



«Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии» государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

Сравнительный анализ культуральных и молекулярно-генетических методов обнаружения и идентификации бактерий вида *Listeria monocytogenes*

Дудчик Н.В., Науменко С.А., Емельянова О.А.

Научная сессия УО «БГМУ», Минск, 30 января 2025г



АКТУАЛЬНОСТЬ

- Современные подходы к организации системы обеспечения безопасности объектов среды обитания человека требуют детального исследования не только фенотипических, но и генотипических особенностей эмерджентных патогенов.
- Микробные патогены проявляют комплекс взаимодействий с представителями своего вида, других видов и абиотической среды обитания. Так, представители микробиоты конкурируют за ресурсы, приводя к усилению факторов патогенности и вирулентности у условно-патогенных микроорганизмов.
- настоящее время на пищевых производствах микробная обсемененность поверхностей и объектов, контактирующих с готовыми к употреблению пищевыми продуктами микроорганизмами вида *Listeria monocytogenes* регламентируется требованиями гигиенического норматива «Допустимые уровни патогенных микроорганизмов на поверхностях, контактирующих с готовыми к употреблению пищевыми продуктами при их производстве», Санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к осуществлению производственного контроля при производстве, реализации, хранении, транспортировке продовольственного сырья и (или) пищевых продуктов» (в редакции постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 30.03.2015 № 32 и от 2.12.2016 № 121).



ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в рамках Задание 02.10. «Разработать молекулярно-генетические экспресс-методы микробиологического контроля патогенных микроорганизмов в среде технологического окружения пищевых производств» подпрограммы «Безопасность среды обитания человека» ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг», 2021–2025 годы

Объекты исследования – смывы с поверхностей при моделировании условий среды технологического окружения пищевых производств, смывы с поверхностей технологического окружения пищевых производств.

Основными методами исследования являлись: культуральный метод, метод ПЦР-анализа



Классический культуральный метод выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в смывах с объектов технологического окружения пищевых производств

Классический культуральный метод выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в смывах с определенной площади объекта технологического окружения пищевых производств, состоит из четырех последовательных этапов:

1) Первичное обогащение анализируемой пробы смыва в жидкой среде со сниженной концентрацией селективных компонентов (полуконцентрированный бульон Фрайзера) при температуре 30 °С в течение 24 ч., соотношение пробы и среды 1 : 9.

2) Вторичное обогащение посевного материала. После термостатирования посевной материал первичного обогащения в количестве 0,1 см³ пересевают в пробирку, содержащую 10 см³ среды вторичного обогащения (концентрированный бульон Фрайзера). Посевы инкубировали в при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

3) Пересев посевного материала проводили с первичного и вторичного обогащения параллельно на две плотные селективные среды: а) первая среда (обязательная): агар *Listeria* по Оттавиани и Агости (ALOA) при температуре (37 ± 1) °С 24-48ч; б) вторая среда: одна из плотных селективных сред, дополнительно к агару ALOA, такие как Оксфорд агар, Палкам агар или ПАЛ при температуре 37 °С в течение 24–48 ч.

