

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Омарова С. М., Исаева Р. И., Багандова Д. Ш., Саидова П. С., Горелова В.Г.

РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИСТЕРИЙ

ФГБОУ ВО Дагестанский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 367000, Махачкала, Россия

*Приведены данные по разработке коммерческих питательных сред для изучения биологических свойств *L. monocytogenes*. Показана эффективность применения разработанных сред для определения важных идентификационных тестов – подвижности и лецитиназной активности листерий в процессе установления принадлежности выделенной культуры к патогенному виду.*

Предлагаемые питательные среды позволяют визуально чётко регистрировать подвижность и лецитиназную активность листерий, на этапе идентификации выделенных культур способствуя совершенствованию диагностики листериоза.

Ключевые слова: листерии; питательная среда; подвижность; лецитиназная активность; факторы патогенности; диагностика; идентификация.

Для цитирования: Омарова С. М., Исаева Р. И., Багандова Д. Ш., Саидова П. С., Горелова В.Г. Разработка и изучение питательных сред для определения биологических свойств листерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 110-114. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-110-114>

Для корреспонденции: Омарова Салидат Магомедовна, д-р биол. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии; e-mail: omarovanpo@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках финансирования НИР «НПО» Микроген».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.09.2021

Принята к печати 20.10.2021

Опубликовано 23.02.2022

Omarova S.M., Isaeva R. I., Bagandova D. Sh., Saidova P. S., Gorelova V.G.

DEVELOPMENT AND STUDY OF NUTRIENT MEDIA FOR DETERMINING THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF LISTERIA

FSBEI HE Dagestan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 36700, Makhachkala, Russia

*The commercial nutrient media for investigation of the biologic properties of *L. monocytogenes* is developed. The efficiency of the use of developed media for determination of motility and lecithinase activity of *Listeria* in the establishment of the isolated culture to the pathogenic species is shown.*

*These nutrient media are developed for visually accurate registration of the motility and lecithinase activity of *Listeria* when identifying the isolated cultures improving the diagnostics of listeriosis.*

Key words: *Listeria*; nutrient medium; motility; lecithinase activity; pathogenic factor; diagnostics; identification.

For citation: Omarova S.M., Isaeva R.I., Bagandova D. Sh., Saidova P.S., Gorelova V.G. Development and study of nutrient media for determining the biological properties of *Listeria*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (2): 110-114 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-2-110-114>

For correspondence: Omarova Salidat Magomedovna, Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology; e-mail: omarovanpo@mail.ru

Information about authors:

Omarova S.M., <https://orcid.org/0000-0002-4034-0742>;

Isaeva R.I., <https://orcid.org/0000-0001-5959-2125>;

Bagandova D.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-0738-1008>;

Saidova P.S., <https://orcid.org/0000-0003-0236-891X>;

Gorelova V.G., <https://orcid.org/0000-0002-0210-4781>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *This work was carried out within the framework of funding for the research work «NPO» Microgen».*

Received 29.09.2021

Accepted 20.10.2021

Published 23.02.2022

На этапе идентификации листерий используют ряд тестов, для подтверждения принадлежности выделенной культуры к *Listeria* spp. и установления принадлежности выделенной культуры к патогенному для человека виду *Listeria monocytogenes* [5–9, 11, 14, 19]. Предлагаемые колонии листерий, выросшие на селективных диагностических средах для дальнейшей идентифика-

ции и изучения, высевают на специальные питательные среды, используя тесты определения подвижности и лецитиназной активности листерий. Последний является показателем их патогенности [1–4, 13, 15].

Важным идентификационным тестом для *Listeria* spp. является тест на подвижность, в котором используется высокая подвижность клеток при 22–25⁰ С и от-

сутствие подвижности при 37⁰ С. Листерии, выросшие при 22⁰ С, выглядят как тонкие короткие палочки с вращательной или подпрыгивающей активностью [12, 13]. Для определения подвижности листерий используют посев уколом в полужидкий агар. При 22⁰ С для подвижной культуры листерий характерен специфический рост в форме зонтика. Помимо модификаций полужидких сред лабораторного приготовления для определения подвижности имеются специальные коммерческие среды ряда зарубежных фирм изготовителей, например, фирмы «Hi Media» (Индия).

