

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Г. С. Скитович¹, Н. Б. Шадрова², О. В. Прунтова³, К. В. Серова⁴

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: skitovich@arriah.ru

² Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shadrova@arriah.ru

³ Главный эксперт, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁴ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: serova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Listeria monocytogenes – один из основных контаминантов пищевых продуктов, вызывающий заболевание, называемое листериоз. По количеству выявленных случаев он значительно уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам, но превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов. Поэтому разработка видоспецифичных методов ПЦР для выявления генома *L. monocytogenes* является актуальной задачей. Оптимизирована методика выявления генома бактерий *L. monocytogenes* посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Мишенью амплификации являлся высокоспецифичный и подходящий для точной качественной оценки всех штаммов ген *iap*, кодирующий поверхностный белок р60 *L. monocytogenes*. Подобрана оптимальная концентрация магния (6 мМ) и температура отжига праймеров (57 °С). Определены чувствительность и специфичность данной методики. Предел обнаружения составил 120 молекул-мишеней. Полученные результаты показывают, что оптимизированный вариант ПЦР-РВ, основанный на амплификации гена *iap*, позволяет выявлять *L. monocytogenes* в пробах продовольственного сырья животного происхождения и пищевых продуктов. Скрининговые исследования на основе оптимизированной ПЦР-РВ обеспечивают быстрые и надежные результаты.

Ключевые слова: ПЦР-РВ, *Listeria monocytogenes*, пищевые продукты животного происхождения.

UDC 619:579.869.1:616-076

REAL-TIME PCR OPTIMIZATION FOR *LISTERIA MONOCYTOGENES* GENOME DETECTION

G. S. Skitovich¹, N. B. Shadrova², O. V. Pruntova³, K. V. Serova⁴

¹ Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: skitovich@arriah.ru

² Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: shadrova@arriah.ru

³ Chief Expert, Doctor of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁴ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: serova@arriah.ru

SUMMARY

Listeria monocytogenes is one of the major food contaminants causing the illness, called Listeriosis. Listeriosis incidence is much less, than the number salmonellosis and campylobacteriosis cases, but the clinical disease is significantly more severe and has a higher mortality. That's why the development of species-specific PCR techniques to detect *L. monocytogenes* genome is a topical task. *L. monocytogenes* bacteria genome detection technique using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was improved. The amplification target was a highly specific and suitable for qualification of all strains *iap* gen, coding *L. monocytogenes* p60 surface protein. Optimum magnesium concentration (6 mM) and primer annealing temperature (57 °C) were selected. The sensitivity and specificity of the technique were identified. Detection threshold was 120 target molecules. The results obtained demonstrate that optimized qRT-PCR version, based on *iap* gen amplification, enables to detect *L. monocytogenes* in animal product and food samples. Optimized qRT-PCR-based screening tests ensure rapid and reliable results.

Key words: qRT-PCR, *Listeria monocytogenes*, food products of animal origin.

ВВЕДЕНИЕ

Listeria monocytogenes – факультативный внутриклеточный патоген, один из основных контаминантов пищевых продуктов, вызывающий редкое, но летальное заболевание, поражающее людей с ослабленным иммунитетом, называемое листериозом. Листериоз не является широко распространенной инфекцией. По количеству выявленных случаев он значительно уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам, но превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов [1]. *L. monocytogenes* обычно сосуществуют с другими видами этого рода, такими как непатогенная *Listeria innocua*, которая может быть использована в качестве индикатора возможного присутствия *L. monocytogenes* в пищевых продуктах [15]. Требования безопасности пищевых продуктов, принятые в большинстве стран, не допускают наличия *L. monocytogenes* [6, 18].

Идентификация *L. monocytogenes* в соответствии с действующими нормативными документами осуществляется традиционными микробиологическими (микроскопия, посев на питательные среды) и серологическими методами (реакция агглютинации, реакция связывания комплемента) [4, 8].

Однако время исследований традиционными методами варьирует от 3–4 дней при отрицательном результате, а для подтверждения положительного результата требуется до 7 дней [24]. Обнаружение *L. monocytogenes* в продуктах животного происхождения микробиологическим методом затруднено из-за высокой концентрации конкурентоспособной микрофлоры, низкого уровня *L. monocytogenes* и наличия ингибирующих листерию пищевых компонентов [23]. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) представляет собой быструю и практичную альтернативу микробиологическому методу. Поэтому разработка видоспецифичных методов ПЦР для выявления генома *L. monocytogenes* является актуальной задачей.