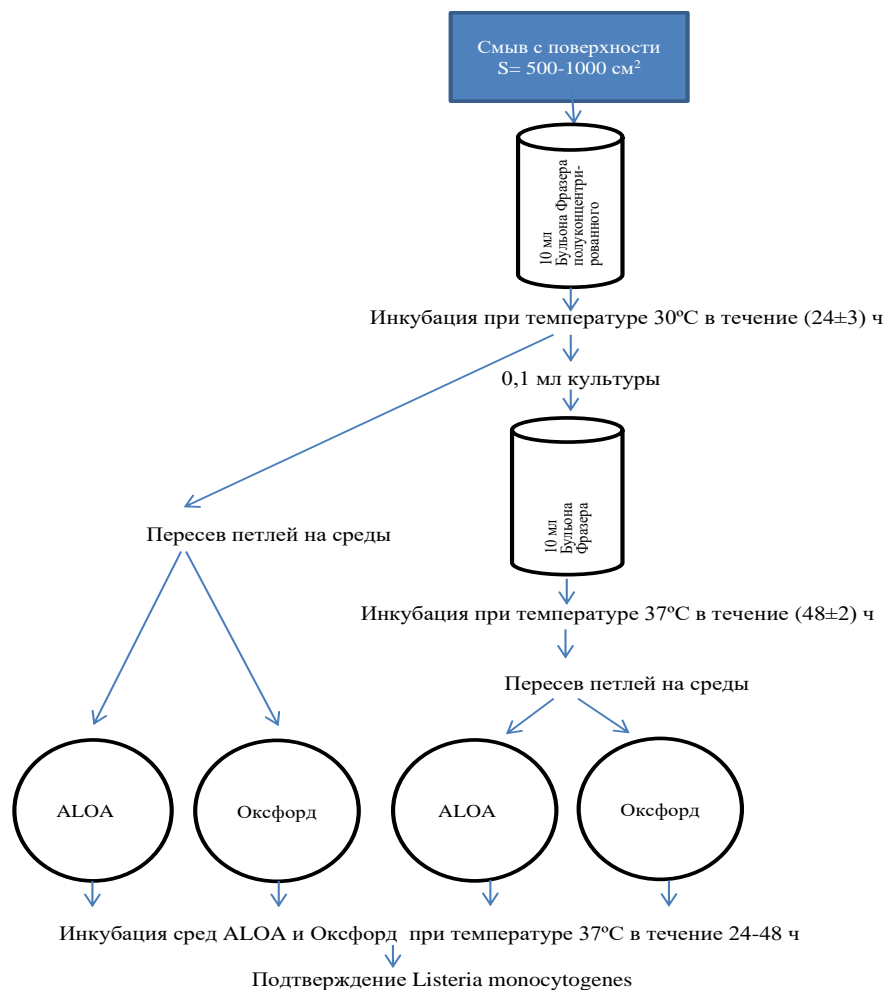
Через (24 ± 3) ч или (48 ± 2) ч производим учет колоний, характерных для бактерий рода *Listeria*: на ALOA – сине-зеленые колонии с ореолом и без него; на Оксфорд агаре – мелкие сероватые колонии, окруженные черным ореолом.

4) При отсутствии роста характерных колоний бактерий рода *Listeria* на ALOA и Оксфорд агаре исследование прекращают и делают заключение об отсутствии в исследуемой пробе *Listeria monocytogenes* указав площадь смыва.

При наличии роста характерных колоний проводили идентификацию выделенных культур до рода *Listeria*: реакция на каталазу, окраска по Граму, определение подвижности; идентификация бактерий рода *Listeria* до вида: определение бета-гемолитической активности, определение лецитиназной активности, определение ферментативных свойств *Listeria monocytogenes* делаем заключение о присутствии в исследуемой пробе *Listeria monocytogenes* указав площадь смыва.



Схема классического культурального метода выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в смывах с объектов среды технологического окружения пищевых производств





Молекулярно-генетический экспресс-метод выявления патогенных бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва с поверхностей технологического окружения пищевых производств

Молекулярно-генетический экспресс-метода выявления патогенных бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва состоит из следующих этапов:

1. Обогащение пробы смыва в полуконцентрированном бульоне Фрайзера, соотношение проба смыва к селектив среде 1:9.
2. Подготовка парных аликвот пробы смыва. (пробу смыва с селективной средой делят на равные парные аликвоты: (аликвота № 1 пробы – с тампоном или губкой/салфеткой и аликвота № 2 пробы – без).

3. Культивирование парных аликвот пробы.

Аликвоту № 1 пробы культивируют при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (20 ± 2) ч.

Аликвоту № 2 пробы культивируют при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (2 ± 1) ч, затем замораживают при температуре от минус 20°C до минус 16°C (допускается только однократная заморозка!).

4. Аликвоту № 2 пробы размораживают естественным способом при комнатной температуре к моменту завершения инкубации аликвоты № 1 пробы.

5. Из аликвоты № 1 удаляют тампон или губку/салфетку/ткань, предварительно их отжав. Аликвоту № 1 и аликвоту № 2 разливают по пробиркам. Центрифугируют пробирки с аликвотами № 1 и № 2 в течение 10 минут с ускорением 6000 об/мин. Удаляют супернатант/надосадочную жидкость. Ресуспендируют осадок в 1 см^3 стерильного физиологического раствора или фосфатно-солевого буферного раствора. Затем снова центрифугируют и удаляют супернатант..

Для экстракции ДНК ресуспендируют осадок 100 мкл стерильного физиологического раствора или фосфатно-солевого буферного раствора и отбирают весь объем взвеси парных аликвот пробы (100 мкл взвеси аликвоты № 1 пробы и 100 мкл взвеси аликвоты № 2 пробы) в пробирки эппендорф вместимостью $1,5\text{ см}^3$.