Одним из важнейших факторов патогенности *L. monocytogenes* является лецитиназа, которая необходима для выживания листерий в процессе внутриклеточного паразитизма. Для выявления лецитиназной активности при культивировании на питательных средах, в которые добавлен лецитин, необходим гидрофобный сорбент, например, активированный уголь. Добавление активированного угля позволяет устранить из питательной среды секретлируемый листериями продукт, подавляющий выявление лецитиназной активности у *L. monocytogenes*. В результате в присутствии угля у *L. monocytogenes* наблюдается чётко выраженная лецитиназная активность, которая при выращивании на плотных питательных средах даёт плотную зону помутнения вокруг колоний [10].

Для определения лецитиназной активности *L. monocytogenes*, предлагается ряд сред, в том числе среда ГРМ № 1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) и HiMedia Motility medium фирмы «HiMedia» (Индия). Использование разных сред для постановки данного теста демонстрирует различия в индукции лецитиназной активности на средах одного наименования, выпускаемых разными фирмами изготовителями. Вероятно, это может быть связано с компонентным составом питательных сред и внешними условиями культивирования.

Цель исследования – создание отечественных коммерческих питательных сред для определения подвижности и лецитиназной активности листерий. Разработка сред целевого назначения пополнит комплекс мероприятий, проводимых при выделении и идентификации культур листерий из исследуемого материала различного происхождения.

В лабораторной практике для определения подвижности микроорганизмов используют полужидкие среды с различным содержанием агара: от 0,2 до 0,5%. При разработке рецептуры сухой питательной среды для определения подвижности листерий в сухой питательный бульон (СПБ на основе каспийской кильки, производства НПО «Питательные среды», Махачкала), взятый за основу как оптимальный для роста и размножения листерий, что было определено в ранее проведенных нами исследованиях при разработке сред для выделения, накопления и идентификации листерий (патенты РФ № 2158758; 2000 г. и № 2201957; 2001 г.), добавляли различные количества агара микробиологического (0,2-0,5%), натрия хлорида от 0,2 до 1,0%. Для усиления роста добавляли 2,0 г/л экстракта кормовых дрожжей (ЭКД). Это количество ЭКД определено в серии опытов как оптимальное.

Приступая к исследованию вариантов среды для определения подвижности тест-штаммов листерий, учитывали их способность и свойства проявлять подвижность только при температуре 22-25⁰ С, так как при температуре (37±1)⁰ С инкубации наступает тепловой

шок (стресс) микроорганизмов, вследствие чего они теряют подвижность [13]. Посевы инкубировали при температурах (23±1)⁰ С и (37±1)⁰ С.

Изучение свойств тест-штаммов листерий по тесту подвижности на экспериментальных сериях среды проводили согласно методическим рекомендациям на музейных и свежeweделенных штаммах *Listeria* spp. [10 – 12].

Исследования показали, что более благоприятным для определения подвижности листерий являлся образец с 3,0 г/л агара микробиологического, так как обеспечивал визуально регистрируемый учёт подвижности тест-штаммов при температуре (23±1)⁰ С через 18±2 ч инкубации, при этом наблюдали, рост культур листерий по ходу укола петли в виде раскрывающегося зонтика. В среде с содержанием агара 2,0 г/л визуальный учёт затруднён, ввиду отсутствия чётко видимого роста по ходу укола петли суточной культуры тест-штаммов. Изучение подвижности листерий в среде с 5,0 г/л микробиологического агара дал отрицательный результат: фиксировали рост листерий по уколу характерный для неподвижных микроорганизмов.

Установлено оптимальное содержание в среде для определения подвижности листерий агара микробиологического – 3,5 г/л и питательной основы СПБ – 15,0 г/л, позволявших проводить чёткую регистрацию данного теста.

Биологическая характеристика предлагаемой среды изучена на широком наборе свежeweделенных штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала различного происхождения, предоставленном из музейной коллекции лаборатории легионеллёза ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава РФ. Среда обеспечивала визуальную регистрацию подвижности свежeweделенных штаммов *L. monocytogenes* в виде характерного роста в форме зонтика, через 18±2 ч инкубации при температуре (23±1)⁰ С, тогда как на контрольной среде подвижность культур отмечена только через 36 ч культивирования (табл. 1).

Среды для определения лецитиназной активности обычно содержат питательную основу, буфер и *ex tempore* добавленный яичный желток. При работе с листериями имеются свои особенности. При культивировании на питательных средах, в которые добавлен лецитин, лецитиназная активность листерий выявляется чрезвычайно слабо или вообще не наблюдается. Это связано с негативной ауторегуляцией, которой подвергаются все гены патогенности *L. monocytogenes*. Исследованиями И. С. Тартаковского и соавт. [13] установлено, что секретлируемый листериями продукт, выполняющий функции ауторепрессора, может быть устранен из среды гидрофобным сорбентом, например, активированным углём. При этом происходит активация генов патогенности, следовательно, увеличение уровня факторов патогенности в среде, в том числе, лецитиназы [13, 16, 17].