Молекулярные методы, такие как ПЦР, позволяют быстро обнаружить и идентифицировать бактериальные патогены [27]. В литературе приведены результаты по применению нескольких традиционных ПЦР, позволяющих выявлять *L. monocytogenes* [13, 15, 19, 21]. А также описаны варианты ПЦР-РВ для ее обнаружения [2, 12, 16, 26, 28].

При идентификации *L. monocytogenes* в настоящее время в качестве мишеней для ПЦР используют различные гены: 16S и 23S рРНК, *prs*, *gyrB*, *rpoB*, *hly*, *inlA* и *inlB*, *plcA*, *iap* и др. [3, 7, 10, 11, 14, 15, 17, 20, 22, 30].

Целью данного исследования была оптимизация качественной ПЦР-РВ для обнаружения генома *L. monocytogenes* при исследовании пищевых продуктов животного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий. В работе использовали референтные штаммы, полученные из американской коллекции типовых культур (ATCC): *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella sonnei* ATCC 11060, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Yersinia kristensenii* ATCC 35669.

Питательные среды и условия культивирования бактерий. Все референтные штаммы культивировали на колумбийском агаре (производство фирмы HiMedia, Индия) при температуре 37 °С в течение 24 ч.

В качестве среды для первичного обогащения листерий использовали «Питательный бульон для листерий» (ПБЛ) (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск).

Среда для вторичного обогащения – удвоенный ПБЛ (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск).

Образцы пищевых продуктов. При разработке методики использовали 100 образцов пищевых продуктов, поступивших на исследование в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г. Образцы представляли следующие группы продуктов животного происхождения:

- мясо (говядина – 8 проб, свинина – 10 проб, птица – 10 проб);
- полуфабрикаты (мясные – 18 проб, куриные – 7 проб);
- рыба и рыбные продукты – 12 проб;
- молоко пастеризованное – 6 проб;
- масло сливочное – 29 проб.

Подготовка образцов к исследованию. Навеску образца массой 25 г, или объемом 25 см³, подготовленную для исследования, вносили в 225 см³ среды для первичного обогащения листерий. Посевы инкубировали при температуре (30 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. После этапа первичного обогащения 0,1 см³ образца, независимо от наличия изменений среды, добавляли в пробирку, содержащую 10 см³ среды для вторичного обогащения. Инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч. После инкубации отбирали 250 мкл суспензии в полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и использовали для тестирования в ПЦР-РВ.

Выделение и количественное определение ДНК. ДНК выделяли из образцов чистых культур с помощью набора «СОРБ-ГМО-А» («Синтол», Москва) в соответствии с рекомендациями производителя.

Олигонуклеотиды. Праймеры и зонды для идентификации бактерий *L. monocytogenes*, используемые в данной работе и описанные ранее в работе D. Rodríguez-Lázaro и соавт. [25] (GenBank AY174670 – AY174682), были синтезированы фирмой «Синтол». Первичная структура олигонуклеотидов представлена в таблице 1.

Условия проведения ПЦР-РВ. Для постановки ПЦР использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ» («Синтол», Россия). Реакционную смесь собирали из следующих компонентов в расчете на одну пробу объемом 20 мкл: 10х ПЦР-буфер – 2,5 мкл; dNTP 2,5 мМ – 2,5 мкл; MgCl₂ 25 мМ – 2,5 мкл; смесь праймеров и зонда (10 пкмоль/мкл каждого) – 0,75 мкл; SунTaq ДНК-полимераза 5 Е/мкл – 0,5 мкл; ddH₂O – 11,25 мкл.

Для амплификации использовали термостат CFX-96 (Bio-Rad, США), при условиях: 20 с при 95 °С и 45 циклов 20 с при 95 °С, 20 с при 57 °С и 20 с при 72 °С.

