

УДК 614.31-078
AGRIS Q03

<https://doi.org/10.33619/2414-2948/42/26>

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ЛИСТЕРИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

©Березняк О. В., ORCID: 0000-0001-7738-2076, Российский университет
дружбы народов, г. Москва, Россия, 1032166723@pfur.ru

©Рысцова Е. О., SPIN-код: 2027-4235, канд. с.-х. наук, Российский университет
дружбы народов, г. Москва, Россия, rystsova-eo@rudn.ru

LABORATORY STUDIES TO IDENTIFY LISTERIA IN FOOD PRODUCT

©Bereznyak O., ORCID: 0000-0001-7738-2076, Peoples' Friendship University of Russia,
Moscow, Russia, 1032166723@pfur.ru

©Rystsova E., SPIN-code: 2027-4235, Ph.D., Peoples' Friendship University of Russia,
Moscow, Russia, rystsova-eo@rudn.ru

Аннотация. Одной из основных задач отечественной мясной промышленности на современном этапе развития является обеспечение безопасности для потребителя выпускаемых мясных продуктов. Известно, что в мясном сырье и продукции из него изготовленной, особенно при нарушении технологических режимов и санитарно-гигиенических условий производства, можно выявить опасные для человека микроорганизмы — листерии. В связи с этим, в зоне Европейского экономического сотрудничества, а также других развитых странах (США, Канада, Япония) строго регламентированы требования по контролю патогенных листерий в мясе и мясных продуктах, потребление которых может вызвать заболевание людей. Исследование пищевых продуктов на наличие возбудителя листериоза является обязательным. Проблема пищевого листериоза приобретает также существенное социально-экономическое значение по причине ущерба от изъятия контаминированной продукции, ограничения экспорта и импорта, остановки производства. Лабораторные исследования являются основой предупреждения пищевых токсикоинфекций на всех этапах производства пищевой промышленности, которые ведут к безопасности жизнедеятельности населения и распространения микробиологических инфекций. Принимая во внимание, указанное выше, необходимо было рассмотреть существующие разработки в технологии современных питательных сред для выявления листерий.

Abstract. One of the main tasks of the domestic meat industry at the present stage of development is to ensure safety for the consumer of produced meat products. It is known that in meat raw materials and products made from it, especially in violation of the technological regimes and sanitary and hygienic conditions of production, it is possible to identify microorganisms dangerous for humans — *Listeria*. In this regard, in the zone of European economic cooperation, as well as other developed countries (USA, Canada, Japan), the requirements for the control of pathogenic listeria in meat and meat products, the consumption of which can cause human disease, are strictly regulated. The study of food for the presence of the causative agent of listeriosis is mandatory. The problem of food listeriosis is also of significant socioeconomic importance due to the damage caused by the removal of contaminated products, the restriction of exports and imports, and the cessation of production. Laboratory studies are the basis for the prevention of foodborne diseases at all stages of the production of the food industry, which lead to health and safety of

the population and the spread of microbiological infections. Taking into account the above, it was necessary to consider the existing developments in the technology of modern nutrient media to identify *Listeria*.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, мясная продукция.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, meat products.

Введение

Известно, что болезни пищевого происхождения в промышленно развитых, а также в непромышленных странах выросла [1–2]. Это может быть результатом серьезных изменений в производстве: переработка, консервации, хранения, а также глобализация и независимость пищевой торговли продуктами питания и ее поставок. *Listeria monocytogenes* (E. Murray et al. 1926) Pirie 1940 — это патоген человека, который широко распространяется в окружающей среде [3–4]. Готовая продукция, пищевое мясное сырье — это основной источник *L. monocytogenes* [5–7].

Международная комиссия по микробиологической спецификации на продукты питания пришли к выводу, что 100 КОЕ *L. monocytogenes* на грамм пищи во время потребления приемлемо для потребителей. Это утверждение касается того факта, что клинические случаи листериоза обычно связаны с высокими обсеменениями *L. monocytogenes*, так как трудно уничтожить листерии из среды пищевого производства [8].

