

Экспрессные методы при исследовании пищевых продуктов

Л.А.Краева¹, Е.В.Смирнова², И.А.Деревянченко²

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Заболеемость населения Российской Федерации острыми кишечными инфекциями продолжает оставаться причиной значительного социального и многомиллиардного экономического ущерба. При этом этиологический фактор заболеваний удается установить лишь в одной трети случаев. Поскольку основным путем передачи острых кишечных инфекций является пищевой путь, а факторами передачи – продукты питания, то вполне обоснована все возрастающая необходимость в разработке и использовании для контроля пищевых продуктов быстрых и эффективных методов микробиологической диагностики.

В настоящее время они представлены в нескольких вариантах: полностью автоматизированные системы и приборы для микробиологической диагностики пищевых продуктов; ручные тесты; приборы и ручные тесты для ускорения отдельных этапов микробиологической диагностики. В основе всех представленных разработок лежат различные методы.

Полностью автоматизированные системы и приборы для микробиологической диагностики пищевых продуктов имеют высокую производительность (до нескольких сотен анализов одновременно), что очень удобно и востребовано в крупных лабораториях. При большой цене приборов экономическая эффективность от их использования в таких лабораториях также высока. Для лабораторий с небольшим потоком проб на исследование более предпочтительными являются ручные тесты или наборы, а также питательные среды для микробиологической диагностики пищевых продуктов или для ускорения отдельных ее этапов.

Высокие показатели качества и скорости анализа пищевых продуктов являются необходимым условием для снижения заболеваемости, обусловленной потреблением недоброкачественной в микробиологическом плане пищи, и экономического ущерба от заболеваний.

Ключевые слова: пищевые продукты, экспрессные методы, лабораторная диагностика

Для цитирования: Краева Л.А., Смирнова Е.В., Деревянченко И.А. Экспрессные методы при исследовании пищевых продуктов. Бактериология. 2020; 5(4): 52–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-52-59

Rapid methods in the study of food

L.A.Kraeva¹, E.V.Smirnova², I.A.Derevyanchenko²

¹St.-Petersburg Pasteur Institute, St.-Petersburg, Russian Federation;

²Eastern Branch of the Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg, St.-Petersburg, Russian Federation

The incidence of acute intestinal infections among the population of the Russian Federation continues to cause significant social and multibillion-ruble economic damage. At the same time, the etiological factor of diseases can be established only in one third of cases. Since the main route of transmission of acute intestinal infections is the food pathway, and the factors of transmission are food, it is quite justified that there is an increasing need to develop and use fast and effective methods of microbiological diagnostics for food control.

Currently, they are presented in several versions: fully automated systems and devices for microbiological diagnostics of food products; manual tests for microbiological diagnostics of food products; devices and manual tests to speed up some stages of microbiological diagnostics. All the presented developments are based on various methods.

Fully automated systems and devices for microbiological diagnostics of food products have a very high productivity (up to several hundred analyses at a time), which is very convenient and in demand in large laboratories. With the high price of devices, the economic efficiency of their use in such laboratories is also high. For laboratories with a small flow of samples for research, manual tests or kits are more preferable, as well as nutrient media for microbiological diagnostics of food products or to speed up its some stages.

High quality and speed of food analysis are essential for reducing morbidity due to consumption of poor quality in microbiological terms of food and economic loss from diseases.

Key words: food products, express methods, laboratory diagnostics

For citation: Kraeva L.A., Smirnova E.V., Derevyanchenko I.A. Rapid methods in the study of food. Bacteriology. 2020; 5(4): 52–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-52-59

Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

Статья поступила 07.09.2020 г., принята к печати 25.12.2020 г.

For correspondence:

Liudmila A. Kraeva, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of medical bacteriology, St.-Petersburg Pasteur Institute

Address: 14 Mira str., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation

Phone: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

The article was received 07.09.2020, accepted for publication 25.12.2020

По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году» отмечается, что острые кишечные инфекции (ОКИ) неустановленной этиологии находятся на втором месте в рейтинге инфекционных болезней по величине экономического ущерба. Так, экономический ущерб от ОКИ, сальмонеллез, бактериальной дизентерии (шигеллеза), псевдотуберкулеза, брюшного тифа, паратифов А, В и С составил в 2019 г. более 27 млрд рублей. В 2019 г. в Российской Федерации зарегистрировано 780 497 случаев ОКИ, причем только 37,1% из них составили заболевания с установленной этиологией. В то же время в документе указывается, что около 4% проб пищевой продукции не соответствовало гигиеническим нормативам при исследовании на предмет микробиологической безопасности. А удельный вес готовых блюд, не отвечающих гигиеническим требованиям, колеблется в различных субъектах РФ до от 2 до 12%.

Очень большое значение для производителей и реализаторов продуктов питания имеет скорость исследования на микробиологическую безопасность. Качество и скорость анализа пищевых продуктов – залог снижения заболеваемости, обусловленной потреблением недоброкачественной в микробиологическом плане пищи, и экономического ущерба от заболеваний. Поэтому при исследовании пищевых продуктов на первое место выходят экспрессные методы исследования. В настоящее время они представлены в нескольких вариантах.

В крупных лабораториях для анализа большого количества проб могут быть использованы **полностью автоматизированные системы и приборы для микробиологической диагностики пищевых продуктов**.

