

Алексеева Е.А.<sup>1</sup>, Миронов А.Ю.<sup>2,4</sup>, Полосенко О.В.<sup>3</sup>, Шепелин А.П.<sup>3</sup>, Храмов М.В.<sup>3</sup>

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

<sup>1</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области», 160001, г. Вологда, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Россия;

<sup>4</sup>ФГБУ Академия постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, 115682, Москва, Россия

*Представлены результаты исследований по выделению, идентификации, изучению биологических свойств клинических изолятов *L. monocytogenes* и тест-штаммов *Listeria spp.* Изучены особенности применения современных методов исследования при индикации и идентификации патогенных листерий с целью повышения качества лабораторных исследований клинического материала. Культуральный метод гарантирует достоверные результаты микробиологических анализов при выявлении *Listeria spp.* Описанный перечень и алгоритм методов лабораторной диагностики может быть использован в качестве основы для разработки нормативных документов для проведения микробиологического исследования биологического материала на наличие бактерий рода *Listeria spp.* и вида *L. monocytogenes* в биологическом материале.*

**Ключевые слова:** клиническая лабораторная диагностика; идентификация; *Listeria spp.*; культуральный метод.

**Для цитирования** Алексеева Е.А., Миронов А.Ю., Полосенко О.В., Шепелин А.П., Храмов М.В. Выделение и идентификация листерий из клинического материала. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 362-368.

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-362-368>

**Для корреспонденции:** Полосенко Ольга Вадимовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. сектора микробиологических исследований; e-mail [polosenko.olga@yandex.ru](mailto:polosenko.olga@yandex.ru)

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.04.2022

Принята к печати 25.04.2022

Опубликовано 20.06.2022

*Alekseeva E.A.<sup>1</sup>, Mironov A.Yu.<sup>2,4</sup>, Polosenko O.V.<sup>3</sup>, Shepelin A.P.<sup>3</sup>, Khramov M.V.<sup>3</sup>*

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LISTERIA IN CLINICAL MATERIAL

<sup>1</sup>FBUZ «Center of Hygiene and Epidemiology in the Vologda region», 160001, Vologda, Russia;

<sup>2</sup>FBIS «Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky», Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>FBIS «State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» Rospotrebnadzor, 142279, Obolensk, Russia;

<sup>4</sup>FSBI «Academy of Postgraduate Education within FNKC FMBA of Russia», 115682, Moscow, Russia

*Results from research on isolation, identification, and study of biological properties of *L. monocytogenes* clinical isolates and *Listeria spp* test strains are presented. Peculiarities of modern research methods for indicating and identifying pathogenic listeria to improve the quality of laboratory studies of clinical material are studied. The culture method provides reliable results of microbiological analyses upon detecting *Listeria spp.* The presented list and algorithm of the laboratory diagnostic methods can be used as a basis for elaborating regulatory documents for carrying out microbiological research on any biological material for the presence of bacteria of the genus *Listeria spp.* and *L. monocytogenes* species in it.*

**Key words:** clinical laboratory diagnostics, identification, *Listeria spp.*, culture method

**For citation:** Alekseeva E.A., Mironov A.Yu., Polosenko O.V., Shepelin A.P., Khramov M.V. Isolation and identification of listeria in clinical material. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 362-368 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-362-368>

**For correspondence:** Polosenko Olga Vadimovna, PhD (Biol), leading researcher, microbiology research unit; e-mail [polosenko.olga@yandex.ru](mailto:polosenko.olga@yandex.ru)

### Information on authors:

Alekseeva E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7199-2180>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

Polosenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-5961-9041>;

Shepelin A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>;

Khramov M.V., <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>.

**Acknowledgment.** The research was carried out within the sectoral program of Rospotrebnadzor.

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

Received 04.04.2022

Accepted 25.04.2022

Published 20.06.2022

**Введение.** Листерия – сапрозоонозное инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое бактериями рода *Listeria*, характеризуется разнообразием источников и резервуаров возбудителя инфекции, множеством механизмов, путей и факторов передачи возбудителя, полиморфизмом клинических проявлений, высокой летальностью у новорожденных и лиц с иммунодефицитами. Чаще всего выявляют клинические формы, связанные с поражением центральной нервной системы, проявляющиеся менингитом или менингоэнцефалитом. Описаны случаи с необычными клиническими проявлениями на фоне сопутствующих заболеваний, иммунодепрессивной терапии, у лиц пожилого возраста: эндокардит, перитонит, остеомиелит, абсцессы и др. В группе риска по листериозам находятся беременные женщины, новорожденные дети, лица пожилого возраста, иммунокомпрометированные лица [1]. Растёт число сопутствующих заболеваний и групп риска, на фоне которых проявляется листериозная инфекция, общей для которых является депрессия клеточного иммунитета, что подтверждает полиэтиологическую роль листерий как микроба-оппортуниста [2].

