

АНТИБИОТИКО-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛИСТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Г. С. Скитович¹, К. В. Серова², Н. Б. Шадрова³, О. В. Прунтова⁴

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: skitovich@arriah.ru

² Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: serova@arriah.ru

³ Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shadrova@arriah.ru

⁴ Главный эксперт ИАЦ, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований образцов пищевых продуктов и сырья на наличие бактерий *Listeria monocytogenes* за 2011–2016 гг. В 2011 г. было выявлено 0,3% положительных проб (n = 1100), в 2016 г. выявляемость составила 7% (n = 698). Основными видами продукции, содержащими бактерии *Listeria monocytogenes*, являются мясо и мясные полуфабрикаты (87,2%; n = 34), мясо птицы и полуфабрикаты из мяса птицы (10,3%; n = 4), а также сливки пастеризованные (2,6%; n = 1). Проведенные исследования показали, что все выявленные изоляты *Listeria monocytogenes* обладали резистентностью к антибиотикам цефалоспоринового ряда, аминогликозидам и фторхинолонам.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, антибиотики, антибиотикорезистентность.

ВВЕДЕНИЕ

Все виды *Listeria* – это грамположительные палочковидные бактерии длиной 0,4–2 мкм, одиночные или в коротких цепочках, реже образующие длинные нити. Листерии не кислотоустойчивы, не образуют споры и капсулы, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Широко распространены в природе и способны выживать в экстремальных условиях среды, в том числе в широком диапазоне температур и в присутствии бактерицидных веществ [6].

Listeria monocytogenes – факультативный внутриклеточный патоген, один из основных контаминантов пищевых продуктов, вызывающий редкое, но летальное заболевание, поражающее людей с ослабленным иммунитетом, называемое листериозом [5]. Листерии не являются широко распространенной инфекцией. По количеству выявленных случаев он значительно уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам, но превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов. Так, из 2518 больных листериозом, выявленных в США в 1997 г., в 20% случаев имел место летальный исход, а госпитализация требовалась в 92% случаев [5, 7, 8].

В Российской Федерации заболеваемость листериозом официально регистрируется с 1992 г. Большинство

крупных эпидемических вспышек листериоза с высоким процентом летальных исходов обусловлено потреблением пищевых продуктов, прежде всего сыра, других молочных продуктов и салатов, в меньшей степени – мясных, куриных и рыбных изделий [6].

Значение пищевого пути передачи листериоза хорошо иллюстрируют данные Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), показавшие, что 11% всех продуктов, хранящихся в домашних холодильниках, контаминированы листериями.

Анализ свойств листерий показал, что такие характеристики возбудителя, как убиквитарность, термотолерантность, психрофильность, исключительно благоприятны для размножения и сохранения листерий в пищевых продуктах. В эпидемиологическом надзоре за листериозом при сохранении традиционного подхода, связанного с контролем за эпизоотиями среди сельскохозяйственных животных и грызунов, вектор смещается в сторону постоянного мониторинга содержания листерий в пищевых продуктах на этапах их изготовления и хранения.

Также важным аспектом в борьбе с патогенными микроорганизмами является снижение со временем активности антибактериальных препаратов, что обусловлено формированием у микробов лекарственной устойчивости (резистентности). Резистентные штаммы микроорганизмов возникают при изменении генома бактериальной клетки в результате спонтанных мутаций. Приобретенная резистентность закрепляется и передается по наследству последующим поколениям бактерий, что повышает риск распространения резистентных штаммов в обществе [1].

Бактерии вида *L. monocytogenes* чувствительны к широкому спектру антибиотиков, за исключением новых цефалоспоринов и фосфомицина. У некоторых изолятов, полученных из пищевых продуктов, показана более высокая устойчивость к таким антибиотикам, как стрептомицин и канамицин. Резистентность к антибиотикам в большинстве случаев детерминиру-

ются соответствующими плазмидами, за исключением тетрациклина, ген устойчивости к которому находится в хромосоме [9].