Одним из первых методов, успешно примененным в экспрессной микробиологии пищевых продуктов, является **импедансный метод**. В 1977 г. он был впервые испробован на клинических образцах, что позволило получать данные о бактериальной обсемененности биологической пробы в течение 2,5 ч [1]. В 1998 г. были опубликованы первые результаты и перспективы использования этого метода при оценке качества пищевых продуктов [2], а чуть позже, в 1999 г., импедансный метод уже использовался для выявления контаминации сырья и продуктов питания на всех этапах технологического процесса [3]. Спустя десятилетие ученые разработали портативные биосенсоры на основе импеданса для оценки качества молока [4]. В то же время другая группа исследователей разработала биосенсоры с использованием этого же метода для исследования любых пищевых продуктов, причем без предварительной обработки изучаемых проб [5]. При сравнении нескольких быстрых методов исследования пищевой продукции установлено, что метод импеданса позволяет быстро и качественно выявлять бактериальную загрязненность в пробе. Этот метод может быть использован для скрининга больших партий пищевой продукции [6] и выявления штаммов *Escherichia coli* O157:H7 в образцах пищевых продуктов [7].

Импедансная микробиология – это непрямой культуральный метод обнаружения микроорганизмов путем определения электрического импеданса. В последние годы данный метод быстро приобрел спрос именно благодаря своей уни-

версальности и надежности. Экспресс-анализаторы «БакТрак 4300», «БиоТрак 4250», созданные на основе импедансного метода, в настоящее время нашли применение при оценке качества пищевой продукции. Производитель указанных анализаторов – австрийская компания «SY-LAB Geraete GmbH», а ее представитель и дочерняя фирма в РФ – ООО «СИ-ЛАБ».

Принцип действия микробиологических анализаторов «БакТрак 4300» и «БиоТрак 4250» основан на методе измерения импеданса. В процессе метаболизма микроорганизмы расщепляют питательные вещества с образованием низкомолекулярных заряженных молекул, которые меняют проводимость жидких питательных сред путем снижения их сопротивления. В питательной среде такое изменение может быть технически измерено с использованием как минимум двух электродов. Импедансный анализ является динамическим процессом, то есть он отображает метаболическую активность растущих микроорганизмов во времени. Микробиологический анализатор «БакТрак 4300» регистрирует два параметра: М-параметр (импеданс среды) и Е-параметр (электродный импеданс), которые могут учитываться отдельно или в комбинации. Использование метода разделения импеданса для регистрации роста микроорганизмов обеспечивает универсальность использования прибора. В нем можно устанавливать одновременно две независимые температуры. Каждая температурная зона имеет 32 измерительных места, что дает возможность исследовать одновременно 64 образца. При необходимости увеличения количества проб для исследования возможно подключение дополнительного модуля прибора на 64 образца. Компьютерная программа позволяет управлять работой 12 модулей; это позволяет одновременно исследовать 768 образцов. Измерительная система прибора высоко чувствительна к микробным метаболитам и позволяет проводить измерения в селективных питательных средах с высоким содержанием солей, что особенно важно для обнаружения патогенных микроорганизмов.

В течение всего нескольких часов (в зависимости от вида патогена) экспресс-анализатор «БакТрак 4300» позволяет выявлять в пробе ряд микроорганизмов: аэробные мезофильные микроорганизмы, психрофильные, термофильные микроорганизмы, энтеробактерии, энтерококки, *Pseudomonas* spp., колиформные бактерии, *E. coli*, сальмонеллы, листерии, лактобациллы, аэробные спорообразующие бактерии, *Staphylococcus aureus*, бактерии, вызывающие порчу пива, клостридии, дрожжи и плесени.

Бактериологический анализатор «БиоТрак 4250» предназначен для относительно малых объемов санитарно-бактериологических исследований, имеющих целью оценку стерильности и обсемененности микроорганизмами различных объектов. Рациональное использование экспресс-анализатора позволяет мониторировать в режиме реального времени динамику роста культур бактерий, обсеменяющих значимые в санитарном отношении объекты. Эта компактная система отвечает всем современным требованиям в области обеспечения безопасности и контроля качества готовой продукции и позволяет одновременно анализировать до 21 образца. Прибор «БиоТрак 4250» позволяет автоматически определять основные санитарно-значимые

показатели. Основным преимуществом микробиологического анализатора «БиоТрак 4250» является автоматическая регистрация и обработка результатов. Это позволяет получать объективные результаты, сократить время исследования, уменьшить трудозатраты и значительно снизить себестоимость анализа. Также несомненным достоинством данного прибора является его портативность и компактность.

Эта модель прибора позволяет выявлять в пробах следующие микроорганизмы: аэробные мезофильные микроорганизмы, психрофильные, термофильные микроорганизмы, грамотрицательные бактерии, энтеробактерии, колиформные бактерии, *E. coli*, сальмонеллы, *Pseudomonas* spp., аэробные спорообразующие бактерии, дрожжи и плесени.

При этом исследуемый образец вносится в измерительную ячейку с питательной средой. Если образец имеет плотную структуру, он должен быть предварительно гомогенизирован. Измерительные ячейки помещаются в инкубаторный блок, на приборе устанавливаются параметры измерения. Далее процесс анализа происходит автоматически. Время анализа обычно составляет около 24 ч. При более высокой микробной загрязненности образцов результат может быть получен в течение нескольких часов.