Таблица 1
Структура праймеров и зонда [по D. Rodríguez-Lázaro, 2004]

Наименование	Последовательность
<i>iap</i> QF	[5'-AATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAA-3']
<i>iap</i> QR	[5'-CACCTTTGATGGACGTAATAACTGT-3']
<i>iap</i> QProbe (FAM-RTQ1)	[5'-CAACACCAGCGCCACTACGGACG-3']

Определение чувствительности ПЦР-РВ. Для оценки чувствительности праймеров использовали ДНК, выделенную из суспензии референтного штамма *L. monocytogenes* ATCC 19115 с оптической плотностью 1 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует 3×10^8 КОЕ/см³. Концентрацию эталонного штамма подтверждали методом титрования на плотной питательной среде. Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P-360 (Implen, Германия). Разведения ДНК готовили с использованием буфера TE в объеме 100 мкл.

Статистическая обработка данных. Результаты ПЦР-РВ анализировали с помощью программного обеспечения системы v3.1 (CFX Manager Software).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор праймеров. По результатам анализа литературных данных для проведения ПЦР-РВ был выбран ген *iap* (GenBank, № X52268), который кодирует поверхностный белок р60, известный также как гидролаза клеточной стенки [29]. Основанием для выбора явилось то, что этот белок у *L. monocytogenes* имеет две уникальные области последовательностей, отсутствующие у других видов листерий, что делает его высокоспецифичным и подходящим для точной качественной оценки всех штаммов *L. monocytogenes* [1].

Сравнивая *iap*-родственные гены разных видов листерий, А. Vurbert и соавт. [15] определили общие и переменные области в пределах этих генов, специфичных для каждого из видов *Listeria*. Основываясь на этих последовательностях гена *iap*, были разработаны праймеры ПЦР для *L. monocytogenes* (табл. 1) [25].

Оптимизация ПЦР-РВ для специфического обнаружения бактерий *L. monocytogenes*. Оптимизация ПЦР-РВ включает следующие этапы: определение точной температуры отжига праймеров и концентрацию ионов магния, при которых отмечается наивысшая интенсивность ответного флуоресцентного сигнала, при высокой специфичности. Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и обычно варьирует от 55 до 72 °С [9].

Для расчета температуры отжига праймеров использовали формулу

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C),$$

где T_m – температура отжига, °С;

A, T, C, G – нуклеотидные основания [9].

В результате проведенных расчетов были получены температуры отжига 66 °С для прямого и 76 °С для обратного праймеров. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, при написании программы ПЦР выбирается наименьшая. Для определения оптимальной температуры проводили ПЦР-РВ в градиенте $\pm 10^\circ$ С от вычисленной температуры отжига праймеров и концентрации ионов магния от 3 до 6 мМ с шагом 0,5 мМ. В ПЦР получили идентичные результаты с уровнем магния от 4 до 6 мМ и была выбрана концентрация магния 6 мМ. Для всех температур от 56 до 75 °С были получены практически идентичные результаты. При 76 °С наблюдали снижение эффективности реакции. На основании проведенного эксперимента оптимальной была выбрана температура отжига 57 °С.

Оптимизировали концентрации праймеров и зонда для специфичного анализа с использованием тех

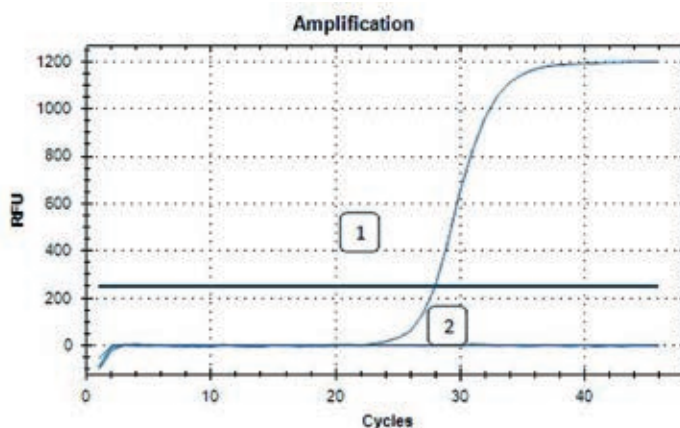


Рис. 1. Амплификация ДНК *L. monocytogenes*

1 – положительный результат; 2 – отрицательный результат.

