

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ



Микробиология инфекций,
вызываемых
листериями и легионеллами

Д.м.н., зав. каф. микробиологии
имени академика В.М. Аристовского
ИСАЕВА Гузель Шавхатовна



Легионеллы. Таксономия

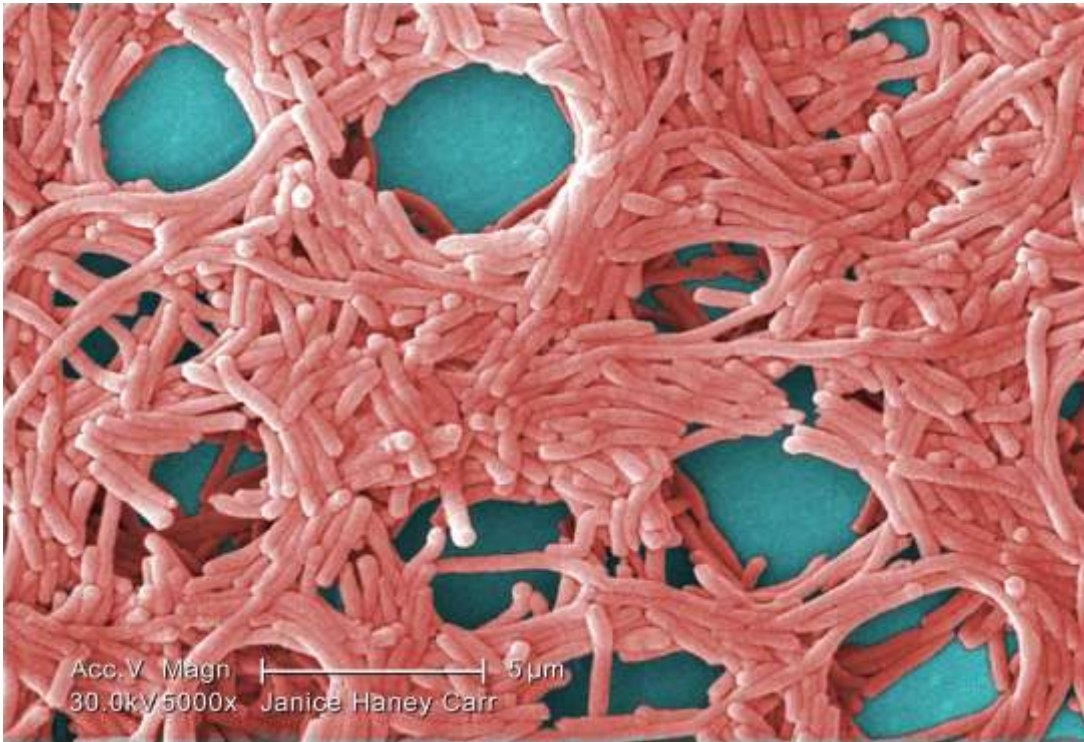
- Класс Proteobacteria
- Класс:
- [Гамма-протеобактерии](#)
- Порядок:
- [Legionellales](#)
- Семейство:
- [Legionellaceae](#)
- Род: *Legionella*
- Известно более 50 видов, в патологии человека доказана роль 22 ВИДОВ.
- Типовой вид: *Legionella pneumophila*



История открытия

- Легионеллы получили своё название от вспышки [легионеллёза](#) в Филадельфии в 1976 году, когда 221 человек заболел неизвестной на то время болезнью и 34 из них скончалось. На вспышку впервые обратили внимание, когда заболели люди, посетившие съезд [Американского легиона](#) — ассоциацию ветеранов американских вооружённых сил. Данный съезд проходил в Филадельфии в честь двухсотлетия образования США. Эта эпидемия среди американских ветеранов, случившаяся в том же городе, где была подписана [Декларация независимости США](#), и за несколько дней до 200-летия её подписания, получила широкое освещение в прессе и вызвала большое беспокойство среди населения^[5]. 18 января 1977 года была выделена до тех пор не известная бактерия, вызвавшая данное заболевание. Впоследствии её назвали *Legionella*.

Морфология



- Грамотрицательные палочки
- Спор и капсул не образуют
- подвижные



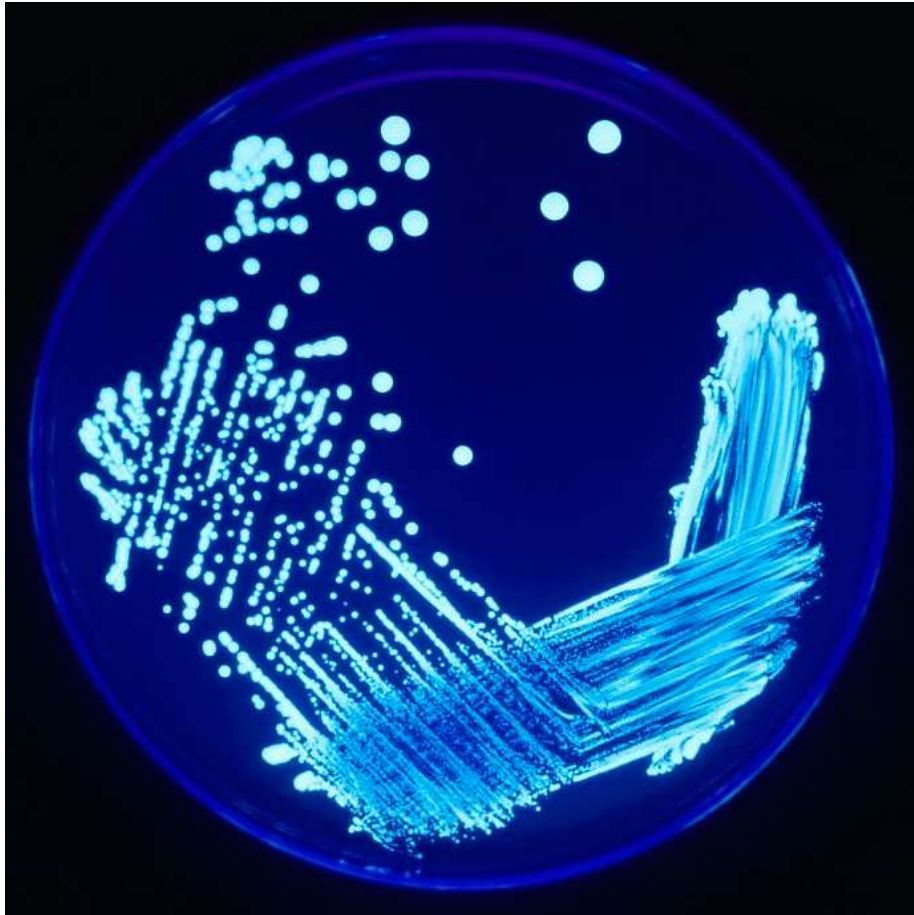
Legionella pneumophila Gram-Färbung von
Erreger-Isolat aus dem Ausbruch 1976