Учитывая вышеизложенное, в питательную среду было введено различное количество активированного угля согласно МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах» и ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*». В каждый испытуемый образец *ex tempore* добавлено 5% желточной эмульсии.

В экспериментальных сериях с различными концентрациями активированного угля отмечены варианты ин-

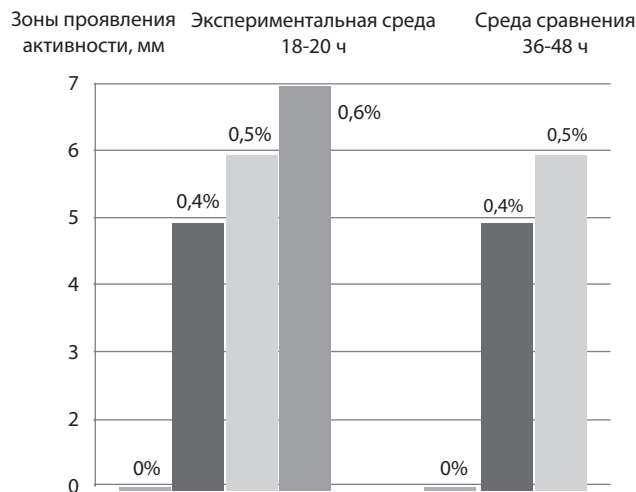
MICROBIOLOGY

дукции лецитиназной активности. Наиболее выражено лецитиназная активность выявлялась в образцах среды с активированным углём в концентрации 0,5% – у 12 исследованных штамма, ширина зоны помутнения среды – от 5 до 7 мм. У 12 штаммов выявлена активность лецитиназы в присутствии 0,2% активированного угля, но более слабая, чем при 0,5% (1–2 мм). Два штамма не обладали лецитиназной активностью, как в присутствии угля, так и без него. Отобран образец наиболее благоприятный для индукции лецитиназной активности листерий с концентрацией активированного угля 0,5 г/л.

Испытания среды для определения лецитиназной активности *L. monocytogenes*, в сравнении с отечественной средой ГРМ-1 (г. Оболонск), показали преимущество предлагаемого препарата по времени проявления лецитиназной активности (появления зон помутнения среды вокруг роста колоний). На испытуемой среде учет результатов был возможен через (18±2) ч, в то время как на среде сравнения не ранее, чем 36-48 ч. На наш взгляд, преимущество предлагаемой нами среды для определения лецитиназной активности перед аналогичной отечественной средой объясняется тем, что используемое нами сырьё – сухой питательный бульон из каспийской кильки превосходит по ростовым свойствам рыбную муку, применяемую при изготовлении среды ГРМ-1 (см. рисунок, табл. 2).

Свойства разработанной среды изучены на штаммах *L. monocytogenes*, предоставленных из коллекции лабо-

ратории легионеллёза НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. Среда обеспечивала чёткую регистрацию проявления лецитиназной активности свежевыделенными штаммами *L. monocytogenes* через 18±2 ч культивирования, тогда



Лецитиназная активность тест-штамма *L. monocytogenes* 4в в процессе культивирования на разработанной и контрольной средах с различным содержанием активированного угля: 0%, 0,4%, 0,5%, 0,6%.

Таблица 1

Определение подвижности свежевыделенных штаммов *L. monocytogenes* на экспериментальной среде и среде сравнения

