

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БАКТЕРИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Лобанова Валентина Георгиевна, ветеринарный врач отдела ПМ и ВСЭ, ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория».

Скворцова Анастасия Николаевна, младший научный сотрудник отдела вирусологии, ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория».

Нурлыгаянова Гульнара Ахметовна, ведущий научный сотрудник отдела координации научно-исследовательских работ ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория».

Аннотация: В данной статье представлена работа по микробиологическому исследованию пищевых продуктов на наличие патогенных бактерий *Listeria monocytogenes*, которые могут вызывать листериоз у людей при несоблюдении санитарно-гигиенических правил и норм. Высококочувствительные и специфичные питательные среды позволяют оперативно и качественно проводить испытание мясной, растительной и молочной продукции по выявлению *Listeria monocytogenes*.

Ключевые слова: возбудитель, *Listeria monocytogenes*, питательные среды, продукция, лабораторные исследования.

Введение. *Listeria monocytogenes* (далее - *L. monocytogenes*) - это бактерия, вызывающая у животных и людей токсикоинфекцию пищевого происхождения. Потребление продуктов питания, контаминированных *L. monocytogenes* может привести к заболеванию, известному как листериоз, которому особенно подвержены беременные женщины, пожилые в возрасте 65 лет и старше, а также люди с ослабленной иммунной системой. У здоровых взрослых людей данное заболевание чаще всего регистрируется в виде гастроэнтерита легкой степени. Однако в некоторых случаях это может привести к более серьезным последствиям, которые могут спровоцировать опасные для жизни заболевания, такие как эндокардит, энцефалит или менингит и тяжелый сепсис, у беременных - к преждевременным родам, мертворождению, аборт и неонатальной инфекции [1].

Листерия относится к зоонозам. Впервые регистрация и учет листериоза у людей, как самостоятельной нозологической формы, введена Минздравом Российской Федерации только в 1992 году [2].

Бактерия отличается особой устойчивостью в благоприятной для ее роста и размножения среде, в том числе при производстве пищевых продуктов, относительно терпима к соли и способна размножаться при низких температурах ($<4^{\circ}\text{C}$). В сырых или минимально обработанных и охлажденных пищевых продуктах (например, мягкие и полумягкие сыры, копченые рыбные продукты), которые термически не обрабатываются, *L. monocytogenes* может развиваться в них, что является серьезной проблемой для пищевой промышленности. В связи с морфологическими особенностями *L. monocytogenes* и тем, что животные являются переносчиками возбудителя, в лабораторной практике регистрируются случаи заражения пищевых продуктов животного происхождения (мясо и молочные продукты) [3,4].

Цель работы: Провести анализ рынка диагностических препаратов - питательных сред, применяемых при диагностике листериоза животных в лабораторно-диагностической практике в настоящее время.

Материалы и методы. Для изучения ростовых и дифференциальных свойств питательных сред, материалом послужили пробы пищевой продукции, поступивших на испытание в Московскую испытательную лабораторию ФГБУ ЦНМВЛ в течение 2019-2020 гг. и 8 месяцев 2021 года. Нами проведены микробиологические исследования мясного сырья: мяса говядины, свинины и птицы; молочной продукции: молоко, сыр, творог, ряженка, кефир и др.; рыбы и рыбной продукции: полуфабрикаты - стейки, котлеты и др., суповые наборы из рыбы; а также прочие изделия (соки, джемы, варенья и др.).

Основным методом, применяемым в наших исследованиях (испытаниях) был классический, включающий: применение различных питательных сред и постановку опытов с помощью лабораторного оборудования (термостаты, сушильные шкафы $+(25-37)^{\circ}\text{C}$); средств измерений (весы электронные лабораторные, термометры); вспомогательного оборудования (гомогенизатор, ламинарные боксы, холодильники $+(4-12)^{\circ}\text{C}$, морозильные камеры $-(18-20)^{\circ}\text{C}$).

Испытания образцов мясной продукции проводили согласно действующих нормативных документов: - ГОСТ 10444.1-84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных

сред, применяемых в микробиологическом анализе; - ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*; - МУК 4.2.3262-15, п. 6.2 Обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом фермент-связанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора; - МУК 4.2.1122-02 Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах.