Культуральные свойства

- Аэробы
- Растут на сложных питательных средах на буферном угольно-дрожжевом агаре (БУДРАГ, ВСУЕА). Для роста бактерии необходимо присутствие [цистеина](#) и железа, и поэтому она не растёт на обычном [кровяном агаре](#)
- Культивируют при температуре 35 градусов С в атмосфере 3% CO₂ в течение 3-4 суток.
- Могут быть культивированы в желточном мешке КЭ, клеточных культурах, на животных (морская свинка) – внутриклеточный факультативный паразит

Рост на питательных средах



**Growth of *Legionella pneumophila*
on BCYE enrichment agar**





Биохимические свойства

- Каталазаположительные
- Не ферментируют углеводы
- Не восстанавливает нитраты
- Не продуцирует уреазу



Эпидемиология

- Легионеллёз — это **сапронозная инфекция**, то есть главным местом обитания легионелл являются абиотические объекты окружающей среды. Резервуар возбудителя — это вода и почва, в природе легионеллы обнаруживаются в пресных водоёмах как симбионты сине-зелёных водорослей или паразиты некоторых организмов. Оптимальная для размножения легионелл температура внешней среды — это 25—42,2 °С.
- Наряду с естественной нишей обитания легионелл существует и созданная человеком искусственная ниша, а именно водные системы, где циркулирует вода оптимальной температуры. В таких системах создаются условия для образования в воздухе мелкодисперсного бактериального аэрозоля. Таким образом, легионеллёз является и техногенной инфекцией. Легионелла высевается из жидкостей кондиционеров, промышленных и бытовых систем охлаждения, бойлерных и душевых установок, оборудования для респираторной терапии. Известно также, что легионелла часто колонизирует резиновые поверхности (например, шланги водопроводного, медицинского и промышленного оборудования). Легионелл также обнаруживают в тёплых водах, сбрасываемых электростанциями. Случаев заражения человека легионеллёзом от млекопитающих, членистоногих или птиц не описано.
- В случаях массовых вспышек заболевала часть людей, регулярно находившихся в помещениях, где находилась среда, в которой размножались легионеллы (например, централизованные кондиционеры).
- Механизм передачи: аэрозольный



Различают следующие клинические формы легионеллёза

- Болезнь легионеров (тяжёлая пневмония)
- Понтиакская лихорадка
- Лихорадка «Форт-Брагг»



Методы диагностики

- Материал: мокрота, промывные воды бронхов, плевральный экссудат, кровь
- Серологические методы. Широкое применение находят: реакция микроагглютинации и непрямой иммунофлюоресценции — АТ появляются в сыворотке с 7 дня болезни, титр нарастает на 2—3 неделе заболевания. Диагностическим считается нарастание титра в 4 и более раза, а при однократном исследовании титр не менее 1:128
- обнаружение в моче растворимого антигена *Legionella pneumophila* 1-й серогруппы методом ИХА



Диагностика легионеллеза НДП

- диагноз легионеллеза в случае острой инфекции нижних дыхательных путей (клинически и рентгенологически подтвержденной) считается установленным:
- 1) при выделении культуры легионелл из отделяемого респираторного тракта или легочной ткани;
- 2) при 4-кратном или более нарастании титра специфических АТ к *L. pneumophila* серогруппы 1 в реакции непрямой иммунофлюоресценции;
- 3) при определении растворимого АГ *L. pneumophila* серогруппы 1 в моче методом ИФА или ИХА.



Методы диагностики

- Бактериологический метод Стандартная среда для выделения культуры легионелл - агар ВСУЕа, который содержит дрожжевой экстракт, L-цистеин, соединения железа, альфа-кетоглутарат и ACES-буфер. Культивирование легионелл - трудоемкий и дорогостоящий процесс. Легионеллы достаточно медленно растут на питательных средах, культивирование занимает не менее 4 - 5 суток, при этом оптимальным клиническим материалом для исследования является БАЛ, получаемый при бронхоскопии.
- Молекулярно-генетический метод (ПЦР)
- РИФ



Бактериологический метод

- В ходе стандартных лабораторных процедур по обнаружению *Legionella* в воде бактерии вначале концентрируют (центрифугированием и/или фильтрацией через 0,2 мкм фильтры) перед инокуляцией на БУДРАГ, содержащий антибиотики (например, [глицин-ванкомицин-полимиксин-циклогексимид](#), ГВПЦ) для того, чтобы подавить другие микроорганизмы в образцах. Обработку температурой или кислотой также используют для подавления роста других микроорганизмов в образце. После инкубации сроком до 10 дней, если выросшие колонии растут на БУДРАГ с цистеином и не растут без него, то это — *Legionella*. Для установления вида или серотипа затем используются иммунологические методики[[]



Идентификация легионелл

- Легионеллы не ферментируют углеводы, разжижают желатин, не образуют уреазу, не восстанавливают нитраты, положительны в пробе на каталазу, вариабельны в пробе на оксидазу. Отсутствие способности к ферментации углеводов у бактерий *Legionella* spp. не позволяет быстро и достоверно провести идентификацию легионелл до вида на основе биохимических тестов. Для быстрой идентификации бактерий *Legionella pneumophila* используют латекс-агглютинацию с моновалентными и групповыми сыворотками и метод флуоресцирующий антител (МФА). В случае необходимости принадлежность выделенной культуры к виду *Legionella pneumophila* определяют с помощью полимеразной цепной реакции с видоспецифичными праймерами.



Концентрации *Legionella pneumophila* в отдельных объектах (СанПиН 3.3686-21)

N	Объект	Концентрация, КОЕ/л
1	Система охлаждения промышленных предприятий и кондиционирования воздуха в зданиях общественного назначения	10^4
2	Системы водоснабжения	10^3
3	Бассейны и аквапарки с "барботированием" типа "Джакузи"	Отсутствие
4	Системы горячего водоснабжения медицинских организаций в отделениях групп риска (трансплантации, онкологии, хирургии реанимации, интенсивной терапии и других) и организациях социального обслуживания граждан пожилого возраста и инвалидов*.	Отсутствие
*для данных групп риска необходимо полностью исключить возможность контакта с водой, содержащей <i>Legionella</i> spp.		



Определение количества легионелл в исследуемом материале

- Для определения количества легионелл в исследуемой пробе берут чашку с посевом предварительного сконцентрированного материала (п. 7) без тепловой и кислотной обработки. Для расчета используют следующую формулу:

- $$X = \frac{a \times b \times 1}{c \times s}, \text{ где}$$

- X - количество легионелл на литр в исследуемой пробе,
- a - количество легионелл, выросших на чашке,
- b - объем концентрата пробы (по завершении этапов фильтрации и центрифугирования) в мл,
- c - объем, посеянный на чашку, в мл,
- s - объем исходной пробы в литрах.