Листерии чувствительны к производным пенициллина и устойчивы к цефалоспорином. Большинство макролидов эффективно против *L. monocytogenes*, за исключением азитромицина и особенно спирамицина. Высокой активностью против листерий обладают аминогликозиды.

Для большинства антибиотиков при действии на листерии *in vitro* характерен бактериостатический, а не бактерицидный эффект. Это относится к β -лактамовым антибиотикам, макролидам, тетрациклинам, хлорамфениколу, рифампицину [9]. У хинолонов бактерицидное действие против листерий выражено слабо. Антибактериальной активностью обладают аминогликозиды, тейкопланин, ко-тримоксазол в сочетании с триметопримом [8].

Учитывая высокую частоту контаминации мясных продуктов и продуктов из птицы, реализуемых населению, бактериями *L. monocytogenes*, наличие у них выраженных патогенных свойств и возрастающее влияние на возникновение патологии у человека, мониторинг антибиотикорезистентности этих микроорганизмов, выделенных из пищевых продуктов, является актуальным.

В связи с этим целью исследования было выделение изолятов *L. monocytogenes* из проб пищевых продуктов и определение антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и питательные среды. Для проведения исследований применялись: трипозосоевый агар (TSA) (Merck, Германия); соево-казеиновый бульон (HiMedia, Индия); бульон Фрейзера для первичного обогащения (Merck, Германия); бульон Фрейзера для вторичного обогащения (Merck, Германия); Оксфорд агар (Merck, Германия); Оттавиани-Агости агар (ALOA) (Merck, Германия).

Контрольные штаммы: *Listeria monocytogenes* штамм 19115 (ATCC, США); *Escherichia coli* штамм 25922 (ATCC, США); *Staphylococcus aureus* 6538 (ATCC, США); *Rhodococcus equi* 6939 (ATCC, США).

Изоляты. В работе были использованы 57 изолятов бактерий *L. monocytogenes*, полученных из различных пищевых продуктов при проведении микробиологических исследований за 2011–2016 гг.

Получение изолятов бактерий *L. monocytogenes*. Выделение и идентификацию проводили в соответствии с ГОСТ 32031-2012 [2]. Навеску продукта массой ($25 \pm 0,1$) г, подготовленную для исследования, вносили в стерильный пакет, содержащий 225 см³ бульона Фрейзера для первичного обогащения. Гомогенизировали в течение 1 мин и инкубировали при температуре (30 ± 1) °C в течение (24 ± 2) ч.

После этапа первичного обогащения 0,1 см³ образца, независимо от наличия изменений среды, пересевали к 10 см³ бульона Фрейзера для вторичного обогащения. Инкубировали при температуре (37 ± 1) °C в течение 48 ч.

Из пробирок после инкубирования бактериологической петлей проводили высев штрихом на поверхность двух сред: агара Оттавиани-Агости и Оксфорд агара. Инкубировали при температуре (37 ± 1) °C в течение 48 ч.

Принадлежность выросших колоний к *L. monocytogenes* подтверждали окраской по Граму, проверкой каталазной активности, определением подвиж-

ности культур, CAMP-тестом, иммуноферментным анализом с использованием анализатора mini VIDAS и биохимическими тестами. После идентификации изоляты *L. monocytogenes* хранили при -20 °C в соево-казеиновом бульоне, содержащем 15% глицерина.

Приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов. Для приготовления суспензии использовали чистую суточную культуру микроорганизмов, выросшую на плотной питательной среде ALOA. Петлей переносили несколько колоний в физиологический раствор, доводя оптическую плотность суспензии до 0,5 ед. по стандарту Мак-Фарланда. Готовую суспензию использовали в течение 15 мин после приготовления.