Значение листериоза в патологии человека, животных не только не уменьшилось, а даже возросло. Особая опасность листериоза возникла в конце XX века, в связи с установленной контаминацией пищевых продуктов листериями. В связи с этим, листериоз получил наименование «пищевой инфекции» и клиницисты и эпидемиологи нашей страны с 1992 г. стали признавать его как инфекцию, склонную к эпидемическому распространению [3]. Отмечается увеличение количества случаев листериоза с тяжёлым течением в Москве за последние годы [4].

Многочисленные вспышки листериоза в ряде стран мира и его широкое распространение в окружающей среде требуют разработки новых подходов к типированию листерий с целью выявления клинически значимых штаммов [1, 5-9].

Длительное время при подборе селективных питательных сред для выделения листерий возникали трудности и разброс результатов при выделении и типировании *L. monocytogenes* [3]. В одном из первых исследований проб от овец и кроликов и чистых культур обнаружено, что задержка роста листерий происходит на питательных средах, содержащих 0,05-0,1% теллурида калия [10]. Сообщалось об использовании гуанофурацина, как селективного агента для выделения *L. monocytogenes* из проб назальных выделений и фекалий овец [11]. Описано использование обогащённого бульона, содержащего фурацин, с последующим высевом на селективную, содержащую кровь питательную среду, состоящую из фенолэтанол-агаровой основы с 0,05% хлористого лития и 1% глицина в качестве селективных агентов, с целью повысить селективность и снизить задержку роста *L. monocytogenes* [12].

Описан селективный рост *L. monocytogenes*, стрептококков и *Erysipelothrix* на питательной среде, содержащей 40 мкг/мл налидиксовой кислоты [3].

Использовались и другие ингибиторы роста: хлористый литий, ацетат таллия и трёхокись хрома и бихромат калия. Для ингибирования роста *Enterococcus faecalis* предложен селективный бульон, содержащий 40 мкг/мл налидиксовой кислоты, 3 мкг/мл полимиксина В, 0,02 мкг/мл метиленового голубого [13]. Эта питательная среда эффективна для выделения *L. monocytogenes*

из проб фекалий, взятых от матерей заражённых плодов или заражённых детей. Акридин или акрифлавин и другие красители (включая индигокармин, метиленовый голубой, пиронин, тионин) часто вводятся в селективные питательные среды для *L. monocytogenes*.

Более поздние составы питательных сред (используемые и в настоящее время), представляют комбинации налидиксовой кислоты, полимиксина В, акрифлавина в качестве ингибирующих рост агентов [3].

В настоящее время при исследованиях на листериоз, в случаях, высокой контаминации материала сопутствующей микрофлорой и низкого содержания листерий, удаётся, тем не менее, выделить и идентифицировать *Listeria* spp. Широкое применение для выделения листерий находят питательные среды, в состав которых в качестве индикаторной добавки входит эскулин в сочетании с цитратом железистого аммония. Цвет питательной среды в результате реакции продуктов гидролиза эскулина с цитратом железистого аммония меняется, что приводит к почернению бульона (бульон Фрейзера) и росту колоний с почернением среды (ПАЛ, ПАЛКАМ) [7-8, 14].

Листерии ферментируют глюкозу, оксидаотрицательны, образуют цитохромы. Некислоустойчивы, не образуют спор и капсул, факультативные анаэробы, хемоорганогетеротрофы. Каталазаположительны, редко встречаются каталазаотрицательные штаммы [3, 18].

Продукция кислоты при ферментации галактозы, лактозы, мелезитозы, сорбитола, крахмала, сахарозы, трегалозы вариабельна. Кислота почти никогда не вырабатывается при ферментации адонитола, арабинозы, дульцита, эритритола, гликогена, инозитола, инулина, мелибиозы, раффинозы, сорбозы. Фенилаланиндаминаза-, орнитин-, лизин- и аргинин-декарбоксилазы не образуются. Сероводород и индол не образуют, мочевины не гидролизуют, слабо восстанавливают нитраты до нитритов [3, 18].