Клинические штаммы <i>L. monocytogenes</i>	Визуальная характеристика роста	Экспериментальная среда (18±2) ч		Контрольная среда (HiMedia Motility medium)			
				(18±2) ч		(36±2) ч	
		Температура инкубации		Температура инкубации		Температура инкубации	
		(23±1)°C	(37±1)°C	(23±1)°C	(37±1)°C	(23±1)°C	(37±1)°C
401Л	Рост по ходу укола в виде зонтика	++	-	±	-	++	-
402Л	-//-	++	-	±	-	++	-
403Л	-//-	++	-	±	-	++	-
404Л	-//-	++	-	±	-	++	-
405Л	-//-	++	-	±	-	++	-
2Э	-//-	++	-	±	-	++	-
5Э	-//-	++	-	±	-	++	-
1109	-//-	++	-	±	-	++	-
1113	-//-	++	-	±	-	++	-
121У	-//-	++	-	±	-	++	-
1183	-//-	++	-	±	-	++	-
322Л	-//-	++	-	±	-	++	-
323Л	-//-	++	-	±	-	++	-
324Л	-//-	++	-	±	-	++	-
325Л	-//-	++	-	±	-	++	-
326Л	-//-	++	-	±	-	++	-
327Л	-//-	++	-	±	-	++	-
328Л	-//-	++	-	±	-	++	-
329Л	-//-	++	-	±	-	++	-
330Л	-//-	++	-	±	-	++	-
331Л	-//-	++	-	±	-	++	-
332Л	-//-	++	-	±	-	++	-
333Л	-//-	++	-	±	-	++	-

Примечание. (++) – наличие четко выраженного роста по уколу в виде зонтика; (-) – отсутствие роста; (±) – рост по уколу сомнительный.

Сравнительное изучение лецитиназной активности *L. monocytogenes* на различных питательных средах

Исследованные штаммы	Предлагаемая среда		Среда ГРМ №1	
	с активированным углем 0,5%	без активированного угля	с активированным углем 0,5%	без активированного угля
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 5214 (4a)	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 10527 (4e)	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 213	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 7973	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 21	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 56	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 138	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 5348	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 55143	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 5214	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 10527	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 616	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> EGD	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 61/18	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 77	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> cep. I	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> VСХИ-52	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> cep. III	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> cep. II	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> Тернополь	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> VСХИ-19	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> Бурьян	+++	-	++	-
<i>L. monocytogenes</i> 944	+++	-	++	-
Время инкубации	18±2 ч	18±2 ч	36-48 ч	36-48 ч

Примечание. (+) – зона помутнения среды шириной 1-2 мм; (++) – зона помутнения среды шириной 2-4 мм; (+++) – зона помутнения среды шириной 5-7 мм; (-) – отсутствие зоны помутнения на среде.

как на среде сравнения проявление лецитиназной активности отмечали через 36-48 ч инкубации (табл. 2).

Таким образом, разработаны отечественные коммерческие сухие питательные среды для определения подвижности и лецитиназной активности культур *Listeria* spp. Качество сред достигнуто за счёт введения в состав сбалансированного количества ингредиентов, что обеспечивает чёткую идентификацию и дифференциацию *Listeria* spp. от других бактерий, сходных по морфологическим и биохимическим свойствам. Важнейшим элементом современных схем выделения листерий является применение дифференциально-диагностических питательных сред. Их использование значительно повышает эффективность выделения листерий из клинического материала и продуктов питания по сравнению с ранее применявшимися средами лабораторного изготовления.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 16-18 см. REFERENCES)

1. Беляева Н.М., Цурикова Н.Н., Трякина И.П. Листерии: этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение: учебное пособие. Москва: ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава РФ; 2014.

2. Гальцева Г.В., Федоренко Л.М., Инжеватова В.Б., Буланова Е.Е. Лабораторная диагностика листериоза. *Успехи современного естествознания*. 2006; 1: 52-3.

3. Ермолаева С.А., Тартаковский И.С. Регуляция экспрессии факторов вирулентности у *L. monocytogenes*. *Микробиология*. 2001; 3: 106-10.

4. Зайцева Е.А., Сопов Г.П. Микробиологическая характеристика *L. Monocytogenes*, изолированных из различных источников в Приморском крае. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2006; 2: 3-6.

5. Зайцева Е.А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоковирулентных штаммов *L. monocytogenes*. Дис. д-ра мед. наук. Москва; 2010.

6. Ибрагимова М.Л. Современные аспекты листериозной инфекции (обзор литературы). *Вестник Алма-Атинского государственного института усовершенствования врачей*. 2016; 1: 75-80.

7. Каральник Б.В., Денисова Т.Г. Славко Е.А., Мека-Меченко Т.В., Тугамбаев Т.И. Лабораторная диагностика листериоза: проблемы и возможности. *Journal of central Asian health serves*. 2016; 10 (4): 46-51.

8. Кладова О.В., Анджели А.Е., Компаниец Ю.В., Гришкевич Н.Л. К вопросу дифференциальной диагностики листериоза. *Детские инфекции*. 2019; 18 (3): 61-6.

MICROBIOLOGY

9. Карпова Т.И., Ермолаева С.А., Лопырев И.В., Бродина Н.С., Тартаковский И.С., Васкес-Боланд Х.А. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001; 3 (3): 266-73.
10. Листерия: методические рекомендации Комитета здравоохранения № 11 г. Москвы. М.; 2001.
11. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах. Методические указания МУК 4.2.1122-02. М.: Минздрав России; 2002.
12. Омарова С.М., Исаева Р.И., Ахмедова Р.С. Микробиологические аспекты листериозной инфекции беременных и новорожденных. Махачкала: ИПЦ ДГМУ; 2017.
13. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех; 2002.
14. Храмов М.В., Костенко Ю.Г., Батаева. Листерия: лабораторная диагностика в современных условиях: материалы II Национального конгресса бактериологов. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6 (3): 299.
7. Karal'nik B.V., Denisova T.G., Slavko E.A., Meka-Mechenko T.V., Tugambaev T.I. Laboratory diagnosis of listeriosis: problems and opportunities. *Journal of central Asian health serves*. 2016; 10 (4): 46-51. (in Russian)
8. Kladova O.V., Angel A.E., Kompaniets Yu.V., Grishkevich N.L. On the issue of differential diagnosis of listeriosis. *Detskie infektsii*. 2019; 18 (3): 61-6. (in Russian)
9. Karpova T.I., Ermolaeva S.A., Lopyrev I.V., Brodinova N.S., Tartakovsky I.S., Vasquez-Boland H.A. New methods for identifying *Listeria monocytogenes*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2001; 3 (3): 266-73. (in Russian)
10. Listeriosis. Methodical recommendations (No. 11) of the Moscow health committee. Moscow; 2001. (in Russian)
11. Control methods. Biological and microbiological factors. Organization of control and methods for detecting *Listeria monocytogenes* bacteria in food. МУК 4.2.1122-02. Moscow: Minzdrav RF; 2002. (in Russian)
12. Omarova S.M., Isaeva R.I., Akhmedova R.S. Microbiological aspects of listeria infection in pregnant women and newborns. Makhachkala: Informatsionno-pechatnyi tsentr Dagestanskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta; 2017. (in Russian)
13. Tartakovskiy I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. Listeria: role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. Moscow: Meditsina dlya vseh; 2002. (in Russian)
14. Khramov M.V., Kostenko Yu.G., Bataeva. Listeriosis: laboratory diagnostics in modern conditions: materials of the II National Congress of Bacteriologists: materials of the II National Congress of Bacteriologists. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6 (3): 299. (in Russian)
15. Ermolaeva S.A., Belyi Yu.F., Tartakovskiy I.S. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 174: 137-41.
16. Peel M., Donachie W., Shaw A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDC-PAGE and Western blotting. *J. Gen. Microbiol.* 1988; 143: 2171-8.
17. Vazquez-Boland J.A., Kocks C., Dramsi S. et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 1992; 60 (1): 219-30. DOI: 10.1128/iai.60.1.219-230.
18. Weaver R.F. Morphological, physiological, and biochemical characterization. In book: James G.L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. US Department of Health and Human Services, CDC. Atlanta; 1989: 39-43.

REFERENCES

1. Belyaeva N.M., Tsurikova N.N., Tryakina I.P. Listeriosis: etiology, epidemiology, clinic, diagnosis, treatment: textbook. Moscow: GBOU DPO RMAPO Minzdrava RF; 2014. (in Russian)
2. Galtseva G.V., Fedorenko L.M., Inzhevatoва V.B., Bulanova E.E. Laboratory diagnostics of listeriosis. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2006; 1: 52-3. (in Russian)
3. Ermolaeva S.A., Tartakovsky I.S. Regulation of expression of virulence factors in *L. monocytogenes*. *Mikrobiologiya*. 2001; 3: 106-10. (in Russian)
4. Zaitseva E.A., Sopov G.P. Microbiological characteristics of *L. monocytogenes* isolated from various sources in Primorsky Krai. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2006; 2: 3-6. (in Russian)
5. Zaitseva E.A. System for the analysis of microbiological and molecular genetic markers for the detection of highly virulent strains of *L. monocytogenes*. Dis. Moscow; 2010. (in Russian)
6. Ibragimova M.L. Modern aspects of listeriosis infection (literature review). *Vestnik Alma-atinskogo gosudarstvennogo instituta usovershenstvovaniya vrachev*. 2016; 1: 75-80. (in Russian)