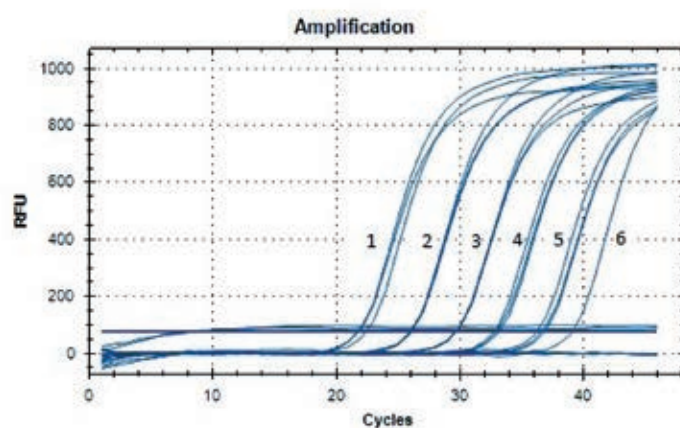


Рис. 2. Определение аналитической чувствительности ПЦР-РВ при идентификации генома *L. monocytogenes* ($n = 3$)

Концентрация бактериальных клеток: 1 – 12×10^5 ; 2 – 12×10^4 ; 3 – 12×10^3 ; 4 – 12×10^2 ; 5 – 120; 6 – 12.

же циклов, что и для разработанного ранее анализа ПЦР-РВ [5]. Оптимальные условия, которые показывают наименьшее значение для порогового цикла (C_t) с наименьшими концентрациями праймеров и зонда (рис. 1), указаны в материалах и методах.

Определение чувствительности оптимизированной ПЦР-РВ. Важной характеристикой разработанного ПЦР-протокола является его чувствительность. Для оценки чувствительности реакции использовали выделенную ДНК, концентрация которой составила 4 нг/мкл.

В соответствии со средним размером генома различных исследуемых микроорганизмов 1 нг геномной ДНК соответствует как минимум 3×10^5 клеткам [28]. Таким образом, концентрация ДНК 4 нг/мкл соответствует приблизительно 12×10^5 бактериальным клеткам.

Чувствительность ПЦР-РВ определяли путем постановки реакций 10-кратных разведений выделенной ДНК, начиная с максимальной, равной 4 нг/мкл, и до 4×10^{-6} нг/мкл, что соответствует 1,2 бактериальной клетки в реакции. Реакцию амплификации проводили в трех повторностях (рис. 2).

Полученные результаты показали, что оптимизированный вариант ПЦР-РВ позволяет выявлять геном *L. monocytogenes* при содержании 120 бактериальных

Таблица 2
Предел обнаружения штамма *L. monocytogenes* ATCC 19115 в ПЦР-РВ
 (n = 3)

Образец	Среднее значение C _q	Стандартное отклонение C _q	Конечные ОЕФ	Результат
Neg Ctrl	0,00	0,000	-1,45	(-) Negative
12 × 10 ⁵	21,61	0,260	970	(+) Positive
12 × 10 ⁴	26,03	0,072	1072	(+) Positive
12 × 10 ³	29,67	0,040	1045	(+) Positive
12 × 10 ²	33,00	0,170	1004	(+) Positive
120	36,59	0,346	940	(+) Positive
12	39,04	0,000	0,196	(-) Negative
1,2	0,00	0,000	-1,55	(-) Negative

клеток в образце, что согласуется с данными других исследователей [12, 25]. Содержание в образце ДНК *L. monocytogenes*, соответствующее приблизительно 12 бактериальным клеткам, выявили только в одной ПЦР-РВ из трех проведенных (табл. 2).

Определение специфичности. Специфичность праймеров тестировали с использованием целевого (*L. monocytogenes*) и 13 нецелевых штаммов бактерий (табл. 3). В реакции был идентифицирован только целевой штамм *L. monocytogenes*. Не было зафиксировано ни одного ложноположительного результата, что подтверждает видоспецифичность предложенного варианта ПЦР-РВ.