Все виды *Listeria* фенотипически сходны, дифференцируются с применением тестов: на гемолиз, выработку кислоты из D-ксилозы, L-рамнозы, α-метил-β-маннозида, маннитола [18]. Фенотипическое сходство согласуются с высокой геномной гомологией между различными видами. Ключевой характеристикой при определении вида и наиболее сложной в плане обнаружения, является гемолиз. Высокий процент ошибок при идентификации *L. seeligeri* и *L. ivanovii* обусловлен неточным прочтением результатов САМР-теста и гемолиза [3]. Изоляты *L. monocytogenes* и *L. seeligeri* образуют узкие, слегка прозрачные зоны β-гемолиза. *L. ivanovii* образуют широкие, чётко очерченные зоны β-гемолиза. *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* не являются гемолитическими. *L. innocua* на ряде питательных сред способны образовывать зону гемолиза с зеленоватым оттенком. *L. monocytogenes* лизируют эритроциты овец, лошадей, крупного рогатого скота, морских свинок, кролика, пороснат, человека.

Для постановки окончательного диагноза листериозной инфекции необходимо выделить чистую культуру *L. monocytogenes* и её идентифицировать. Молекулярно-биологические методы исследования для выявления ДНК-патогена (ПЦР) могут быть использованы в качестве дополнительного метода при исследовании клинического материала. Серологические методы – реакция связывания комплемента (РСК), реакция непрямой геммагглютинации с эритроцитарным антигеном (РНГА),

Культуральное исследование клинического материала

№ п/п	Клинический материал	Алгоритм исследования	Выделенная культура
1.	Мазок с папулы кожи	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ-агар, кровяной агар	<i>L. monocytogenes</i>
2.	Околоплодные воды	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
3.	Плацента	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
4.	Мазок из цервикального канала	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
5.	Кровь на стерильность Секционный материал:	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
6.	Мозг	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
7.	Печень	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
8.	Селезёнка	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
9.	Кровь	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
10.	Почки	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>

метод определения антилистериозных антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) позволяют установить предполагаемый диагноз листериозной инфекции, требующий бактериологического подтверждения<sup>1</sup>.

Для микробиологов, занимающихся лабораторной диагностикой листериоза, важно иметь в своем арсенале методы, позволяющие быстро и эффективно проводить мониторинг листериоза, выявляя патогенные для человека листерии. Новые методы позволяют проводить исследования в более широком масштабе, что вырисовывает картину реального распространения листерий в различных продуктах и их связь с болезнью [15-16]. Культуральный метод остается незаменимым при диагностике листериозной инфекции [9, 14, 18]. Культуральное исследование позволяет определить чувствительность к антибиотикам, что позволяет лечащему врачу выбрать эффективные препараты для лечения пациента.

Наличие *L. monocytogenes* в пищевых продуктах регламентируется документами Евразийского экономического союза<sup>2,3</sup>. Для её выявления на территории РФ имеются утверждённые методы определения в пищевых продуктах (ГОСТ, МУК)<sup>4,5</sup>. Для определения *Listeria* spp. и *L. monocytogenes* в биологическом материале регламентированный метод отсутствует. Бактерии рода *Listeria* и вида *L. monocytogenes* обнаруживаются и выделяются попутно при диагностических исследованиях клинического материала на наличие микроорганизмов других групп.

Цель работы – оптимизировать культуральный метод диагностики листериоза с целью повышения качества лабораторных исследований клинического материала.

**Материал и методы.** Использованы 10 культур листерий, выделенных из клинического материала от пациентов: околоплодные воды, мазок с папулы кожи, плацента, кровь, секционный материал Городской больницы № 1 и Областной клинической детской больницы г. Вологда, выделенных в период с 2018 по 2020 гг.; музейные штаммы из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ, Оболенск) – 5 тест-штаммов: *L. monocytogenes* 766, *L. monocytogenes* NCTC11994, *L. ivanovii* ATCC19119, *L. innocua* NCTC 11288, *L. seeligeri* ATCC 35967. Для определения САМР-теста использованы тест-штаммы: *Rhodococcus equi* 1621 и *Staphylococcus aureus* Wood-46. Для накопления листерий использован селективный накопительный бульон «ПБЛ» и «Бульон Фрейзера, основа» (ФБУН ГНЦ ПМБ). В качестве дифференциально-диагностических применены среды «*Listeria* agar (base) асс. OTTAVIANI and AGOSTI» (ALOA-агар) (Merck), «ПАЛ» и «ПАЛКАМ агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Для определения ферментативных свойств листерий использованы среды Гисса с рамнозой, ксилозой, маннитом с бромкрезоловым пурпурным (ФБУН ГНЦ ПМБ), тест-система «API *Listeria* идентификация рода *Listeria*» (БиоМерье, Франция). Серотип определяли в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле с помощью теста «Латексный тест *Listeria monocytogenes*» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Определение гемолитической активности проводилось на чашках Петри с 7%-м кровяным агаром. Для САМР-теста применён кровяной агар на основе питательной среды № 1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ) и крови барана 7%.