На территории Российской Федерации основными нормативными документами, регламентирующими Требования безопасности пищевой продукции являются Технические Регламенты Таможенного Союза: - ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции"; - ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции"; - ТР ТС 034/2013 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности мяса и мясной продукции"; - ТР ЕАЭС 040/2016 Технический регламент Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции".

Постановка классического метода предусматривает использование питательных сред импортного и/или отечественного производства: селективный накопительный бульон Фразер I, UVM, ПБЛ, селективный накопительный бульон (Фразер II, UVM II, ПБЛ II), ALOA–агар *Listeria* по Оттавиани и Агости, Палкам агар, кровяной агар или Колумбийский агар, трипказо-соевый агар, трипказо-соевый бульон, мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), среды Гисса (рамноза, ксилоза, альфа-метил D-маннозид) и др.

Результаты исследований и обсуждение. С целью обнаружения *L. monocytogenes* в образцах пищевой продукции были проведены лабораторные исследования на научно-производственной базе ФГБУ ЦНМВЛ. До начала исследований все пробы пищевых продуктов, поступающих на испытание в Московскую испытательную лабораторию для микробиологического исследования, хранятся в холодильной камере при температуре $+(4-8)^{\circ}\text{C}$, чтобы исключить контаминацию сопутствующими микроорганизмами, в ряде случаев для проведения дефростации.

Выявление бактерий *L. monocytogenes* в определенной массе или объеме продукта состоит из четырех последовательных этапов, при этом на каждом этапе используются питательные среды отечественного и импортного производства, которые создают благоприятные условия для роста бактерий *L. monocytogenes* (см. табл.). Питательные среды имеют высокую специфичность и чувствительность [5].

В таблице 1 представлены питательные среды отечественного и импортного производителей, используемые в государственных ветеринарных лабораториях РФ для роста бактерий, их накопления и идентификации, в том числе *L. monocytogenes*.

При проведении исследований в отделе пищевой микробиологии и ветеринарно-санитарной экспертизы МИЛ ФГБУ ЦНМВЛ мы использовали следующие питательные среды:

На первом этапе предобогащения проводили посев испытуемого образца пищевого продукта на селективный накопительный бульон UVM (UVM I) и инкубировали при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (24 ± 3) ч.

Таблица

Питательные среды для выявления *L. monocytogenes*

Этапы выделения	Наименование питательной среды	Страна производитель	Цена питательной среды (Интернет-источник)
ЭТАП I предобогащение	Селективный накопительный бульон UVM (UVM I)	Индия	10 850 руб. (9 л)
		Германия	10 850 руб. (9 л)
	ПБЛ-I	Россия	1 227,38 руб. (500г)
ЭТАП II обогащение	Селективный накопительный бульон (UVM II)	Индия	3 734 руб. (добавка)
		Германия	3 734 руб. (добавка)
	ПБЛ-II	Россия	1 227,38 руб.+ добавка
ЭТАП III выделение	ALOA –агар <i>Listeria</i> по Оттавиани и Агости	Германия	47 520 руб. + добавки 12 000 руб. и 23 000 руб.

Продолжение таблицы

	Палкам агар	Россия	1500 руб. (250г)
		Германия	45 360 руб (500 г) + добавка 13 000 руб.
	ПАЛ	Россия	10 437 руб. (250г)
ЭТАП IV идентификация и подтверждение	Трипказо-соевый агар (TSA);	Германия	11 691,67 руб.(500г)
	Трипказо-соевый бульон (TSB)	Германия	6 700 руб. (400мл)
	Мясо-пептонный (агар) бульон с глюкозой	Россия	720 руб. (400г)
	Сахарный кровяной агар по Цейслеру	Россия	2 195 руб. (МПА). (500г)
	ColumbiaAgar - Колумбийский агар	Великобритания	6 307,52 руб. (500г)
	Мясопептонный агар (МПА)	Россия	2 195 руб. (500г)
		Индия	33 940 руб. (500г)
	Мясопептонный бульон (МПБ) (500г)	Россия	2 030 руб. (500г)
		Индия	33 940 руб. (500г)
	Рамноза	Россия	29 640 руб. (100г)
		Германия	126 972 руб. (100г)
	Ксилоза	Россия	4 684,65 руб. (50г)
		Германия	7 576.85 руб. (50г)
	Альфа-метил D-маннозид	Россия	584 руб. (100г)
		Германия	14 530 руб. (100г)

На втором этапе для селективного обогащения проводили пересев с первичной среды предобогащения на селективный накопительный бульон (UVM II), посев инкубировали при температуре $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение (48 ± 2) ч.