Лабораторная диагностика листериоза у животных осуществляется в соответствии с действующими нормативными и методическими документами с применением питательных сред, диагностических препаратов (тест-системы, диагностикумы и другие), разрешенными к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке. Молекулярно-генетические методы исследования (полимеразно-цепная реакция, ПЦР) могут быть использованы в качестве дополнительного метода при исследовании патологического (биологического) материала с последующим подтверждением результатов бактериологическими исследованиями [9]. Обычные методы тестирования для обнаружения *L. monocytogenes* в пище включают рост в среде предварительного обогащения, с последующим ростом на селективной среде и батареей подтверждающих биохимический и серологический тестов [10]. Эти методы трудоемки и занимают много времени, около 10 дней, быстрый альтернативный метод в режиме реального времени (RTi) ПЦР, который позволяет точно и однозначно идентифицировать количественное определение последовательности нуклеиновых кислот [11–12].

Цель исследования — мониторинг блочного сырья говядины, полутуш свиней, готовой мясной продукции, на наличие *Listeria monocytogenes* и подбор эффективных экспресс методов выявления возбудителя.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в лаборатории (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН). Для исследования использованы 80 проб: смывы с полутуш свиней (n=10), смывы с блоков сырья говядины (n=10), смывы с технологического оборудования (n=10), 50 образцов готовой продукции, среди образцов были мягкие колбасы: (вареные, варено-копченые) колбасы, вареная «Любительская» (n=6), Ветчина вареная (n=4), «Докторская» колбаса (n=10), «Зернистая» салями (n=4), «Московский сервелат» (n=6); твердые колбасы сырокопченые: «Брауншвейгская» (n=4), «Прошутто»

(n=10), «Кремлевская» (n=6). Исследуемая продукция из торговых точек московских рынков с января 2017 по январь 2019 года.

L. monocytogenes по результатам исследований методом Real-time PCR. Исследования проводились согласно ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*.

Выделение ДНК проводили с использованием пробы быстрого спина PrepSEQ.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР) была использована для обнаружения *Listeria monocytogenes* и TaqMan® был применен для обнаружения амплифицированной последовательности.

Для проведения мониторинга свиных полутуши и готовых мясных продуктов отбирали смывы согласно п.7.3.2 ГОСТ Р ИСО 17604.

Отбор смывов с блочного сырья говядины производилось согласно п. 7.3 ГОСТ 17604.

Отбор смывов с поверхностей оборудования цехов мясоперерабатывающего предприятия осуществляется согласно методическому руководству по санитарно-микробиологическому контролю мяса и молочных продуктов на наличие листерий.

Микробиологические методы: при исследовании на *Listeria monocytogenes* использован ГОСТ 32031-12. Для биохимической идентификации сделаны тесты двух различных систем. Microbact: Esc–эскулин, Mannitol–маннит, Xylose–ксилоза, Arabitol–арабитол, Ribose–рибоза, Rhamnose–рамноза, Trehalose–трегалоза, Tagatose–тагатоза, Gluc-1-Phos–Глюкоз-1-фосфат, M–D–Gluc–Метил–D–глюкозид, M–D–Man–Метил–D–маннозид, Haemolysis Api–тест: DIM–ферментативный субстрат, ESC–эскулин железа цитрат, αMan-4–нитрофенил–αD–маннопиранозид, DARL–D–арабит, XYL–D–ксилоза, RHA–L–рамноза, MDG–метил–αD–глюкопиранозид, RIB–D–рибоза, G1P–глюкоза-1-фосфат, TAG–D–тагатоза.

При исследовании методом полимеразно–цепной реакции использовались тест–системы, разработанные в ВНИИМП мясной промышленности.