Для определения лецитиназной активности использована питательная среда № 1 ГРМ с внесением *ex tempore* 5% желточной эмульсии и питательная среда № 1 ГРМ с внесением активированного угля в концентрациях 0,3-0,6% с внесением *ex tempore* 5% желточной эмульсии.

Исследования проведены с использованием методов, рекомендованных СП 3.1.7.2817-10<sup>6</sup>, МУК 4.2.1122-02, ГОСТ 32031-2012.

Данные исследований обработаны с помощью прикладной программы «STATISTICA» (StatSoftRussia) и BIostat.

<sup>1</sup>СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Зарегистрировано в Минюсте РФ 15.02. 2021 г.

<sup>2</sup>Технический регламент Таможенного союза. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011. Введены 2013-07-01. М.: РосТест; 2013.

<sup>3</sup>Технический регламент Таможенного союза о безопасности молока и молочной продукции ТР ТС 033/2013. Введены 2014-05-01. Москва; 2013.

<sup>4</sup>ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. – Москва: Стандартинформ; 2014.

<sup>5</sup>МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах».

<sup>6</sup>Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2817-10. Профилактика листериоза у людей (в настоящее время утратили силу).

**Результаты и обсуждение.** Для выделения листерий биоматериал предварительно обогащали посевом в жидкую селективную питательную среду с последующим пересевом выросших микроорганизмов на плотные дифференциально-диагностические среды, выделением и идентификацией чистых культур. У исследуемых культур листерий изучены культуральные свойства, показавшие принадлежность 10 культур к виду *L. monocytogenes* (табл. 1).

На этапе селективного обогащения все культуры засеивали в 10 мл среды для накопления листерий: ПБЛ I и Бульон Фрейзера I. Посевы инкубировали в термостате при температуре 30° С в течение 24 часов. При необходимости инкубацию посевов биоматериала продлевали до 48-72 часов. При росте микроорганизмов рода *Listeria* в бульоне Фрейзера, наблюдалось слабое помутнение среды. Рост листерий в среде ПБЛ I регистрировался в виде слабого помутнения среды, при встряхивании которой наблюдались муаровые волны.

Через 24 ч после предварительного обогащения пересевали 0,1 мл материала в 9 мл среды для вторичного накопления – питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II) с последующей инкубацией в термостате при температуре 37° С в течение 24 часов. Штаммы бактерий рода *Listeria* при селективном обогащении вызывали помутнение питательной среды с образованием слизистого осадка. Бульон Фрейзера II на 2-е сутки инкубации обеспечивал рост в виде помутнения и окрашивания питательной среды в тёмно-коричневый цвет.

Через 24-48 ч инкубации из пробирок с посевами с верхнего слоя питательных бульонов материал пересевали на плотные селективные питательные среды для выделения листерий: АЛОА агар, ПАЛ агар, ПАЛКАМ-агар, кровяной агар.

На среде ПАЛ через 24 ч инкубации листерии формировали мелкие, серовато-зелёные или жёлто-зелёные колонии с чёрным ореолом, диаметром 0,5-1,0 мм, иногда с чёрным центром. Через 48 ч колонии имели диаметр 1,0-2,0 мм зелёной окраски с углублёнными центрами, окружёнными чёрным ореолом. На ПАЛКАМ агаре через 24 ч инкубации вырастали колонии серо-зелёного цвета, с образованием вокруг колоний чёрной зоны, на вторые сутки колонии имели диаметр 1,4-1,8 мм.

На АЛОА-агаре вырастали колонии сине-зелёного цвета, окружённые непрозрачным ореолом – типичные колонии *Listeria monocytogenes* – диаметром 0,6-0,8 мм на первые сутки инкубации посевов и диаметром до 2,0мм – на вторые сутки.