Третий этап - выделение бактерий рода листерий. Провели пересев со второй среды обогащения на две плотные селективные среды:

1) ALOA – Агар *Listeria* по Оттавиани и Агости, инкубация при температуре $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 ч.

2) Палкам агар, инкубация при температуре $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч.

Четвертый этап - дифференциация роста микроорганизмов рода листерии *L. monocytogenes* от других видов листерий: *L. ivanovi*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. Seeligeri*, *L. murray*; *L. innocua* и др.

на ALOA:

1) выявление характерного роста. Колонии бактерии *L. monocytogenes* растут в виде сине-зеленых колоний, окруженные непрозрачным ореолом.

2) определение фосфатидилинозитолфосфолипазной С активности (среда ALOA).

На ALOA рост через 24 часа и через 48 часов, при температуре $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Некоторые штаммы *L. monocytogenes* характеризуются слабым ростом, для выявления таких штаммов требуется более продолжительное культивирование. На твердых средах может происходить превращение типичных для листерии колоний S-форм в R-формы [6].

На Палкам:

1) выявление характерного роста. Все виды бактерий рода *Listeria* формируют мелкие серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом, иногда с черным центром.

На Палкам агаре (диагностическая среда) виден рост колоний через (24 ± 3) ч, при температуре $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. На твердых средах может происходить превращение типичных для листерий колоний S-форм в R-формы [6].

Также на четвертом этапе определяются ферментативные свойства *L. monocytogenes*. На кровяном агаре зона гемолиза у культуры *L. monocytogenes* - в виде узкой, чистой, светлой зоны (рис.1).

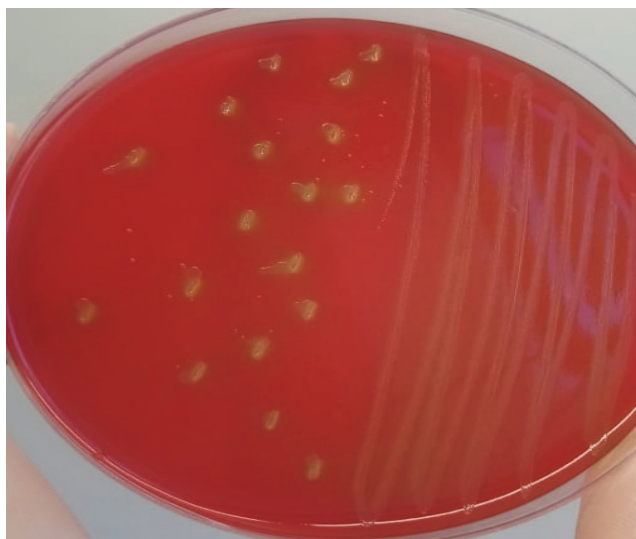


Рис. 1. Зона гемолиза на кровяном агаре (выполнен рассев бактериологической петлей и рассев уколом в глубину агара)

Для изучения биохимических свойств возбудителя проводится постановка тестов «Идентификация и подтверждение».

При росте *L. monocytogenes* на жидких питательных средах (рис.2) наблюдаются видимые изменения цвета среды углеводов из соломенно-желтого цвета в розовый: рамноза, альфа-метил D-маннозид. Изменяется окраска среды в течение 24-48 ч., из исходного соломенно-желтого цвета без розового оттенка в розовый цвет за счет образования кислоты и индикатора Андрее. Реакция – ксилоза отрицательная, цвет среды не меняется, остается соломенно-желтого цвета без розового оттенка.

