 16 часов.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения капли биопрепарата образовывалась прозрачная зона лизиса или негативные колонии. В контрольном секторе наблюдали равномерный рост культуры в толще среды без участков лизиса.

Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса в опытном секторе.

При положительном результате культуру относили к роду *Listeria*.

Одновременно были проведены исследования по выделению бактерий рода *Listeria*. в исследуемых объектах бактериологическим методом согласно МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах».

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Результаты исследований показали, что минимальная концентрация листерий, выделяемых бактериологическим методом, составляет 10^3 КОЕ/мл (г) исследуемого материала. Длительность исследований от 168 до 336 часов.

При исследовании пищевой продукции по предложенной ускоренной схеме выделения и идентификации *Listeria spp* с помощью бактериофагового биопрепарата L.m 4 УлГАУ чувствительность метода - 100 КОЕ/мл (г). Длительность исследований составляет 82 часа.

Обсуждение

С тех пор, как в 1981 году был впервые установлен факт передачи листерий через пищевые продукты, произошел скачок в разработке новых методов, нацеленных на индикацию и идентификацию бактерий рода *Listeria*. Приоритетным

Таблица 1

Результаты фагоидентификации *Listeria spp* и обнаружения бактерий *Listeria* в разных концентрациях бактериологическим методом

Объекты исследования	Результат фагоидентификации биопрепаратом L.m 4 УлГАУ					Результаты идентификации бактериологическим методом				
	КОЕ/мл (г)					КОЕ/мл (г)				
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
Мясо курицы	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Мясные рубленые полуфабрикаты	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Длительность исследования, ч	82					от 168 до 336				

Примечание - «+» положительный результат, «-» отрицательный результат.

направлением исследований является выявление листерий на пищевом производстве и раннее обнаружение зараженных пищевых продуктов для предотвращения вспышек болезни. В связи с этим постоянно существует потребность в разработке более быстрых, чувствительных, экономичных методов и тестов, обеспечивающих высокую пропускную способность [10].

Методы, основанные на бактериофагах, успешно используются для быстрого обнаружения патогенов [19-20]. Они основаны на способности фагов эффективно и специфично прикрепляться к бактерии-хозяину и впоследствии вызывать ее лизис. Дополнительные преимущества использования бактериофагов включают: доступность, специфичность, повышенную устойчивость к температуре, pH и т.д.; способность распознавать и обнаруживать только живые бактерии.

Для разработки ускоренной схемы идентификации *Listeria spp* мы сконструировали биопрепарат на основе бактериофага L.m 4 УлГАУ, экспериментально подобрав такие основополагающие параметры, как оптимальное значение множественности инфекции, время пассирования системы фаг/бактерия и температура культивирования. Опираясь на полученные данные, предложили технологическую цепочку изготовления биопрепарата. Разработанная схема ускоренной идентификации *Listeria spp* с помощью биопрепарата на основе бактериофага L.m 4 УлГАУ была апробирована в опыте с искусственно контаминированными продуктами и показала себя как чувствительный и менее продолжительный способ в сравнении с традиционным бактериологическим методом. Если же рассматривать предложенный вариант фагоидентификации как один из тестов классической схемы выделения и идентификации листерий и использовать его на этапе типирования чистой культуры, то длительность данного исследования составит 18 часов.

Но, несмотря на сокращения времени исследований при использовании предложенной схемы на более чем 50% (84 часа) и увеличения чувствительности в 10 раз, требуется разработка более быстрых методов скрининга технологических линий пищевого производства на наличие листерий.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что для производства фага L.m 4 УлГАУ оптимальными яв-

ляются параметры: множественность инфекции MOI 1, температура культивирования - 28°C, время инкубирования системы фаг/ культура – 6 часов. На основе полученных данных предложена технологическая схема изготовления и контроля фагового биопрепарата L.m 4 УлГАУ. Установлено, что разработанная схема идентификации листерии с помощью фагового биопрепарата L.m 4 УлГАУ позволяет сократить длительность исследований на 84 часа и обнаружить листерий в концентрации 100 КОЕ/мл (г) за 82 часа.

Библиографический список

1. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens // E. Scallan, R.M. Hoekstra F.J. Angulo, R.V. Tauxe, M.A. Widdowson, S.L. Roy. - Emerg Infect Dis. – 2011. – Т. 17. – С. 7-15.
2. Vázquez-Boland, J. A. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants / J. A. Vázquez-Boland // Clinical microbiology reviews. – 2001. – Т. 14. – №. 3. – С. 584-640.
3. Buchanan, R. L. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments / R. L. Buchanan // Food control. – 2017. – Т. 75. – С. 1-13.
4. Goulet, V. What is the incubation period for listeriosis? / V.Goulet et al. // BMC Infectious Diseases. – 2013. – Т. 13. – №. 1. – С. 11.
5. Lammerding, A. M. Stability of *Listeria monocytogenes* to non-thermal processing conditions / A. M. Lammerding // Foodborne listeriosis: topics in industrial microbiology Volume 2. – 1990. – С. 195-202.
6. Donnelly, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge / C. W. Donnelly // Nutrition Reviews. – 2001. – Т. 59. – №. 6. – С. 183-194.
7. Ryser E. T., Marth E. H. (ed.). *Listeria: listeriosis, and food safety*. – CRC Press, 1999. – 730 p.
8. МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах». Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2002. (МУК 4.2.1122-02 "Organization

