

УДК 619:614.31.637.5

КОНТАМИНАЦИЯ ЛИСТЕРИЯМИ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ И ИХ УСКОРЕННАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ НА ОСНОВЕ ПЦР

И. М. Нитяга

*ФГБУ ВПО «Московский государственный университет
пищевых производств»*

Показана высокая степень контаминации мясных продуктов бактериями рода *Listeria*. Предложена схема ускоренной идентификации *L. monocytogenes* в мясе и мясной продукции на основе ПЦР.

Ключевые слова: *L. monocytogenes*, мясо, мясная продукция, ПЦР, биохимические тесты.

LISTERIA CONTAMINATION OF MEAT PRODUCTS AND EXPRESS THEIR IDENTITY USING METHODS BASED ON PCR

I. M. Nityaga

The high degree of contamination of meat products with bacteria of the genus *Listeria*. The scheme accelerated the identification of *L. monocytogenes* in meat and meat products on the basis of PCR.

Key words: *L. monocytogenes*, meat, meat products, PCR, biochemical tests.

Введение

Одна из актуальных задач в обеспечении микробиологической безопасности пищевых продуктов – снижение риска возникновения пищевого листериоза.

Существующие данные об обнаружении листерий в мясопродуктах свидетельствуют как о разной частоте и уровне выявления *L. monocytogenes* (от 0,5 до 30...40% проб в количестве от 0,1 до 10³ КОЕ/г и более), так и о большой распространенности видов листерий, наиболее близких к ним по фенотипическому профилю, в первую очередь *L. innocua*. При этом использованы различные методические схемы идентификации штаммов листерий, что затрудняет сопоставление полученных данных и существенно усложняет анализ эпидемиологической ситуации [2, 6, 9].

С 2001 г. в нашей стране выделение листерий из сырья и пищевых продуктов проводят в соответствии с Методически-

ми указаниями 4.2.1122-02 [4] и ГОСТ Р 51921-2002 [1]. Проведенные исследования показали, что существенными недостатками регламентируемого метода являются его продолжительность (более 7 сут), трудоемкость, недостаточная специфичность тестов, идентификация при замене или отсутствии отдельных реагентов или компонентов сред, а также высокая стоимость исследований при использовании системы miniVidas или биохимических наборов API Listeria. В последнем случае иногда возможна неоднозначная интерпретация результатов теста, дифференцирующего именно *L. monocytogenes* и *L. innocua*, что приводит к существенной гипердиагностике, недопустимой при контроле на наличие патогенных представителей рода *Listeria*.

Значительный прогресс в изучении молекулярно-генетических детерминант и природы патогенности бактерий позволил разработать целый ряд диа-

гностических методов, использующих различные варианты ПЦР-анализа [5, 9, 10]. Однако для идентификации многих микроорганизмов, в том числе «пищевых» патогенов, в настоящее время наиболее надежным признан системный комплексный подход, основанный на комбинировании молекулярно-генетических методов (ДНК-ДНК-гибридизация, ПЦР с 16s-РНК или с секвенированными участками генома) с тестированием наиболее специфичных фенотипических признаков рода, вида или серотипа. В отношении патогенных микроорганизмов, имеющих близких непатогенных представителей в пределах рода, к которым в первую очередь относятся *L. monocytogenes*, подбор наиболее информативных биохимических тестов и ДНК-зондов для идентификации должен основываться на определении именно патогенетических признаков, а не только метаболических свойств, большинство из которых в пределах рода кодируются консервативными участками генома. При оценке фенотипа *L. monocytogenes* такими признаками являются подвижность, способность к гемолизу, наличие специфичных лецитиназ; при генотипировании это индикация участков генома, определяющих выработку гемолизина и фосфолипаз, факторов инвазивности и цитотоксичности.

Освоение высокоспецифичных комбинированных методов быстрой идентификации и типирования позволит создать современную схему эффективного мониторинга наличия *L. monocytogenes* в продуктах питания на разных этапах их изготовления и хранения, а также получить более достоверные сведения о циркуляции этого возбудителя на предприятиях пищевой индустрии.