Микробиологический анализатор управляется встроенным портативным компьютером с удобным программным обеспечением в среде Windows. Программное обеспечение позволяет получать полную информацию о процессе измерения и о текущем состоянии каждого образца. Цветная диаграмма состояния каждой ячейки позволяет легко оценивать результаты измерения. Имеется возможность сохранения условий анализа, параметров и калибровочных зависимостей для каждого образца. Универсальная компьютерная программа позволяет совмещать и обмениваться данными с другими программными продуктами.

На базе Федерального центра Госсанэпиднадзора проведены аттестационные испытания, разработаны и утверждены методические указания для проведения бактериологических исследований с использованием экспресс-анализаторов серии «БакТрак» в соответствии с медико-биологическими требованиями и САНПиНом 2.1.4.1074-01. МУК 4.2.2578-10 «Санитарно-бактериологические исследования методом разделенного импеданса» разработаны для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также мониторинг их микробной загрязненности; лабораторий других организаций, аккредитованных в установленном порядке на проведение исследований продовольственного сырья и пищевых продуктов; организаций, независимо от форм собственности осуществляющих производственный контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов в процессе промышленного производства и оборота продукции. «БакТрак 4300» и расходные материалы к нему зарегистрированы Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Приборы «БакТрак 4300» и «БиоТрак 4250» внесены в Реестр средств измерений как кондуктометрические анализаторы для микробиологических исследований.

На основе **калориметрического метода** разработаны и выпущены несколько автоматизированных систем для исследования продуктов питания и напитков. Так, компанией «bioMérieux» выпущена простая, полностью **автоматизированная система быстрого выявления микроорганизмов**, позволяющая определять загрязнение бактериями, дрожжами и плесневыми грибами во многих продуктах питания и напитках, – «BACT/ALERT® 3D». Эта система и оптимизированный для производств диапазон питательных сред обеспечивают выявление широкого спектра микроорганизмов в течение 24–72 ч. Снижение времени определения дрожжей сокращает производственный цикл и ускоряет выпуск продуктов. Эта система не только сокращает сроки выпуска продукта на рынок, но и обеспечивает экономичное производство. Контроль процесса производства в режиме реального времени дает ценную информацию для принятия оперативных решений. Короткое время определения микроорганизмов позволяет предпринять корректирующие действия и надлежащим образом устранять случаи контаминации.

Стандартная система «BACT/ALERT®» состоит из управляющего и инкубационного модулей. Система позволяет одновременно инкубировать и определять микробное загрязнение в 240 отдельных образцах. Модульный дизайн позволяет добавлять до шести инкубационных модулей к одному управляющему модулю, регулируя систему в соответствии со своими задачами.

Каждый флакон «BACT/ALERT®» содержит стерильную питательную среду и оснащен колориметрическим датчиком, который в присутствии CO₂, вырабатываемого растущими микроорганизмами, меняет цвет с серого на желтый. После загрузки флаконов колориметрические датчики подвергаются сканированию каждые десять минут. При определении роста микроорганизмов в системе срабатывают звуковые и визуальные предупредительные сигналы и регистрируются данные образца.

Основные достоинства модульной конструкции «BACT/ALERT®» – **простота использования**, объективные результаты, воспроизводимость и прослеживаемость. Поэтому, начиная с повышения производительности лабораторий и заканчивая сокращением сроков карантинного хранения продукта, система «BACT/ALERT®» имеет большое значение на многих этапах организации производства пищевых продуктов.

Работа с помощью системы «BACT/ALERT® 3D» представляет собой простой, стандартизированный рабочий процесс, который многократно сокращает длительность ручных операций и трудовых затрат, позволяет получать объективные результаты даже при анализе вязких или мутных образцов. При этом система достоверно определяет бактерии, дрожжи и плесневые грибы, не разрушая сам образец. В системе «BACT/ALERT® Dual-T» доступны две температуры инкубации (32,5 и 22,5°C). В ней возможно исследование продуктов и напитков с низкой и высокой кислотностью.

При сравнительном исследовании различных автоматизированных систем для выявления микроорганизмов было установлено, что «BACT/ALERT® 3D» отличается относительно невысокой ценой, надежностью и простотой в обслуживании [8].

Следующая инновационная разработка на основе колориметрической идентификации – анализатор «VITEK 2

Compact». Это полностью автоматизированная система, гарантирующая превосходное качество рутинного процесса идентификации микроорганизмов. Она отличается повышенной производительностью за счет автоматической идентификации. В результате проведенных многочисленных независимых исследований было установлено, что 98,3% микроорганизмов были правильно идентифицированы с помощью анализатора «VITEK 2 Compact» [9]. Этот прибор включает обширную идентификационную базу данных, позволяющую выявлять широкий спектр микроорганизмов. Все стадии идентификации, от считывания показаний прибора до регистрации результатов, автоматизированы, что позволяет оптимизировать рабочий процесс. Поскольку в процессе работы системы используются карты со штрих-кодами, обеспечивается полная прослеживаемость и сводится к минимуму риск ошибок считывания.

Система считывает карты VITEK последнего поколения, содержащие 64 лунки, каждые 15 мин при трех различных длинах волн для обеспечения точности. Этот метод позволяет проанализировать больше данных, что повышает точность результатов. Время до получения результата составляет от 2 до 18 ч (в зависимости от вида микроорганизма). Так, например, результаты по грамотрицательным бактериям или грамположительным коккам могут быть готовы через 2–8 ч, по анаэробным бактериям – в течение 6 ч, а дрожжеподобным грибам – через 18 ч. Программное обеспечение «VITEK® 2 Compact» предельно понятно и не требует большого количества времени для обучения, что повышает производительность.