Антибиотики. В работе использовали стандартные бумажные диски следующих антибиотиков: амоксициллин (20 мкг/диск), сульфаметоксазол/триметоприм (23,75/1,25 мкг/диск), ампициллин (10 мкг/диск), ампициллин/сульбактам (10/10 мкг/диск), гентамицин (10 мкг/диск), доксициклин (30 мкг/диск), энронит (300 мкг/диск), цефтриаксон (30 мкг/диск), цефепим (30 мкг/диск), цефотаксим (30 мкг/диск), левомецетин (30 мкг/диск), имипенем (10 мкг/диск), меропенем (10 мкг/диск), тикарциллин/клавуланат (75/10 мкг/диск), цефоперазон (75 мкг/диск), цефтазидим (30 мкг/диск), ципрофлоксацин (5 мкг/диск), офлоксацин (5 мкг/диск), амикацин (30 мкг/диск), азитронит (15 мкг/диск) (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, РФ).

Определение антибиотикорезистентности. Чувствительность изолятов *L. monocytogenes* к антибиотикам изучали по общепринятым утвержденным методическим рекомендациям [3, 4]. В стерильные чашки Петри диаметром 100 мм наливали по 20 мл расплавленного питательного агара TSA. Перед посевом поверхность среды подсушивали. Бактериальную суспензию в количестве 0,1 мл наносили на поверхность агара и равномерно распределяли шпателем, после чего стерильным пинцетом накладывали диски, пропитанные различными антибиотиками. В каждой чашке испытывали действие четырех антибиотиков. После аппликации дисков чашки Петри инкубировали при температуре 37 °C в течение 18–24 ч сверху дном. Оценку результатов проводили по наличию зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков. Отсутствие роста тест-организма на расстоянии более 10 мм от диска с антибиотиком указывало на чувствительность штамма. Если тест-организм развивался в непосредственной близости от диска, пропитанного антибиотиком, то данный микроорганизм оценивали как устойчивый к действию антибиотика. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм [4]. Для контроля качества использовали *Escherichia coli* № 25922.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В период с 2011 по 2016 г. лаборатория микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводила испытания образцов пищевой продукции по показателям безопасности в рамках выполнения Плана государственного ветеринарного лабораторного мониторинга остатков запрещенных и вредных веществ в организме живых животных, продукции животного происхождения и кормах, планов государственных заданий и заявок от производителей пищевого сырья и продукции.

Определение *L. monocytogenes* в таких видах пищевых продуктов, как молоко и мясо, регламентируется требованиями Технических регламентов (ТР) Таможенного союза (ТС), соответственно ТР ТС 033/2013 и ТР ТС 034/2013. За указанный период было выполнено 7289 исследований по определению *L. monocytogenes* и выявлено 153 положительных пробы. Анализ данных по обнаружению *L. monocytogenes* при исследовании пищевых продуктов за 2011–2016 гг. представлен в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что количество выявляемых изолятов *L. monocytogenes* растет с каждым годом. Так, в 2016 г. было выявлено 66 (6,6%) положительных проб, что в 3,5 раза превышает показатели за предыдущий год.

Распределение выделенных изолятов *L. monocytogenes* в пищевых продуктах за 2011–2016 гг. показано на рисунке.

Большинство изолятов *L. monocytogenes* получены из сырых мясных и мясосодержащих продуктов, таких как свинина, говядина, тушки кур, ноги свиные, перец фаршированный, пельмени, купаты, котлеты куриные, котлеты свиные, субпродукты говяжьи. Два изолята были выделены из готовых к употреблению молочных продуктов: пастеризованных сливок и твердого сыра. Также высокий уровень обнаружения данного микроорганизма в сухой рыбе, упакованной под вакуумом (17,1%), и соленом шпике (2,7%). Наибольшее количество изолятов *L. monocytogenes* было выявлено при исследовании проб говядины (28,10%).

Основной проблемой последних лет является широкое распространение резистентных форм патогенных микроорганизмов и снижение эффективности ряда антибиотиков.

В данной работе была определена резистентность к антибактериальным препаратам 57 изолятов *L. monocytogenes*, полученных при исследовании пищевых продуктов в 2016 г. По характеру роста тестируемых культур различали чувствительные изоляты и резистентные. Результаты исследования приведены в таблице 2.