Оформление результатов

- Если легионеллы не выявлены в исследуемой пробе: *Legionella pneumophila* не обнаружена.
- - При выявлении *Legionella* spp.: в исследуемой пробе выявлены *Legionella* spp.; *Legionella pneumophila* не обнаружена.
- - При выявлении *Legionella pneumophila*: в исследуемой пробе выявлена *Legionella pneumophila* в установленном количестве бактерий (геномных копий) на литр.
- - При исследовании пробы биопленки: в исследуемой пробе выявлена *Legionella* spp. или *Legionella pneumophila*.



Исследования питьевой воды

- Для выделения легионелл используют любую стандартную среду, разрешенную к применению на территории Российской Федерации (буферный угольно-дрожжевой агар (далее - БУДРАГ) с ростовой и селективной добавкой, легионелл бакагар в соответствии с инструкцией производителя, приложение 2 к настоящим МУК).
- Исследования приведены на примере использования среды БУДРАГ. Для прогревания из подготовленного сконцентрированного образца отбирают 0,2 см³ и переносят в стерильную пробирку, после чего помещают на водяную баню при температуре 50 °С и прогревают в течение 30 мин. Для обработки кислотным буфером, 0,2 см³ сконцентрированного образца переносят в стерильную пробирку и добавляют 0,2 см³ раствора кислотного буфера KCl-HCl, pH 2,2, инкубируют при комнатной температуре в течение 4 мин. Для приготовления кислотного KCl-HCl буфера к 39 см³ 0,4 М раствора HCl добавляют 250 см³ 0,4 М раствора KCl. Доводят значение pH буфера до 2,2 с помощью 1 М раствора KOH. Хранят в темном флаконе при температуре 4 °С не более 1 месяца. Кислотную обработку проводят непосредственно перед посевом на плотные питательные среды. Далее по 0,1 см³ концентрированного, обработанного кислотным буфером и прогретого при температуре 50 °С образца, а также не обработанного концентрата высевают на чашки со средой БУДРАГ с ростовой и селективной добавкой. Образец распределяется по поверхности питательной среды шпателем или стеклянной палочкой. Чашки инкубируют при температуре (37±1) °С до 10 дней во влажной атмосфере в присутствии 2,5 % CO₂.
- Просмотр чашек БУДРАГ начинают с 2 суток, при отрицательном результате продолжают до 5 - 7 суток и в более поздние сроки. В случае массивной контаминации проб посторонней микрофлорой, не позволяющей проводить подсчет колоний, сконцентрированную пробу разводят в 100 раз и производят повторный высеv. При анализе результата учитывают разведения.
- Подозрительные на легионеллы колонии выявляют при стереомикроскопическом просмотре чашек или под лупой. На селективной среде колонии легионелл обычно имеют вросший центр, гранулярную или блестящую поверхность, серовато-голубоватую, иногда зеленоватую окраску. Колонии легионелл на 3 - 5 сутки небольшие, диаметром 1 - 2 мм, плоско-выпуклые, гладкие с острым краем.
- Для идентификации бактерий рода *Legionella* spp. используют окраску мазков по Граму и посев на среду БУДРАГ без селективной и ростовой добавок, на которой колонии легионелл не вырастают.



Идентификация

- В мазках легионеллы выглядят как небольшие грамотрицательные палочки длиной 2 - 3 мкм. В мазках с 4 - 5-дневных колоний длина легионелл может достигать 10 - 15 мкм.
- Легионеллы растут на среде БУДРАГ без селективной добавки и не растут на контрольной среде.
- Для идентификации бактерий рода *Legionella spp.* применяют также реакцию латекс-агглютинации (РЛА), ИХА, матрично-активированную лазерную времяпролетную масс-спектрометрию (MALDI-ToF) и молекулярно-генетические методы.



Учет результатов

- При обнаружении в пробах воды из систем горячего централизованного питьевого водоснабжения в документе о результатах проведенного исследования (например, протокол, отчет) записывают: "*Legionella pneumophilla* в 1000 см³/1 дм³ обнаружена".
- Если легионеллы не выявлены в исследуемом объеме записывают: "*Legionella pneumophilla* в 1000 см³/1 дм³ не обнаружена".
- При выявлении *Legionella spp.*: в исследуемой пробе воды в документе о результатах проведенного исследования (например, протокол, отчет) записывают: "*Legionella spp.* обнаружена в 1000 см³/1 дм³, *Legionella pneumophilla* в 1000 см³/1 дм³ не обнаружена".



Бактериологический контроль контаминации легионеллами в МО

- Объекты мониторинга
- Централизованные системы кондиционирования и увлажнения воздуха, системы водоснабжения МО
- Бассейны с "барботированием" типа "джакузи";
- дополнительно (в отделениях повышенного риска: например, трансплантология, онкология, хирургия, интенсивная терапия, реанимация, ожоговые отделения, перинатальная и неонатальная патология)
- оборудование, инструменты и растворы, применяемые при осуществлении интубации, вентиляции легких и других процедурах;
- бутилированная вода, используемая пациентами



Нормативно-методические документы

- Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21
"Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»)
- Методические указания МУК 4.2.2217-07
"Методические указания по выявлению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды"
(утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 мая 2007 г.)
- [Методические рекомендации Выявление антигена бактерий *Legionella pneumophila* серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом](#)
- МУ 3.1.2/4.2.3373-23 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями» Раздел Этиологическая диагностика внебольничных пневмоний. Особенности диагностики пневмонии, вызванной *Legionella pneumophila*



Нормативно-методические документы

- Методические указания МУК 4.2.3963-23
"Бактериологические методы исследования воды"
(утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 1 сентября 2023 г.)
- Методические рекомендации МР 3.1.0346-24
"Организация и проведение микробиологического мониторинга в медицинских организациях"