Основными преимуществами «VITEK® 2 Compact» для идентификации микроорганизмов являются: повышенная производительность и безопасность за счет автоматизации, быстрота получения результатов, высочайшая точность, соответствие стандартам BAM и ISO 7218, возможность создавать свою базу данных, интуитивно понятные система и программное обеспечение, полная прослеживаемость анализируемой пробы благодаря картам со штрих-кодом.

В последние годы большую популярность приобрела **технология фермент-связанного флуоресцентного анализа (ELFA)**. В 2010 г. эта технология и прибор на ее основе были испытаны при исследовании материала на клостридии [10], а в 2013 г. эта методология была признана лучшей при исследовании продуктов питания на наличие листерий [11]. Компания «bioMérieux» выпустила автоматизированную систему для выявления патогенных микроорганизмов в продуктах питания «VIDAS® UP». Эта система предусматривает быстрые и упрощенные протоколы в сочетании с признанной надежностью «VIDAS®». Протоколы созданы на основе новейшего метода рекомбинантных фаговых белков.

Компанией «bioMérieux» производится целая линейка приборов «VIDAS», характеризующихся широким спектром решаемых задач, высокой скоростью идентификации (от нескольких часов до 48 ч), высокой специфичностью и полной автоматизацией. Так, с помощью системы «VIDAS» можно выявлять штаммы сальмонелл, листерий, *E. coli* O157 (включая H7), кампилобактер, стафилококковые энтеротоксины. При этом тест «VIDAS UP» для определения *E. coli* O157 (включая H7) является самым быстрым мето-

дом скрининга данного микроорганизма, позволяющим получать результаты менее чем за 8 ч.

Еще одной недорогой и быстрой альтернативой стандартным культуральным методам является следующая разработка компании «bioMérieux» – «Система TEMPO®», использующая **специальные питательные среды TEMPO с флуоресцентным индикатором**.

Для выполнения количественного учета микроорганизмов система требует наличия двух эргономичных рабочих станций: станции пробоподготовки и станции учета результатов. На станции учета результатов определяется количество (КОЕ/г) исходного продукта. На основании количества и размера положительных лунок (флуоресцирующих или нефлуоресцирующих) прибор «TEMPO®» рассчитывает количество микроорганизмов в исходном образце с помощью статистических методов.

Разработанная система была апробирована при исследовании образцов на наличие энтеробактерий. Результаты были выполнены качественно и получены через 24 ч [12]. При исследовании соевых продуктов с помощью системы «TEMPO®» также были получены достоверные результаты о наличии различных микроорганизмов в пробах [13]. При сравнении различных методов исследования молока были получены результаты, доказывающие преимущество системы «TEMPO®» [14].

Указанная система позволяет за 24 ч выявлять и определять количество энтеробактерий, колиформных бактерий, в том числе *E. coli*, аэробных мезофильных микроорганизмов, стафилококков, *Bacillus cereus*; 40–48 ч необходимо для выявления молочнокислых бактерий и 72–76 ч – для дрожжей и плесневых грибов.

Цитометрический метод обнаружения и подсчета микроорганизмов в режиме реального времени завоевал большую популярность в клинической практике. В последние годы компания «bioMérieux» выпустила аналитические анализаторы на основе цитометрии для санитарной микробиологии.

Анализатор для проточной цитометрии «CHEMUNEX®» – это система выявления микроорганизмов в режиме реального времени, полностью автоматизированная. При сравнении различных методов анализатор «CHEMUNEX®» показал наилучшие результаты по скорости выявления микроорганизмов и чувствительности метода [15].

Методика маркировки клеток «CHEMUNEX» обеспечивает маркировку всех жизнеспособных микроорганизмов, включая растущие в условиях стресса (например, в технической воде, лишенной питательных веществ) или при наличии ингибиторов роста. Автоматические, сверхбыстрые анализаторы «CHEMUNEX» с чрезвычайно высокой чувствительностью осуществляют непосредственную маркировку и поклеточный подсчет микроорганизмов. Получение результатов возможно в течение нескольких минут, иногда – через 24 ч (50 ч для плесневых грибов). Это анализатор с высокой пропускной способностью: он позволяет обрабатывать до 48 образцов на партию или 50 тестов/час. При этом происходит автоматическая маркировка и учет результатов.

Быстрое получение информации о микробной загрязненности пробы помогает сократить продолжительность производственного цикла за счет сокращения сроков карантинно-

го хранения конечного продукта. Поэтому продукция, не отвечающая должным спецификациям, может быть забракована до ее помещения в упаковки, что позволит снизить риск поступления некачественного продукта в реализацию.

Еще один автоматический анализатор по обнаружению и подсчету микроорганизмов в режиме реального времени – система «SCANRDI®».

Работа системы «SCANRDI®» основана на **методе твердофазной цитометрии**: комбинации флуоресцентной маркировки клеток и лазерного сканирования. Все жизнеспособные микроорганизмы маркируются передовой системой реактивов, которая за счет ферментативного расщепления высвобождает свободный флуорохром в цитоплазме всех метаболически активных (жизнеспособных) клеток. Система «SCANRDI®» выявляет все микроорганизмы, меченные реактивами Fluoaasure.