Выявление генома бактерий *L. monocytogenes* в продуктах животного происхождения. С использовани-

ем оптимизированной ПЦР-РВ исследовали 100 проб продуктов животного происхождения (табл. 4), которые также были протестированы и традиционным микробиологическим методом. Геном *L. monocytogenes* был выявлен в 16% образцов. При исследовании тех же проб микробиологическим методом положительными оказались только 8% проб. Различие в результатах исследований можно объяснить способностью ПЦР выявлять генетический материал не только живых микроорганизмов, но и погибших, в отличие от микробиологического метода, с помощью которого можно обнаружить только живые микроорганизмы.

Результаты показали, что скрининговые исследования на основе оптимизированной ПЦР-РВ обеспечивают быстрые и надежные результаты.

Таблица 3
Определение специфичности праймеров для выявления генома *L. monocytogenes*

№ п/п	Вид бактерий	Штамм	Оценка по Граму	Праймеры <i>iap</i>
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	+	+
2	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	+	-
3	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	+	-
4	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	+	-
5	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	+	-
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	+	-
7	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-
8	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393	+	-
9	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	-	-
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-
11	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	-	-
12	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 P	+	-
14	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	-	-

Таблица 4
Определение *L. monocytogenes* в образцах пищевых продуктов микробиологическим методом и ПЦР-РВ

№ п/п	Наименование образца	Количество проб	Количество положительных проб	
			ПЦР-РВ	микробиологический метод
1	Говядина	8	4 (50%)	1 (12%)
2	Свинина	10	2 (20%)	1 (10%)
3	Полуфабрикаты мясные	18	4 (22%)	3 (17%)
4	Птица	10	3 (30%)	2 (20%)
5	Полуфабрикаты куриные	7	3 (43%)	1 (14%)
6	Рыба и рыбные продукты	12	0	0
7	Молоко пастеризованное	6	0	0
8	Масло сливочное	29	0	0
Всего		100	16 (16%)	8 (8%)

Основным преимуществом использования оптимизированной ПЦР-РВ для скрининговых исследований является возможность быстрого выявления образцов, являющихся отрицательными по контролируемому патогенному организму, т. е. по наличию в нем генома *L. monocytogenes*. Однако этот метод не позволяет отличать жизнеспособные бактериальные клетки от нежизнеспособных. Поэтому положительные результаты, полученные в ПЦР-РВ, обязательно должны быть подтверждены микробиологическим методом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимизирована ПЦР-РВ для выявления генома *L. monocytogenes*. Определены аналитическая чувствительность и специфичность ПЦР-РВ, установлен предел обнаружения генома *L. monocytogenes* 120 молекул мишеней в исследуемом образце.

Показана возможность применения оптимизированной ПЦР-РВ для выявления генома *L. monocytogenes* в образцах продуктов животного происхождения при скрининговых исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бхуниа А. К. Патогенные микроорганизмы пищевых продуктов. – СПб.: Профессия, 2014. – 342 с.
2. Васильев Д. А., Ковалева Е. Н., Мастиленко А. В. Идентификация бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* методом мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» // Биотика. – 2014. – № 1 (1). – С. 3–6.
3. Зайцева Е. А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоковирулентных штаммов *Listeria monocytogenes*: дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2010. – 270 с.
4. Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей: утв. начальником ГУВ Госагропрома СССР А. Д. Третьяковым от 13 февраля 1987 г. – URL: http://www.libussr.ru/doc_usstr/usgr_13807.htm (дата обращения: 05.02.18).
5. Методические указания по выявлению генома *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах с помощью ПЦР-РВ / А. В. Пискунов, О. В. Прунтова; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2013. – 17 с.
6. Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яйцопродуктов: пер. с англ. / под ред. Дж. К. Мида. – СПб.: Профессия, 2008. – 384 с.
7. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* / Т. И. Карпова, С. А. Ермолаева, И. В. Лопырев [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 266–273.
8. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*: ГОСТ 32031-2012. – М.: Стандартинформ, 2014. – 47 с.

9. Рекомендации по постановке ПЦР / Евроген. – Вер. 18 сентября 2017 г. – URL: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf> (дата обращения: 05.02.18).

10. Тартаковский И. С., Малеев В. В., Ермолаева С. А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. – М.: Медицина для всех, 2002. – 200 с.

