

УДК 637 : 616.98 : 579.869.1
DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.48

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ ЛИСТЕРИЙ В МЯСОПРОДУКТАХ

Нечаев А.Ю. - д.в.н., доцент, Белополюский А.Е. – д.в.н., доцент,
ФГБОУ ВО СПбГУВМ

Ключевые слова: методы, листерия, мясопродукты, ПЦР в реальном времени
Key words: methods, listeria, meat products, real-time PCR



РЕФЕРАТ

В ежегодных отчетах по заболеваемости взрослого населения сообщается о вспышках листериоза, вызванного *Listeria monocytogenes* с клинически выраженным фебрильным гастроэнтеритом. Считается, что основным путем передачи инфекции человеку является приём в пищу готовых к употреблению зараженных мясопродуктов. Быстрое и специфическое обнаружение *L. monocytogenes* в пищевых продуктах имеет решающее значение для обеспечения безопасности потребителей. Целью данной работы было изучение встречаемости *L. monocytogenes* в мясных продуктах в вакуумной упаковке с использованием современных методов диагностики. В общей сложности 60 мясопродуктов в вакуумной упаковке были исследованы с использованием ПЦР в реальном времени (набор для ПЦР в реальном времени iQ-Check™), методом иммуноанализа (тест VIDAS LMO2) и культуральным методом. Тридцать два из 60 (53%) мясных продуктов в вакуумной упаковке были положительными на *L. monocytogenes* с помощью ПЦР в реальном времени. Этот показатель был особенно высок в колбасах, подвергнутых термической обработке (80%). Только два продукта (два колбасных батона) были положительными по VIDAS и культуральным методом. Кроме того, *L. monocytogenes* была выделена из одной термообработанной колбасы, которая была отрицательной по VIDAS. Все VIDAS и культурально-положительные образцы также были положительными по ПЦР в реальном времени. В двух (12%) из 17 мясопродуктов в вакуумной упаковке количество *L. monocytogenes* превысило 100 КОЕ/г, что свидетельствовало о том, что срок годности, установленный для некоторых продуктов в вакуумной упаковке, истёк. Было показано, что ПЦР в реальном времени на основе набора для ПЦР в реальном времени iQ-Check™ очень чувствителен к обнаружению *L. monocytogenes* в пищевых продуктах и, следовательно, является полезным инструментом для скрининга.

ВВЕДЕНИЕ

Листериоз, вызываемый *Listeria monocytogenes*, в течение многих лет признаётся серьезным заболеванием у людей и животных, проявляющийся явлениями септицемии, менингита и высокой летальностью [2]. Листериоз преимущественно поражает определенные группы риска, включая беременных женщин, новорож-

денных, а также пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом. Хотя листериоз человека встречается редко, общее число случаев листериоза в странах Европы за последние годы значительно увеличилось. *L. monocytogenes* – возбудитель психротрофная бактерия, широко распространенная в окружающей среде,

которая может выживать и расти в широком диапазоне условий окружающей среды, таких как низкие температуры и значения pH, а также высокие концентрации солей. В то время как приготовление пищи и пастеризация убивают *L. monocytogenes*, вторичное обсеменение после обработки является распространенным явлением, поскольку патоген распространен в окружающей среде. В результате продукты, предназначенные для употребления без предварительной кулинарной обработки, часто заражаются *L. monocytogenes*. Как факультативный анаэробный вид, он способен расти в упакованных в вакуум продуктах, что делает его присутствие, особенно в продуктах с относительно длительным сроком хранения, особенно опасным. Кроме того, эта бактерия может выживать и расти при температурах охлаждения (от +2 до +4°C), что ещё больше затрудняет меры контроля [5].