Результаты исследования и их обсуждение

Были взяты смывы с образцов неdestructивным методом. Пакеты были доставлены в этот же день в лабораторию, в каждый пакет было добавлено по 90 мл ПБЛ 1. Посевы инкубировались при температуре в 30 °С. Через 24 ч в пакетах был проведен первичный учет посевов при котором было отмечено наличие/отсутствие роста.

В каждой пробе наблюдалось помутнение питательной среды ПБЛ, то есть наличие роста микроорганизмов.

После первичного обогащения в соответствии с ГОСТ №32031-12 пересевали одновременно на селективную среду накопления Бульон Фразера 2 и плотную дифференциально-диагностическую среду ALOA. Посевы термостатировали при 37 °С.

Учет результатов посева на бульон Фразера осуществлялся через 24 ч, и дополнительно — на 24 ч.

Род *Listeria* дает характерные колонии зеленого цвета. Зеленые бактерии как видно не имели отдельных колоний, соответственно был сделан пересев на истощение на среду ALOA штрихом. Через 48 ч наблюдали характерный рост отдельных колоний, в т. ч. характерных для *Listeria sp.*

На 4 день исследования на Бульоне Фразера после 48 ч культивирования отмечали почернение среды, после чего был произведен пересев на среду ALOA. Процент зеленых колоний был выше со вторичной среды накопления. Чистую культуру выделяли методом рассева штрихом на ALOA. На ALOA с Фразера отмечались рост отдельных колоний

зеленого цвета, это не требовало рассева штрихом на чистоту. Был произведен пересев на скошенный агар TSA.

Идентификация: выросшие колонии зеленого цвета, характерные для *Listeria sp.* отобрали и пересеяли на TSA, посеы культивировали 48 часов при 37 °С. Пересев осуществлялся для дальнейшей биохимической и ПЦР идентификации выросших колоний.

Мониторинг блочного сыря на наличие бактерии рода Listeria.

В Таблице 1 представлены результаты лабораторного исследования на Бульоне Фразер, в ходе анализа представлено десять смывов с блочного сыря.

Таблица 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ НА БУЛЬОНЕ ФРАЗЕР

Исследуемые образцы	Учет роста спустя 24 часа	Учет роста спустя 48 часов
№1	+	+
№2	+	+
№3	+	+
№4	+	+
№5	–	–
№6	–	–
№7	–	–
№8	–	–
№9	–	–
№10	–	–

Примечание: + присутствие роста; – отсутствие роста.

Среда Фразера почернела в четырех образцах из тридцати, которые были отобраны от блочного сыря. Когда отмечают рост на Бульоне Фразера, содержащем эскулин наблюдают почернение среды из-за распада эскулина до глюкозы и эскулетина. Эскулин взаимодействует с ионами железа и создает комплекс черного цвета.

Из всех исследованных образцов только 6 были выделены и прошли идентификацию (Таблица 2).

Таблица 2.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ

№	Тест на каталазу	Тест на оксидазу	Окраска по Граму
1	+	–	+
2	+	+	–
6	+	–	+
8	+	–	+
18	+	–	+
19	+	–	+

Примечание: + присутствие роста; – отсутствие роста.

Бактерия рода *Listeria* является каталаза положительная, оксидаза отрицательная, грамположительная.

Все колонии, характерные по свойствам для бактерий рода *Listeria* были идентифицированы с использованием биохимических тестов Ари–тест и Microbact. Колонию, давшую характерную для *L. monocytogenes* зону помутнения, дополнительно идентифицировали методом ПЦР.

Для сравнения были предложены две тест–системы Ари–тест и Microbact–тест.

Таблица 3.
 РЕЗУЛЬТАТЫ ПО MICROBACT–ТЕСТ; КОЛОНИЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ОБРАЗЦА №1

№	Esc	Mann	Xyl	Arab	Rib	Rham	Tre	Tag	Gluc- 1-Phos	M-D- Gluc	M-D- Man	Haem
1	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+

Исходя из Таблицы 3 и согласно профилю идентификации производителя тест–системы, данный результат показал 99,9% сходимость с видом *Listeria monocytogenes*.