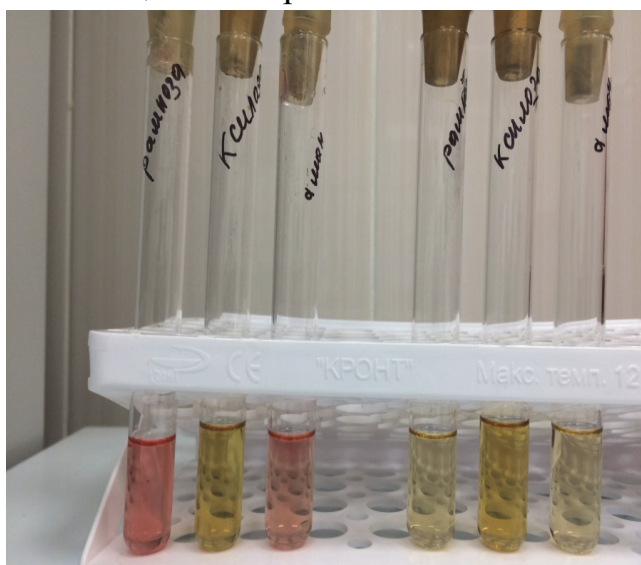


Рис. 2. Постановка тестов для идентификации и подтверждения роста *L. monocytogenes* на жидких питательных средах: слева - положительная реакция углеводов (рамноза (+), ксилоза (-), альфа-метил D-маннозид (+)); справа – отрицательный контроль углеводов (рамноза (-), ксилоза (-), альфа-метил D-маннозид (-))

По представленной выше схеме, всего исследовано классическим методом мясной, молочной, рыбной и другой продукции в 2019 году - 700 проб, в 2020 году – 709 проб, за 8 мес. 2021 года - 570. По результатам испытаний положительные результаты получены: в 2019 году - 17 (2,4%), в 2020 году - 41 (5,7%), за 8 мес. 2021 года - 9 (0,15%).

Нами определена стоимость одного исследования по выявлению *L. monocytogenes* – 1 332,78 руб. (в том числе цена питательных сред, расходных материалов, амортизация оборудования, затраты электроэнергии и т.д.).

Выводы. По нашим практическим наблюдениям в течение ряда лет, применение питательных сред разных производителей не влияет на качество испытаний. Анализ показал, что при использовании селективных накопительных сред ПБЛ-1, ПБЛ-2 и UVM I, UVM II накопительная способность - на качественном и одинаковом уровне.

Дифференциально-диагностические плотные среды АЛОА, ПАЛКАМ или ПАЛ, также применимы в лабораторной практике, по своим качествам не уступают аналогам.

Готовая к посеву питательная среда должна храниться согласно инструкции, разработанной производителем.

С целью повышения выявляемости *L. monocytogenes* мы рекомендуем применять питательные среды, как отечественного производства, так и импортного, при этом учитывать стоимость препарата, чтобы снизить себестоимость исследований.

Допускается в работе использовать среды, аналогичные основным (по ГОСТ, см. табл.), по качеству не ниже указанных.

Библиографический список

1. Vazquez-Boland JA, Kuhn M., Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants / Clin. Microbiol. -№14. - 2001.-P.584–640.
2. Родина, Л.В. Состояние заболеваемости и эпизоотическая ситуация по листериозу в Москве / Л.В Родина, Г.М.Маненкова, В.В. Тимошко // Дезинфекционное дело. - № 4. - 2002. - С. 12-13.
3. Алексеева, Е.А. Методы выявления *Listeria monocytogenes* / Е.А. Алексеева // в коллективной монографии Микробиологический контроль качества пищевой продукции. М.: Издательство «Династия», 2020. - С. 136-148.

4. Dowe MJ, Jackson ED, Mori JG, Bell CR. *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection*. - №60. - 1997.-P. 1201-1207.
5. Farber, J.M. and Peterkin, P. *Listeria monocytogenes* a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*. -№55. -1991.-P. 476-501.
6. ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*.

DIAGNOSTIC PREPARATIONS FOR DETERMINING THE SPECIES OF THE BACTERIA *Listeria monocytogenes*

Lobanova Valentina Georgievna, veterinarian of the Department of PM and VSE, Federal State Budgetary Institution "Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory".

Anastasia Skvortsova, Junior Researcher, Virology Department, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory.

Nurlygayanova Gulnara Akhmetovna, Leading Researcher of the Department for Coordination of Research Works of the Federal State Budgetary Institution "Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory".

Abstract: *This article presents a work on the microbiological study of food products for the presence of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, which can cause listeriosis in humans if sanitary and hygienic rules and regulations are not followed. Highly sensitive and specific nutrient media make it possible to quickly and efficiently test meat, vegetable and dairy products for the detection of *Listeria monocytogenes*.*

Key words: *pathogen, *Listeria monocytogenes*, nutrient media, products, laboratory research.*