of control and methods of detection of *Listeria monocytogenes* bacteria in food products". Methodical Instructions. Moscow, 2002. (In Russian). – 31 c.

9. Ryser, E. T. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes* / E. T. Ryser, E. H. Marth // *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. – CRC Press, 2007. – С. 233-274.

10. Gasanov, U. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review / U. Gasanov, D. Hughes, P.M. Hansbro // *FEMS microbiology reviews*. – 2005. – Т. 29. – №. 5. – С. 851-875.

11. Minikh, O. Bacteriophage-based biosensors coupled with bioluminescent ATP assay for rapid concentration and detection of *Escherichia coli* / O. Minikh // *Journal of microbiological methods*. – 2010. – Т. 82. – №. 2. – С. 177-183.

12. Dunne, M. Molecular basis of bacterial host interactions by Gram-positive targeting bacteriophages / M. Dunne et al. // *Viruses*. – 2018. – Т. 10. – №. 8. – С. 397.

13. Dunne, M. Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins / M. Dunne et al. // *Cell reports*. – 2019. – Т. 29. – №. 5. – С. 1336-1350. e4.

14. Klumpp, J. Detection of bacteria with bioluminescent reporter bacteriophage / J. Klumpp, M. J. Loessner // *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 1*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. – С. 155-171.

15. Выделение бактериофагов *Listeria monocytogenes* методом индукции / Е.Н. Ковалева,

Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.В. Сульдина, М.А. Имаммов, И.Г. Швиденко // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2013. – № 1 (21). – С. 45-48.

16. Выделение листериозных бактериофагов и изучение их основных биологических свойств / Е.В. Сульдина, Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, Б.И. Шморгунов // *Аграрный научный журнал*. – 2015. – № 3. – С. 37-41.

17. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Listeria* Fl. m 4 УЛГАУ / Е.В. Сульдина, А.В. Мاستиленко, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2019. – №. 4 (48). – С. 129-135.

18. Peng, S. Y. Isolation and Characterization of a New Phage Infecting *Elizabethkingia anophelis* and Evaluation of Its Therapeutic Efficacy in vitro and in vivo / S. Y Peng. et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Т. 11. – С. 728.

19. Squirrell, D. J / Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence / D. J. Squirrell, R. L. Price, M. J. Murphy // *Analytica Chimica Acta*. – 2002. – Т. 457. – №. 1. – С. 109-114.

20. Dunne M., Loessner M. J. Modified bacteriophage tail fiber proteins for labeling, immobilization, capture, and detection of bacteria / Dunne M., Loessner M. J. // *Foodborne Bacterial Pathogens*. – Humana Press, New York, NY, 2019. – С. 67-86.

21. Stone, E. Understanding and exploiting phage–host interactions / E. Stone, et al. // *Viruses*. – 2019. – Т. 11. – №. 6. – С. 567.

DEVELOPMENT OF QUICK SCHEME IDENTIFICATION OF LISTERIA USING PHAGE BIOPREPARATION L.M 4 УЛГАУ

Suldina E.V.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017. Ulyanovsk, Novy Venets boulevard, 1; 89374545651

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Key words: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *listeria*, *listeriosis*, *food pathogens*, *phage*, *bacteriophages*, *bacteria*, *multiplicity of infection*, *MOI*, *identification*

The causative agent *Listeria monocytogenes* *causes listeriosis, a severe foodborne illness associated with high mortality. Rapid and sensitive methods are required to detect and identify this pathogen in the food production process.*

The article presents the results of research on the development of technological parameters for the production of biopreparation based on the bacteriophage L. m 4 ULSAU for quick identification of bacteria of the genus *Listeria* *with its help.*

It was established that for the production of L. m 4 phage of ULSAU with maximum titers, the optimal parameters are: multiplicity of MOI 1 infection, cultivation temperature-28°C, incubation time of the phage/ culture system – 6 hours. Based on these results, we have offered technological scheme for the production of phage biopreparation L. m 4 ULSAU, which includes the following steps: confirmation of biological properties of indicator phage and increasing its titer (if necessary), verification and confirmation of biological properties of indicator culture, production of phage biopreparation and control of its indicators.