Таблица 4.
 РЕЗУЛЬТАТЫ ПО АРИ КОЛОНИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОСТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ

№	Dim	Esc	αMan	Darl	Xyl	Rha	Mdg	Rib	Glp	Tag
Совокупный профиль образцов 2, 6, 8, 18,19	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–

Исходя из данных, представленных в Таблице 4 и согласно профилю идентификации производителя тест–системы, данный результат показал 99,6% сходимость с видом *L. innocua*.

В результате ПЦР анализа было установлено, что выделенная колония с образца №1 действительно относится к виду *L. monocytogenes*.

Исходя из полученных данных нами было установлено, что в полутушах №7, № 8 была обнаружена *Listeria innocua*, в смывах с оборудования №6, №8 — также *Listeria innocua*, в смывах с блочного сыря №2 — *Listeria innocua*, №1 — *Listeria monocytogenes*.

Блочная говядина может источником *L. monocytogenes* и контаминировать через разделочные доски, оборудование и инвентарь другое «чистое» мясное сырье и готовую продукцию.

Примечательно, что данный метод не требует каких-либо шагов культивирования, а это означает, что результаты могут быть получены значительно быстрее (Таблица 5).

Выводы

С точки зрения практичности, метод на основе ДНК потенциально может быть использован для положительного скрининга *L. monocytogenes*, и основное преимущество метода на основе ДНК состоит в том, что он может обнаруживать *L. monocytogenes* без обогащения в мясных продуктах. Однако для этого не нужно выполнять больше шагов, и только приблизительно прогнозирует уровень загрязнения мясного продукта.

Таблица 5.

ПЦР–ОБНАРУЖЕНИЕ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ВНУТРЕННЕГО ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО
 КОНТРОЛЯ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ОБРАЗЦАХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

<i>Ст–пороговый цикл</i>			
<i>№ образца</i>	<i>Мясной продукт</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>IPS Внутренний позитивный контроль</i>
1		16,23	29,69
2	Вареная «Любительская»	16,59	17,31
3		14,77	14,76
4		15,89	15,98
5	Ветчина вареная	19,44	28,60
6		24,27	29,18
7		19,11	27,39
8	«Докторская» колбаса	24,27	29,18
9		35,46	32,91
10	«Зернистая» салями	34,39	32,58
11		32,94	31,90
12	«Зернистая» салями	31,58	29,95
13		11,58	16,13
14	«Московский» сервелат	7,47	18,52
15		27,46	29,46
16	«Брауншвейгская» сырокопченая	14,34	17,88
17	«Прошутто» сырокопченая	11,23	20,28
18		11,74	30,63
19	«Кремлевская» сырокопченая	9,78	29,74
20		6,10	29,19

Результаты показывают, что ПЦР–анализ в режиме реального времени, указанный в этих исследованиях, могут обнаруживать *Listeria monocytogenes* в образцах мясных продуктов. Быстрый метод ПЦР в реальном времени показал очень хорошие результаты по сравнению с традиционным методом. Это быстрый, простой, специфичный и чувствительный способ обнаружения нуклеиновых кислот, который может быть использован в клинических диагностических тестах.

Список литературы:

1. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis - United States, 2000 // MMWR. Morbidity and mortality weekly report. 2000. V. 49. №50. P. 1129.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Public health dispatch: Outbreak of listeriosis - Northeastern United States, 2002 // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002. V. 51. P. 950-951.
3. Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., ..., Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants // Clinical microbiology reviews. 2001. V. 14. №3. P. 584-640. DOI: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
4. Rocourt J., Hogue A., Toyofuku H., Jacquet C., Schlundt J. *Listeria* and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem // American Journal of Infection Control. 2001. V. 29. №4. P. 225-227. DOI: 10.1067/mic.2001.115681.
5. Wing E. J., Gregory S. H. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update // The Journal of infectious diseases. 2002. V. 185. № Supplement 1. P. S18-S24. DOI: 10.1086/338465.