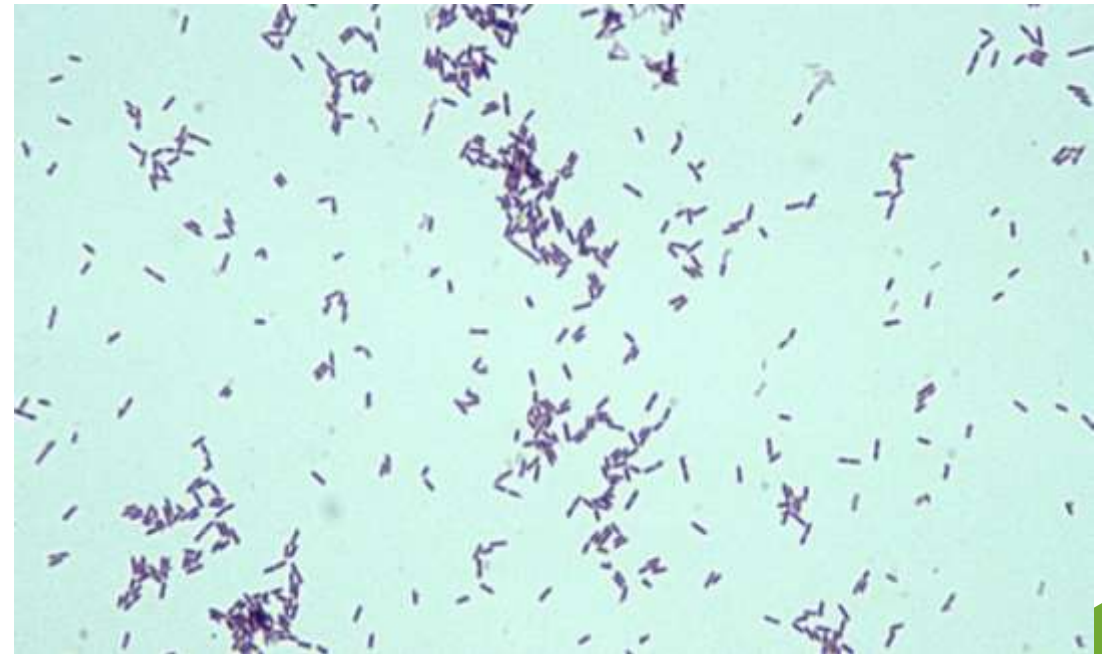


Листерии. Таксономия

- Домен:
- [Бактерии](#)
- Тип:
- [Фирмикуты](#)
- Класс: Bacillota
- Порядок:
- [Bacillales](#)
- Семейство:
- [Listeriaceae](#)
- Род:
- **Листерии**
- Типичный вид: *Listeria monocytogenes*

Морфология

- палочки с закруглёнными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках, реже образуют длинные нити
- Подвижные
- Не образуют спор
- могут образовывать капсулу
- Грамположительные





- *L. monocytogenes* относится к роду *Listeria*. Представители рода *Listeria* представляют собой грамположительные короткие палочки, размером 0,4 - 0,5 на 0,5 - 2,0 мкм, с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные или в коротких цепочках, реже в длинных нитях. Спор и капсул не образуют, не кислотоустойчивы. Факультативный анаэроб, хемоорганогетотроф, во внешней среде они являются хемолитоавтотрофами. Ферментируют глюкозу, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Листерии высоко устойчивы во внешней среде, растут в широком диапазоне pH (от 4,0 - 4,8 до 9,5 - 10,0), в присутствии NaCl (20 %) и 15 % CO₂.
- Оптимальная температура роста для листерий плюс 30 - 37 °C, хотя листерии могут расти и при комнатной температуре 20 - 25 °C, и при температуре плюс 4 °C, и даже при температуре 44 - 45 °C. Микроорганизмы, выросшие при температуре 20 - 25 °C, подвижны за счет немногочисленных перитрихально расположенных жгутиков. При температуре 37 °C жгутики, как правило, не образуются, и листерии неподвижны.



Культуральные свойства

- Микроаэрофилы, растут при 5% CO₂
- Не требовательны к питательным средам
- растут на кровяном агаре, образуя полупрозрачные колонии , окруженные зоной гемолиза
- Могут образовывать пигмент
- Психрофилы



Биохимические свойства

- Обладают сахаролитическими свойствами
- Сероводород и индол не продуцируют, желатин не разлагают
- Каталазаположительные





Питательные среды для выделения листерий из пищевых продуктов

- Селективный бульон для обогащения листерий (бульон UVM) – диффузное помутнение
- Селективный бульон для обогащения листерий (бульон Фрейзера) – помутнение и окрашивание среды в темно-коричневый или черный цвет
- Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ) – мелкие серо-желтые колонии с образованием
- Питательный бульон для выделения листерий (ПБЛ) – помутнение среды, при встряхивании наблюдаются муаровые волны
- Питательные среды для выделения и идентификации листерий (ПАЛКАМ) – Круглые серо-зеленого цвета колонии, среда под колониями окрашивается в черный цвет

Рост на ПАЛ (слева) и ПАЛКАМ (справа)



Рост на ПБЛ и бульоне Фрейзера

ПИТАТЕЛЬНЫЙ БУЛЬОН ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИСТЕРИЙ сухой (Среда ПБЛ)

НАЗНАЧЕНИЕ:

Для выделения листерий из клинического материала и пищевых продуктов при бактериологических исследованиях.
РУ № ФСР 2010/09161.

КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ:

Панкреатический гидролизат казеина, пептон мясной, дрожжевой экстракт, литий хлористый, натрий хлористый, натрий углекислый, селективная добавка.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА:

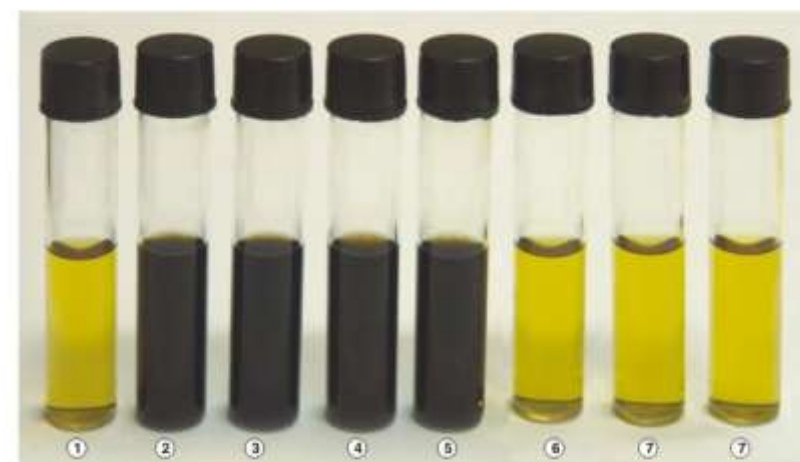
Тест-штамм	Наблюдаемый эффект
<i>Listeria monocytogenes</i> 766	Помутнение среды, при встряхивании наблюдаются "мушкетерские волны"
<i>Listeria ivanovi</i>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Рост подавлен
<i>Proteus vulgaris</i> HX 19 222	Рост подавлен
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood-46	Рост подавлен

"Мушкетерские волны"
Listeria monocytogenes

Композит *Escherichia coli* *Listeria monocytogenes* *Listeria ivanovi*

Композит *Listeria*

СРОК ГОДНОСТИ - 2 года
Фасовка 250 г для приготовления 7,4 л среды



Fraser Broth Base (M1327)

1. Control
2. *Listeria monocytogenes* ATCC 19111
3. *Listeria monocytogenes* ATCC 19112
4. *Listeria monocytogenes* ATCC 19117
5. *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
6. *Escherichia coli* ATCC 25922
7. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
8. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Хромогенные среды для обнаружения листерий **Оттавиани-Агости**

- **Принцип действия**

Среда содержит хромогенный субстрат для определения фермента β -глюкозидазы. Все листерии обладают активностью фермента β -D-глюкозидазы и образуют при взаимодействии с хромогенным субстратом сине-зеленые колонии.