Целью и задачами исследований являлись:

– изучение распространения бактерий рода *Listeria* в мясном сырье и ферментированных мясопродуктах, оценка частоты обнаружения *L. monocytogenes* и листерий других видов в процессе производства мясных продуктов;

– исследование свойств выделенных культур листерий с использованием микробиологических и биохимических методов в сопоставлении с методами ПЦР-диагностики и определение информативности и диагностической значимости отдельных тестов идентификации листерий с целью включения их в схему ускоренного мониторинга пищевых продуктов.

Материалы и методы

В работе использованы коллекционные штаммы *L. monocytogenes* NCTC 10527 и № 766 (коллекция ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи). Для выделения листерий применяли питательные среды производства фирмы HiMedia (бульон Фрейзера, среды Оксфорд и ПАЛКАМ-агар). Подготовку и посев проб продуктов и смывов проводили в соответствии с методикой, изложенной в МУК 4.2.1122-02 [4], при этом смывы вносили в среды для первичного обогащения в количестве 2 мл в соотношении 1:9 по объему. Биохимические свойства штаммов изучали на средах Гисса с углеводами, в тест системах АРІ *Listeria* фирмы Bio Merieux (Франция). Способность к индукции лецитиназной активности культур определяли на специально подобранной среде в присутствии гидрофобного сорбента [7]. Гемолитические свойства выделенных штаммов изучали на кровяном агаре с эритроцитами барана [1]. Протеиназу инактивировали кипячением проб в течение 5 мин, после чего образцы замораживали.

В работе использовали Taq-полимеразу и другие реагенты производства фирмы «Бионем». Праймеры для родовой и видовой идентификации были синтезированы в ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи (табл. 1). Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология»).

Используемые праймеры представлены в табл. 1.

Режимы амплификации:

– для пары Prsl-Prs2 : 94 °С – 2 мин; затем 5 циклов: 94 °С – 5 с, 42 °С – 5 с, 72 °С – 5 с; затем 25 циклов: 94 °С – 1 с, 42 °С – 1 с, 72 °С – 1 с;

Таблица 1
Праймеры для родовой и видовой идентификации

Праймер	Нуклеотидный состав праймера
Prs1	GCATTGCGTGAAGCTGGCGCAAC
Prs2	CAGAAGCATTTTCATGAAC
Plc1	AGGGGGCCATTTGTATAAG
Plc2	ATCGTTGCTGTTTTGCTCGT
Act3	CATGCGGTCGACCAGTATTCGGCGGG
Act4	TCTGTTGGATCCCACTTATACTCCC

– для пары Plc1-Plc2 : 94 °С – 2 мин; затем 5 циклов: 94 °С – 5 с, 55 °С – 5 с, 72 °С – 5 с; затем 25 циклов: 94 °С – 1 с, 55 °С – 1 с, 72 °С – 1 с;

– для пары Act3-Act4 : 94 °С – 2 мин; затем 5 циклов: 94 °С – 20 с, 60 °С – 20 с, 72 °С – 20 с и еще 30 циклов: 94 °С – 5 с, 60 °С – 5 с, 72 °С – 5 с.

Аmplифицированные фрагменты ДНК анализировали гелеэлектрофорезом в 1%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере в присутствии 5 мкг/мл бромида этидия. Результаты учитывали путем окраски и выявления окрашенных ампликонов в УФ-свете (254 нм), оценивая молекулярную массу полученных участков ДНК в сравнении со стандартными маркерами (1kb DNA Ladder, 100 kb DNA Ladder производства фирмы «Бионем»).

В качестве объектов исследования были выбраны пробы замороженного и охлажденного мясного сырья различных

изготовителей, мясные полуфабрикаты (кусковые и рубленые), сырокопченые и сыровяленые колбасы на разных стадиях созревания, смывы с технологического оборудования и инвентаря.