Микроорганизмы фильтруются на специальной мембране, к которой добавляют раствор для флуоресцентной маркировки всех жизнеспособных клеток. Меньше чем через 3 мин под действием лазерного излучения определяются все жизнеспособные клетки, фиксированные на одноуровневой мембране (диаметр пор 0,22 мкм). Результат прямого подсчета жизнеспособных клеток мгновенно отображается на карте сканирования, что позволяет определять точное расположение каждого микроорганизма на мембране.

Эта передовая технология идеально подходит для контроля процесса производства и конечного продукта, дает достоверные результаты уже в течение 90 мин и позволяет выявлять все жизнеспособные микроорганизмы, такие как бактерии, споры бактерий, дрожжевые, плесневые грибы и их споры. Благодаря своей совершенной чувствительности прибор «SCANRDI®» способен обнаружить единственную жизнеспособную клетку в одном образце. Этот метод и прибор для его осуществления признан лучшим по чувствительности и скорости получения результата [16].

Через три часа с момента забора образцов до получения результатов можно узнать, следует ли продолжить производство или реализацию данного продукта или нужно немедленно принять меры к приостановке. Таким образом, с помощью этой системы можно получать результат не в ретроспективе, а в режиме реального времени.

Кроме фенотипических тестов выявления патогенов в продуктах питания, специалистами компании «bioMérieux» усовершенствован молекулярный метод на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и выпущен продукт «GENE-UP®». Он позволяет быстро получать надежные результаты при выявлении патогенных микроорганизмов, ассоциированных с продуктами питания.

С помощью системы «GENE-UP®» можно определять в пробе сальмонеллы, листерии, *E. coli* O157:H7, энтерогемотоксические *E. coli*, норовирусы, вирусы гепатита А и Е. Пробоподготовка занимает 8–24 ч, используется упрощенный механический лизис в течение 5 мин, амплификация и учет результатов осуществляются в течение 1 ч.

Для ускорения некоторых этапов при микробиологическом исследовании пищевых продуктов можно воспользоваться рядом разработок, которые с успехом применяются в клинической лабораторной диагностике. Например, **временная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS)** позволя-

ет значительно ускорить результат идентификации и его достоверность.

MALDI-TOF масс-спектрометрия определяет соотношение масса/заряд для отдельных частиц в биопробе и позволяет получить бактериальный спектр в течение нескольких минут. База данных используется для сравнения полученных масс-спектров неизвестных микроорганизмов со спектрами достоверно идентифицированных микроорганизмов из базы данных. В ходе сравнения на основе корреляции полученных пиков, их интенсивности высчитывается коэффициент соответствия. Последние публикации на тему MALDI-TOF масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что данный метод является более эффективным методом идентификации бактерий и грибов, чем большинство биохимических тестов [17]. У масс-спектрометров различных производителей есть слабые и сильные стороны [18]. Тем не менее эти приборы однозначно помогают сократить время анализа как минимум на сутки.

Небольшие лаборатории с малым объемом исследований пищевых продуктов, скорее всего, отдадут предпочтение недорогому портативному оборудованию или тестам, позволяющим быстро получать информацию о микробиологическом качестве продукции. **Разработан ряд ручных тестов для микробиологической диагностики пищевых продуктов.** Так, на рынке лабораторного обеспечения санитарно-микробиологических исследований существуют портативные наборы, **основанные на флуоресцентной цитометрии**, которые позволяют вести прямой учет микробных клеток в процессе их роста в специальной среде – тесты «СимПлэйт».

В настоящее время разработаны тесты «СимПлэйт» для обнаружения, учета и идентификации возбудителей кишечных инфекций в пищевых продуктах [19]. В России эти тесты представляет компания «ЗИП-И». С помощью флуоресцентной и калориметрической детекции тесты позволяют определять за 24 ч общее количество микроорганизмов в пробе, количество колиформных и энтеробактерий, в том числе *E. coli*, за 48 ч – дрожжи, плесени, кампилобактер.

Легкие и удобные в эксплуатации тесты «СимПлэйт» обладают следующими преимуществами: позволяют в широком диапазоне вести подсчет микроорганизмов; не требуют многократных разведений; гарантируют воспроизводимый точный результат; имеют простую интерпретацию, основанную на визуальном различии позитивного и негативного результата; позволяют получить быстрый результат (за 24–48 ч).

В определенных ситуациях могут помочь **тесты для латексной агглютинации**. Метод латексной агглютинации является вариантом реакции пассивной гемагглютинации. Латексные частицы полистирена с адсорбированными на них молекулами антител вступают в реакцию и агглютинируют с соответствующими антигенами микроорганизмов. Тщательно разработанные наборы позволяют достигать специфичности метода 95–98% [20]. При этом скорость анализа составляет всего 2–3 мин.

Среди отечественных производителей можно отметить продукцию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Оболенск), который выпускают латексные тесты: *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O104:H4. Из зарубежных производителей вы-

Таблица. Характеристика экспресс-методов по времени исследования		
Используемый метод	Наименование приборов, диагностических наборов	Время исследования (этапа)
Импедансный метод	Анализатор «БакТрак 4300», Анализатор «БиоТрак 4250»	4–24 ч
Колориметрическая методика	Система «BACT/ALERT® 3D», анализатор «VITEK 2 Compact»	24–72 ч 2–18 ч
Фермент-связанный флуоресцентный анализ	Система «VIDAS»	4–48 ч
Питательные среды «ТЕМПО» с флуоресцентным индикатором	Система «ТЕМПО®»	24–48 (72) ч
Проточная цитометрия	Анализатор «CHEMUNEX®»	1–24 ч
Твердофазная цитометрия	Система «SCANRDI®»	10–90 мин
ПЦР в реальном времени	Система детекции «GENE-UP®»	9–25 ч
Флюоресцентная и калориметрическая детекция	тесты «СимПлэйт»	24–48 ч
Времяпролетная масс-спектрометрия	«MALDI Biotyper», «Vitek MS»	2–3 мин
Латексная агглютинация	Наборы для латексной агглютинации	2–3 мин
Иммунохроматографический анализ	Иммунохроматографические тесты	5–20 мин
Биохимическая идентификация с хромогенными субстратами	Наборы «RapID»	4 ч
Хромогенные среды для посева	Хромогенные среды	24–48 ч

деляется компания «Oxoid» (Великобритания), «Remel» (США) / «Thermo Fisher Scientific» и их представитель в России «Biovitrum», которые предлагают латексные наборы для выявления стрептококков, стафилококков, клостридий, энтерогеморрагических *E. coli*, легионелл, листерий, сальмонелл, шигелл. Метод латексной агглютинации быстр, нагляден и удобен в использовании, не требует дополнительного лабораторного оснащения для проведения исследований.

Очень удобны в использовании иммунохроматографические тесты, в основе которых лежит **иммунохроматографический анализ (ИХА)** – метод, основанный на разделении частиц методом парной связки и реакции между антигеном в биопробе и мечеными золотом моноклональными антителами на твердой основе. Данный вид анализа проводится с помощью специальных экспресс-тестов, тест-полосок или тест-кассет.

Метод ИХА характеризуется простотой постановки, высокой специфичностью и скоростью выполнения анализа (несколько минут). Его часто используют для быстрого скрининга качества пищевой продукции [21].

ФБУН ГНЦПМБ (Оболенск) производит иммунохроматографические тесты для экспресс-выявления и идентификации листерий, возбудителей туляремии, чумы, холеры O1-группы, спор возбудителя сибирской язвы. Компания «Biovitrum» поставляет в РФ продукцию «Хрест» – наборы для прямого качественного определения токсинов А и/или В *Clostridium difficile*.

При наличии «чистой» культуры для ускорения идентификации выделенных микроорганизмов можно воспользоваться наборами «RapID» для **биохимической идентификации** за 4 ч, в которых использованы традиционные и хромогенные субстраты.

Использование таких наборов позволяет получать результат идентификации бактерий не через 24 ч, как при обычных биохимических тестах, а через 4 ч [22]. Компания «Biovitrum» поставляет в РФ наборы производства «Remel» для идентификации энтеробактерий, глюкозоферментирующих, оксидазо-положительных грамотрицательных палочек, стафи-

лококков, стрептококков, дрожжей, клинически значимых анаэробных бактерий (Грамм+ и Грамм-).

Для легкой дифференциации и быстрой предварительной идентификации микроорганизмов в мировой бактериологической практике все более широкое применение получают **хромогенные среды** [23, 24]. Принцип действия заключается в образовании окрашенных веществ (индикаторов) в результате взаимодействия высокоспецифичных ферментов бактерий с компонентами среды.

Из основных производителей хромогенных сред следует назвать «Oxoid», «Merck», «bioMerieux», «HiMedia», «Fluka2», «Sifin», «Biolife». Выпуск освоен и отечественным производителем – ГНЦ ПМБ (Оболенск), который производит хромогенную среду для обнаружения колиформных бактерий и *E. coli*. Компания «Biovitrum» поставляет в РФ хромогенные среды «Brilliance™ Oxoid»: для быстрой изоляции и идентификации 5 клинически важных видов *Candida* spp. и среду для идентификации колиформных бактерий, энтерококков, бактерий родов *Proteus*, *Morganella* и *Providencia* spp.; она же позволяет отличать *Staphylococcus saprophyticus* от других стафилококков.

Таким образом, существует большое количество более и менее дорогих методов экспрессной диагностики (таблица), которые реализованы в виде автоматизированных станций, приборов и диагностических наборов, способных значительно сократить время исследования пищевой продукции или сырья для ее изготовления с целью оперативного контроля за качеством продуктов питания. Экономический эффект от повсеместного использования экспресс-методов будет многократно превышать материальные затраты на приобретение соответствующего оборудования и диагностических наборов.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Throm R, Specter S, Strauss R, Friedman H. Detection of bacteriuria by automated electrical impedance monitoring in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1977 Sep;6(3):271-3
2. Model investigations of the impedance effectiveness concerning bacterial relevant to food hygiene]. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998 Nov;45(9):551-9.
3. Wawerla M, Stolle A, Schalch B, Eisgruber H. Impedance microbiology: applications in food hygiene. *J Food Prot.* 1999 Dec;62(12):1488-96. DOI: 10.4315/0362-028x-62.12
4. García-Aljaro C, Muñoz-Berbel X, Muñoz FJ. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. *Biosens Bioelectron.* 2009 Feb 15;24(6):1712-6. DOI: 10.1016/j.bios.2008.08.047
5. Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):631-46. DOI: 10.1128/CMR.00120-13
6. Monzó J, Insa I, Fernandez-Trillo F, Rodriguez P. Fundamentals, achievements and challenges in the electrochemical sensing of pathogens. *Analyst.* 2015 Nov 7;140(21):7116-28. DOI: 10.1039/c5an01330e
7. Wang R, Lum J, Callaway Z, Lin J, Bottje W, Li Y. A Label-Free Impedance Immunosensor Using Screen-Printed Interdigitated Electrodes and Magnetic Nanobeads for the Detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors (Basel).* 2015 Dec 15;5(4):791-803. DOI: 10.3390/bios5040791
8. Totty H, Ullery M, Spontak J, Viray J, Adamik M, Katzin B, Dunne WM Jr, Deol P. A controlled comparison of the BacT/ALERT® 3D and VIRTUO™ microbial detection systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Oct;36(10):1795-1800. DOI: 10.1007/s10096-017-2994-8
9. Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, Kisanuki K, Shiohira CM. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Jun;58(2):191-8. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.008
10. Chmelarová E, Skapová T. Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile* [Practical experience with the detection *Clostridium difficile*]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2010 Jun;16(3):86-9.
11. Benetti TM, Monteiro CL, Beux MR, Abrahão WM. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: a comparison with conventional methods. *Braz J Microbiol.* 2014 Jan 15;44(3):791-4. DOI: 10.1590/s1517-83822013000300019
12. Paulsen P, Borgetti C, Schopf E, Smulders FJ. Enumeration of *Enterobacteriaceae* in various foods with a new automated most-probable-number method compared with petrifilm and international organization for standardization procedures. *J Food Prot.* 2008 Feb;71(2):376-9. DOI: 10.4315/0362-028x-71.2.376
13. Katase M, Tsumura K. Enumeration of micro-organisms in processed soy products with an automated most probable number method compared with standard plate method. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Nov;53(5):539-45. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03143.x
14. Loss G, Apprich S, Kneifel W, von Mutius E, Genuneit J, Braun-Fahrlander C; GABRIEL Study Group. Short communication: appropriate and alternative methods to determine viable bacterial counts in cow milk samples. *J Dairy Sci.* 2012 Jun;95(6):2916-8. DOI: 10.3168/jds.2011-4897
15. Méheust D, Gangneux JP, Cann PL. Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring airborne bacteria and fungi concentrations. *J Occup Environ Hyg.* 2013;10(8):455-9. DOI: 10.1080/15459624.2013.800955
16. McDonald CP, Colvin J, Robbins S, Barbara JA. Use of a solid-phase fluorescent cytometric technique for the detection of bacteria in platelet concentrates. *Transfus Med.* 2005 Jun;15(3):175-83. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2005.00569.x
17. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One.* 2011 Jan 25;6(1):e16424. DOI: 10.1371/journal.pone.0016424
18. de Alegría Puig CR, Torres MF, Marfil-Pérez E, Fernández MIR, Del Río MC, Balbín JA, Martínez-Martínez L. Comparison between Vitek MS, Bruker Biotyper, Vitek2, and API20E for differentiation of species of the genus *Raoultella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Mar;38(3):467-470. DOI: 10.1007/s10096-018-03444-4
19. Аспандиярова М.Т. Микробиологический экспресс-анализ молочной продукции. *Переработка молока.* 2010;8(130):12-13.
20. Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1999 Feb;37(2):396-9. DOI: 10.1128/JCM.37.2.396-399.1999
21. Ueda S, Iwase M, Kuwabara Y. Evaluation of immunochromatography for the rapid and specific identification of *Listeria monocytogenes* from food. *Biocontrol Sci.* 2013;18(3):157-61. DOI: 10.4265/bio.18.157
22. Maloney S, Engler C, Norton R. Evaluation of the Remel RapID NF plus rapid biochemical method for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun;52(6):2175-6. DOI: 10.1128/JCM.00025-14
23. Greenwood M, Willis C, Doswell P, Allen G, Pathak K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J Appl Microbiol.* 2005;99(6):1340-5. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02734.x
24. Lee SK, Song KY, Chon JW, Kim DH, Seo KH. Evaluation of Selective-Enrichment and Chromogenic Media for *Salmonella* Detection in Raw Shell Egg Contents with a Low Microbial Load. *Foodborne Pathog Dis.* 2017 Jul;14(7):414-418. DOI: 10.1089/fpd.2016.2250

References

1. Throm R, Specter S, Strauss R, Friedman H. Detection of bacteriuria by automated electrical impedance monitoring in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1977 Sep;6(3):271-3
2. Model investigations of the impedance effectiveness concerning bacterial relevant to food hygiene]. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998 Nov;45(9):551-9.
3. Wawerla M, Stolle A, Schalch B, Eisgruber H. Impedance microbiology: applications in food hygiene. *J Food Prot.* 1999 Dec;62(12):1488-96. DOI: 10.4315/0362-028x-62.12
4. García-Aljaro C, Muñoz-Berbel X, Muñoz FJ. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. *Biosens Bioelectron.* 2009 Feb 15;24(6):1712-6. DOI: 10.1016/j.bios.2008.08.047
5. Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):631-46. DOI: 10.1128/CMR.00120-13
6. Monzó J, Insa I, Fernandez-Trillo F, Rodriguez P. Fundamentals, achievements and challenges in the electrochemical sensing of pathogens. *Analyst.* 2015 Nov 7;140(21):7116-28. DOI: 10.1039/c5an01330e
7. Wang R, Lum J, Callaway Z, Lin J, Bottje W, Li Y. A Label-Free Impedance Immunosensor Using Screen-Printed Interdigitated Electrodes and Magnetic Nanobeads for the Detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors (Basel).* 2015 Dec 15;5(4):791-803. DOI: 10.3390/bios5040791
8. Totty H, Ullery M, Spontak J, Viray J, Adamik M, Katzin B, Dunne WM Jr, Deol P. A controlled comparison of the BacT/ALERT® 3D and VIRTUO™ microbial detection systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Oct;36(10):1795-1800. DOI: 10.1007/s10096-017-2994-8

9. Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, Kisanuki K, Shiohira CM. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Jun;58(2):191-8. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.008
10. Chmelarová E, Skapová T. Praktické zkušenosti s diagnostikou *Clostridium difficile* [Practical experience with the detection *Clostridium difficile*]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2010 Jun;16(3):86-9.
11. Benetti TM, Monteiro CL, Beux MR, Abrahão WM. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: a comparison with conventional methods. *Braz J Microbiol.* 2014 Jan 15;44(3):791-4. DOI: 10.1590/s1517-83822013000300019
12. Paulsen P, Borgetti C, Schopf E, Smulders FJ. Enumeration of *Enterobacteriaceae* in various foods with a new automated most-probable-number method compared with petrifilm and international organization for standardization procedures. *J Food Prot.* 2008 Feb;71(2):376-9. DOI: 10.4315/0362-028x-71.2.376
13. Katase M, Tsumura K. Enumeration of micro-organisms in processed soy products with an automated most probable number method compared with standard plate method. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Nov;53(5):539-45. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03143.x
14. Loss G, Apprich S, Kneifel W, von Mutius E, Genuneit J, Braun-Fahrlander C; GABRIEL Study Group. Short communication: appropriate and alternative methods to determine viable bacterial counts in cow milk samples. *J Dairy Sci.* 2012 Jun;95(6):2916-8. DOI: 10.3168/jds.2011-4897
15. Méheust D, Gangneux JP, Cann PL. Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring airborne bacteria and fungi concentrations. *J Occup Environ Hyg.* 2013;10(8):455-9. DOI: 10.1080/15459624.2013.800955
16. McDonald CP, Colvin J, Robbins S, Barbara JA. Use of a solid-phase fluorescent cytometric technique for the detection of bacteria in platelet concentrates. *Transfus Med.* 2005 Jun;15(3):175-83. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2005.00569.x
17. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One.* 2011 Jan 25;6(1):e16424. DOI: 10.1371/journal.pone.0016424
18. de Alegría Puig CR, Torres MF, Marfil-Pérez E, Fernández MIR, Del Río MC, Balbín JA, Martínez-Martínez L. Comparison between Vitek MS, Bruker Biotyper, Vitek2, and API20E for differentiation of species of the genus *Raoultella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Mar;38(3):467-470. DOI: 10.1007/s10096-018-03444-4
19. Aspandiyarova M.T. Mikrobiologicheskii ekspres-analiz molochnoi produktsii. *Milk Processing.* 2010;8(130):12-13. (In Russian).
20. Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1999 Feb;37(2):396-9. DOI: 10.1128/JCM.37.2.396-399.1999
21. Ueda S, Iwase M, Kuwabara Y. Evaluation of immunochromatography for the rapid and specific identification of *Listeria monocytogenes* from food. *Biocontrol Sci.* 2013;18(3):157-61. DOI: 10.4265/bio.18.157
22. Maloney S, Engler C, Norton R. Evaluation of the Remel RapID NF plus rapid biochemical method for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun;52(6):2175-6. DOI: 10.1128/JCM.00025-14
23. Greenwood M, Willis C, Doswell P, Allen G, Pathak K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J Appl Microbiol.* 2005;99(6):1340-5. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02734.x
24. Lee SK, Song KY, Chon JW, Kim DH, Seo KH. Evaluation of Selective-Enrichment and Chromogenic Media for *Salmonella* Detection in Raw Shell Egg Contents with a Low Microbial Load. *Foodborne Pathog Dis.* 2017 Jul;14(7):414-418. DOI: 10.1089/fpd.2016.2250

Информация об авторах:

Смирнова Елена Викторовна, заведующая бактериологической лабораторией, врач-бактериолог Восточного филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург»
 Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12
 E-mail: elenasmirno@yandex.ru

Деревянченко Ирина Анатольевна, биолог бактериологической лаборатории Восточного филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург»
 Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12
 E-mail: tamiirina110804@mail.ru

Information about authors:

Elena V. Smirnova, head of the bacteriological laboratory, doctor-bacteriologist, Eastern Branch of Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg
 Address: 12 Novo-Alexandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation
 E-mail: elenasmirno@yandex.ru

Irina A. Derevyanchenko, biologist of the bacteriological laboratory, Eastern Branch of Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg
 Address: 12 Novo-Alexandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation
 E-mail: tamiirina110804@mail.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Российские ученые нашли новый способ борьбы с бактериями

Ученые из Московского института стали и сплавов создали нанопокрyтия с антибактериальными и противогрибковыми свойствами, за сутки почти полностью уничтожающие болезнетворных микробов. Механизм действия – прямой физический контакт с игловидной поверхностью нанопленки на основе нитрида бора. Полагают, что этот подход будет перспективен в хирургии имплантатов и стоматологии.

Нанозффект: российские ученые нашли новый способ борьбы с бактериями [Electronic resource]. RT на русском. URL: <https://russian.rt.com/science/article/781338-nanoplyonki-protiv-mikrobov> (accessed 08.12.2020).