6. Выделение (экстракция) ДНК из каждой анализируемой аликвоты пробы ..

7 Проведение ПЦР-анализа

8. Для оценки жизнеспособности бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва сопоставляют результаты одновременного тестирования аликвоты № 1 и аликвоты № 2.

Оценка жизнеспособности бактерий вида *Listeria monocytogenes* в анализируемых парных аликвотах пробы смыва проводится по разнице значений C_t (пороговых циклов амплификации) для парных аликвот пробы образца, регистрируемых в процессе реального времени.

Значения C_t для парных аликвот пробы образца различаются на три единицы и более ($C_{t\text{аликвота № 2}} - C_{t\text{аликвота № 1}} \geq 3$) свидетельствуют о наличии в пробе смыва живых (неинактивированных) клеток бактерий вида *Listeria monocytogenes*.

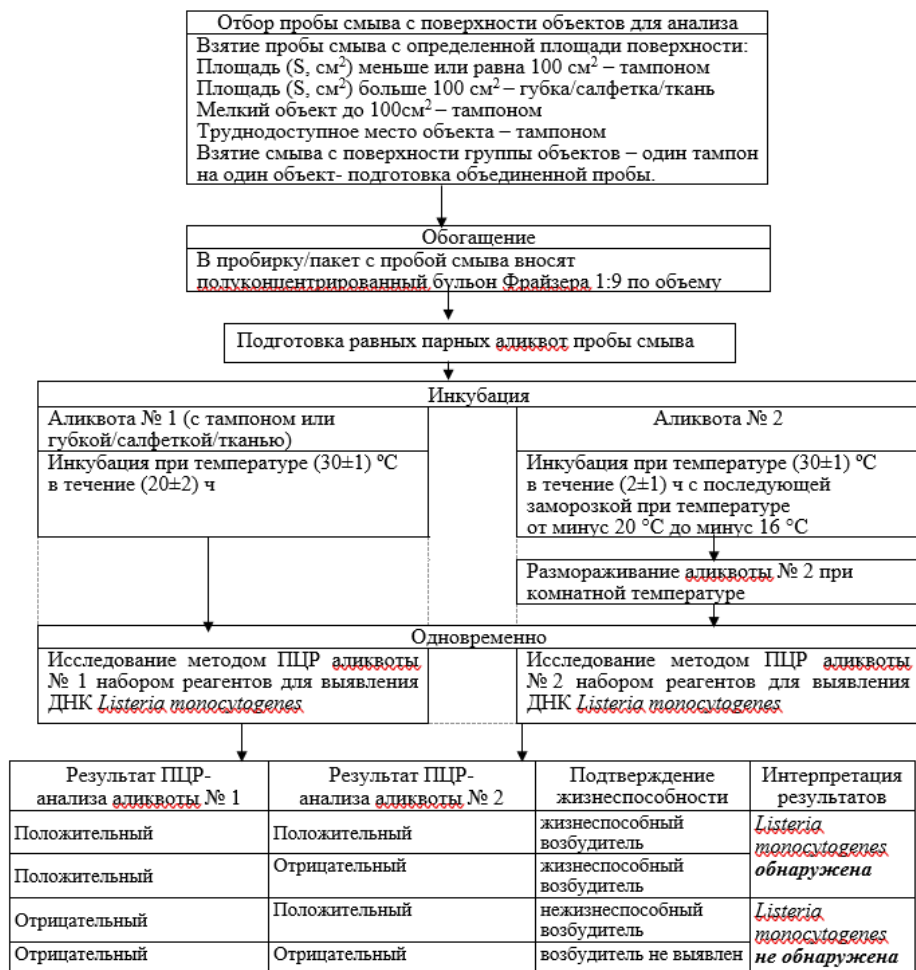
9. Учет и интерпретация результатов

9.1 Заключение о наличии бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва с исследуемой площади объекта технологического окружения пищевых производств выдают при получении положительного результата ПЦР в одной либо двух аликвотах и при подтверждении жизнеспособности бактерий.

9.2 Заключение об отсутствии бактерий вида *Listeria monocytogenes* в пробе смыва с исследуемой площади объекта технологического окружения пищевых производств выдают при получении отрицательного результата ПЦР в двух аликвотах; либо при получении положительного результата ПЦР в одной (двух) аликвотах и при подтверждении нежизнеспособности бактерий.