Результаты исследований

На наличие *L. monocytogenes* исследовано образцов: говядины сырой (охлажденная и замороженная) – 14 проб, свинины сырой – 7, фарша свиного и говяжьего для сырокопченых колбас – 19, полуфабрикатов из говядины и свинины кусковых – 12, готовых сырокопченных и сыровяленых колбас – 19, смывов с инвентаря и оборудования – 72 пробы. Образцы для исследований отбирали в течение года в сыром цехе и цехах по производству сырокопченных и сыровяленых мясопродуктов (колбасы сырокопченные, вырабатываемые без применения бактериальных стартовых культур, суджук, бастурма и т.д.) на типовых мясоперерабатывающих предприятиях Москвы с периодичностью 1...2 раза в месяц; точки отбора проб определяли в соответствии с принципами ХАССП.

По результатам первичных посевов было выделено 49 культур, которые по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам (типичный рост на среде Оксфорд или ПАЛКАМ-агаре, подвижность при 22 °С, наличие каталазы, отсутствие ферментации маннита) были отнесены к роду *Listeria*. Частота их обнаружения по группам продуктов представлена в табл. 2.

Таблица 2

Частота обнаружения бактерий рода *Listeria*

Объект исследования	Число проб	Частота обнаружения <i>Listeria</i>			
		всего	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>
1	2	3	4	5	6
Говядина (сырье)	14	5 (35,7)	1	4	0
Свинина (сырье)	7	4 (57,1)	2	2	0
Полуфабрикаты мясные рубленые, в том числе фарш для изготовления сырокопченных колбас	19	7 (36,8)	3	4	0
Полуфабрикаты мясные кусковые	12	3 (25,0)	2	1	0

1	2	3	4	5	6
Сырокопченые и сыровяленые колбасы	19	6 (31,6)	1	5	0
Всего	71	25 (35,2)	9	16	0
Смывы, в том числе с поверхности:	72	24 (32,4)	15	6	3
– оборудования (конвейерные ленты, куттеры, пилы)	7	5 (71,4)	3	0	2
– инвентаря (разделочные ножи, доски, лотки, столы)	65	19 (29,2)	12	6	1
Всего	143	49 (34,3)	24 (16,8)	22	3

Примечание: в скобках – %.

В готовых сырокопченых и сыровяленых мясопродуктах бактерии рода *Listeria* обнаруживались практически с той же частотой (31,6%), как и в мясном сырье для их производства (38,6%), что свидетельствует о способности листерий к выживанию во время созревания (ферментации) колбас и об отсутствии в технологии ферментированных мясопродуктов факторов, обеспечивающих листерицидное воздействие или существенное снижение степени контаминации листериями.

Показано также, что в технологических циклах производства ферментированных мясных продуктов происходит постоянное инфицирование объектов производственной среды бактериями рода *Listeria*, которые систематически обнаруживаются практически на всех видах оборудования (71,4%) и инвентаря (29,2%), что может приводить не только к обсеменению сырья, но и к загрязнению готовых сырокопченых и сыровяленых колбас или других мясных изделий. Таким образом, полученные результаты подтвердили наличие на мясоперерабатывающих предприятиях благоприятных условий для размножения патогенных штаммов листерий с потенциальной опасностью контаминации ими готовой продукции.

При видовой идентификации выделенных культур рода *Listeria* на средах Гисса с углеводами и с использованием наборов API *Listeria* 49% изученных штаммов соответствовали культуральным и биохимическим характеристикам

L. monocytogenes: они ферментировали рамнозу и маннозу, но не сбраживали маннит и ксилозу и по остальным тестам API *Listeria* были типичны.

Однако только 9 штаммов (37,5%) из 24 культур образовывали четкие зоны β-гемолиза на кровяном агаре с эритроцитами барана. Эти же культуры обладали выраженной лецитиназной активностью на среде с добавлением желточной эмульсии в присутствии активированного угля. Ранее было показано [7], что секретиремый листериями продукт, выполняющий функции авторепрессора синтеза лецитиназы, может быть устранен из среды гидрофобным сорбентом, в частности активированным углем. При этом происходит активация генов патогенности и, как следствие, увеличивается экспрессия лецитиназы в среду. Данный тест позволяет дифференцировать *L. monocytogenes* от другого вида (37,5%) – *L. ivanovii*, синтез фосфолипаз у которых не зависит от присутствия в среде авторепрессора.