Быстрое и специфическое обнаружение *L. monocytogenes* в пищевых продуктах имеет решающее значение для обеспечения безопасности потребителей. Обнаружение *L. monocytogenes* традиционно включает методы культивирования, включая селективное обогащение и посев с последующей идентификацией *Listeria spp.* на основе морфологии колоний, ферментации сахара и гемолитических свойств [1]. Бактериологический метод является эталонным и наиболее широко используемым методом культивирования для обнаружения *Listeria spp.* в продуктах питания. Однако этот метод требует много времени и не подходит для тестирования продуктов с коротким сроком годности. Поэтому было разработано несколько иммунологических и молекулярно-биологических методов для скрининга *L. monocytogenes* в пищевых продуктах [4]. Целью данной работы было изучение диагностических возможностей различных методов: ПЦР в реальном времени, иммуноанализа и классического бактериологического метода для определения *L. monocytogenes* в мясных продуктах в вакуумной упаковке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего было исследовано 60 мясных продуктов в вакуумной упаковке 30 – свежие и 30 с истекшим сроком годности. От каждого продукта отбирали 10 г для приготовления образца, который гомогенизировали в течение 2 мин в 90 мл бульона half-Fraser. Перед инкубацией 100 мкл гомогената непосредственно наносили на агаровые пластины Oxford (Merck) и Palcam (Merck) для количественного анализа. Затем гомогенаты инкубировали при 30°C в течение 24 ч. После инкубации они использовались для обнаружения *L. monocytogenes* непосредственно из бульона для первичного обогащения с помощью ПЦР и иммуноферментного анализа. Кроме того, бульон для первичного обогащения использовали для выделения листерий путем культивирования на питательных средах. Таким образом, культуральный метод поэтапно предусматривал первичное и вторичное обогащение, посев на дифференциально-диагностические и хромогенные среды с последующей инкубацией в течение 24-48 ч. и в завершении проводился учет характерно окрашенных колоний и идентификация возбудителя. Идентификация осуществлялась по ГОСТу Р51921 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*». Иммуноферментный анализ проводили на автоматическом приборе VIDAS 30 (bioMérieux), который обнаруживает антигены *L. monocytogenes* в пище. Интенсивность флуоресценции измерялась при 450 нм оптическим сканером, встроенным в VIDAS, и выражалась в виде относительной величины флуоресценции (RFV). Результаты измерений автоматически анализировались встроенным компьютером, RFV $\geq 0,05$ указывало на присутствие *L. monocytogenes* в образце.

Для выявления листерий молекулярно-генетическим методом использовался набор для ПЦР в реальном времени iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (BioRad, Германия), предназначенный для обнаружения *L. monocytogenes* в образцах пище-

вых продуктов. Набор содержал реагент для лизиса и гранулы для лизиса, амплификационную смесь с праймерами, ДНК-полимеразу и нуклеотиды, флуоресцентный ДНК-зонд, специфичный для *L. monocytogenes*, отрицательный и положительный контроль. ПЦР в реальном времени проводили с использованием тепловой программы, состоящей из начальной денатурации 10 мин при 95°C и 50 циклов по 20 с при 95°C (денатурация), 30 с при 55°C (отжиг) и 30 с при 72°C (удлинение). Были проведены два параллельных ПЦР-анализа с использованием методов извлечения ДНК А и В. Ген *hlyA* был амплифицирован и обнаружен во время ПЦР с использованием специфических праймеров и зонда молекулярного маяка. Этот ген кодирует листериолизин О, который участвует в процессе вирулентности и высокоспецифичен к *L. monocytogenes*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод ПЦР в реальном времени продемонстрировал большой потенциал благодаря высокой специфичности и чувствительности. В этом исследовании 64% мясных продуктов в вакуумной упаковке были положительными на *L. monocytogenes* при определении с помощью ПЦР в реальном времени. Встречаемость была высокой во всех видах продуктов, особенно в термообработанных колбасах (80%). R.Beumer et al. (2003) обнаружили *L. monocytogenes* только в 28% (10/36) образцов мяса, используя сокращенное двухступенчатое обогащение в сочетании с ПЦР в реальном времени. Их исследования показали, что инкубация в течение 48 ч вместо 24 ч перед ПЦР с помощью набора iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* (BioRad, Мюнхен, Германия) уменьшила количество ложноотрицательных результатов.

Только два продукта (4%) (два образца бекона, исследованные до истечения срока годности) были положительными по VIDAS. Те же продукты были положительными при исследовании культуральным методом. Однако, один культурально-положительный продукт, термообрабо-

танный образец колбасы с истекшим сроком годности, был отрицательным по VIDAS. Было проведено комплексное исследование для сравнения иммуноанализа VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2) и культуральных методов для выявления *L. monocytogenes* в пищевых продуктах, и в этом исследовании не было обнаружено статистических различий между анализом VIDAS и культуральными методами. Обнаружение *L. monocytogenes* в пищевых продуктах может быть затруднено, поскольку эти бактерии обычно обнаруживаются в очень малых количествах в присутствии гетерогенной микрофлоры [5]. В данном исследовании только три (6%) продукта (два до и один после истечения срока годности) были культурально положительными.

L. monocytogenes был выделен из двух образцов бекона и одного образца термообработанной колбасы. Было показано, что уровень выделения в беконе, оба образца которого были взяты до истечения срока годности был высоким (2/7, 29%). Beumer and Hazeleger (2003) сообщили о степени выделения 17% в мясе и мясопродуктах. В этих исследованиях использовались те же бульоны селективного обогащения, что и в этом исследовании. Одним из объяснений низкой скорости выделения, но высокой частоты обнаружения с помощью ПЦР в нашем исследовании может быть более низкий уровень загрязнения или большое количество некультивируемых клеток. В проведенном исследовании *L. monocytogenes* можно было выделить без обогащения непосредственно из гомогената на оксфордском агаре из двух образцов, один из которых изучался до и один после истечения срока годности. Было показано, что оксфордский агар более продуктивен, чем Palcam-агар. Oxford и Palcam по-прежнему широко используются как селективные агары для выделения бактерий рода *Listeria*, однако в настоящее время чаще используются хромогенные среды, поскольку они улучшили выделение *L. monocytogenes*, позволяя напрямую идентифицировать колонии по их характер-

ным цветам [1,5]. Большинство (24/30) продуктов, исследованных после истечения срока годности, были загрязнены *L. monocytogenes* согласно результатам ПЦР. Основным продуктом, отобранном по истечении срока хранения, были термообработанные колбасы в вакуумной упаковке, которые были сильно (80%) загрязнены *L. monocytogenes*. Эти же продукты, изученные до истечения срока годности, в меньшей степени (48%) были положительными по *L. monocytogenes* с помощью ПЦР.

В двух (12%) из 17 упакованных в вакуум мясопродуктов количество *L. monocytogenes* превышало 100 КОЕ/г. Известно, что концентрация *L. monocytogenes*, превышающая 100 КОЕ/г пищи во время потребления, по-видимому, представляет высокий риск для потребителя [3]. Патогенные листерии естественным образом присутствуют в окружающей среде и время от времени неизбежно загрязняют пищевые продукты в процессе производства или обращения с ними. Таким образом, хранение пищевых продуктов, способствующих росту *L. monocytogenes*, в холодильнике не должно быть слишком длительным. Кроме того, для профилактики заболеваемости и снижения смертности от листериоза необходимо просвещать потребителей о продуктах высокого риска заражения листериозом и безопасных методах приготовления пищи.

ВЫВОДЫ

Результаты исследований показали, что готовые к употреблению мясные продукты в вакуумной упаковке, особенно термообработанные колбасы, часто заражаются *L. monocytogenes*. В некоторых упакованных под вакуумом продуктах, готовых к употреблению, количество *L. monocytogenes* превышало 100 КОЕ/г. Было показано, что молекулярно-биологический метод на основе ПЦР в реальном времени iQ-Check™ очень чувствителен к обнаружению *L. monocytogenes* в пищевых продуктах и поэтому является полезным инструментом для скрининга.

Таким образом, использование ускоренных методов обнаружения листерий

повысит эффективность производственного контроля мясопродуктов и обеспечит выпуск качественной и безопасной для здоровья человека готовой пищевой продукции.

DIAGNOSTIC CAPABILITIES OF MODERN METHODS OF DETERMINATION PATHOGENIC LISTERIA IN MEAT PRODUCTS

Nechaev A.J.-Doctor of Veterinary Sciences, Dozent, Belopolsky A.E. - Doctor of Veterinary Sciences, Dozent, "St. Petersburg State University of Veterinary Medicine"

ABSTRACT

Annual reports on the morbidity of the adult population report outbreaks of listeriosis caused by *Listeria monocytogenes* with clinically pronounced febrile gastroenteritis. The main transmission route to humans is believed to be through consumption of contaminated food, especially ready-to-eat meat products. Rapid and specific detection of *L. monocytogenes* in food is critical for ensuring the safety of consumers. The aim of this work was to study the occurrence of *L. monocytogenes* in vacuum-packed meat products using modern diagnostic methods. In total, 60 vacuum-packed meat products were studied using real-time PCR (iQ-Check™ real-time PCR kit), immunoassay (VIDAS LMO2 test) and culturing. Thirty-two of 60 (53%) vacuum-packed meat products were *L. monocytogenes* positive by real-time PCR. The occurrence was especially high in heat-treated sausages (80%). Only two products (two bacons) were VIDAS and culture positive. Additionally, *L. monocytogenes* was isolated from one heat-treated sausage, which was VIDAS negative. All VIDAS and culture-positive samples were also PCR positive. In two (12%) out of 17 vacuum-packed ready-to-eat products, the number of *L. monocytogenes* was over 100 cfu/g demonstrating that the shelf life assigned to some vacuum-packed products is not appropriate. Real-time PCR based on iQ-Check™ real-time PCR kit was shown to be very sensitive to detect *L. monocytogenes* in foods and thus a useful tool for screening.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Батаева, Д.С. Применение ускоренных микробиологических методов для определения патогенных листерий в мясе / Д.С.Батаева, А.Ю.Нечаев // *Всё о мясе*. Москва, 2007. №3. С. 27–28.
2. Нечаев, А.Ю. К оценке эффективности выявления патогенных листерий в пищевых продуктах/ А.Ю.Нечаев// *Ветеринарная патология*. 2007. №1(20). С.141–143.
3. Яшин, А.В. Особенности ветсанэкспертизы мясопродуктов на листериоз / А.В. Яшин, А.Ю.Нечаев // *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*. 2008. №11. С.101–104.
4. Яшин, А.В. Экспресс-методы для определения листерий в мясе и мясных продуктах / А.В. Яшин, А.Ю.Нечаев // *Мясная индустрия*. Москва, 2008. №8. С. 51–53.
5. Beumer R. Listeria monocytogenes: diagnostic problems / R. Beumer, W. C. Hazeleger // *FEMS Immunology and Medical*

Microbiology. 2003. Vol.35. S.191–197.

REFERENCES

1. Bataeva DS, Nechaev AJ. Application of accelerated microbiological methods for the determination of pathogenic listeria in meat. *All about meat*. 2007; (3):27 – 28. (In Russ.)
2. Nechaev AJ. To assess the effectiveness of detecting pathogenic listeria in food products. *Veterinary pathology*. 2007; 20(1):141 –143. (In Russ.)
3. Yashin AV, Nechaev AJ . Features of veterinary examination of meat products for listeriosis. *Izvestiya St. Petersburg State Agrarian University*. 2008; (11):101–104. (In Russ.)
4. Yashin AV, Nechaev AJ . Express methods for the determination of listeria in meat and meat products. *Meat industry*. 2008; (8):51– 53. (In Russ.)
5. Beumer R, Hazeleger WC. Listeria monocytogenes: diagnostic problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2003; 35:191–197.