- *L.monocytogenes* выявляется по наличию вирулентного фактора – фермента фосфатидилинозит-фосфолипазы C. Фосфолипаза расщепляет специфический субстрат среды с образованием зоны просветления (гало) вокруг колоний *L.monocytogenes*.

- Кроме *L.monocytogenes* только *L.ivanovii* проявляет фосфолипазную активность после 48 часов инкубации



Listeria monocytogenes
ATCC® 13932



Дифференцировка листерий

Признак	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeni</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. welshimeri</i>
Ферментация:						
- маннита	-	-	-	-	+	-
- ксилозы	-	+	+	-	-	+
- рамнозы	+	-	-	+/-	+/-	+/-
Бета-гемолиз	+	+	+	-	-	-
КАМП-тест (CAMP-test). Усиление гемолиза около штриха:						
- <i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-	-
- <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-
Лецитиназная активность:						
- на среде с активированным углем	+	+	-	-	-	-
- на среде без угля	-	+	-	-	-	-



Тесты для идентификации

- Подвижность культур определяют посевом уколом в среды (Среда для определения подвижности листерий (*Listeria motility medium*)) и инкубированием при двух температурах - 25 и 37°C в течение 48-72 ч. Бактерии рода *Listeria* подвижны при 20-25°C (образуют характерный рост вокруг линии укола, похожий на зонтик) и неподвижны (или слабоподвижны) при 35-37°C.
- Постановку КАМП-теста проводят для дифференциации *L. monocytogenes* от других видов листерий, обладающих гемолитической активностью.
- Для проведения теста 2-3-суточные культуры гемолитических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi* засевают на кровяной агар с эритроцитами барана двумя параллельными штрихами на расстоянии 5,0-5,5 см. Между вертикальными штрихами *St. aureus* и *Rh. equi* засевают параллельными штрихами исследуемые культуры листерий на расстоянии друг от друга не менее 1 см и от вертикальных штрихов - 0,5 см. В качестве контрольных используют тест-штаммы *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*. Инкубацию проводят 24 ч при 37°C. Отмечают форму и размеры зон гемолиза около вертикальных штрихов роста стафилококка и родококка. *Listeria monocytogenes* дает расширение зоны гемолиза около штриха *St. aureus* (положительный КАМП-тест) и имеет отсутствие изменений зоны гемолиза рядом со штрихом *Rh. equi* (отрицательный КАМП-тест).



Листериоз

- Это сапрозоонозное инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое патогенными представителями рода *Listeria*, характеризуется множеством источников и резервуаров инфекции, разнообразием путей и факторов передачи возбудителя, полиморфизмом клинических проявлений, высокой летальностью у новорожденных и лиц с иммунодефицитами с возможным развитием висцеральной, нервной, железистой, гастроэнтеритической и смешанной форм, а также бессимптомным носительством листерий.



Эпидемиология листериоза

- Основным резервуаром возбудителя в природе являются многие виды синантропных и диких грызунов. Листерий обнаруживаются у лисиц, норок, песцов, диких копытных, птиц. Листериоз поражает домашних и сельскохозяйственных животных (свиней, мелкий и крупный рогатый скот, лошадей, кроликов, реже кошек и собак), а также домашнюю и декоративную птицу. Листерий обнаружены также в рыбе и продуктах моря (креветки).
- Источником инфекции для человека являются сельскохозяйственные животные - больные и бессимптомные носители и грызуны.
- Переносчиком инфекции листериоза могут быть кровососущие членистоногие (иксодовые и гамазовые клещи), а также различные виды блох и вшей.
- Больной листериозом человек или бессимптомный носитель также представляет эпидемиологическую опасность.



Механизмы и пути передачи

- При листериозе имеют место многообразные механизмы передачи возбудителя инфекции: фекально-оральный, контактно-бытовой, аспирационный, трансплацентарный.
- Листерии проникают в организм человека прежде всего через желудочно-кишечный тракт, в редких случаях возможно проникновение через органы дыхания, слизистые оболочки, поврежденную кожу,
- Заражение человека происходит в результате:
 - употребления в пищу инфицированных продуктов животного происхождения (молочные продукты, мясные продукты, птицеводческая продукция), овощей и фруктов, морепродуктов), преимущественно готовых к употреблению продуктов;
 - вдыхания пыли, контаминированной возбудителем;
 - контакта с больными или носителями возбудителя листериоза животными;
 - внутриутробной передаче возбудителя через плаценту,
 - контакта новорожденных детей с инфицированными предметами ухода и медицинским инструментарием в родильных домах.



Методы диагностики

- Материал для исследования: ликвор, кровь, пунктат лимфатических узлов, слизь из носоглотки, отделяемое влагалища, околоплодные воды, плацента, трупный материал
- Методы диагностики:
 - Бактериологический
 - Серологический (ИФА, РНГА)
 - Молекулярно-генетический (ПЦР)
 - ИХА тест на определение антигена в кале



Определение *L. monocytogenes* в воде

- Определение *L. monocytogenes* проводят в воде по эпидпоказаниям с целью подтверждения их отсутствия/присутствия в 1 дм³ воды.
- Определение *L. monocytogenes* титрационным способом.
- Посевной объем пробы воды составляет 1000 см³.
- Для посева используют 2 объема воды по 250 см³, 4 объема по 100 см³, 10 объемов по 10 см³, при этом воду засевают сразу в среды накопления и инкубируют при температуре (30±1) °С в течение 24 - 48 ч. Для накопления листерий используют селективный накопительный бульон UVM, бульон Фрейзера, питательный бульон для выделения листерий (ПБЛ1).



Определение *L. monocytogenes* мембранным способом.