По данным Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST), у бактерий *L. monocytogenes* выражена природная устойчивость к антибиотикам цефалоспоринового ряда, включая цефтазидим. В данной работе было проведено исследование целого ряда цефалоспоринов. Показано, что все испытываемые изоляты резистентны к таким антимикробным препаратам цефалоспоринового ряда, как цефтазидим, цефоперазон, цефепим, цефтриаксон и цефотаксим. Эти данные согласуются с результатами, полученными в 2015 г.

Аминогликозиды проявляют бактерицидное действие в отношении всех изолятов *L. monocytogenes*. Они связываются с 16S рРНК 30S субъединицы бактериальной рибосомы и таким образом ингибируют синтез белка [4].

Однако мутации в 16S рРНК, в частности метилирование, приводят к резистентности высокого уровня к таким антибиотикам аминогликозидного ряда, как гентамицин, амикацин и др. [6]. По данным собственных исследований (табл. 2), все изоляты *L. monocytogenes*, выделенные в 2015 и 2016 гг., обладали тотальной резистентностью к антимикробным препаратам этой группы.

Фторхинолоны обладают бактерицидным действием. Однако мутации в генах топоизомеразы II типа (*gyrA* и *gyrB*), которые являются предпочтительными мише-

Таблица 1
Выявление бактерий *L. monocytogenes* в пищевых продуктах за 2011–2016 гг.

Год	Всего исследований	Количество положительных проб (%)
2011	1100	3 (0,3)
2012	839	2 (0,2)
2013	1807	42 (2,3)
2014	1007	13 (1,3)
2015	1532	27 (1,8)
2016	1004	66 (6,6)
Всего	7289	153

нями у грамположительных микроорганизмов, приводят к развитию резистентности высокого уровня, что подтверждается проведенными исследованиями.

Важно отметить, что в РФ фторхинолоны впервые были официально разрешены для использования в лечебно-профилактических целях при выращивании сельскохозяйственных животных и птицы в 1994 г. [6]. Обнаруженная в настоящем исследовании тотальная резистентность к фторхинолонам *L. monocytogenes* свидетельствует о том, что последствия использования данных препаратов, в виде формирования резистентности к ним, оказались масштабными.

Также все выделенные изоляты оказались резистентны к таким антибиотикам, как левомецетин и энронит.

Из всех изученных антибиотиков антимикробным действием обладали антибиотики группы пенициллинов: ампициллин, ампициллин/сульбактам и тикарциллин/клавуланат, за исключением амоксициллина, резистентность к которому характерна для 58% изолятов. Причем, по сравнению с 2015 г., резистентность к амоксициллину возросла.

Частичную резистентность изоляты бактерии *L. monocytogenes* проявляли по отношению к карбапенемам (19 и 14%), макролидам (47%) и сульфанилами-

Рис. Распространенность бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах (n = 146)