Схема молекулярно-генетического экспресс –метода выявления *Listeria monocytogenes* в пробе смыва с объектов технологического окружения пищевых производств





Результаты и обсуждение

- Молекулярно-генетический экспресс-метод выявления бактерий вида *Listeria monocytogenes* проводили параллельно с классическим микробиологическим методом в ноябре 2024 г. на 2 предприятиях г. Минска и Минской области: предприятие по изготовлению молочной продукции и предприятие по изготовлению продукции из мяса птицы.
- Для проверки метода на чувствительность в условиях лаборатории был подготовлен контрольный образец смыва с внесенной культурой музейного штамма *L. monocytogenes* ATCC 13932 плотностью 1×10^2 КОЕ/см³.
- Всего было исследовано 39 СМЫВОВ.

Показатель	Номер пробы смыва	Результаты испытаний классическим микробиологическим методом ГОСТ 32031-2022	Результаты испытаний молекулярно-генетическим экспресс-методом (проект Инструкции)
бактерии вида <i>Listeria monocytogenes</i> / не менее 500 см ²	1	не обнаружены	не обнаружены
	2	не обнаружены	не обнаружены
	3	не обнаружены	не обнаружены
	4	не обнаружены	не обнаружены
	5	не обнаружены	не обнаружены
	6	не обнаружены	не обнаружены
	7	не обнаружены	не обнаружены
	8	не обнаружены	не обнаружены
	9	не обнаружены	не обнаружены
	10	не обнаружены	не обнаружены
	11	не обнаружены	не обнаружены
	12	не обнаружены	не обнаружены
	13	не обнаружены	не обнаружены
	14	не обнаружены	не обнаружены
	15	не обнаружены	не обнаружены
	16	не обнаружены	не обнаружены
	17	не обнаружены	не обнаружены
	18	не обнаружены	не обнаружены
	19	не обнаружены	не обнаружены
	20	не обнаружены	не обнаружены
	21	не обнаружены	не обнаружены
	22	не обнаружены	не обнаружены
	23	не обнаружены	не обнаружены
	24	не обнаружены	не обнаружены
	25	не обнаружены	не обнаружены
	26	не обнаружены	не обнаружены
	27	не обнаружены	не обнаружены
	28	не обнаружены	не обнаружены
	29	не обнаружены	не обнаружены
	30	не обнаружены	не обнаружены
	31	не обнаружены	не обнаружены
	32	не обнаружены	не обнаружены
	33	не обнаружены	не обнаружены
	34	не обнаружены	не обнаружены
	35	не обнаружены	не обнаружены
	36	не обнаружены	не обнаружены
	37	не обнаружены	не обнаружены
	38	не обнаружены	не обнаружены
	39	обнаружены	обнаружены
Время исследования		5 суток	20 ± 2 ч
Требования ГН от 02.12.2016 №121		не допускаются в не менее 500 см ² -	



Выводы

- Разработанный молекулярно-генетический экспресс-метод выявления *Listeria monocytogenes* в условиях пищевых производств на 2 предприятиях г. Минск и Минской области показал 100 % относительную специфичность.
- Применение разработанного метода на практике позволит в более короткие сроки, чем классические бактериологические методы, выявлять патогенные микроорганизмы вида *Listeria monocytogenes* в смывах с поверхностей объектов технологического окружения пищевых производств.
- Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний населения, ассоциированных с патогенами вида *Listeria monocytogenes*, с целью контроля соблюдения гигиенического норматива, устанавливающего санитарно-эпидемиологические требования к допустимому уровню патогенных микроорганизмов *Listeria monocytogenes* на поверхностях, контактирующих с готовыми к употреблению пищевыми продуктами, а также для реализации производственного контроля наличия патогенных микроорганизмов на объектах технологической среды пищевых производств при изготовлении, реализации, хранении, транспортировке продовольственного сырья и (или) пищевых продуктов с целью мониторинга.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований подтвердили высокую эффективность выбранного формата молекулярно-генетического метода диагностики. Использование метода ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени для выявления эмерджентных патогенов позволяет повысить эффективность проводимого контроля и обеспечивает получение достоверных и сопоставимых результатов при существенном сокращении времени проведения анализа. Применение данного метода позволяет снизить трудоемкость исследований и улучшить качество проводимых анализов.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