11. A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus / A. Lehner, S. Loncarevic, M. Wagner [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 1999. – Vol. 34, No. 3. – P. 165–171.

12. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk / H. K. Nogva, K. Rudi, K. Naterstad [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, No. 10. – P. 4266–4271; doi: 10.1128/AEM.66.10.4266-4271.2000.

13. Application of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous confirmation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria species* in turkey sample surveillance / I. V. Wesley, K. M. Harmon, J. S. Dickson, A. R. Schwartz // J. Food Prot. – 2002. – Vol. 65, No. 5. – P. 780–785.

14. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria species* / B. Sallen, A. Rajoharison, S. Desvarenne [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1996. – Vol. 46, No. 3. – P. 669–674; doi: 10.1099/00207713-46-3-669.

15. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR / A. Bubert, I. Hein, M. Rauch [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, No. 10. – P. 4688–4692.

16. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay / I. Hein, D. Klein, A. Lehner [et al.] // Res. Microbiol. – 2001. – Vol. 152, No. 1. – P. 37–46; [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01166-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01166-9).

17. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR / M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, No. 8. – P. 3819–3822; doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.

18. Gallagher D. L., Ebel E. D., Kause J. R. Draft FSIS Risk Assessment for *Listeria* in Ready-to-eat Meat and Poultry Products. – Washington, 2003. – URL: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.198.7563&rep=rep1&type=pdf> (дата обращения: 05.02.18).

19. Lawrence L. M., Gilmour A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60, No. 12. – P. 4600–4604.

20. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages / R. Meinersmann, R. W. Phillips, M. Wiedmann, M. E. Berrang // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, No. 4. – P. 2193–2203; doi: 10.1128/AEM.70.4.2193-2203.2004.

21. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food / N. S. Bansal, F. H. McDonell, A. Smith [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 1996. – Vol. 33, No. 2–3. – P. 293–300; [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01161-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01161-0).

22. Nightingale K., Windham K., Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, No. 16. – P. 5537–5551; doi: 10.1128/JB.187.16.5537-5551.2005.

23. Norton D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: Toward real-time screening for food and environmental samples // *J. AOAC Int.* – 2002. – Vol. 85, No. 2. – P. 505–515.

24. Paoli G. C., Bhunia A. K., Bayles D. O. *Listeria monocytogenes* // *Food-borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology* / ed. P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, J. L. Smith. – Norfolk: Caister Academic, 2005. – P. 295–325.

25. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology / D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, M. Scortti [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, No. 3. – P. 1366–1377; doi: 10.1128/AEM.70.3.1366-1377.2004.

26. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction / A. J. Hough, S. A. Harbison, M. G. Savill [et al.] // *J. Food Prot.* – 2002. – Vol. 65, No. 8. – P. 1329–1332.

27. Rijpens N. P., Herman L. M. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens // *J. AOAC Int.* – 2002. – Vol. 85, No. 4. – P. 984–995.

28. Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 233, No. 2. – P. 257–267; https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09490.x.

29. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes* / S. Köhler, M. Leimeister-Wächter, T. Chakraborty [et al.] // *Infect. Immun.* – 1990. – Vol. 58, No. 6. – P. 1943–1650.

30. σ^B -dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment / D. Sue, D. Fink, M. Wiedmann, K. J. Boor // *Microbiology.* – 2004. – Vol. 150 (Pt. 11). – P. 3843–3855; doi: 10.1099/mic.0.27257-0.