- Пробу воды делят на 4 объема по 250 см³, для более легкого прохождения воды через фильтры. При видимом загрязнении, образец можно поделить на 5 и (или) 10 равных частей. Воду фильтруют. После фильтрации мембранные фильтры вносят в 50 - 100 см³ среды накопления и инкубируют в термостате при температуре (30±1) °С в течение 24 - 48 ч.
- Бактерии рода *Listeria* при селективном обогащении в бульоне UVM, ПБЛ-1 через 24 и 48 ч инкубации при температуре (30±1) °С вызывают незначительное диффузное помутнение среды (рис. 1А приложения 16 к настоящим МУК). При росте листерий в бульоне Фрейзера, содержащем эскулин и цитрат железа аммонийного, отмечается почернение среды за счет гидролиза эскулина (рис. 1А, рис. 1Б приложения 16 к настоящим МУК).
- Дальнейшие этапы исследования для титрационного и фильтрационного способов одинаковы: после предварительного обогащения проводят пересев 0,1 см³ материала в 10 см³ среды для вторичного накопления с последующей инкубацией при температуре (37±1) °С в течение 24 - 48 ч в среду ПБЛ-2 (селективная среда для обогащения) или в бульон Фрейзера 2 или бульон UVM.



- Материал отбирается из верхнего слоя питательной среды микробиологической петлей на селективно-диагностические питательные среды (например, ПАЛ, ПАЛКАМ агар, ALOA агар по Оттавиани и Агости). На среде ПАЛ/ПАЛКАМ агар при температуре (37⁰) °С через 24 ч инкубирования листерии формируют мелкие, серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии, диаметром 0,5 - 1,0 мм (рис. 2А приложения 16 к настоящему МУК). Через 48 ч колонии заметно увеличиваются в диаметре до 1,0 - 2,0 мм и окружены черным ореолом.
- Выделение листерий на ПАЛКАМ агаре основано на их способности гидролизовать эскулин с образованием эскулетина, который в присутствии ионов железа образует серо-зеленый комплекс с почернением среды вокруг колоний. За счет внесения селективной добавки: полимиксина, акрифлавина, цефтазидима, а также присутствия в составе хлорида лития, среда обладает высокими селективными свойствами по отношению к сопутствующей микрофлоре. На среде ALOA - агаре *Listeria* по Оттавиани и Агости *L. monocytogenes* формировали сине-зеленые колонии, окруженные непрозрачным ореолом (наличие фосфолипазной активности), рост *L. innocua* сопровождался образованием сине-зеленых колоний без зоны помутнения (рис. 2А, 2Б, 2В приложения 16 к настоящему МУК).



Идентификация

- Для определения принадлежности выделенных микроорганизмов к роду *Listeria* полученные на средах культивирования чистые культуры микроскопируют по Граму. Бактерии рода *Listeria* являются грамположительными тонкими короткими палочками, спор не образуют. Определяют наличие каталазы, подвижность при двух температурах инкубирования (25) °C и (37) °C.
- Каталазную активность культур определяют по способности каталазы разлагать перекись водорода с выделением пузырьков газа. Реакцию ставят с суточной культурой на стерильном предметном стекле.
- Изолированную колонию, взятую с поверхности питательной среды, растирают на стекле и пипеткой наносят каплю 3 %-го раствора перекиси водорода. Если через 30 - 60 сек на стекле появляются пузырьки газа, то считают результаты реакции положительными. Бактерии рода *Listeria* являются каталазоположительными.
- Подвижность культур определяют посевом уколом в 0,4 % полужидкий агар, инкубируют при двух температурах (25) °C и (37) °C в течение 48 - 72 ч.
- Бактерии рода *Listeria* подвижны при (25) °C (образуют характерный рост вокруг линии укола, похожий на зонтик) и неподвижны (или слабоподвижны) при температуре (37) °C.
- Обнаружение в посевах грамположительных коротких тонких палочек, каталазоположительных, подвижных при температуре 25 °C и неподвижных при температуре 37 °C, указывает на принадлежность выделенных на дифференциально-диагностических средах культур с характерной морфологией к роду *Listeria*.



Идентификация

- Для подтверждения принадлежности выделенных листерий к виду *L. monocytogenes* определяют способность к ферментации маннозы, рамнозы, ксилозы, маннита, наличие лецитиназной и бета-гемолитической активности.

Для видовой дифференциации выделенных культур листерии допускается использовать среды Гисса, коммерческие тест-системы согласно рекомендациям изготовителя. *L. monocytogenes* утилизируют рамнозу и маннозу с образованием кислоты и не утилизируют ксилозу и маннит.

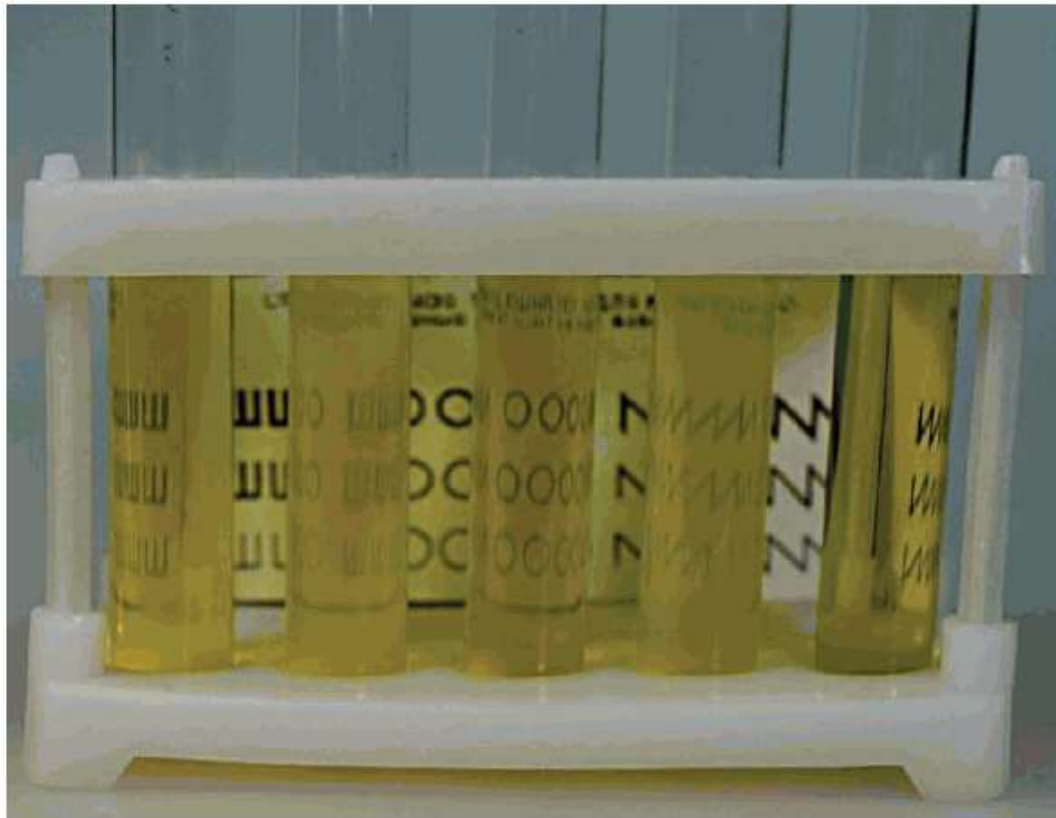
Бета-гемолитическую активность исследуемых культур определяют по образованию зон просветления за счет растворения эритроцитов вокруг колоний при посеве на поверхность кровяного агара, приготовленного с добавлением стерильной дефибринированной крови барана или кролика. Посевы на кровяном агаре термостатируют при температуре (371) °С в течение 24 ч. *Listeria monocytogenes* обладают бета-гемолитической активностью (образуют узкие четкие зоны просветления вокруг колоний).

Для определения лецитиназной активности дно двух чашек Петри со средой ГРМ N 1, содержащих: 1 чашка - желток куриного яйца и активированный уголь, 2 чашка - желток куриного яйца без активированного угля - делят на несколько секторов или квадратов, исследуемые культуры и контрольные штаммы листерий пересевают параллельно короткими штрихами на соответствующие секторы чашек, содержащих и не содержащих уголь. Инкубируют 48 ч при температуре (371)°С. Чашки просматривают в проходящем свете, сравнивая с контрольными высевами музейных штаммов. *Listeria ivanovii* дает плотную зону помутнения шириной 3 - 6 мм независимо от присутствия активированного угля. *Listeria monocytogenes* дает аналогичную зону помутнения в присутствии активированного угля и не дает при отсутствии угля. Другие виды листерий не дают зоны помутнения.

- Допускается проведение идентификации выделенных возбудителей методом MALDI-TOF MS.



Рост листерий в питательных средах ГБЛ
II (А) и бульоне Фрейзера (Б). Слева
направо: помутнение или почернение
среды указывают на рост листерий



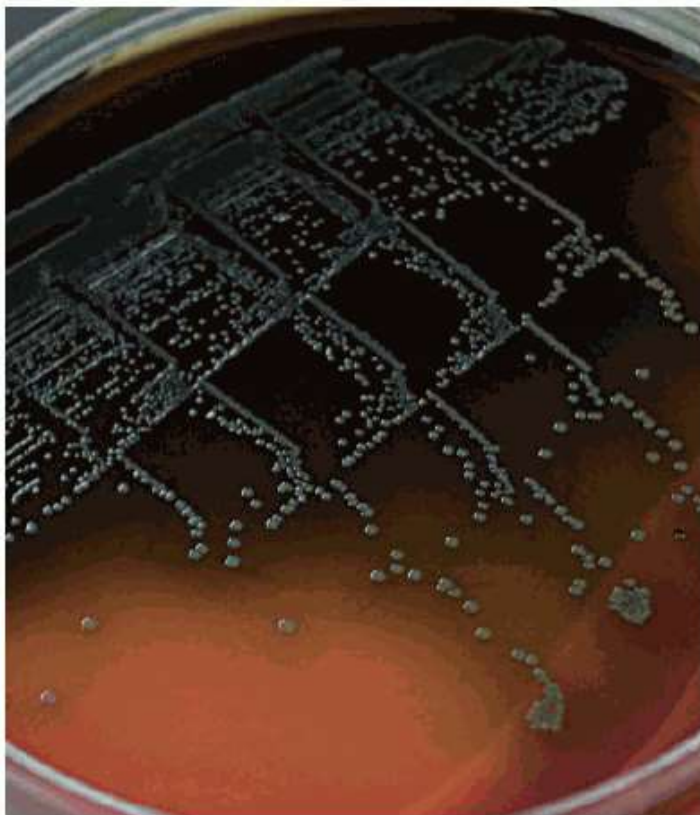
А



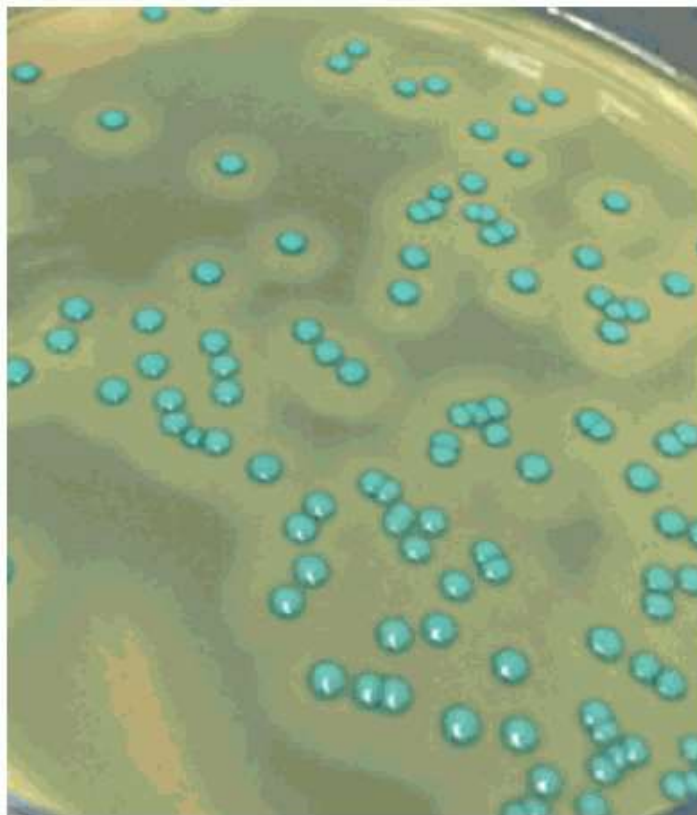
Б



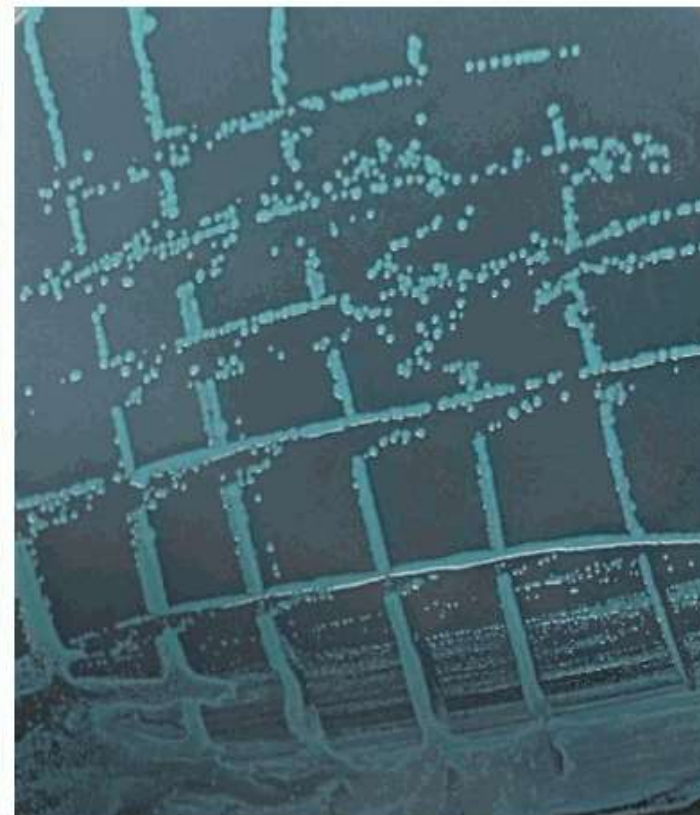
Рост *L. monocytogenes* на плотных питательных средах ПАЛКАМ-агаре (А), АЛОА агаре *Listeria* по Оттавиани и Агости (Б, В).



А



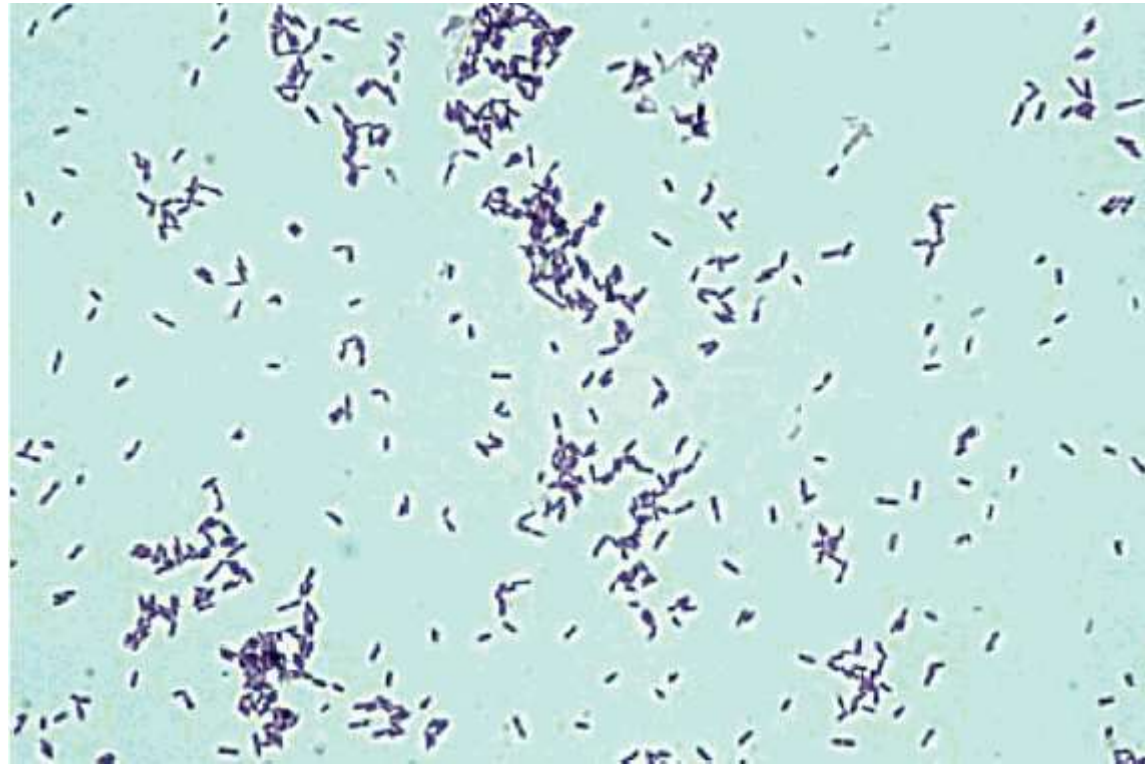
Б



В

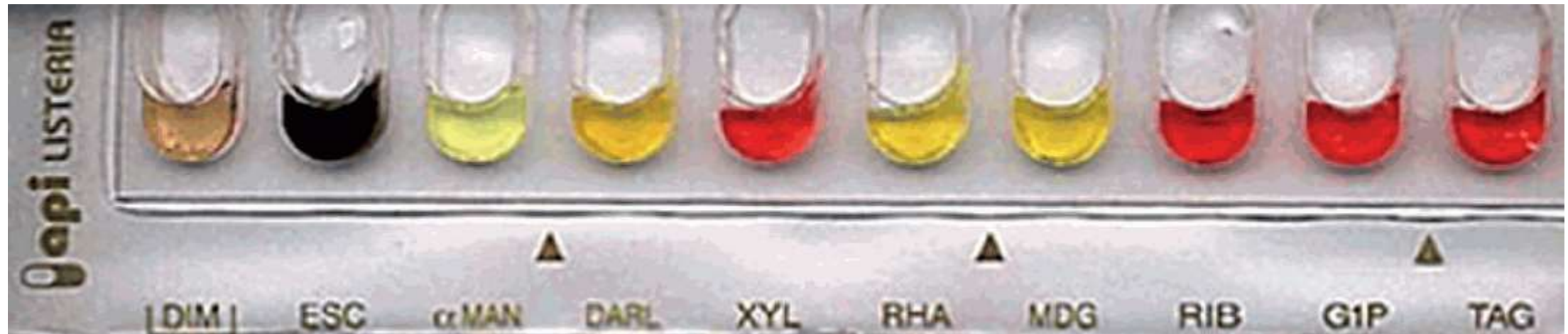


Микроскопия . Листерии в чистой культуре





Биохимическая идентификация на тест-системе "API Listeria идентификация рода Listeria"





Учет результатов

- При отсутствии роста на чашках с дифференциально-диагностическими средами анализ прекращают и дают заключение об отсутствии *L. monocytogenes* в исследуемой пробе воды в документе о результатах проведенного исследования (например, протокол, отчет) записывают: "*L. monocytogenes* в 1000 см³/1 дм³ не обнаружена".
- При обнаружении характерного роста на чашках отбирают 3 - 5 колоний для их дальнейшего изучения.
- Отобранные колонии пересевают одну из сред: простой питательный агар с 1 % глюкозы, триптон-соевый агар, триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом для получения изолированных колоний. Посевы термостатируют при температуре (30±1) °С в течение 24 ч.



Нормативно-методическая документация

- [Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. N 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" \(с изменениями и дополнениями\)](#)

XXVIII. Профилактика листериоза

- Методические указания МУК 4.2.1122-02
"Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах"
(утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 22 апреля 2002 г.)



Нормативно-методическая документация

- Методические рекомендации МР 4.2.0220-20
"Методы санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды"
- Методические указания МУК 4.2.3963-23
"Бактериологические методы исследования воды"
- Методические указания МУК 4.2.4067-24
"Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов"



Благодарю
за внимание!