Accelerated scheme for *Listeria* *identification was offered with the help of prepared biological product based on L. m 4 bacteriophage of ULSAU. The scheme was tested on samples of chicken meat and minced meat semi finished products artificially contaminated with* *Listeria monocytogenes* *bacteria in concentrations 101-105 CFU/ml.*

It was established that the proposed scheme of listeria identification allows to reduce the duration of studies by 84 hours in comparison with the traditional bacteriological method and to detect listeria at a concentration of 100 CFU/ml (g) in 82 hours. The phage identification time at the pure culture typing stage is 18 hours.

Bibliography

1. Scallan E. Hoekstra rM, Angulo fJ, tauxe rV, Widdowson MA, roy SL, et al // *Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. Emerg Infect Dis.* – 2011. – V. 17. – P. 7-15.

2. Vázquez-Boland J. A. et al. *Listeria* *pathogenesis and molecular virulence determinants* // *Clinical microbiology reviews*. – 2001. – V. 14. – №. 3. – P. 584-640.

3. Buchanan R. L. et al. *A review of* *Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments* // *Food control*. – 2017. – V. 75. – P. 1-13.

4. Goulet V. et al. *What is the incubation period for listeriosis?* // *BMC Infectious Diseases*. – 2013. – V. 13. – №. 1. – P. 11.

5. Lammerding A. M. et al. *Stability of* *Listeria monocytogenes* *to non-thermal processing conditions* // *Foodborne listeriosis: topics in industrial*

microbiology Volume 2. – 1990. – P. 195-202.

6. Donnelly C. W. *Listeria monocytogenes: a continuing challenge* // *Nutrition Reviews*. – 2001. – V. 59. – №. 6. – P. 183-194.
7. Ryser E. T., Marth E. H. (ed.). *Listeria: listeriosis, and food safety*. – CRC Press, 1999.
8. MCI 4.2.1122-02 «Organization of control and methods of detection of *Listeria monocytogenes* bacteria in food products». *Methodological guidelines*. Moscow: Federal center of state sanitary and epidemiological supervision of the Ministry of health of the Russian Federation; 2002. (MUK 4.2.1122-02 "Organization of control and methods of detection of *Listeria monocytogenes* bacteria in food products". *Methodical Instructions*. Moscow, 2002. (In Russian).
9. Ryser E. T., Marth E. H. *Conventional methods to detect and isolate Listeria monocytogenes* // *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. – CRC Press, 2007. – P. 233-274.
10. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M. *Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: a review* // *FEMS microbiology reviews*. – 2005. – V. 29. – №. 5. – P. 851-875.
11. Minikh O. et al. *Bacteriophage-based biosorbents coupled with bioluminescent ATP assay for rapid concentration and detection of Escherichia coli* // *Journal of microbiological methods*. – 2010. – V. 82. – №. 2. – P. 177-183.
12. Dunne M. et al. *Molecular basis of bacterial host interactions by Gram-positive targeting bacteriophages* // *Viruses*. – 2018. – V. 10. – №. 8. – P. 397.
13. Dunne M. et al. *Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins* // *Cell reports*. – 2019. – V. 29. – №. 5. – P. 1336-1350. e4.
14. Klumpp J., Loessner M. J. *Detection of bacteria with bioluminescent reporter bacteriophage* // *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 1*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. – P. 155-171.
15. *Isolation of Listeria monocytogenes bacteriophages by induction*/E. N. Kovaleva, D. A. Vasiliev, S. N. Zolotukhin, E. V. Suldina, M. A. Imamov, I. G. Shvidenko // *Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy*. -2013. -№ 1 (21). -P. 45-48.
16. *Isolation of listeriosis bacteriophages and study of their basic biological properties* / E. V. Suldina, E. N. Kovaleva, D. A. Vasiliev, B. I. Shmorgun // *Agrarian scientific journal*. 2015. № 3. P. 37-41.
17. *Molecular genetic characteristics of the bacteriophage Listeria Fl. m 4 ULSAU* / E. V. Suldina, A.V. Mastilenko, N. A. Feoktistova, D. A. Vasiliev // *Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy*. – 2019. – №. 4 (48). - P. 129-135.
18. Peng S. Y. et al. *Isolation and Characterization of a New Phage Infecting Elizabethkingia anophelis and Evaluation of Its Therapeutic Efficacy in vitro and in vivo* // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 728.
19. Squirrell D. J., Price R. L., Murphy M. J. *Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence* // *Analytica Chimica Acta*. – 2002. – V. 457. – №. 1. – P. 109-114.
20. Dunne M., Loessner M. J. *Modified bacteriophage tail fiber proteins for labeling, immobilization, capture, and detection of bacteria* // *Foodborne Bacterial Pathogens*. – Humana Press, New York, NY, 2019. – P. 67-86.
21. Stone E. et al. *Understanding and exploiting phage–host interactions* // *Viruses*. – 2019. – V. 11. – №. 6. – P. 567.