Описанные выше культуры, отнесенные по комплексу биохимических признаков к *L. monocytogenes*, были в 8 случаях выделены из смывов с оборудования и инвентаря (конвейеры, пилы, рабочие столы, разделочные ножи, доски) и в 1 – из сырья (свинина). Остальные из 24 первично отнесенных к *L. monocytogenes* штаммов, не обладающие гемолитической и лецитиназной активностью, по совокупности признаков были отнесены к виду *L. innocua*. Кроме того, фенотипическим харак-

теристикам этого вида соответствовали еще 23 культуры, выделенные из фарша, полуфабрикатов, сырья для производства сырокопченых и сыровяленых колбас, смывов с инвентаря, а также из готовых продуктов. Приведенные данные свидетельствуют о том, что наибольшее число (77,6%) выделенных культур листерий относится к виду *L. innocua*. Выделенные из смывов 3 штамма были идентифицированы как *L. welshimeri*. Листерии видов *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi* в данном исследовании не обнаружены.

Дальнейшее изучение выделенных культур листерий проводили методом ПЦР с родо- и видоспецифическими праймерами. Для подтверждения родовой принадлежности использовали праймеры Prs1 и Prs2, направляющие синтез фрагмента гена, кодирующего консервативный для рода *Listeria* белок фосфорибозилпирофосфатсинтазу, участвующую в общем метаболизме бактериальной клетки [5].

Подбор видоспецифических праймеров проводили путем выделения фрагментов ДНК, участвующих в кодировании наиболее значимых для *L. monocytogenes* факторов вирулентности. Для видовой дифференциации использовали 2 пары праймеров: Act3-Act4, амплифицирующих участок гена, ответственного за синтез поверхностного белка ActA, индуцирующего полимеризацию актина и обеспечивающего способность к движению возбудителя в цитоплазме инфицированных клеток [9]; Plc1-Plc2, направляющих амплификацию участка размером 474 н.п. гена PlcA – фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы C [3].

Для исследований в ПЦР были отобраны 49 культур, идентифицированных по микробиологическим тестам как *L. monocytogenes*, *L. innocua* и *L. welshimeri*. В качестве контрольных использовали коллекционные тест-штаммы *L. monocytogenes* различных серотипов, гемолитический штамм *Enterococcus faecalis* и штамм *Staphylococcus aureus* с выраженной лецитиназной активностью.

Результаты ПЦР-анализа культур полностью соответствовали данным микробио-

логических исследований в части родовой идентификации листерий. Положительные результаты ПЦР с видоспецифическими для *L. monocytogenes* парами праймеров Act3-Act4 и Plc1-Plc2 были получены только у штаммов, обладающих лецитиназной и гемолитической активностью (за исключением 1 штамма, давшего отрицательные результаты в ПЦР), что, безусловно, подтверждает диагностическую значимость этих тестов. Из 24 штаммов, первоначально (по данным тестирования с применением набора API Listeria) отнесенных к *L. monocytogenes*, по результатам ПЦР-анализа подтверждена принадлежность к данному виду только 8 штаммов, все они при этом обладали β -гемолитической и лецитиназной активностью.

Таким образом, комбинированный подход к идентификации бактерий рода *Listeria*, выделенных в процессе производства мясопродуктов (путем использования наиболее информативных фенотипических тестов и ПЦР-анализа с праймерами на участки генов, кодирующих факторы патогенности листерий), позволил в 3 раза сократить число культур, изначально (по комплексу биохимических признаков) расцененных как *L. monocytogenes*. Правильный выбор видоспецифических праймеров в значительной степени определяет достоверность результатов идентификации патогенных микроорганизмов с помощью ПЦР. Направленный подбор фрагментов генома, участвующих в кодировании наиболее значимых факторов патогенности, может не только подтвердить результаты микробиологического тестирования выделенных штаммов, но и оценить патогенность этих культур по наличию генов, экспрессирующих те или иные факторы патогенности.

Заключение

Обобщая полученные данные, следует отметить, что в процессе производства мясных продуктов происходит контаминация сырья, полуфабрикатов и готовой продукции бактериями рода *Listeria*. Эти микроорганизмы обнаружены в 36,5% проб сырья и 31,8% образцов готовых

сырокопченых колбас. Установленная в исследовании частота обнаружения *L. monocytogenes* в смывах с технологического оборудования и инвентаря (9,7%) свидетельствует об интенсивной циркуляции возбудителя листериоза на мясоперерабатывающих предприятиях, что требует ужесточения санитарно-гигиенических требований к производству и хранению мясopодуктов. С этой целью должен быть налажен и регламентирован контроль на наличие *L. monocytogenes* не только в сы-

рье и готовой продукции, но и на наиболее значимых участках технологических процессов (посев смывов с технологического и холодильного оборудования, инвентаря, посуды, вспомогательных материалов, рук и одежды работников). Для ускоренной видовой идентификации *L. monocytogenes* предлагается схема, включающая определение гемолитической и лецитиназной активности штаммов в сочетании с ПЦР-анализом с видоспецифическими праймерами к генам *P1cA* и *ActA*.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*».
2. Карликанова Н. Р., Куваева И. Б., Карликанова С. Н. Листерии в молоке и молочных продуктах. – М.: Углич, 1999.
3. Карпова Т. И. Идентификация и типирование *Listeria monocytogenes* на основе особенностей полиморфизма и экспрессии генов факторов патогенности: Автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 2003.
4. МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах». – Минздрав России, 2002.
5. Тартаковский И. С., Малеев В. В., Ермолаева С. А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. – М.: Медицина для всех, 2002.
6. Beumer R. R., te Giffel M. C., de Boer E., Rombouts F. M. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products // *Food Microbiology*. – 1996. – Vol. 13. – P. 333–340; цит. по <http://www.foodsafety.gov/>.
7. Ermolaeva S., Karpova T., Novella S. et al. A simple method for the rapid identification of *Listeria monocytogenes* based on the induction of lecithinase activity by charcoal // *Food Microbiology*. – 2003. – Vol. 82. – P. 87–94.
8. Farber J. M., Peterkin P. I. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products // *Listeria, Listeriosis and Food Safety* / Eds E. T. Ryser, E. H. Marth. – N.Y.: Marcel Dekker, 1999. – P. 505–542.
9. Walter E. Hill The Polymerase Chain Reaction: Applications for the Detection of Foodborne Pathogens // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – Vol. 36 (1–2). – P. 123–173 (1996 by CRC Press, Inc).

REFERENCES

1. GOST R 51921-2002 «Produktyi pischevyye. Metodyi vyyavleniya i opredeleniya bakteriy *Listeria monocytogenes*».
2. Karlikanova N. R., Kuvaeva I. B., Karlikanova S. N. Listerii v moloke i molochnyih produktah. – M.: Uglich, 1999.
3. Karpova T.I. Identifikatsiya i tipirovanie *Listeria monocytogenes* na osnove osobennostey polimorfizma i ekspressii genov faktorov patogennosti: Avtoref. dis.... kand. biol. nauk. – M., 2003.
4. MUK 4.2.1122-02 «Organizatsiya kontrolya i metodyi vyyavleniya bakteriy *Listeria monocytogenes* v pischevyyih produktah», (Minzdrav Rossii, 2002).
5. Tartakovskiy I. S., Maleev V. V., Ermolaeva S. A. Listerii: rol v infektsionnoy patologii cheloveka i laboratornaya diagnostika. – M.: Meditsina dlya vseh, 2002.

Сведения об авторе: Нутяга Инга Михайловна, доцент каф. ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности; inga99@mail.ru.