6. Peccio A., Autio T., Korkeala H., Rosmini R., Trevisani M., Peccio A. et al. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants // *Letters in Applied Microbiology*. 2003. V. 37. №3. P. 234-238. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01384.x.
7. Тартоковский И. С., Малеев В. В., Ермолаева С. А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех, 2002. 162 с.
8. Батаева Д. С., Нечаев А. Ю. Применение ускоренных микробиологических методов для определения патогенных листерий в мясе // *Все о мясе*. 2007. №3. 27-28 с.
9. Ларионова О. С., Ивашенцева Л. М. Применение ПЦР для индикации *L. monocytogenes* в пищевых продуктах // *Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов труды: междун. науч.-практ. конференция*. Покров, 2003. Ч. 1. С. 282-286.
10. Красникова Л. В., Гунькова П. И. Микробиологическая безопасность пищевого сырья и готовой продукции. СПб., 2014. 91 с.
11. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations // *Trends in molecular medicine*. 2002. V. 8. №6. P. 257-260. DOI: 10.1016/S1471-4914(02)02355-9.
12. Мухина Л. Б., Дмитриева Е. Ю. Организация контроля за распространением возбудителя листериоза *Listeria monocytogenes* на рыбоперерабатывающих предприятиях. СПб. 2003. 32 с.

References:

1. Centers for Disease Control and Prevention. (2000). Multistate outbreak of listeriosis - United States, 2000. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 49(50), 1129.
2. Centers for Disease Control and Prevention. (2002). Public health dispatch: Outbreak of listeriosis - Northeastern United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51, 950-951.
3. Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., ... & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 584-640. doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
4. Rocourt, J., Hogue, A., Toyofuku, H., Jacquet, C., & Schlundt, J. (2001). *Listeria* and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *American Journal of Infection Control*, 29(4), 225-227. https://doi.org/10.1067/mic.2001.115681.
5. Wing, E. J., & Gregory, S. H. (2002). *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *The Journal of infectious diseases*, 185(Supplement 1), S18-S24. doi:10.1086/338465.
6. Peccio, A., Autio, T., Korkeala, H., Rosmini, R., & Trevisani, M. (2003). *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 234-238. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01384.x.
7. Tartokovskij, I. S., Maleev, V. V., & Ermolaeva, S. A. (2002). Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Москва, 162.
8. Bataeva, D. S., & Nechaev, A. Yu. (2007). Применение ускоренных микробиологических методов для определения патогенных листерий в мясе. *Все о мясе*, (3), 27-28.
9. Larionova, O. S., & Ivashentseva, L. M. (2003). Применение PCR для индикации *L. monocytogenes* в пищевых продуктах. In: *Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов труды: междун. науч.-практ. Конференция*, Покров, 1, 282-286.
10. Krasnikova, L. V., & Gunkova, P. I. (2014). Микробиологическая безопасность пищевого сырья и готовой продукции. St. Petersburg, 91.
11. Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8(6), 257-260. https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9.

12. Muhina, L. B., & Dmitrieva, E. Yu. (2003). Organizatsiya kontrolya za rasprostraneniem vozбудitelya listerioza *Listeria monocytogenes* na rybopererabatyvayushchikh predpriyatiyakh: Metodicheskie rekomendatsii. St. Petersburg, 32.

*Работа поступила
в редакцию 01.04.2019 г.*

*Принята к публикации
05.04.2019 г.*

Ссылка для цитирования:

Березняк О. В., Рысцова Е. О. Лабораторные исследования по выявлению листерии в пищевой продукции // Бюллетень науки и практики. 2019. Т. 5. №5. С. 192-199. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/42/26>.

Cite as (APA):

Bereznyak, O., & Rystsova, E. (2019). Laboratory Studies to Identify *Listeria* in Food Product. *Bulletin of Science and Practice*, 5(5), 192-199. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/42/26>. (in Russian).