На кровяном агаре через 18 ч инкубации вокруг колоний наблюдалась узкая зона гемолиза.

САМР-тест проводили с использованием культур гемолитических штаммов *S. aureus* и *R. equi*, тест-штамма *L. ivanovii* и всех испытуемых клинических изолятов *L. monocytogenes*. При посеве на кровяной агар с 5% эритроцитами барана получены результаты без существенных различий. После инкубации посевов в течение 24 ч при 37° С отмечены зоны гемолиза перпендикулярных посевов испытуемых культур около параллельных линий посевов штрихом *S. aureus* и *R. equi*. Все тестируемые культуры *L. monocytogenes* показали расширение зоны гемолиза около роста *S. aureus* (положительный САМР-тест) и отсутствие изменений зоны гемолиза рядом с ростом *R. equi* (отрицательный САМР-тест). Характерное усиление и увеличение зоны гемолиза около роста *R. equi* и *S. aureus* наблюдалось у культуры *L. ivanovii*.

Морфологические и тинкториальные свойства всех выросших на импортных и отечественных питательных средах культур листерий идентичны. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдались грамположительные, короткие палочки с закруглёнными концами, располагающиеся поодиночке или в виде коротких цепочек; спор и капсул не образующие.

Клинические изоляты и музейные штаммы листерий исследованы по биохимическим и антигенным свойствам в условиях равнозначности с использованием различных тестов.

Для установления принадлежности выделенной культуры к патогенному виду определялась лецитиназная активность исследуемых клинических изолятов листерий. Для этого исследуемые культуры листерий высевали короткими параллельными штрихами на питательную среду ГРМ № 1 с добавлением активированного угля в концентрациях 0,3; 0,4; 0,5, 0,6% и внесением *ex tempore* 5% желточной эмульсии. Эти же культуры сеяли на питательную среду ГРМ № 1 с добавлением *ex tempore* 5% желточной эмульсии, но без добавления активированного угля. Лецитиназную активность предварительно определяли через 18 ч инкубации посевов, окончательно – через 48 ч по появлению зон помутнения вокруг штрихов.

Показано, что для удаления секретируемого листериями продукта, выполняющего функции ауторепрессора, можно применить гидрофобный сорбент, в частности, активированный уголь [17]. При этом происходит экспрессия генов патогенности и, соответственно, увеличение уровня ферментов агрессии в питательной среде, в том числе лецитиназы. Использование питательной среды № 1 ГРМ с добавлением 5% желточной эмульсии и активированного угля показало, что оптимальными являются концентрации активированного угля 0,4% и 0,5% при росте тест-штаммов *L. monocytogenes* 766, *L. monocytogenes* NCTC 11994 и клинических изолятов *L. monocytogenes*, демонстрирующие ярко выраженную зону лецитиназной активности питательной среды уже через 18-20 ч инкубации посевов при визуальном просмотре и позволяющие дифференцировать *L. monocytogenes* от непатогенных видов листерий. Концентрация активированного угля 0,6% не позволяет чётко видеть зону лецитиназной активности ввиду интенсивного почернения питательной среды.

При определении биохимических свойств клинических изолятов *L. monocytogenes* при использовании тест-системы «API *Listeria* идентификация рода *Listeria*» показано, что клинические штаммы не образуют индол и сероводород, не восстанавливают нитраты в нитриты, желатин не разжижают, ферментируют с образованием кислоты глюкозу, левулёзу, трегалозу, медленно и непостоянно – мальтозу, лактозу, сахарозу, декстрин, салицин, рамнозу, растворимый крахмал.

Для определения способности сбрасывать углеводы все клинические и музейные штаммы пересевали на среды Гисса с бромкрезоловым пурпурным. Посевы инкубировали в термостате 48 ч при 37° С, наличие ферментативной активности в отношении углеводов определяли по изменению окраски среды за счёт образования кислоты.

Использование сред Гисса позволило установить, что ферментация ксилоты наблюдалась при посеве тест-штаммов: *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. seeligeri* ATCC 35967, ферментация рамнозы – у всех клинических изолятов патогенных листерий и тест-штаммов *L. monocytogenes* 766, *L. monocytogenes* NCTC 11994, *L. innocua* NCTC 11288 (слабая) (табл. 2).