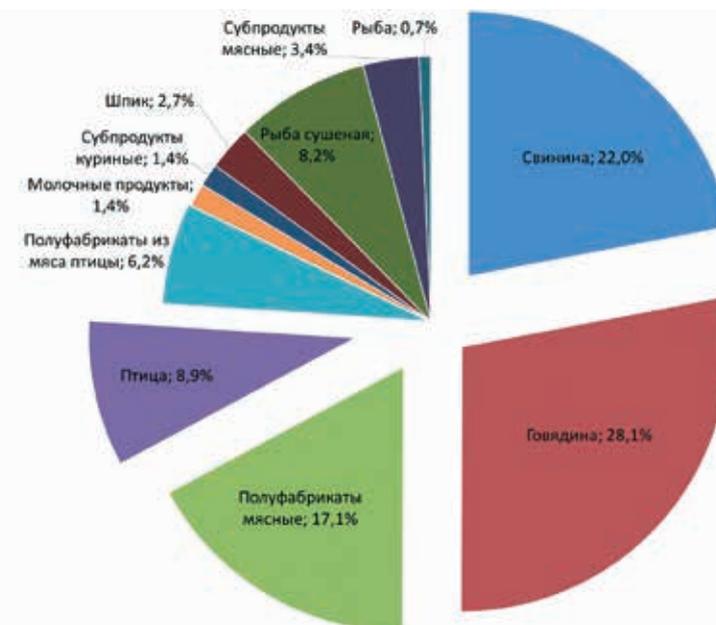


Таблица 2
Антибиотикорезистентность изолятов бактерий *L. monocytogenes*

№ п/п	Антибиотик		Количество резистентных изолятов (%)		
	группа	наименование	2016 г. (n = 59)	2015 г. (n = 19)	данные лит-ры (n = 43)
1	Цефалоспорины	Цефтазидим	57 (100)	н/и	6 (14)
2		Цефоперазон	57 (100)	н/и	н/и
3		Цефепим	57 (100)	19 (100)	н/и
4		Цефтриаксон	57 (100)	19 (100)	н/и
5		Цефотаксим	57 (100)	19 (100)	0
6	Аминогликозиды	Гентамицин	57 (100)	19 (100)	0
7		Амикацин	57 (100)	н/и	0
8	Фторхинолоны	Ципрофлоксацин	57 (100)	н/и	0
9		Офлоксацин	57 (100)	н/и	н/и
10	Пенициллины	Ампициллин	0	1 (5)	9 (20,9)
11		Ампициллин/сульбактам	0	н/и	н/и
12		Амоксициллин	33 (58)	2 (11)	н/и
13		Тикарциллин/клавуланат	0	н/и	н/и
14	Тетрациклинового ряда	Доксициклин	35 (61)	19 (100)	0
15	Левомецетинового ряда	Левомецетин	57	н/и	н/и
16	Карбапенемы	Меропенем	11 (19)	н/и	н/и
17		Имипенем	8 (14)	н/и	н/и
18	Макролиды	Азитронит	27 (47)	н/и	н/и
19	Полипептиды	Энронит	57	н/и	н/и
20	Сульфаниламиды	Триметоприм/сульфаметоксазол	14 (25)	19 (100)	5 (11,6)
21	Резистентные к 1 антибиотику		0	0	15 (34,9)
22	Резистентные к 2 антибиотикам		0	0	20 (46,5)
23	Резистентные к > 2 антибиотикам		57 (100)	19 (100)	6 (14)

дам (25%). Большая группа изолятов резистентна в отношении доксициклина (61%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненных исследований свидетельствуют о высокой резистентности изолятов бактерий *L. monocytogenes*, циркулирующих на территории Российской Федерации, к изученным антибиотикам.

Вследствие этого необходимо уделять большое внимание исследованию пищевых продуктов на наличие бактерий *L. monocytogenes*, проводить изучение биологических свойств выделенных изолятов, совершенствовать методы диагностики данного микроорганизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биоритмы антибиотикорезистентности микроорганизмов / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, С. Б. Фадеев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. – № 5. – С. 35–38.
2. ГОСТ 32031-2012. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. – М.: Стандартинформ, 2014. – 26 с.
3. Диско-диффузионный метод (ДДМ) / МУК 4.2.1890-04 // Определение чувствительности ми-

кроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – С. 18–21.

4. Методические указания. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (Версия-2014-01). Имплементация рекомендаций Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST): утв. 23.05.2014. – М., 2014. – 154 с.

5. Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яйцепродуктов / под ред. Дж. К. Мид. – СПб.: Профессия, 2008. – 384 с.

6. Тартаковский И. С., Малеев В. В., Ермолаева С. А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. – М.: Медицина для всех, 2002. – 195 с.

7. Food-related illness and death in the United States / P. S. Mead [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 5, № 5. – P. 607–625.

8. Lorber B. Listeriosis // Clin. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 24, № 1. – P. 1–11.

9. Slade P. J., Collins-Thompson D. L. Listeria, plasmids, antibiotic resistance, and food // Lancet. – 1990. – Vol. 336 (8721). – P. 1004.