REFERENCES

- Bkhuia A. K. Pathogenic Microorganisms of Food Products. SPb.: Professia, 2014 (in Russian).
- Vasiliev D. A., Kovaleva Ye. N., Mastilenko A. V. Identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* bacteria species by multiplex real-time PCR. Biotika. 2014; 1 (1): 3–6 (in Russian).
- Zaitseva Ye. A. Microbiological and molecular and genetic marker analysis system for detection of highly virulent *Listeria monocytogenes* strains: Doctorate thesis (Medical Science). M., 2010 (in Russian).
- Guidelines on laboratory diagnostics of human and animal listeriosis: Approved by Head of Main Veterinary Department of the USSR Gosagroprom A. D. Tretyakov on February 13, 1987. URL: http://www.libussr.ru/doc_ussr/ussr_13807.htm (request date: 05.02.18) (in Russian).
- Guidelines on *Listeria monocytogenes* genome detection in foodstuffs by qRT-PCR. A. V. Piskunov, O. V. Pruntova; FGBI "ARRIAH". Vladimir, 2013 (in Russian).
- Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs: Translation from English. Ed. G. C. Mead. SPb.: Professia, 2008 (in Russian).
- New techniques of *Listeria monocytogenes* identification. T. I. Karpova, S. A. Yermolayeva, I. V. Lopyrev [et al.]. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 3 (3): 266–273 (in Russian).
- Food Products. *Listeria monocytogenes* Bacteria Detection Techniques: GOST 32031-2012. M.: Standartinform, 2014 (in Russian).
- PCR Design Recommendations. Evrogen. – September 18, 2017. – URL: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf> (request date: 05.02.18) (in Russian).
- Tartakovskiy I. S., Maleyev V. V., Yermolayeva S. A. Listeria: Role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. M.: Meditsina dlya vseh, 2002 (in Russian).
- A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus. A. Lehner, S. Loncarevic, M. Wagner [et al.]. *J. Microbiol. Methods*. 1999; 34 (3): 165–171.
- Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. H. K. Nogva, K. Rudi, K. Naterstad [et al.]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66 (10): 4266–4271; doi: 10.1128/AEM.66.10.4266-4271.2000.
- Application of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous confirmation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in turkey sample surveillance. I. V. Wesley, K. M. Harmon, J. S. Dickson, A. R. Schwartz. *J. Food Prot.* 2002; 65 (5): 780–785.
- Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. B. Sallen, A. Rajoharison, S. Desvarenne [et al.]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996; 46 (3): 669–674; doi: 10.1099/00207713-46-3-669.
- Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. A. Bubert, I. Hein, M. Rauch [et al.]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65 (10): 4688–4692.
- Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. I. Hein, D. Klein, A. Lehner [et al.]. *Res. Microbiol.* 2001; 152 (1): 37–46; https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01166-9.
- Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser [et al.]. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (8): 3819–3822; doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.
- Gallagher D. L., Ebel E. D., Kause J. R. Draft FSIS Risk Assessment for *Listeria* in Ready-to-eat Meat and Poultry Products. Washington, 2003. URL: <http://citeserx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.198.7563&rep=rep1&type=pdf> (дата обращения: 05.02.18).
- Lawrence L. M., Gilmour A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60 (12): 4600–4604.
- Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. R. Meinersmann, R. W. Phillips, M. Wiedmann, M. E. Berrang. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 (4): 2193–2203; doi: 10.1128/AEM.70.4.2193-2203.2004.
- Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. N. S. Bansal, F. H. McDonell, A. Smith [et al.]. *Int. J. Food Microbiol.* 1996; 33 (2–3): 293–300; https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01161-0.
- Nightingale K., Windham K., Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J. Bacteriol.* 2005; 187 (16): 5537–5551; doi: 10.1128/JB.187.16.5537-5551.2005.
- Norton D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: Toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.* 2002; 85 (2): 505–515.
- Paoli G. C., Bhunia A. K., Bayles D. O. *Listeria monocytogenes* // *Food-borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Ed. P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, J. L. Smith. Norfolk: Caister Academic, 2005: 295–325.
- Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, M. Scortti [et al.]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 (3): 1366–1377; doi: 10.1128/AEM.70.3.1366-1377.2004.
- Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. A. J. Hough, S. A. Harbison, M. G. Savill [et al.]. *J. Food Prot.* 2002; 65 (8): 1329–1332.
- Rijpens N. P., Herman L. M. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J. AOAC Int.* 2002; 85 (4): 984–995.
- Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 233 (2): 257–267; https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09490.x.
- The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. S. Köhler, M. Leimeister-Wächter, T. Chakraborty [et al.]. *Infect. Immun.* 1990; 58 (6): 1943–1650.
- σ^B -dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. D. Sue, D. Fink, M. Wiedmann, K. J. Boor. *Microbiology.* 2004; 150 (Pt. 11): 3843–3855; doi: 10.1099/mic.0.27257-0.

Поступила 09.02.18
Принята в печать 06.08.18