Свойства клинических изолятов и тест-штаммов листерий

№ п/п	Питательные среды	Наблюдаемый эффект					
		Посев клинических образцов, типизация изолятов	Посев тест-штаммов				
			<i>L. monocytogenes</i> 766	<i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994	<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	<i>L. seeligeri</i> ATCC 35967	<i>L. innocua</i> NCTC 11288
1.	ПБЛ I	Рост виде слабого помутнения среды, при встряхивании наблюдаются муаровые волны	Рост в виде слабого помутнения среды, при встряхивании наблюдаются муаровые волны				
2.	Бульон Фрейзера I	Рост виде помутнения и окрашивания среды в тёмно-коричневый цвет	Рост в виде помутнения и окрашивания среды в тёмно-коричневый цвет (гидролиз эскулина)				
3.	Среда ПАЛ I	Рост мелких, серовато-жёлтых колоний с чёрным ореолом	Рост мелких, серовато-жёлтых колоний с чёрным ореолом (гидролиз эскулина)				
4.	Среда ПАЛ-КАМ агар	Рост колоний серо-зелёного цвета, с образованием вокруг колоний чёрной зоны (Гидролиз эскулина)	Рост колоний серо-зелёного цвета, с образованием вокруг колоний чёрной зоны (гидролиз эскулина)				
5.	ALOA агар	Рост сине-зелёных колоний, окружённых непрозрачным ореолом	Рост сине-зелёных колоний, окружённых непрозрачным ореолом (фосфолипазная активность)		Рост сине-зелёных колоний		
6.	Кровяной агар	Рост колоний с образованием узкой зоны просветления	Рост колоний с образованием узкой зоны просветления (β-гемолитическая активность)			Рост колоний без образования зоны просветления	
7.	Кровяной агар для CAMP-теста	Усиление гемолиза около штриха <i>S. aureus</i>	Усиление гемолиза около штриха <i>S. aureus</i>	Усиление гемолиза около штриха <i>R. equi</i>	Усиление гемолиза около штриха <i>S. aureus</i>	Без гемолиза	
8.	Среда № 1 ГРМ с активированным углём 0,4% и желточной эмульсией	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)		Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Без зоны помутнения вокруг колоний	Без зоны помутнения вокруг колоний
	Среда № 1 ГРМ с активированным углём 0,5% и желточной эмульсией	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)		Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Без зоны помутнения вокруг колоний	Без зоны помутнения вокруг колоний
	Среда № 1 ГРМ с активированным углём 0,6% и желточной эмульсией	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Без зоны помутнения вокруг колоний	Без зоны помутнения вокруг колоний
9.	Питательная среда № 1 ГРМ с добавлением желточной эмульсии (без угля)	Отсутствие зоны помутнения	Отсутствие зоны помутнения	Отсутствие зоны помутнения	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний	Отсутствие зоны помутнения	Отсутствие зоны помутнения
10.	Среда Гисса с бромкрезоловым пурпурным (с ксилозой)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует ксилозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует ксилозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)
11.	Среда Гисса с бромкрезоловым пурпурным (с рамнозой)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует рамнозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует рамнозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует рамнозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует рамнозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует рамнозу)	Слабое изменение цвета среды (ферментирует рамнозу слабо)

Все выросшие изолированные колонии культур *Listeria* на чашках со всеми дифференциально-диагностическими средами, пересеивались на питательную среду № 1 ГРМ, подвергались исследованию в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле. В ЛАГ клетки *L. monocytogenes*, присутствующие в исследуемой пробе, взаимодействуя с частицами латекса, сенсибилизированными антителами против углеводной фракции ЛПС *L. monocytogenes*, образовывали видимые агглютинаты.

Бактериологическим методом подтверждена родовая и видовая принадлежность листерий для всех клинических изолятов.

Действующие нормативные документы: ГОСТ 32031-2012 и МУК 4.2.1122-02 распространяются на пищевые продукты и устанавливают методы выявления *L. monocytogenes*. Лабораторная диагностика листериоза у людей в данной работе осуществлялась в соответствии с действующими нормативными документами на пищевые продукты.

Действующие Методические рекомендации<sup>7</sup> по лабораторной диагностике листериоза животных и людей, регламентирующие устаревшие методы исследований, приборы, низкоселективные дифференциально-диагностические питательные среды, требуют изменений и дополнений. Специалистам аккредитованных микробиологических лабораторий необходима современная методология исследований по индикации и идентификации листерий в клиническом материале.

