

## **2.4. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для обнаружения патогенных микроорганизмов в сыром молоке (Остроухова В.И., Соловьева О.И., Ананьева Т.В.)**

Одной из актуальных задач в области обеспечения микробиологической безопасности молока-сырья и молочных продуктов является минимизация потенциальных рисков возникновения инфекционных болезней и пищевых инфекций у потребителей.

К числу важнейших пищевых инфекций с доминированием алиментарного механизма заражения относят листериоз – антропозооноз, характеризующийся полиморфизмом клинических проявлений. Заболевание у человека протекает с признаками поражения центральной нервной системы, органов размножения, септическими явлениями или в форме бессимптомного носительства. Летальность при листериозе достигает 60%. У сельскохозяйственных животных клинические признаки листериоза – энцефалиты, аборт, маститы и септицемия.

Возбудителями листериоза являются микроорганизмы рода *Listeria* – грамположительные короткие палочки. Из известных в настоящее время видов листерий (в том числе *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*), только *L. monocytogenes* патогенен для человека и животных, а *L. ivanovii* – для животных (СанПиН 3.3686-21).

В современной концепции патогенеза признанными факторами передачи инфекционного начала являются продукты животноводства: молоко и мясо. Поэтому основополагающим принципом профилактики листериоза у людей и животных является систематический контроль качества и безопасности животноводческой продукции, сырья и кормов.

Технический регламент Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» регламентирует предельно допустимые уровни содержания микроорганизмов в сыром молоке. Основной микробиологический показатель общей бактериальной обсемененности, отображающий картину санитарного состояния молока – количество

мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). Представители родов семейства Enterobacteriaceae (бактерии группы кишечных палочек) в сыром молоке не нормируются, но контролируются в молочных продуктах, пастеризованном и стерилизованном молоке. К числу патогенных микроорганизмов, наличие которых не допускается в 25 г (см<sup>3</sup>) сырого молока относят представителей рода *Salmonella*. Допустимые уровни содержания патогенных микроорганизмов, в том числе листерий (*Listeria monocytogenes*) регламентируют в продукции детского питания, в продуктах переработки молока при выпуске их в обращение, а также в молочных продуктах, молочных составных продуктах для питания детей дошкольного и школьного возраста.

Согласно микробиологическим нормативам безопасности, предъявляемым к сырому молоку, приведенным в Приложении 1 «Микробиологические нормативы безопасности (патогенные)» к Техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011), наличие *L. monocytogenes* не регламентируется.

Широкая распространенность видов листерий близких по фенотипическому профилю, использование различных методических схем идентификации штаммов, разная частота и уровни выявления *Listeria monocytogenes* в испытуемых образцах сырого молока затрудняют получение объективных данных и, соответственно, усложняют анализ эпидемиологической ситуации. Молокоперерабатывающие компании, в соответствии с программами производственного контроля, как правило, с периодичностью один раз в шесть месяцев, определяют наличие бактерий рода *L. monocytogenes* в образцах молока-сырья. Микробиологические исследования проводятся в аккредитованных молочных лабораториях, так как они требуют высокой квалификации персонала, навыков прикладной работы и строгого соблюдения требований безопасности при выполнении работ.

Классические лабораторные методы, используемые для проведения микробиологического контроля патогенных микроорганизмов и определения биологической безопасности молока, зафиксированы в ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий рода *Listeria monocytogenes* (с Поправкой) (ГОСТ 32031-2012) и требуют, согласно схеме проведения испытаний (Приложение А), до пяти суток. В связи с вышеизложенным необходимы высокоточные методы индикации, которые могут быть использованы для быстрого обнаружения *L. monocytogenes* в молоке-сырье и минимизации распространения возбудителя болезни.

Работа по изучению контаминация сырого молока бактериями рода *Listeria* проводилась в лаборатории кафедры молочного и мясного скотоводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева и в профильной лаборатории компании ООО «ДНК-Технология».

Фактическое изучение микробиологических показателей проводили в образцах сырого молока коров с использованием молекулярно-биологических методов на примере полимеразной цепной реакции по ГОСТ ISO 20838-2014 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа (ГОСТ ISO 20838-2014). Для анализа были отобраны индивидуальные пробы молока 9 коров и одна проба сборного молока (ГОСТ 26809.1-2014).

ПЦР-анализ проводили в микробиологической лаборатории, оснащенной необходимым оборудованием. Были использованы реактивы: набор «ПРОБА-ГС», предназначенный для выделения ДНК из исследуемого биоматериала и тест «Фемофлор-16» – для проведения количественного и качественного анализа биоматериала в ПЦР-амплификаторе «ДТ-96». Выделение ДНК из 50 мл сырого молока проводили через 18 часов после контрольной дойки, образцы хранились при температуре 2...8 °С. Завершающим этапом являлась амплификация матричной ДНК, которая

проводится в режиме реального времени, что позволяет следить за течением реакции на всех этапах.

Для изучения наличия патогенных микроорганизмов в молоке нами использован молекулярно-биологический метод – полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, позволяющий быстро и точно идентифицировать ДНК *L. monocytogenes*. Главным преимуществом метода перед классическим методом микробиологического анализа (ГОСТ 32031-2012) является почти полная автоматизация процесса, его быстрота, спектр проводимых анализов, а также возможность следить за ходом реакции на всех этапах. На проведение амплификации в режиме реального времени в среднем требуется около 1 часа, при полной загрузке амплификатора биоматериалом для анализа. ПЦР в реальном времени исключительно точно дифференцирует *L. monocytogenes* в образцах молока, избегая ошибок.

В изученных образцах сырого молока не обнаружено ДНК патогенных микроорганизмов, что гарантирует отсутствие патогенной микрофлоры, в частности бактерий рода *L. monocytogenes* (табл. 2.9). Инфицирование людей листериозом наблюдается при употреблении в пищу молока от зараженных сельскохозяйственных животных, не подвергнутого достаточной термической обработке.

При проведении ПЦР в реальном времени объем образца молока составлял 50 мл (51,5 г), то есть примерно в два раза превышал необходимую для обнаружения патогенных микроорганизмов (в т.ч. сальмонелл) массу продукта. Отсутствие ДНК бактерий *L. monocytogenes* в пробах сырого молока гарантирует его качество и биологическую безопасность.

ПЦР является высокоспецифичным методом, характеризуется быстротой, превосходит по чувствительности бактериологический анализ, что позволяет обнаруживать микроорганизмы, присутствующие в очень низких и единичных концентрациях. ДНК инфекционных агентов эффективно экстрагируется из биологических жидкостей, тканей, молока и продуктов питания, подтверждая универсальность молекулярно-

биологического метода. ПЦР-диагностика с успехом применяется для обнаружения вирусных и бактериальных инфекций у сельскохозяйственных животных. Единственным фактором, снижающим возможность применения данного метода, могут являться финансовые затраты на реализацию.

Таблица 2.9

### Определение ДНК *Listeria monocytogenes*

№ образца	<i>Listeria monocytogenes</i>	Цикл внутреннего контроля, Ср
1	не выявлено	29,0
2	не выявлено	28,4
3	не выявлено	29,2
4	не выявлено	28,5
5	не выявлено	28,5
6	не выявлено	29,2
7	не выявлено	28,4
8	не выявлено	29,4
9	не выявлено	29,2
10	не выявлено	28,7

Возможность применения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для идентификации *L. monocytogenes* в молоке показала высокую эффективность по сравнению с бактериологическим методом и может быть рекомендована для исследования сырья и молочных продуктов.