СанПиН 3.3686-21 регламентирует для диагностики листериоза использовать бактериологический и серологический методы. ПЦР может быть использована для быстрого выявления генетического материала возбудителя в ликворе, ткани плаценты, секционном материале. Мультилокусное или полногеномное секвенирование используется для типирования клинических изолятов листерий и их сравнения с культурами листерий, выделенных из продуктов питания.

Последовательное соблюдение алгоритма исследования и использование различных методов микробиологической диагностики позволит проводить лабораторные исследования в клинической микробиологии с целью выделения листерий из исследуемого материала. От выбора метода диагностики зависит возможность реализации исследования – его проведения и получения определённого результата.

Исследовав и оценив возможности выделения из клинического материала листерий и их идентификацию современными методами, можно сделать вывод о применении как ручных тестов идентификации патогенов (наборы мультимикротестов, серологические тесты), так и методов амплификации нуклеиновых кислот (как дополнительный метод при исследовании биологического материала). Выделение и идентификация листерий требует получения чистых культур с использованием стандартных питательных сред [16, 18-20].

Во многом применение того или иного метода при диагностике листериоза зависит от оснащённости лаборатории. «Золотым стандартом» диагностики листериозной инфекции является культуральный метод.

**Заключение.** Современный этап развития клинической лабораторной диагностики инфекционной болезни характеризуется применением высокоточных методов лабораторного анализа. Полученные данные могут быть использованы в качестве основы для разработки методических указаний, рекомендаций, других документов для проведения микробиологического исследования биологического материала на наличие бактерий рода *Listeria* spp. и вида *L. monocytogenes* в биологическом материале. Многолетний опыт применения качественных питательных сред гарантирует потребителям обеспечение достоверных результатов микробиологических анализов при выявлении *Listeria* spp. Использование комплекса методов и препаратов для выявления и идентификации листерий позволит в полном объёме удовлетворить потребности клинической и санитарной микробиологии в России, что обеспечит санитарно-эпидемиологическое благополучие населения Российской Федерации.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 10-13 см. REFERENCES)

1. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Монография. М.: Медицина для всех; 2001.
2. Бакулин Н.И., Батура А.П., Блинкова Л. П. Бутова С.А., Воропаева С.Д., Гавристова И.А. и др. Клиническая лабораторная аналитика: Клиническая лабораторная аналитика в 5-ти томах. М.: ООО «Агат-Мед»; 2003.
3. Бакулов И.А., Васильев Д.А., Ковалева Е.Н., Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О. Листерии и листериоз. Монография. Ульяновск: НИИЦМиБ; 2016 (2): 49-62.
4. Ковалёв В.А., Филатов Н.Н., Алёшина Е.Н., Симонова Е.Г., Заболеваемость листериозом в Российской Федерации. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019;7(4): 509-17.
5. Фертиков В. И., Тихонов А. Н., Хрипунов Е. М., Егорова И. Ю. К формированию бактерий рода *Listeria* в эпоху позднего плейстоцена: факты и гипотезы. *Сельскохозяйственная биология*. 2009 (6): 18-26.
7. Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Фурсова Н.К. Выявления в сточных водах Вологодской области *Listeria monocytogenes* с уникальным сиквенс-типом ST7, ST20 и ST425. *Бактериология*. 2021; 6(3):14-5.
8. Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Опыт выделения *Listeria monocytogenes* на территории Вологодской области. *Бактериология*. 2019; 4(2): 31-6.
9. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Дятлов И.А. Листерии. Современный подход к проблеме выделения листерий с использованием питательных сред. *Справочник заведующего КДЛ*. 2018; (7): 33-48.
14. Полосенко О.В., Шепелин А.П., Марчихина И.И., Шолохова Л.П. Разработка питательных сред для выделения листерий. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6 (3): 92.
15. Стародумова С.М., Зайцева Е.А. Способ быстрой идентификации бактерий рода *Listeria* и патогенного вида *Listeria monocytogenes* с помощью мультиплексной ПЦР. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014; 1(55): 95-7.
16. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Попова А.Ю., Дятлов И.А., ред. М.: Династия; 2020.
17. Ермолаева С.А., Карпова Т.И., Тартаковский И.С., Вазкес Боланд Хосе Антонио. Способ дифференциации культуры *Listeria monocytogenes*. Патент РФ № 2196827; 2001.
18. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н. Несвижский Ю.В., Дратвин С.А., Пашков Е.П. и др. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство; 2022.
19. Дятлов И.А., Мионов А.Ю., Шепелин А.П., Алешкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.

<sup>7</sup>Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей (утв. Минздравом СССР и Госагропромом СССР 04.09.1986 г. и 13.02.1987 г.).

20. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алешкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63-5.

## REFERENCES

1. Tartakovskiy I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. Listeria: the role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. Monograph. [Listerii: rol' v infekcionnoj patologii cheloveka i laboratornaya diagnostika. Monografiya]. Moscow: Meditsina dlya vseh; 2001. (in Russian)
2. Bakulin N.I., Batur A.P., Blinkova L.P., Burova S.A., Voropayeva S.D., Gavristova I.A. et al. Clinical Laboratory Analytics: Clinical Laboratory Analytics in 5 volumes. [Klinicheskaya laboratornaya analitika: Klinicheskaya laboratornaya analitika v 5 tomakh]. Moscow: «Agat-Med»; 2003. (in Russian)
3. Bakulov I.A., Vasil'ev D.A., Kovaleva E.N., Egorova I.Yu., Selyaninov Yu.O. Listeria and listeriosis. *Monograph* [Listerii i listerioz. Monografiya]. Ul'yanovsk: NIICMiB; 2016 (2): 49-62. (in Russian)
4. Kovalev V.A., Filatov N.N., Aleshina E.N., Simonova E.G. Sickness of listeriosis in Russian Federation. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)* 2019;7(4): 509-17. (in Russian)
5. Fertikov V.I., Tikhonov A.N., Hripunov E.M., Egorova I.Yu. On the occasion of formation of bacteria of Listeria genus in epoch of late pleistocene: the facts and hypothesis. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2009; (6): 18-26. (in Russian)
6. Lepe J. A. Current aspects of listeriosis. *Med. Clin. (Barc)*. 2020; 154(11): 453-8.
7. Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Fursova N.K. Detection of Listeria monocytogenes in wastewater of the Vologda region with a unique sequence type ST7, ST20 I ST425. *Bakteriologiya*. 2021; 6(3):14-5. (in Russian)
8. Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Experience a selection of Listeria monocytogenes in the territory of the Vologda region. *Bakteriologiya*. 2019; 4(2): 31-6. (in Russian)
9. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Dyatlov I.A. A modern approach to the problem of listeria isolation using nutrient media. *Spravochnik zavedyushchego KDL*. 2018; (7): 33-48. (in Russian)
10. Gray M.L., Stafseth H.J., Thorp F. Jr. The use of potassium tellurite, sodium azide, and acetic acid in a selective medium for the isolation of Listeria monocytogenes. *J. Bacteriol.* 1950; 59(3): 443-4.
11. Shimizu K., Otsuka G., Oka M. Guanofuracin media for isolation of *L. monocytogenes* and its practical application. *Japn. J. Vet. Res.* 1954; (2): 3-10.
12. Mc Bride M.E., Girard K.F. A selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. *J. Lab. Clin. Med.* 1960; 55: 153-7.
13. Despierres M. Isolation de *Listeria monocytogenes* dans un milieu defavorable a *Streptococcus faecalis*. *Ann. Inst. Pasteur.* 1971; (121): 493-501.
14. Polosenko O.V., Shepelin A.P., Marchihina I.I., Sholokhova L.P. Development of nutrient media for the isolation of listeria. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6 (3): 92. (in Russian)
15. Starodumova S.M., Zaytseva E.A. The way of a quick identification of bacteria genus Listeria and pathogenic species of Listeria monocytogenes by means of the multiplex polymerase chain reaction. *Tikhookeanskiy meditsinskij zhurnal*. 2014; 1(55): 95-7. (in Russian)
16. Microbiological quality control of food products. Collective monograph [Mikrobiologicheskij kontrol' kachestva pishchevoy produktsii. Kollektivnaya monografiya]. Popova A.Yu., Dyatlov I.A., eds. Moscow: Dinastiya; 2020. (in Russian)
17. Ermolaeva S.A., Karpova T.I., Tartakovskiy I.S., Vazkes Boland Hose Antonio. A way to differentiate culture Listeria monocytogenes. Patent RF № 2196827; 2001. (in Russian)
18. Vorob'yov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N., Nesvizhsky Yu.V., Dratvin S.A., Pashkov E.P. et al. Medical Microbiology, Virology and Immunology: Textbook for medical university students. [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: Uchebnik dlya studentov meditsinskih vuzov]. Moscow: MIA; 2022. (in Russian)
19. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. The condition and tendencies of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)
20. Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A. et al. The actual approaches to problem of import substitution in the field of production growth medium. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian).