



## ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

---

**Жануарлар**

**ЛИСТЕРИОЗДЫҢ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКА ӘДІСІ**

**Животные**

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА**

**ҚР СТ 3509-2019**

*(Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Listeria monocytogenes, chapter 3.9.6, 2018, NEQ)*

**Ресми басылым**

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің  
Техникалық реттеу және метрология комитеті  
(Мемстандарт)**



БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3509-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





## ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

---

**Жануарлар**

**ЛИСТЕРИОЗДЫҢ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКА ӘДІСІ**

**ҚР СТ 3509-2019**

*(Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Listeria monocytogenes, chapter 3.9.6, 2018, NEQ)*

**Ресми басылым**

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің  
Техникалық реттеу және метрология комитеті  
(Мемстандарт)**

**Нұр-Сұлтан**



**1 «ElitArt» ЖШС ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

**2** Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитеті Төрағасының 2019 жылғы 11 желтоқсандағы № 457-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП, ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

**3** Осы стандарт Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, *Listeria monocytogenes*, chapter 3.9.6, 2018 («Жердегі жануарларға арналған диагностикалық тестілер мен вакциналар жөніндегі нұсқаулықтар» Халықаралық эпизоотикалық бюро (ХЭБ), Листерия, 3.9.6, 2018 тарау» Халықаралық Эпизоотиялық Бюроның нұсқаулығын ескере отырып әзірленген

Сәйкестік дәрежесі – балама емес (NEQ).

Ағылшын (en) тілінен аударылған

**4** Осы стандартта Қазақстан Республикасының «Стандарттау туралы» 2018 жылғы 5 қазандағы № 183-VI, «Ветеринария туралы» 2002 жылғы 10 шілдедегі № 339 Заңдарының ережелері іске асырылған

**5 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ**

*Осы стандартқа енгізілген өзгерістер туралы ақпарат жыл сайын басып шығарылатын «Қазақстан Республикасының стандарттау жөніндегі құжаттары» ақпараттық каталогында, ал өзгерістер мәтіні мерзімді басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтеуіштерінде жарияланады. Осы стандарт қайта қаралған (ауыстырылған) немесе жойылған жағдайда, тиісті ақпарат мерзімді басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтеуішінде жарияланады.*

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде толықтай немесе бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды

**Кіріспе**

Listeria monocytogenes листериозының қоздырғышы сүтқоректілерді, құстарды, балықтарды және шаян тәрізділерді қоса алғанда, жануарлардың бірнеше түрлерін зақымдауы мүмкін (1-кесте).

Көбінесе күйіс қайыратын жануарларға қарағанда, шошқалар сирек зақымданады. Құстар әдетте инфекцияның симптомсыз тасымалдаушылары болып табылады. Жануарлардың көптеген жұқпалары симптомсыз өтеді, бірақ инвазивті ауру анда-санда кездесетін сырқат немесе таралу түрінде пайда болуы мүмкін. Экономикалық шығыннан басқа листериоз жануарлардан адамдарға, бірінші кезекте ауру жануарлардан алынған термиялық өңделмеген жануарлар өнімдерін пайдалану арқылы беріледі.

**1-кесте – Listeria monocytogenes сезімтал жануарлардың түрлері**

Сүт қоректілер				
Ірі қара мал	Мысық	Қояндар	қойлар	Бұғылар
Теңіз шошқасы	Ешкі	Еноттар	Шиншалла	Шошқалар
Егеуқұйрықтар	Скунстар	Жылқылар	Тышқандар	Күзен
Иттер	Леммингтер	Саскүзен	Түлкілер	Кеміргіштер
Бұлан	Адамдар			
Құстар				
Шымшық	Үйректер	Үкі	Зябликтер	Қырандар
Тотықұс	Балапандар	Қаздар	Шымшықтар	Тырналар
Қаршыға	қырғауылдар	Көгершіндер	Лори тотықұсы	Көгершіндер
Шағала	Күркетауық	Шотландық ақ шіл	Ақтамақты колибри	Орман қарабауыры
Басқалары				
Бақалар	Шаянтектестер	Кенелер	Балықтар	Құмырсқалар
Шыбындар	Жыландар			

Жануарларда, әсіресе қойларда, ешкілерде және ірі қара малдарда листериоздың клиникалық белгілері энцефалит, септицемия және түсік тастау түрінде байқалады. Табында таралу кезінде әдетте листериоздың бір ғана клиникалық түрі кездеседі. Ромбоэнцефалитті түрі жануарлардың бір бағытта айналуына байланысты «айналмалы ауру» деп аталады және ол күйіс қайыратын жануарларда осы аурудың ең көп таралған көрінісі болып табылады. Бұдан басқа, бұл күйіс қайыратын жануарларының неврологиялық ауруларының ең көп тараған себептерінің бірі. Клиникалық белгілер жүдеу жағдайын, анорексияны, бас қысылуы немесе бас бір жаққа бұрылуы және біржақты параличті қамтиды. Түсік тастау буаздықтың соңғы мерзімінде (ірі қара малда 7 айдан кейін және қойда 12 аптадан кейін) байқалады. [3]. Септикалық түрі салыстырмалы түрде сирек кездеседі және бірақ әдетте, жаңа туған төлдерде әрдайым кездесе бермейді.



## ҚР СТ 3509-2019

Бұл бәсеңдік, тәбеттің болмауының көрінісімен байқалады, безгек және өліммен аяқталады. Сондай-ақ, ірі қара мал мен қойдың офтальмиттері сипатталды. Күйіс қайыратын жануарларда мастит түрінде сирек көрінеді. Қойда листериоз асқазан-ішек жолы жұмысының бұзылуымен пайда болуы мүмкін. Шошқада листериоз, сепсис түрінде, энцефалит түрінде сирек, ал түсік тастау одан да сирек кездеседі. Құстар әдетте симптомсыз тасушылар болып табылады, листериоздың кездейсоқ жағдайлары түрінде көрінеді, көбінесе сепсис және менингоэнцефалит байқалады. Құстардың листериозы вирустық аурулар мен сальмонеллез кезінде екінші инфекцияның нәтижесі болуы мүмкін.

Жануарлардың листериозы кезіндегі өлгеннен кейінгі өзгерістер мен гистопатология клиникалық түріне байланысты. Энцефалит түрінде жұлын сұйықтығы лайлануы мүмкін, ал менингеальды қан тамырлары толып кетеді. Кең зақымданулар, әдетте, әлсіз байқалғандар және қан тамырларындағы іркіліс құбылыстармен және ми діңінің түсінің айтарлықтай өзгеруімен сипатталады. Кейде ми затында жұмсарту (безгек) және абсцесстер пайда болады. Өзіне тән гистопатологиялық өзгерістер жақын маңдағы периваскулярлық мононуклеарлық манжетпен ми діңіндегі ішкі паренхимиялық нейтрофилдер мен макрофагтардың (микроабсцесс) ошақтарынан тұрады. Микроабсцесстер көбінесе бір жағын қатты зақымдайды. Неғұрлым кеңірек безгек патологиясы пайда болуы мүмкін. Ұзын жұлын миы мен варолий көпір қатты зақымданады. Септикалық түрде бауыр некрозының және сирек көкбауырдың көптеген ошақтары байқалуы мүмкін. Күйіс қайыратын жануарлардың түсік тасталған ұрықтары өте аз зақымдануларды көрсетеді, бірақ егер ұрығы оны жойғанға дейін өлген болса, автолиз болуы мүмкін [6].

Жануарлардың листериозды жұқтыруы көбінесе ластанудың негізгі көзі ретінде жем және қоршаған орта арқылы орын алады. Қоршаған ортада бұл сапрофитті микроорганизмдер топырақта, суда және ыдырайтын көкөністерде сақталуы мүмкін. Сүрлем ең жиі кездесетін көзі болып табылады. Септикалық/абортивті листериоз кезінде ішектің шырышты қабығы ішу арқылы қабылдағаннан кейін енудің негізгі жолы болып табылады. Инкубациялық кезең бар болғаны 1 күнді құрауы мүмкін. Листериоздың энцефалит түрі кезінде қоздырғыш зақымдалған ауыз қуысының шырышты қабығы арқылы ми діңіне түседі. Инкубациялық кезең септикалық түрден әлдеқайда ұзағырақ, әдетте 2-3 апта. Қой мен ешкіде ауру әдетте 1-4 күн бойы күрделі өтеді, бірақ ірі қара малда ол ұзақ болуы мүмкін.

Листериоздың инвазивті түрлері адамдарда септицемия, менингит (немесе менингоэнцефалит) және энцефалитты (ромбэнцефалит) қамтиды. Сондай-ақ, безгегі бар асқазан-ішек белгілері кездеседі. Листериозбен аурушандық салыстырмалы түрде төмен болса да, өлім 30% - ға жетуі мүмкін. Жүкті әйелдерде инфекция түсік тастауға, өлі тууға немесе мерзімінен бұрын тууға әкелуі мүмкін және оның алдында қызбаны қоса алғанда, тұмауға ұқсас белгілер болуы мүмкін.

*Listeria monocytogenes* грам оң таяқша болып табылады және адамдарда инфекцияның негізгі қоздырушысы болып табылады; *L.ivanovii* туындаған инфекцияның сирек жағдайлары тіркелген болса да, *L.monocytogenes* жануарларында инфекцияның негізгі қоздырғышы болып табылады, бірақ *L.ivanovii* және *L.seeligeri* инфекциясының пайда болу жағдайлары бар. *Listeria ivanovii* түсік тастаумен бірге жүреді және қойларда менингиттік-энцефалит өте сирек туындайды.

Бұдан басқа, *L.monocytogenes* қоздырғышы белгілі бір зоонозды әлеуетке ие, ол сондай-ақ қоршаған ортаны ластаушылардың бірі болып табылады..

2 кесте – *Listeria monocytogenes* патогенді түрлері

Листерий түрі	Адамдардағы вируленттілік	Жануарлардағы вируленттілік
<i>L.monocytogenes</i>	+	+
<i>L.ivanovii</i> , <i>ivanovii</i> кіші түрі	_a	+
<i>L.ivanovii</i> , <i>londoniensis</i> кіші түрі	-	+
<i>L.innocua</i>	_б	-
<i>L.welshimeri</i>	-	-
<i>L.seeligeri</i>	_б	+
<i>L.grayi</i> subsp. <i>Grayi</i> <i>L.Grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	_б	-
<i>L.marthii</i>	-	-
<i>L.rocourtiae</i>	-	-
<i>L.weihenstephanensis</i>	-	-
<i>L.fleischmannii</i> подв. <i>fleischmannii</i>		
<i>L.fleischmannii</i> подв. <i>coloradensis</i>	-	-

a= адамдардың жұқтыруының тек 11 жағдайы ғана тіркелді;  
б= адамның жұқтыруының 1 ғана жағдайы тіркелді.

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3509-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ****Жануарлар****ЛИСТЕРИОЗДЫҢ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКА ӘДІСІ**

Енгізілген күні 2020-07-01

**1 Қолданылу саласы**

Осы стандарт листериозды зертханалық диагностикалау бойынша әдістемелік көрсеткішті белгілейді.

**2 Белгіленулер мен қысқартулар**

Сыни бақылау нүктелерін талдау; HACCP  
Ресми талдамалық химиктер қауымдастығы; AOAC  
Бактериологиялық талдамалық нұсқау; BAM  
Гель-импульс өрісі; PFGE  
Импульсті өрістегі гель-электрофорез; PFGE  
Дезоксирибонуклеин қышқылы; ДНК  
Еуропа стандарттау жөніндегі комитеті; CEN, EN  
Халықаралық стандарттау ұйымы; ISO  
АҚШ Ауыл шаруашылығы министрлігі; USDA  
Кристи-Аткинс-Мунк-Петерсон әдісі; CAMP  
Мультилокус ферменті; MEE  
Listeria байытылған ерітіндісі; BLEB  
Полимеразды тізбекті реакция; ПЦР  
Полимиксин-акрифлавин-хлорид литий – цефтазидим – эскулин – маннит -  
агар; Palcam  
Рестрикциялық фрагменттер; RFLP  
Рибонуклеин қышқылы; РНК  
Тамақ өнімдерін талдау жөніндегі солтүстік комитеті; NMKL  
Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігі және инспекциясы қызметі; FSIS  
АҚШ өнімдер мен дәрілерді бақылау басқармасы; FDA  
Вермонт университеті; UVM

**3 Диагностикалау әдістері****3.1 Агентті сәйкестендіру**

*L.monocytogenes* азық-түлік тізбегінің сынамаларында (бастапқы өндірістік үлгілер, азық, тамақ сынамалары және қоршаған орта үлгілері) және өлген жануарлардың патологиялық материалын анықтау және сәйкестендірудің көптеген әдістері бар. Бактериологиялық әдістер эпидемиологиялық қадағалау және өршуге қарсы күрес жүргізу үшін қажет болатын қоздырғыштың таза өсірінділерін алу үшін қажет. Олар валидацияланатын және басқа да әдістер тексерілетін «Алтын стандарттар» болып табылады. Бұл әдістер өте сезімтал және күрделі әрі қымбат жабдықты талап етпейді, бұл оларды кеңінен пайдалануға мүмкіндік береді.

Бұл әдістердің кемшіліктерінің бірі селективті және дифференциалды агар



## ҚР СТ 3509-2019

тостағандарында бактериялардың өсуін түсіндіру кезінде әдіс жүргізудің кезеңінің салыстырмалы түрде ұзақтығы және субъективтілігі болып табылады [14].

*L.monocytogenes* азық-түлік тізбегінің сынамаларынан және жануарлардан алынған патологиялық материал сынамаларынан бөліп алу және сәйкестендіру селективті препараттар мен байыту процедураларын пайдалануды талап етеді, олар микроорганизмдердің тұқымдану деңгейін ақылға қонымды мәндерге дейін қолдайды және *L.monocytogenes* қоздырғышты анықтау үшін жеткілікті деңгейлерге дейін көбейтуге мүмкіндік береді. Бактериологияның алғашқы күндері салқын байыту қолданылады, ол қоздырғыштың салқындату температурасында (4°C-қа жуық) көбею қабілетін пайдаланады, ал тұқымдастырушы бактериялар осы жағдайларда көбею мүмкін емес. Бұл ретте, бұл рәсім өте ұзақ уақыт инкубациялауды талап етеді, бұл оны тамақ өнімдерімен байланысты өршулер мен кездейсоқ жағдайларды ағымдық тексеру үшін, сондай-ақ тамақ өнімдерін өндіру және қайта өңдеу кезінде сыни бақылау нүктелерін (НАССР) тиімді талдау бағдарламаларын іске асыру үшін қолайсыз етеді. Инкубацияның қалыпты температурасы кезінде *L.monocytogenes* өсуін қамтамасыз ететін бірқатар селективті қосылыстар ағзаның селективті өсуі үшін қажетті уақытты қысқарту арқылы қоректік ортаға енгізілді. Осы селективті қосылыстардың мысалдары циклогексимид, колистин, цефотетан, фосфомицин, литий хлориді, налидикс қышқылы, акрифлавин, фенилэтанол, цефтазидим, полимиксин В және моксалактам. Хромогенді ортаның дамуы бұл микроорганизмдерді тағам тізбегінен үлгілерде жақсы бөліп көрсетуге мүмкіндік берді.

Листериозды диагностикалаудың бактериологиялық әдістері дәстүрлі түрде қан ағарында немесе басқа да байытылған орталарда үлгіні тіркеу және 12 аптаға дейінгі мерзімде апта сайын субкультивациялаумен «суық байытудың» әдісін қамтиды. Формалинда тіркелген тіндердегі *L.monocytogenes* антигендерін иммуногистохимиялық анықтау күйіс қайыратын жануарларда аурудың энцефалит түрін диагностикалау үшін тікелей себуге және салқын бактериялық байыту мәдениетіне қарағанда сезімтал болып табылады. Бұл сондай-ақ адамдардағы ромбоэнцефалит диагностикасына қатысты. Дегенмен, адамдарға қарағанда жануарларда жұлын сұйықтығынан микроорганизмді бөліп алу немесе қоздырғышты ПТР көмегімен жұлын сұйықтығына сәйкестендіру өте қиын немесе мүмкін емес. Осылайша, қазіргі уақытта тірі жануарда листериоздық ромбоэнцефалит растау диагнозы мүмкін емес және өзіне тән гистопатологиялық зақымданулар немесе иммуногистохимия, ми діңінен немесе ПТР бактериялық бөлінулер анықталғаннан кейін ғана жетеді.

Тағамдық өнімдері мен қоршаған орта сынамаларынан *L.monocytogenes* бөліп алу үшін баламалы байыту процедуралары мен селективті агенттерді енгізу жануарлардың листериозынан сынамаларды бактериологиялық талдау үшін осы әдістердің кейбірін пайдалану мүмкіндігін ашты. Дегенмен, бұл әдістер олардың валидациясы шеңберінен тыс пайдаланылғанда жұмыс сипаттамалары қамтамасыз етілмейтінін атап өткен жөн.

### 3.1.1 Микроскопиялық зерттеу.

Микроскопиялық зерттеуге бас миының, ішкі ағзалар мен тіндердің жұқа жағындылар-іздері жатады. Жағындылар Грамм бойынша боялады және микроскоптау жолымен зерттеледі.

Листериоз қоздырғышы-полиморфты, көбінесе ұзындығы 0,5-2,0 мкм таяқша тәрізді бактерия; ол барлық анилинді бояулармен жақсы боялады, грамоң (бірақ ескі өсірінділерде жеке грам теріс таяқшалары кездеседі).

### 3.1.2 Оқшаулау әдістері

Халықаралық нормативтік мақсаттарда танылған тағам тізбегінің сынамаларынан *L.monocytogenes* бөлінуінің әдеттегі әдістері АҚШ-тың өнімдері мен дәрі-дәрмектерін бақылау бойынша басқару әдісін (FDA), ресми аналитикалық химиктер қауымдастығы (АОАС) ресми әдіс (АОАС, 2012), Стандарттау бойынша Еуропалық комитет (CEN, EN)

және стандарттау бойынша халықаралық ұйым (ISO) (ISO, 1996; 1998; 2005a; (NMKL) әдіс (nmkl, 2007) және АҚШ ауыл шаруашылығы министрлігінің (USDA-FSIS, 2013a; 2013b) тамақ өнімдерінің қауіпсіздігі және инспекциясы қызметінің әдісін (FSIS) қамтиды.

EN ISO, FDA, USDA және AOAC әдістері олардың қолдану саласына сәйкес пайдаланылуға тиіс, бірақ азық-түлік матрицаларының алуан түрін қамтиды. Талдауға арналған тағам сынамалары сыртқы беті мен ішкі бөлігін қоса алғанда, тамаққа репрезентативті болуға тиіс. Өсірудің әдеттегі тәсілдері селективті препараттары бар сұйық коректік орталарды пайдалануға негізделген байыту рәсімін қамтиды. AOAC әдісі әртүрлі селективті препараттардан тұратын әр түрлі селективті байытуды талап етеді.

Сынаманың сипатына байланысты нақты әдіс қажет. ISO ISO / TC 34 техникалық комитеті, Ауыл шаруашылық Тамақ өнімдері, SC 9 кіші комитеті, Микробиология, EN CEN / TC275 Техникалық комитетінің келісімі бойынша, тамақ өнімдерін талдау, 6 жұмыс тобы, тамақ тізбегіндегі Микробиология, EN ISO 11290 стандарты, 1 және 2-бөліктер (ISO, 1996; 1998; 2005) тамақ және азық өнімдерінде, сондай-ақ шикізат және қоршаған орта сынамаларында *L.monocytogenes* анықтау үшін пайдаланылуы мүмкін.

EN ISO 11290 қағидаты, 1-бөлім, барлық тағамдық тізбектер мен шикізат сынамаларын қамтитын *Listeria monocytogenes* (ISO, 2005a) анықтаудың өзгертілген әдісі. Тест үлгісі мен бастапқы суспензияны дайындағаннан кейін бірінші кезең құрамында литий хлоридінің бір көлемі және акрифлавин көлемінің жартысын, сондай-ақ налидикс қышқылын (жартылай Фрейзер сорпасы) қамтитын байытуға арналған селективті бастапқы ортаны инокуляциялау болып табылады, ол сондай-ақ тест үлгісі үшін сұйылтатын сұйықтық ретінде пайдаланылады. Тест бөлігі 29 °C-ден 31 °C-ге дейінгі температурада 21-ден 27 сағатқа дейін инкубацияланады. Екінші кезең – екіншілік сұйық байытылған ортаны бірінші кезеңде алынған толық беріктік өсіріндісімен (Фрейзер сорпасы) инокуляциялау. Фрейзер сорпасы 34 °C ден 38 °C дейінгі температурада 45-51 сағат бойы инкубацияланады.

Үшінші кезеңде бірінші және екінші кезеңдерде алынған өсірінділердің үлгілері екі селективті қатты ортаға себіледі: «Оттавиани және Агости бойынша Агар *Listeria* (Ottaviani және Agosti)» (ALOA) және aloa-литий хлориді, налидикс қышқылы, цефтазидим, полимиксин В және амфотерицин В (немесе циклогексимид) және Оксфорд немесе Palcam (полимиксин-акрифлавин-хлорид лития-цефтазидим-эскулин-маннит-агар) сияқты зертхананың таңдауы бойынша кез келген басқа да қатты селективті орта. *Listeria* агары Ottaviani және Agosti бойынша 36 °C бастап 38 °C дейінгі температурада инкубацияланады және шамамен *L.monocytogenes* болып табылатын тән колониялардың болуын тексеру үшін 21-27 сағаттан кейін байқалады. Ottaviani және Agosti бойынша *Listeria* агарында *L. monocytogenes* типтік колониялары жасыл-көгілдір түсті, мөлдір емес ореолмен қоршалған (ISO, 2005a). Оксфорд агары құрамында литий хлориді, циклогексимид, колистин, акрифлавин, цефотетан және фосфомицин селективті препараттар ретінде және *Listeria* spp. типтік колониялары бар - қара ореолмен қоршалған кішкентай, қара. Екінші селективті орта тиісті температурада инкубацияланады және тиісті уақыт өткеннен кейін зерттеледі. EN ISO 11290-да 2-бөлімде сипатталған есептеу әдісі үшін тек «Ottaviani және Agosti бойынша агар *Listeria*» (ISO, 2005b) қолданылуы тиіс.

Листериялар үшін хромогендік ортаның екі негізгі тобы бар. Орталардың бірінші тобында β-D-глюкозидазаның белсенділігін анықтайтын хромоген пайдаланылады, бұл *Listeria* түрлерінің бар болуының куәсі, ал ал колонияны қоршаған дененің лецитинін пайдалануды куәландыратын айқын ореолды қалыптастыру *L. monocytogenes* және *L. ivanovii* идентификациясы үшін қолданылады. Бұл топтағы тасымалдаушылар ALOA және ALOA-ұқсас тасымалдаушылар. Екінші топта хромогенді субстрат фосфатидилинозит-с



## ҚР СТ 3509-2019

(PI-PLC) ерекше фосфолипазаның белсенділігін анықтау үшін қолданылады. Осы топ *L.monocytogenes* агарларының және кейбір *L.ivanovii* хромоген ыдырайды, ал қалған *Listeria* түрлері ақ болып қалады. Осы соңғы топтың кейбір орталарында ксилоза түрінде қант *L.ivanovii* қоршаған колонияны, сары ореалдың болуына *L.monocytogenes* және *L.Ivanovii* ажырату үшін ортаға қосылған. *Listeria monocytogenes* сары ореалы жоқ көк колонияны (Pi-PLC-оң) (ксилоза-теріс) дамытады, ал *L.ivanovii* жасыл-көгілдір колонияларды (Pi-PLC-оң) сары жаңғақ бар (ксилоза-оң) шығарады.

«Бактериологиялық аналитикалық нұсқаулығының» (BAM) 10-тарауында сипатталған FDA [19] әдісі үшін байытылған *Listeria* ерітіндісі (BLEB) базалық байыту болып табылады. Ашытқы сығындысының негізі бар триптонның соя сорпасы буферлік қабілетін жақсарту үшін монокалийфосфатпен толықтырылған, сондай-ақ зақымдалған немесе бөлінген жасушаларды қалпына келтіру үшін жүзім қышқылы қосылған. Аналитикалық порцияларды 4 сағат бойы BLEB-те 30° C-та алдын ала байытады, селективті препараттар, HCL акрифлавин (10 мг/литр), налидикс қышқылы (40 мг/литр) және циклогексамид (50 мг/литр) қосады және 30°С-та 48 сағат бойы байытуды жалғастырады. Байытылған үлгілер 24 және 48 сағаттан кейін Оксфорд немесе модификация, Агар МОКС (МОХ) немесе литий хлориді/фенилэтанол/моксалактам (LPM) сияқты үш валентті темірден тұратын селективті/дифференциалды агары бар шыныаяқтарға Fe3+қоса отырып еленеді. Сондай-ақ, екінші хромогендік агардың нұсқасы да ұсынылады. Болжанатын *L.monocytogenes* субөсіру және әдісте сипатталған тиісті морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық тестілердің көмегімен бекіту керек.

USDA-FSIS әдісі байытудың екі кезеңінде қолданылады (USDA-FSIS, 2013a; 2013b): «бастапқы» байытылуы құрамында налидикс қышқылы мен акрифлавин бар Вермонт университетінің (UVM) ортасында орындалады және «қайталама» байытылуы құрамында налидикс қышқылы, литий хлориді және акрифлавин бар Фрейзер сорпасында немесе морфолин-пропансульфон қышқылымен (UVM) байыту үшін *Listeria* буферлік сорпасында өткізіледі. MOPS-bleb жүргізіледі. Инкубация шарттары байыту сатысы үшін таңдалған матрицаға байланысты ерекшеленуі мүмкін. Селективті байытудан кейін өсіріндіні тох-агарға себеді, оның құрамы литий хлоридіні, колистинді және моксалактамды қамтиды. Болжанған *L.monocytogenes* субөсіру және әдісте сипатталған тиісті морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық тестілердің көмегімен бекіту керек.

Nmkl (nmkl, 2007) әдісі үшін Фрейзер сорпасында 30°С кезінде 24 сағат ішінде бастапқы байыту Фрейзер сорпасында 37°С кезінде 48 сағат ішінде қайталама байытумен сүйемелденеді. Байытудың екі сатысында алынған өсірінділер *L.monocytogenes* үшін тән ортаға, aloa немесе *Listeria monocytogenes* (LMBA) қан агары бар агар ортасына немесе негізінен ALOA-ға ұқсас хромогендік агар ортасына және басқа да қатты селективтік ортаға және окшаулағыш ортаға тән.

Барлық дайындалған қоректік орта ISO 11133 (ISO, 2003; 2009) стандарттарына сәйкес сапаны бақылауға алуға тиіс.

Жануарлар тіндерінен *L.monocytogenes* бөліп алудың дәстүрлі әдісі қой қанымен немесе басқа да бай өсірінді орталармен агарда тікелей сынама егу және бір уақытта апта сайын 12 аптаға дейін субөсірумен «суықтай байытудың» әдісін қолдану болып табылады. Қоздырғыштың тікелей себу жолымен бөлінуі, оның саны сынамаларда көп болған кезде, мысалы, аурудың септикалық түрінде, бірақ қоздырғыш энцефалит түрінде немесе сынамалар өте контаминацияланған кезде аз мөлшерде болған кезде, бөлінуі қиын болады.

Ауру жануарлардан сынамаларды аурудың клиникалық түріне байланысты іріктеп алу керек: Септикалық түрі жағдайында бауыр, бүйрек немесе көкбауыр зақымдану ошағынан материал; жұлын сұйықтығы, варолий көпір және энцефалит формасы



жағдайында ми заты; және плацент (котиледоны), ұрықтың шырышты ішіндегісі немесе түсік тастау кезінде жатырдан бөлініп шығуы. Салқындату температурасы (4°C) сынамаларды өңдеу, сақтау және тасымалдау үшін пайдаланылуға тиіс. Егер сынамалар мұздатылған болса, оларды талдау жүргізгенге дейін мұздатылған күйінде сақтау керек.

#### 3.1.2.1 Жануарлардың өлекселерін ашқан кезде материалды іріктеу рәсімі

а) 10-25г немесе мл үлгіні (қол жетімді үлгінің мөлшеріне байланысты) 225 мл *Listeria* ерітіндісіне енгізу. Ауру жануарлардың сынамаларымен жұмыс істеу кезінде енгізуге арналған үлгі мөлшері сынамалар үшін ұсынылатын тағамнан (25 г немесе мл) кем болуы мүмкін. Сынама материалын мүмкіндігінше көп енгізу керек (10-25 г немесе мл) [21]. (*Listeria* байыту негізі: 30 г. триптон оксидінің соя ерітіндісі; 6 Г. difco ашытқы сығындысы; 1 литр су; селективті препараттар: 2,3 мг акрифлавин; 9,2 мг налидикс қышқылы; 11,5 мг циклогексимид; ерітіндінің 225 мл-ге селективті препараттарды қосады).

б) 30°C кезінде 48 сағат ішінде ерітіндіні инкубациялау.

в) 0,1 мл байытылған ерітінді өсірінділерін Оксфорд ағары бар тостағандарға бөлу.

г) 37°C кезінде тостағанды инкубациялаңыз. Бактериялардың өсуін 24 және 48 сағаттан кейін зерделенді.

д) жасушалардың формасы үшін *L.monocytogenes* типтік пайда болуы бар бес колонияны (немесе олар аз болған кезде барлығын), Грамм реакциясын, қан ағарындағы гемолитикалық белсенділікті (дефибринирленген жылқы қаны), 20°C кезінде үрлеу кезіндегі қозғалушылықты, глюкоза ( + ), рамноза ( + ) және ксилоза ( - ), эскулиннің гидролизін және каталаза өндірісі тексеріледі.

#### 3.1.2.2 Баламалы іріктеу әдісі

а) Сынамалар қоршаған ортамен араласпауға тиіс. Егер күдік болса, Бунзен жанарғысының көмегімен стерильдеңіз немесе заттаңбаны бекітіңіз, сынама іріктеу кезінде ластанған. Сынама тұрақты бастапқы суспензия алу үшін ұсақтағыштың көмегімен буферлік пептонды суда гомогениздейді. Ұсақталмаған кез келген сынама 2-8°C температурада сақталады.

б) бастапқы суспензияны ми-жүрек немесе Розен ерітіндісі сияқты байытылған ерітіндіге енгізеді. Параллель ол модификацияланған Palcam және Columbia-дан қойдың қанымен налидикс қышқылымен (15 мг/литр) және колистин сульфатымен (10 мг/литр) тікелей бақылау үшін қолданылады. Palcam-ның негізі келесідей модификацияланады: қоспаны дайындайды (құрамында 100 000 халықаралық полимиксин сульфаты В, 20 мг цефтазидин, 5 мг акрифлавин хлоргидраты, 200 мг циклогексимид және 10 мл стерильді су бар), сүзу арқылы және 10 мл стерилдейді. Palcam-ның негізгі ортасы 1000 мл қосылады.

в) 36 °C-ден 38 °C-ге дейінгі температурада сұйық өсірінділер үшін 24 сағат және катты орта үшін 24-48 сағат бойы инкубацияланады.

г) Егер Петри тостағандарында 24 сағаттан кейін, леверия болып табылатын колония пайда болса, одан әрі тексеру сынақтары үшін олар таңдалады. Егер олар болмаса, тостағандар дәл сол жағдайларда 24 сағат бойы қайтадан инкубациялаңыз. Байытылған ерітіндіні Palcam және Columbia қойының қанымен (15 мг/литр) және колистин сульфатымен (10 мг/литр) агарда себеді және 37 ± 1°C кезінде 24 сағат бойы инкубациялайды. Palcam және модификацияланған Palcam ортасында қайтадан қызғылт немесе күлгін түсті болу үшін 1 сағат бойы ауада пластиналарды экспонаттаңыз. 24 сағаттан кейін *Listeria* spp. осы орталарда диаметрі 1,5-2 мм кішкентай немесе өте кішкентай сұр-жасыл немесе зәйтүн-жасыл колониялар түрінде, кейде қара нүктелермен, бірақ әрдайым қара жаңғақтармен өседі. 48 сағаттан кейін *Listeria* spp. диаметрі 1,5–2 мм, ОЖЖ тежелуі және қара жаңғақпен қоршалған жасыл колониялар түрінде пайда болады. Колистин сульфаты және налидикс қышқылы бар Columbia қойдың қанында, *Listeria* spp.

## ҚР СТ 3509-2019

сұр және жазық колониялар түрінде өседі және *L.monocytogenes* колонияны алып тастағаннан кейін бақылауға болатын гемолиз аймағы болып табылады. *Listeria ivanovii* колонияның айналасында әлсіз гемолитикалық белсенділік танытады.

д) Егер Петри тостағандарында 48 және 72 сағаттан кейін, *Listeria* колониялары пайда болса, одан әрі тексеру тығындары үшін оларды таңдаңыз. Егер табақшада *Listeria* бес колониясы бар болса, олардың бәрін таңдаңыз. Егер табақшада *Listeria* бес колониясынан артық болса, тек бес колонияны таңдаңыз.

Экскременттер мен сүрлем үшін, сондай-ақ плаценталық қабық үшін екі әдіс бар.

Экскременттер мен сүрлем үшін суспензияны 1/10 (25 г в 225 мл) half-Fraser ерітіндісіне енгізеді және  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  кезінде 24 сағат бойы инкубациялайды. 24 сағаттан кейін бұл суспензияны модификацияланған Palcam-ге себеді және Фрейзер сорпасында 10 мл-ден 0,1 мл-ге ауыстырады 48 сағаттан кейін Фрейзердің инкубацияланған сорпасы модификацияланған Palcam-ге қашалады және Петри тостағандары  $36^\circ\text{C}$  ден  $38^\circ\text{C}$  дейінгі температурада 24-48 сағат бойы инкубацияланады. Фрейзер сорпасы  $36^\circ\text{C}$  ден  $38^\circ\text{C}$  дейінгі температурада 24 сағат бойы қайта инкубацияланады, содан кейін ол модификацияланған Palcam-ге салынады.

Плаценталық қабық үшін зерттелетін бөлік буферизацияланған пептонды суда 1/2 және 1/5-ке ажыратылады және тікелей селективті ортада оқшауланады. Бұл жағдайда Palcam модификацияланған Palcam ауыстырылады.

ALOA<sub>g</sub> және *Listeria* үшін басқа хромогенді орта *Listeria* spp көбісіне өседі. және адамның нәжісін скрининг үшін клиникалық микробиологияда қолданылуы мүмкін.

### 3.2 Дәстүрлі сәйкестендіру әдістері

Типтік *Listeria* spp. жоғарыда аталған агары бар селективті/дифференциалды тостағандардағы колониялар тестілер жиынтығын пайдалана отырып, сорттар деңгейінде одан әрі сәйкестендіру үшін іріктейді. Әдістер Грам бойынша бояуды, каталазды, қозғалғыштықты (фазалық-контрасты микроскопия кезінде байқалатын ылғалды ортада да, жартылай қатты жылжымалы агарға [0,2–0,4 % агар] немесе U/Graigie пробиркасына) енгізгенде де, гемолизді және көмірқышқылды пайдалануды қамтиды.

Қозғалысты бақылау үшін препаратты соя ашытқы триптондары сығындысы бар сорпа сияқты жаңа сорпалық өсіріндіден аспалы тамшылар түрінде дайындайды және бөлме температурасында 8-24 сағат бойы инкубациялайды. Жартылай қатты сұйық агарды (шамамен 1 см) енгізгеннен және инкубациядан кейін  $20-28^\circ\text{C}$  температурада пайдаланғанда листерия лайланған ортаға енеді. Агар бетінен шамамен 0,5 см төмен қолшатырға ұқсас өсу қабаты байқалады. Бұл қатаң анаэробты жағдайларда емес, аэробты жағдайларда *Listeria* дамуына байланысты болады.

Гемолиздік эсер ету үшін жылқы және қой қанымен агарлы тостағандарды пайдалану керек.  $37^\circ\text{C}$  кезінде 24 сағат бойы инкубациялаудан және *L.ivanovii* ортасын тесу жолымен енгізгеннен кейін гемолиздің кең аймағын көрсетеді. Гемолиз аймағы *L.monocytogenes* тар, жиі колониядан тыс шықпайды. Бұл жағдайда колонияларды жою интерпретацияға көмектесе алады. *L.monocytogenes* сирек штаммдары гемолитикалық болып табылмайды.

Кристи-Аткинс-Мунк-Петерсон тесті (Christie-Atkins-Munch-Peterson) (CAMP) *Listeria* spp өсірінді түрлерін анықтау үшін өте пайдалы құрал болып табылады. Ол ISO және кейбір АОАС хаттамаларында қолданылады және FDA және USDA-FSIS әдістерінде міндетті емес деп саналады. Тестті орындау оңай және оңай оқылады. Ол  $\beta$ -гемолитикалық алтын стафилококктың штрихтарынан (ATCC<sup>TM</sup> 49444г немесе 25923г штаммдары, NCTM 7428г немесе 1803г штаммдары) және *Rhodococcus equi* (ATCC<sup>TM</sup> 6939г штаммдары, NCTM 1621г штаммдары), параллель бір түзу сызықтарда, қой қанынан

жасалған ыдыста немесе қан агарының өте жұқа қабаты бар агары бар екі қабатты пластинкада тұрады. Жолақтар екі индикаторлық ағзалар арасында перпендикуляр орналасуы үшін, оларға тимей (1-2 мм-ге бөлінген) *Listeria* штамдарын сынауға және бақылауға мүмкіндік беру үшін жеткілікті бөлінуге тиіс. Инкубациядан кейін 24-48 сағат ішінде 35-37°C кезінде (жұқа қан агарын қолдану кезінде 12-18 сағат) оң реакция β-гемолиздің кеңейтілген аймағынан, тест/бақылау мен штамм индикаторынан тұрады. *Listeria monocytogenes* s. *aureus* жолағымен оң және *R. equi*-мен теріс болып табылады, ал *L.ivanovii* тест кері реакция береді.

*Listeria* түрінің шеңберінде таксономиялық он түрі сипатталды: *Listeria monocytogenes*, *L.Ivanovii*, *ivanovii* кіші түрлері және *londoniensis* кіші түрлері, *L.welshimeri*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.Grayi*, *Grayi* кіші түрлері және *Subp. murrayi*, *L.marthii*, *L.rocourtiae*, *L.weihenstephanensis*, *L.Fleischmannii*, *L.Fleischmannii* кіші түрлері және *coloradensis* кіші түрі. Жаңа түрлері (*L.rocourtiae*, *L.marthii*, *L.weihenstephanensis*, *L.fleischmannii* кіші түрі. *Fleischmannii* және жерасты. *Coloradensis*) негізінен қоршаған ортаның сынамаларынан бөлінген және сирек кездеседі. *Listeria fleischmannii* шикізат пен өсімдік топырағында немесе жертөлелерде бөлінуі мүмкін.

**1-кесте – Листерийлердің негізгі түрлерінің негізгі сипаттамалары**

Сынама	<i>Listeria</i> spp. реакция
Грамм бойынша бояу	оң
Жасушалы морфология	Бірнеше перитрихоздық талшықтары бар қысқа (0,4-0,5 мкм × 0,5-2,0 мкм) споралық емес таяқшалар
Өсу шарты	Аэробтық және факультативтік анаэробтық
Қозғалысы	Оң акробатикалық қозғалыс немесе қолшатырдағы жылжымалы агарда 20–28°C кезінде, 37°C кезінде теріс
Каталаза	оң
Оксидаз	теріс
Эскулин гидролиз	оң
Индол	теріс
Уреаза	теріс

**2-кесте – Листерийлердің негізгі түрлерін саралау**

Түрлері	β-гемолиз	Мыналардан қышқылды дайындау			Қой қанына Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP) реакциясы	
		L-Рамноз	D-ксилоза	D-Маннит	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L.monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	-
<i>L.innocua</i>	-	v	-	-	-	-
<i>L.ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	+	-	+	-	-	+
<i>L.ivanovii</i> подв. <i>londoniensis</i>	+	-	+	-	-	+

2-кесте соңы

Түрлері	β-гемолиз	Мыналардан қышқылды дайындау			Қой қанына Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP) реакциясы	
		L-Рамноз	D-ксилоза	D-Маннит	S. aureus	R. equi
L. seeligeri	(+)	-	+	-	(+)	-
L. welshimeri	-	v	+	-	-	-
L. grayi подв. grayi	-	-	-	+	-	-
L. grayi подв. murrayi	-	+	-	+	-	-

V = ауыспалы;  
 (+) = әлсіз реакция;  
 + = > 90 % оң реакция;  
 - = реакция жоқ.

### 3.3 Микробқа қарсы сезімталдықты тексеру

Listeria monocytogenes өзінің табиғаты бойынша цефалоспориндерге (цефазолин, цефтиофур, цефпир), хинолондарға (налидикс қышқылы және офлоксацин сияқты ерте фторхинолон), фосфомицин мен клиндамицинге төзімді. Пайда болған төзімділік сирек анықталады. Изоляттардың көпшілігі G пенициллинге, амоксициллинге, аминогликозидтерге (гентамицин), тетрациклинге, фениколға, триметопримге және сульфонамидке, рифампинге, гликопептидке (ванкомицинге) сезімтал. Тетрациклинге төзімділігі өте төмен жиіліктерде әртүрлі көздерден анықталды: сиыр еті, ет өңдеу зауыттары, шошқа жоңқасы және қой. Эритромицинге төзімділік қоршаған орта мен тамақ өнімдерінің сынамаларында анықталды. Қазіргі уақытқа дейін пенициллиндерге төзімділік расталған жоқ [29].

Сезімталдыққа талдау әдетте микробқа қарсы емдеуді талап ететін инфекцияны тудыратын бактериялық патогендер үшін және егер қоздырғышты сәйкестендіру емдеу нәтижесін болжау үшін жеткіліксіз болса жүргізіледі.

L.monocytogenes инфекциясын емдеу үшін микробқа қарсы препараттарға сезімталдық болжамдау және терапия эмпирикалық негізде кеңінен қолданылады. Сезімталдыққа талдау эпидемиологиялық зерттеулер жүргізу үшін немесе микробқа қарсы жаңа препараттарды бағалау үшін құнды құрал болып табылады.

### 3.4 Кіші типті бөлу әдістері

L. monocytogenes реттеушілік анықтаудың көп бөлігі окшаулаудың қандай да бір ерекше түрін талап етпейді. Алайда, кіші типтердің схемалары таралу ошақтарын тексеру, қоршаған ортаның жай-күйін қадағалау және халық денсаулығының жағдайын бақылау кезінде пайдаланылуы мүмкін.

Listeria monocytogenes серотиптеуді, фаготиптеуді, ДНҚ рестрикциясы ферменттерін талдауды (немесе фрагменттерді бөлуге арналған жоғары жиілікті кесетін ферменттерді және қарапайым гель-электрофорезді пайдалана отырып немесе гелді-импульстік өрісте (pfge) сирек ферменттер мен электрофорез көмегімен (фрагменттерді бөлу үшін), сондай-ақ нуклеин қышқылдарын секвенирлеу негізінде типтеуді, микрочиптерді талдауды қамти отырып, әр түрлі бірқатар тәсілдердің көмегімен кіші типтелуі мүмкін.

#### 3.4.1 Серотиптеу және геносеротиптеу (ПТР тобы)

L.monocytogenes штамдары 13 түрлі сероварларға жатқызылуы мүмкін (1/2a, 1/2b,



1/2с, 3А, 3В, 3С, 4а, 4б, 4ab, 4с, 4d, 4е және 7) олардың соматикалық (О) және талшықты (Н) антигендерінің комбинациясы процедураларға сәйкес, Силигер және Хеинге (1979). Серотипті антигендер *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L. Seeligeri* және *L. welshimeri*. арасында таралған. Олардың барлығы ықтимал патогенді деп саналады, адам үшін патогенді өсірінділердің көпшілігі (> 95 %) 1/2А, 1/2b және 4b үш серотиптеріне жатады.. Басқа кіші типтендіру әдістерімен салыстырғанда серотиптеу әлсіз дифференциациясы бар, бірақ адамдар арасында өршудің немесе спорадиялық жағдайдың пайда болу себептері болып табылмайтын өсірінділерді алып тастауды жеңілдету үшін пайдаланылуы мүмкін.

Серотиптеуді Доумис және т.б. (2004) әзірлеген ПТР негізінде ауыстыруға болады, ол ДНК prs, ORF2110, ORF2819, lmo1118, lmo0737 төрт фрагментін көздейді. Бұл геносеротиптеу әдісі қазіргі уақытта халықаралық деңгейде танылған және расталған. *Listeria*, *L.rocourtiae* басқа барлық түрлерінде ПА ПЦР-күкірт тобы генінің амплификацияланатын фрагменті бар 1/2a және 3А (PRS және lmo0737 ДНК фрагменттерінің амплификациясы) сероварлардың штамдарын қамтиды; ПВ ПЦР-күкірт тобы 1/2b, 3В және 7 (PRS және ORF2819 ДНК фрагменттерінің амплификациясы) күкіртқыштар штамдарын қамтиды.); Пс серотоптарының ПТР 1/2с және 3с (ДНК PRS, lmo0737 және lmo1118 фрагменттерінің амплификациясы); IVB ПЦР-серотоптары 4В, 4d және 4е (ДНК prs, ORF2819 және ORF2110 фрагменттерінің амплификациясы) сероварларының штамдарын қамтиды. Соңында ПТР-күкірт тобы *L* басқа күкірт штамдарын қамтиды.

#### 3.4.2 Жасушалық желі

*L.monocytogenes* серотиптеуінен кейін үш сызыққа бөлуге болады, оның ішінде I сызыққа 1/2b, 3b, 4В, 4d және 4е күкірттері кіреді; II сызыққа 1/2a, 1/2с, 3а және 3с күкірттері кіреді; және III сызыққа Виедман және т.б. (1997b) сәйкес 4а, 4с күкірттері және атиптік 4b күкірттері кіреді. 4ab және 7 күкірт желісінің мәртебесі мұндай штамдардың шектеулі қол жетімділігіне байланысты түсініксіз болып қалады. III сызықтың шегінде, үш генетикалық ерекше кіші топ (IIIА, IIIВ және IIIС) act а және sig гендерінің тізбектерін салыстырмалы талдаудан кейін сәйкестендірілді. *L.monocytogenes*, рамнозды ферментациялау қабілеті, ал IIIВ және IIIС сызықтарының штамдары рамнозаны кәдеге жарату бойынша айтарлықтай тапшы. I және II желілері адам листериозының құжатталған жағдайларында қатысады, ал III желісі олардың тамақ өнімдері мен қоршаған орта сынамаларының жиі бөлінуіне қарамастан, өршумен сирек байланысты. I және II желілерінің оқшауламалары жануарларда бірдей таралған.

#### 3.4.3. Хромосомалық ДНК рестрикциясы эндонуклеазасын талдау

Хромосомалық ДНК рестрикциялық эндонуклеазаны (REA) талдау *L.monocytogenes* салыстыру әдісі болып табылады. Бұл ферменттер көлемі мен электрофоретикалық қозғалғыштығы бойынша ерекшеленетін ДНК ыдырау фрагменттері нәтижесінде алынған нуклеотидті тізбектерді айыруда жоғары спецификалық болып табылатындықтан, геномдық айырмашылықтарды көрсетеді, бұл басқа тектес штамдардың ерекше «тән белгілеріне» әкеледі. Рестрикциялық эндонуклеазаның ерекшелігіне байланысты әдіс жоғары жаңғыртылатын болып табылады.

REA-ны хромосомды-қыланды үлгілерді пайдалана отырып, Саузерн будандастырумен біріктіре отырып, тиісті хромосомды учаскелерге байланысты тек белгілі бір рестрикциялық фрагменттер анықталады, бұл ДНК-ның талданатын фрагменттерінің санын едәуір қысқартады. Бұл әдіс рестрикциялық фрагменттердің (RFLP) ұзындығының полиморфизмін талдау ретінде белгілі. РНК / ДНК рибосомдық үлгілері қолданылған кезде РНК үшін хромосомдық локустармен байланысты тек нақты рестрикциялық фрагменттер анықталады. Бұл әдіс риботиптеу ретінде белгілі және ол ең негізгісі EcoRI рестрикциясының эндонуклеазасын пайдалану есебінен *L.Monocytogenes*



## ҚР СТ 3509-2019

кіші типтеу үшін кеңінен пайдаланылады. Дегенмен, әдістеме фаготиптеу, REA немесе мультилокус ферменті (МЕЕ) бар электрофорезге қарағанда айқын болды. Ол бактериялардың рибопринттерін, оның ішінде *Listeria* бактериялардың рибопринттерінің үлгілерін жасайды, талдайды және сақтайды.

Рестрикциялық эндонуклеазды ферменттер *ApaI*, *SmaI*, *NotI* және *AscI* сияқты хромосомды ДНҚ ыдырату үшін қолданылса, өте үлкен фрагменттер алынады. Өз көлеміне байланысты бұл үлкен фрагменттер агарозды геледе электрофорез жүргізу кезінде бөлінбейді. Алайда импульстер арқылы геледе электр өрісінің бағдарын мезгіл-мезгіл өзгерту жолымен ірі фрагменттер агарозды матрица арқылы «жылжи» алады және өлшемдегі айырмашылықтарға сәйкес бөлінеді. Бұл әдіс импульстік өрісте (PFGE) геле-электрофорез ретінде белгілі. PFGE *L. monocytogenes* үшін жоғары сезімтал әдіс бодып табылады. PFGE әсіресе 4В серотипінің өсірінділерін субтиптеу үшін пайдалы, олар субтиптеудің басқа әдістерінің көпшілігімен қанағаттанарлық субтиптелмеген.

### 3.5 Биологиялық зерттеу

Биологиялық зерттеу 2-3 ақ тышқанда (салмағы 18 г) жүргізіледі. Бас миы мен ішкі ағзалардан немесе өсірінділерден алынған суспензия жануарларға тері астына немесе ішперде ішке 0,3-0,5 мл дозада енгізіледі. Биосынама оң болған жағдайда жануарлар жұқтырғаннан кейін 2-6 тәуліктен кейін өледі. Өлген жануарлардың ішкі мүшелерінен таңба жұғындыларды және қоректік ортаға егуді жасайды. Тәжірибеге алынған жануарларды бақылау 14 тәулік ішінде жүзеге асырылады.

---

ӘОЖ 636.2

МСЖ 65.020.30 (NEQ)

**Түйін сөздер:** Моноцитогенді листерия, листериоз. зертханалық әдістер, агентті сәйкестендіру, серологиялық тест.

---



## НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

---

**Животные**

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА**

**СТ РК 3509-2019**

*(Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Listeria monocytogenes, chapter 3.9.6, 2018, NEQ)*

**Издание официальное**

**Комитет технического регулирования и метрологии  
Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан  
(Госстандарт)**

**Нур-Султан**



## Предисловие

### 1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН ТОО «Elit Art»

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от 11 декабря 2019 г. № 457-од.

**3** Настоящий стандарт разработан с учетом Руководства Международного эпизоотического бюро Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, *Listeria monocytogenes*, chapter 3.9.6, 2018 (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных» Международное Эпизоотическое Бюро (МЭБ), Листерия, глава 3.9.6, 2018).

Степень соответствия – неэквивалентная (NEQ).

Перевод с английского языка - (en).

**4** В настоящем стандарте реализованы нормы Законов Республики Казахстан «О стандартизации» от 5 октября 2018 года № 183-VI, «О ветеринарии» от 10 июля 2002 года № 339.

### 5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Документы по стандартизации Республики Казахстан», а текст изменений – в периодических информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (отмены) или замены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в периодическом информационном указателе «Национальные стандарты».*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан.

## Введение

Возбудитель листериоза *Listeria monocytogenes* может поражать несколько видов животных, включая млекопитающих, птиц, рыб и ракообразных (Таблица 1).

Наиболее часто поражаются жвачные животные, реже свиньи. Птицы, как правило, являются бессимптомными носителями инфекции. Большинство инфекций у животных протекает бессимптомно, но инвазивное заболевание может возникать спорадически или в виде вспышки. Помимо экономического ущерба листериоз от животных передается людям, в первую очередь через употребление термически необработанных продуктов животного происхождения, полученных от больных животных.

**Таблица 1 – Виды восприимчивых животных к *Listeria monocytogenes***

Млекопитающие				
рогатый скот	кошки	кролики	овцы	олени
морская свинка	козы	еноты	шиншиллы	свиньи
крысы	сунсы	лошади	мыши	норки
собаки	лемминги	хорьки	лисы	грызуны
лось	люди			
птицы				
канарейка	утки	совы	зяблики	орлы
попугаи	цыплята	гуси	куропатки	журавли
ястребы	фазаны	голуби	попугайчик лори	голуби
чайки	индюки	белая шотландская куропатка	белогорлый колибри	лесной рябчик
другие				
лягушки	ракообразные	клещи	рыба	муравьи
мухи	змеи			

Клинические признаки листериоза у животных проявляются в виде энцефалита, септицемии и аборт, особенно у овец, коз и крупного рогатого скота. Во время вспышки в стаде обычно встречается только одна клиническая форма листериоза. Ромбоэнцефалитная форма называется «вертячкой» из-за тенденции животных кружиться в одном направлении, и она является наиболее распространенным проявлением этой болезни у жвачных животных. Кроме того, это одна из самых распространенных причин неврологических заболеваний у жвачных животных. Клинические признаки включают подавленное состояние, анорексию, прижимание головы или поворот головы в одну сторону и односторонний паралич. Аборты проявляются на поздних сроках стельности (после 7 месяцев у крупного рогатого скота и 12 недель у овец). Септическая форма встречается относительно редко и обычно, но не всегда, встречается у новорожденных. Данная форма проявляется подавленностью, отсутствием аппетита, лихорадкой и летальным исходом. Также были описаны офтальмиты крупного рогатого скота и овцы.

## СТ РК 3509-2019

Реже проявляется в виде мастита у жвачных животных. Нарушением работы желудочно-кишечного тракта при листериозе может проявляться у овец. У свиней листериоз проявляется в виде сепсиса, реже в виде энцефалите, и еще реже - абортами. Птицы обычно являются бессимптомными носителями, у них болезнь носит форму спорадий, чаще проявляется в виде сепсиса и реже - менингоэнцефалита. Листериоз птиц может быть результатом вторичной инфекции при вирусных заболеваниях и сальмонеллезе.

Посмертные изменения и гистопатология при листериозе животных зависят от клинической формы. При энцефалитной форме спинномозговая жидкость может быть мутной, а менингеальные сосуды переполнены. Обширные поражения слабовыраженные и характеризуются застойными явлениями в сосудах и незначительным изменением цвета ствола головного мозга. Иногда в мозговом веществе проявляются области размягчения (маляция) и абсцессы. Характерные гистопатологические изменения состоят из очагов внутривисцеральных нейтрофилов и макрофагов (микроабсцесс) в стволе головного мозга с прилегающей периваскулярной мононуклеарной манжеткой. Микроабсцессы часто сильнее поражают одну сторону. Может возникнуть более обширная маляционная патология. Сильнее поражаются продолговатый спинной мозг и варолиев мост. При септической форме могут отмечаться множественные очаги некроза печени и реже селезенки. Абортированные плоды у жвачных животных показывают очень мало обширных повреждений, но может присутствовать автолиз, если зародыш замер прежде чем его удалили.

Заражение листериозом животных часто происходит через корма и окружающую среду - основные источники контаминации. В окружающей среде этот сапрофитный микроорганизм может сохраняться в почве, воде и разлагающихся овощах, через которые он может попадать в корм для животных. Силос является наиболее частым источником. При септическом/абортном листериозе слизистая оболочка кишечника является основным путем проникновения после перорального приема. Инкубационный период может составлять всего 1 день. При энцефалитной форме листериоза возбудитель попадает через поврежденную слизистую оболочку полости рта в ствол мозга. Инкубационный период значительно длиннее, чем при септической форме, обычно 2–3 недели. У овец и коз обычно болезнь протекает остро в течение 1–4 дней, хотя у крупного рогатого скота она может быть более продолжительной.

Инвазивные формы листериоза у людей включают септицемию, менингит (или менингоэнцефалит) и энцефалит (ромбэнцефалит). Также встречаются желудочно-кишечные проявления с лихорадкой. Хотя заболеваемость листериозом относительно низкая, смертность может достигать около 30 %. У беременных женщин инфекция может привести к аборту, мертворождению или преждевременным родам, и ей могут предшествовать признаки, подобные гриппу, включая лихорадку.

*Listeria monocytogenes* является грамположительной палочкой и является основным возбудителем инфекции у людей; хотя были зарегистрированы редкие случаи инфекции, вызванной *L. ivanovii*. У животных *L. monocytogenes* также является основным возбудителем инфекции, но имеются случаи инфицирования *L. ivanovii* и *L. seeligeri*. Поражение *L. ivanovii* сопровождалось абортами, и очень редко вызывало менингоэнцефалит у овец.

Кроме того, что возбудитель *L. monocytogenes* обладает определенным зоонозным потенциалом, он также является одним из основных загрязнителей окружающей среды.

Таблица 2 – Патогенные виды *Listeria monocytogenes*

Вид листерий	Вирулентность у людей	Вирулентность у животных
<i>L. monocytogenes</i>	+	+
<i>L. ivanovii</i> подвид <i>ivanovii</i>	_a	+
<i>L. ivanovii</i> подвид <i>londoniensis</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	_б	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	_б	+
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Grayi</i> <i>L. Grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	_б	-
<i>L. marthii</i>	-	-
<i>L. rocourtiae</i>	-	-
<i>L. weihenstephanensis</i>	-	-
<i>L. fleischmannii</i> подв. <i>fleischmannii</i>		
<i>L. fleischmannii</i> подв. <i>coloradensis</i>	-	-

a= зарегистрировано только 11 случаев заражения людей;  
б= зарегистрировано только 1 случай заражения человека.

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3509-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН****Животные****МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА**

Дата введения 2020-07-01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает методические указания по лабораторной диагностике листериоза.

**2 Обозначения и сокращения**

Анализ критических контрольных точек; HACCP  
Ассоциация официальных аналитических химиков; AOAC  
Бактериологическое аналитическое руководство; BAM  
Гель-импульсное поле; PFGE  
Гель-электрофорез в импульсном поле; PFGE  
Дезоксирибонуклеиновая кислота; ДНК  
Европейский комитет по стандартизации; CEN, EN  
Международная организация по стандартизации; ISO  
Министерство сельского хозяйства США; USDA  
Метод Кристи-Аткинс-Мунк-Петерсон; CAMP  
Мультилокусный фермент; MEE  
Обогащенный раствор *Listeria*; BLEB  
Полимеразная цепная реакция; ПЦР  
Полимиксин-акрифлавин-хлорид лития – цефтазидим – эскулин – маннит -  
агар; Palcam  
Рестрикционные фрагменты; RFLP  
Рибонуклеиновая кислота; РНК  
Северный комитет по анализу пищевых продуктов; NMKL  
Служба безопасности и инспекции пищевых продуктов; FSIS  
Управление по контролю за продуктами и лекарствами США; FDA  
Университет Вермонта; UVM

**3 Методы диагностики****3.1 Идентификация агента**

Существует множество методов обнаружения и идентификации *L. monocytogenes* в пробах пищевой цепи (первичные производственные образцы, корм, пробы пищевой продукции и окружающей среды) и патологическом материале от павших животных. Бактериологические методы необходимы для получения чистой культуры возбудителя, необходимой для проведения эпидемиологического надзора и борьбы со вспышками. Они являются «золотыми стандартами», на основании которых валидируются и проверяются другие методы. Эти методы очень чувствительны и не требуют сложного и дорогостоящего оборудования, что позволяет широко использовать их.

Одним из недостатков этих методов является относительно длительный период



## СТ РК 3509-2019

проведения исследований и субъективность при интерпретации роста бактерий на селективных и дифференциальных агаровых чашках.

Выделение и идентификация *L. monocytogenes* из проб пищевой цепи и проб патологического материала от животных требует использования селективных препаратов и процедур обогащения, которые поддерживают уровни обсеменения микроорганизмами до разумных значений и позволяют культивировать *L. monocytogenes* до уровней, достаточных для обнаружения возбудителя. В первые дни бактериологии используется холодное обогащение, которое использует способность возбудителя размножаться при низкой температуре (около 4 °С), тогда как другие обсеменяющие бактерии не размножаются в этих условиях. При этом, данная процедура требует очень длительного времени инкубации, что делает её неприемлемой для текущих расследований вспышек и спорадических случаев, связанных с пищевыми продуктами, а также для реализации программ эффективного анализа критических контрольных точек (НАССР) при производстве и переработке пищевой продукции. Ряд селективных соединений, которые обеспечивают рост *L. monocytogenes* при нормальной температуре инкубации, были включены в питательные среды, сокращая время, необходимое для селективного роста организма. Примеры этих селективных соединений включают циклогексимид, колистин, цефотетан, фосфомицин, хлорид лития, налидиксовую кислоту, акрифлавин, фенилэтанол, цефтазидим, полимиксин В и моксалактам. Развитие хромогенных сред позволило лучше выделять этот микроорганизм в пробах из пищевой цепи.

Бактериологические методы диагностики листериоза традиционно включают метод фиксации пробы на кровяном агаре или других обогащенных средах и одновременное использование метода «холодного обогащения» с еженедельным субкультивированием в срок до 12 недель. Иммуногистохимическое обнаружение антигенов *L. monocytogenes* в тканях, фиксированных в формалине, является более чувствительным для диагностики энцефалитной формы заболевания у жвачных животных, чем прямой посев и холодная культура бактериального обогащения. Это также относится к диагностике ромбоэнцефалита у человека. Тем не менее, в отличие от человека, у животных очень трудно или даже невозможно выделить микроорганизм из спинномозговой жидкости или идентифицировать возбудитель в ней с помощью ПЦР. Таким образом, в настоящее время подтверждающий диагноз листериозного ромбоэнцефалита у живого животного невозможен и достигается только после обнаружения характерных гистопатологических поражений или иммуногистохимии, бактериального выделения от ствола мозга либо ПЦР.

Введение альтернативных процедур обогащения и селективных агентов для выделения *L. monocytogenes* из проб пищевой продукции и окружающей среды открыло возможность использования некоторых из этих методов для бактериологического анализа проб от листериоза животных. Тем не менее, следует подчеркнуть, что рабочие характеристики не могут быть обеспечены, когда эти методы используются вне рамок их валидации.

### 3.1.1 Микроскопическое исследование.

Микроскопическому исследованию подвергаются тонкие мазки-отпечатки от головного мозга, внутренних органов и тканей. Мазки окрашиваются по Граму и исследуются путем микроскопирования.

Возбудитель листериоза - полиморфная, чаще палочковидная бактерия длиной 0,5-2,0 мкм; она хорошо окрашивается всеми анилиновыми красками, грамположительна (однако в старых культурах могут встречаться единичные грамотрицательные палочки).

### 3.1.2 Методы изоляции

Обычные методы выделения *L. monocytogenes* из проб пищевой цепи, которые получили признание в международных нормативных целях, включают метод Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), официальный метод Ассоциации

официальных аналитических химиков (АОАС) (АОАС, 2012), Европейского комитета по стандартизации (CEN, EN) и Международной организации по стандартизации (ISO) (ISO, 1996; 1998; 2005a; 2005b), Северного комитета по анализу пищевых продуктов (NMKL) метод (NMKL, 2007) и метод Службы безопасности и инспекции пищевых продуктов (FSIS) Министерства сельского хозяйства США (USDA-FSIS, 2013a; 2013b).

Методы EN ISO, FDA, USDA и АОАС должны использоваться в соответствии с их областью применения, но охватывают большое разнообразие пищевых матриц. Пробы пищевой продукции, предназначенные для анализа, должны быть репрезентативными для пищевой продукции, включая внешнюю поверхность и внутреннюю часть. Обычные способы культивирования включают процедуру обогащения, основанную на использовании жидких питательных сред, содержащих селективные препараты. Метод АОАС требует различного селективного обогащения, содержащего разные селективные препараты.

В зависимости от характера пробы, необходим конкретный метод. Технический комитет ISO ISO/TC34 «Сельскохозяйственные пищевые продукты, Подкомитет SC 9, Микробиология», по согласованию с Техническим комитетом EN CEN/TC275 «Анализ пищевых продуктов, Рабочая группа 6, Микробиология пищевой цепи», утверждает, что стандарт EN ISO 11290, части 1 и 2 (ISO, 1996; 1998; 2005), могут быть использованы для обнаружения *L. monocytogenes* в пищевых и кормовых продуктах, а также в пробах сырья и окружающей среды.

Принцип EN ISO 11290, часть 1, измененный метод обнаружения *Listeria monocytogenes* (ISO, 2005a), охватывающий всю пищевую цепь и пробы сырья. После приготовления тестового образца и исходной суспензии первой стадией является инокуляция селективной первичной обогащающей среды, содержащей один объем хлорида лития и половину объема как акрифлавина, так и налидиксовой кислоты (половина бульона Фрейзера), которая также используется в качестве разбавляющей жидкости для тестового образца. Тестовая часть инкубируется при температуре от 29 °C до 31 °C в течение от 21 до 27 часов. Второй этап - инокуляция вторичной концентрированной жидкой обогащающей среды (бульон Фрейзера) культурой, полученной на первом этапе. Бульон Фрейзера инкубируется при температуре от 34 °C до 38 °C в течение 45-51 часов. На третьем этапе образцы из культур, полученных на первом и втором этапах, высевает на две селективные твердые среды: «агар *Listeria* по Оттавиани и Агости (Ottaviani и Agosti)» (ALOA) и ALOA-подобный агар, который содержит хлорид лития, налидиксовую кислоту, цефтазидим, полимиксин В и амфотерицин В (или циклогексимид) и любая другая твердая селективная среда по выбору лаборатории, такая как Оксфорд или Palcam (полимиксин-акрифлавин-хлорид лития-цефтазидим-эскулин-маннит-агар). Инкубируется агар *Listeria* по Ottaviani и Agosti при температуре от 36 °C до 38 °C и наблюдается через 21-27 часов для проверки наличия характерных колоний, которые предположительно являются *L. monocytogenes*. Типичные колонии *L. monocytogenes* в агаре *Listeria* по Ottaviani и Agosti имеют зелено-голубой цвет, окружены непрозрачным ореолом (ISO, 2005a). Оксфордский агар содержит хлорид лития, циклогексимид, колистин, акрифлавин, цефотетан и фосфомицин в качестве селективных препаратов и типичные колонии *Listeria* spp. - маленькие, черные, окруженные черным ореолом. Вторую селективную среду инкубируется при соответствующей температуре и исследуется через соответствующее время. Для метода подсчета, описанного в EN ISO 11290, Часть 2, должен использоваться только «агар *Listeria* по Ottaviani и Agosti» (ISO, 2005b).

Существует две основные группы хромогенных сред для листерий. В первой группе сред используется хромоген, который обнаруживает активность β-D-глюкозидазы, что свидетельствует о наличии разновидностей *Listeria*, а формирование отчетливого ореола,

## СТ РК 3509-2019

свидетельствующего об использовании лецитина организма, окружающего колонию, используется для идентификации *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*. Носители в этой группе включают ALOA и ALOA-подобные носители. Во второй группе хромогенный субстрат используется для определения активности фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы C (PI-PLC). С этой группой агаров *L. monocytogenes* и некоторые *L. ivanovii* расщепляют хромоген, а остальные виды *Listeria* остаются белыми. В некоторых средах этой последней группы сахар в виде ксилозы был добавлен в среду для дифференциации *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* по наличию желтого ореола, окружающего колонии *L. ivanovii*. *Listeria monocytogenes* развивает синие колонии (PI-PLC-положительный) без желтого ореола (ксилоза-отрицательный), а *L. ivanovii* производит зеленовато-голубые колонии (PI-PLC-положительный) с желтым ореолом (ксилоза-положительный).

Для метода FDA, описанного в главе 10 «Бактериологическое аналитическое руководство» (BAM), обогащенный раствор *Listeria* (BLEB) является базовым обогащением. Соевый бульон триптона с основой из дрожжевого экстракта был дополнен монокалийфосфатом для улучшения буферной способности, а также добавлена пировиноградная кислота для восстановления поврежденных или выделенных клеток. Аналитические порции предварительно обогащаются в BLEB в течение 4 часов при 30 °C, добавляются селективные препараты, акрифлавин HCl (10 мг/литр), налидиксовую кислоту (40 мг/литр) и циклогексамид (50 мг/литр) и продолжается обогащение при 30 °C в течение 48 часов. Обогащенные пробы просеиваются через 24 и 48 часов на чашки с селективным/дифференциальным агаром, которые содержат эскулин и трехвалентное железо, такие как Оксфорд или модификация, агар МОКС (MOX) или хлорид лития/фенилэтанол/моксалактам (LPM) с добавлением Fe<sup>3+</sup>. Также рекомендуется вариант вторичного хромогенного агара. Субкультивируется предполагаемая *L. monocytogenes* и подтверждается с помощью соответствующих морфологических, физиологических и биохимических методов, описанных в методе.

Метод USDA-FSIS используется в двух этапах обогащения (USDA-FSIS, 2013a; 2013b): «первичное» обогащение выполняется в среде Университета Вермонта (UVM), содержащей налидиксовую кислоту и акрифлавин, и «вторичное» обогащение проводится в бульоне Фрейзера, содержащем налидиксовую кислоту, хлорид лития и акрифлавин или в буферном бульоне *Listeria* для обогащения морфолин-пропансульфоновой кислотой (MOPS-BLEB). Условия инкубации могут отличаться в зависимости от матрицы, выбранной для стадии обогащения. После селективного обогащения культуры высевают на MOX-агар, который содержит хлорид лития, колистин и моксалактам. Субкультивируется предполагаемая *L. monocytogenes* и подтверждается с помощью соответствующих морфологических, физиологических и биохимических тестов, описанных в методе.

Для метода NMKL (NMKL, 2007) первичное обогащение в бульоне Фрейзера при 30°C в течение 24 часов сопровождается вторичным обогащением в бульоне Фрейзера при 37°C в течение 48 часов. Культуры, полученные на обеих стадиях обогащения, высеваются на среду, специфичную для *L. monocytogenes*, агаровую среду с кровавым агаром ALOA или *Listeria monocytogenes* (LMBA) или хромогенную агаровую среду *Listeria*, которая в основном похожа на ALOA, и на другую твердую селективную среду и изолирующую среду.

Все подготовленные питательные среды должны подвергаться контролю качества, в соответствии со стандартами ISO 11133 (ISO, 2003; 2009).

Традиционным методом выделения *L. monocytogenes* из тканей животных является прямой посев проб на агаре с овечьей кровью или другими богатыми культуральными средами и одновременное использование метода «холодного обогащения» с еженедельным субкультивированием на срок до 12 недель. Выделение возбудителя путем



прямого посева относительно легко, когда его много в пробах, например, при септической форме заболевания, но выделение затруднено, когда возбудитель присутствует в небольших количествах, как при энцефалитной форме или, когда пробы сильно контаминированы.

Пробы от больных животных следует отбирать в зависимости от клинической формы заболевания: материал из очагов поражений печени, почек или селезенки, в случае септической формы; спинномозговая жидкость, варолиев мост и мозговое вещество в случае энцефалитной формы; плацента (котиледоны), слизистое содержимое плода или выделения из матки в случае аборта. Температура охлаждения (4 °С) должна использоваться для обработки, хранения и транспортировки проб. Если пробы были заморожены, их следует хранить в замороженном виде до проведения анализа.

#### 3.1.2.1 Процедура изоляции из материала, полученного при вскрытии животных

а) Вводят 10-25г или мл пробы (в зависимости от количества доступной пробы) в 225 мл раствора *Listeria*. При работе с пробами от больных животных размер пробы для инокуляции может быть меньше, чем рекомендуемый для проб пищевой продукции (25 г или мл). Следует вводить как можно больше материала пробы (стремление к 10-25 г или мл). (Основа для обогащения *Listeria*: 30 г соевого раствора оксида триптона; 6 г дрожжевого экстракта Difco; 1 литр воды; селективные препараты: 2,3 мг акрифлавина; 9,2 мг налидиксовой кислоты; 11,5 мг циклогексимида; добавляются селективные препараты к 225 мл основы раствора).

б) Раствор инкубируется при 30 °С в течение 48 часов.

в) 0,1 мл культуры обогащенного раствора распределяется на чашки с оксфордским агаром.

г) Чашки инкубируются при 37 °С. Рост бактерий изучается через 24 и 48 часов.

д) Проверяется пять колоний (или все, когда их меньше) с типичным проявлением *L. monocytogenes* для формы клеток, реакции Грама, гемолитической активности на агаре крови (дефибринированная кровь лошади), подвижности при вращении при 20 °С, ферментации глюкозы (+), рамнозы (+) и ксилозы (-), гидролиза эскулина и продуцировании каталазы.

#### 3.1.2.2 Альтернативный протокол

а) Пробы не должны быть контаминированы с окружающей средой. Если есть подозрения, пробы стерилизуются с помощью горелки Бунзена или крепится ярлык, указывающий на то, что проба загрязнена при отборе. Проба гомогенизируется в буферизованной пептонной воде с помощью дробилки для получения стабильной исходной суспензии. Любая еще не измельченная проба хранится при температуре 2–8°С.

б) Исходная суспензия вводится в обогащенный бульон, такой как бульон мозг-сердце или бульон Розенова. Параллельно она применяется для прямого наблюдения на модифицированном Palcam и агаре с кровью овец Columbia с налидиксовой кислотой (15 мг/литр) и сульфатом колистина (10 мг/литр), если предполагается, что проба не загрязнена. Основа Palcam модифицируется следующим образом: готовится добавка (содержащая 100 000 международных единиц сульфата полимиксина В, 20 мг цефтазидина, 5 мг хлоргидрата акрифлавина, 200 мг циклогексимида и 10 мл стерильной воды), стерилизуется фильтрацией и 10 мл добавляется к 1000 мл основной среды Palcam.

в) Инкубируется при температуре от 36 °С до 38 °С в течение 24 часов для жидкой культуры и 24-48 часов для твердой среды.

г) Если на чашках Петри появляются колонии через 24 часа, предположительно являющиеся листериями, они отбираются для дальнейших проверочных испытаний. Если их нет, чашки инкубируются снова в тех же условиях в течение 24 часов. Обогащенный бульон высевается на агаре с кровью овец Palcam и Columbia с налидиксовой кислотой

## СТ РК 3509-2019

(15 мг/литр) и сульфатом колистина (10 мг/литр) и инкубируется при температуре от 36 °С до 38 °С в течение 24 часов. На Palcam и модифицированном Palcam экспонируются пластины на воздухе в течение 1 часа, чтобы среда вновь стала розового или фиолетового цвета. Через 24 часа *Listeria* spp. вырастает на этих средах в виде маленьких или очень маленьких серовато-зеленых или оливково-зеленых колоний диаметром 1,5-2 мм, иногда с черными точками, но всегда с черными ореолами. Через 48 часов *Listeria* spp. появляются в виде зеленых колоний диаметром около 1,5-2 мм, с центральными вдавливаниями и окруженной черным ореолом. На агаре с кровью овец Columbia с налидиксовой кислотой и сульфатом колистина, *Listeria* spp. растут в виде серых и плоских колоний, и *L. monocytogenes* представляет собой небольшую зону гемолиза, которую можно наблюдать после удаления колонии. *Listeria ivanovii* проявляет слабую гемолитическую активность вокруг колонии.

д) Через 48 и 72 часов, если на чашках Петри появляются колонии, предположительно *Listeria*, они отбираются для дальнейших подтверждающих проверок. Если на тарелке пять предполагаемых колоний *Listeria*, они отбираются все. Если на тарелке находится более пяти предполагаемых колоний *Listeria*, отбирается только пять колоний.

Для экскрементов и силоса, а также для плацентарной оболочки существует два метода.

Для экскрементов и силоса суспензия 1/10 (25 г в 225 мл) вносится в раствор half-Fraser и инкубируется при температуре от 29 °С до 31 °С в течение 24 часов. Через 24 часа данная суспензия высевается на модифицированный Palcam и проводится пересев в бульоне Фрейзера по 0,1 мл в 10 мл. Среда инкубируется при температуре от 36 °С до 38 °С в течение 24 часов. Через 48 часов этот инкубированный бульон Фрейзера высевается на модифицированный Palcam и чашки Петри инкубируются при температуре от 36 °С до 38 °С в течение 24-48 часов. Бульон Фрейзера повторно инкубируется при температуре от 36 °С до 38 °С в течение 24 часов, после чего он наносится на модифицированный Palcam.

Для плацентарной оболочки исследуемая часть разводится в 1/2 и 1/5 в буферизованной пептонной воде и непосредственно изолируется на селективной среде. В этом случае Palcam заменяется модифицированным Palcam.

ALOA<sub>g</sub> и другие хромогенные среды для *Listeria* позволяют расти большинству *Listeria* spp. и может использоваться в клинической микробиологии для скрининга фекалий человека.

### 3.2 Традиционные методы идентификации

Типичные колонии *Listeria* spp. на вышеупомянутых селективных/дифференциальных чашках с агаром отбираются для дальнейшей идентификации на уровне видов с использованием набора тестов. Методы включают окрашивание по Граму, каталазу, подвижность (как во влажной среде, наблюдаемой при фазово-контрастной микроскопии, так и при введении в полутвердый подвижный агар [0,2–0,4 % агар] или пробирку U/Graigie), гемолиз и использование углевода.

Для наблюдения за подвижностью приготавливается препарат в виде висячих капель из свежей бульонной культуры, такой как бульон с экстрактом соевых дрожжевых триптонов, и инкубируется при температуре от 20 °С до 23 °С в течение 8-24 часов. При использовании полутвердого жидкого агара после введения (около 1 см) и инкубации при температуре от 20 °С до 28 °С листерия проникает в среду, которая становится мутной. Примерно на 0,5 см ниже поверхности агара наблюдается характерный слой повышенного роста, похожий на зонтик. Это происходит из-за развития *Listeria* в аэробных условиях, а не в строго анаэробных условиях.

Для гемолизирующего действия следует использовать агаровые чашки с конской и овечьей кровью. После инкубации при 37 °С в течение 24 часов и введения путем прокалывания среды *L. ivanovii* проявляет широкую зону гемолиза. Зона гемолиза *L. monocytogenes* узкая, часто далеко не выходит за пределы колоний. В этом случае удаление колоний может помочь интерпретации. Редкие штаммы *L. monocytogenes* не являются гемолитическими.

Метод Кристи-Аткинс-Мунк-Петерсон (Christie-Atkins-Munch-Peterson) (CAMP) является очень полезным инструментом для идентификации видов *Listeria spp.* культур. Он используется в ISO и некоторых протоколах AOAC и считается необязательным в методах FDA и USDA-FSIS. Метод прост в исполнении и легко читается. Он состоит из штрихов β-гемолитического золотистого стафилококка (штамм ATCC<sup>TM</sup> 49444r или 25923r, штамм NCTCTM 7428r или 1803r) и *Rhodococcus equi* (штамм ATCC<sup>tm</sup> 6939r, штамм NCTC<sup>tm</sup> 1621r) в одиночных прямых линиях параллельно, на чашке с агаром из овечьей крови или двухслойной пластинке с агаром с очень тонким слоем кровяного агара. Полосы должны иметь достаточное разделение, позволяющее тестировать и контролировать штаммы *Listeria*, чтобы они были расположены перпендикулярно между двумя индикаторными организмами, не касаясь их (разделенных на 1-2 мм). После инкубации в течение 24-48 часов при от 35 °С до 37°С (12-18 часов при использовании наложения тонкого кровяного агара) положительная реакция состоит из расширенной зоны β-гемолиза на пересечении теста/контроля и индикатора штаммы. *Listeria monocytogenes* является положительной с полосой *S. aureus* и отрицательной с *R. equi*, тогда как метод с *L. ivanovii* дает обратные реакции.

В рамках рода *Listeria* таксономически описаны десять видов: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii* подвиды *ivanovii* и подвиды *londoniensis*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi* подвиды *Grayi* и *Subp. murrayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* подв.*L. fleischmannii* и подвид *coloradensis*. Новые виды (*L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* подв. *Fleischmannii* и подв. *Coloradensis*) в основном выделены из проб окружающей среды и встречаются редко. *Listeria fleischmannii* может быть выделен в сырье и почвах растений или подвалах.

**Таблица 1 - Основные характеристики основных видов листерий**

Проба	<i>Listeria spp.</i> реакция
Окраска по Граму	положительный
Клеточная морфология	короткий (0,4-0,5 мкм × 0,5-2,0 мкм) неспоровая палочка с несколькими перитрихозными жгутиками
Условия роста	аэробные и факультативные анаэробные
Подвижность	положительная акробатическая подвижность или в зонтике в подвижном агаре при 20–28 °С, отрицательная при 37 °С
Каталазы	положительный
Оксидазы	отрицательный
Эскулин гидролиз	положительный
Индол	отрицательный
Уреазы	отрицательный

Таблица 2 - Дифференциация основных видов листерий

Виды	β-гемолиз	Выработка кислоты из			Реакция Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP) на кровь овец	
		L-Рамноз	D-ксилоза	D-Маннит	S. aureus	R. equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	v	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	+	-	+	-	-	+
<i>L. ivanovii</i> подв. <i>londoniensis</i>	+	-	+	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	-	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	v	+	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	+	-	+	-	-

V = переменная;  
 (+) = слабая реакция;  
 + = > 90 % положительных реакций;  
 - = нет реакции.

### 3.3 Проверка антимикробной чувствительности

*Listeria monocytogenes* по своей природе устойчив к цефалоспорином (цефазолин, цефтиофур, цефпиром), хинолонам (налиндиксовая кислота и ранний фторхинолон, такой как офлоксацин), фосфомицину и клиндамицину. Приобретенная устойчивость редко выявляется. Большинство изолятов чувствительны к пенициллину G, амоксициллину, аминогликозидам (гентамицин), тетрациклином, фениколам, триметоприму и сульфонидам, рифампину, гликопептидам (ванкомицину). На очень низких частотах устойчивость к тетрациклину выявлялась из различных источников: говядины, мясоперерабатывающих заводов, свиной щековины и овец. Устойчивость к эритромицину была выявлена в пробах окружающей среды и пищевой продукции. До настоящего времени не было подтверждено устойчивости к пенициллинам.

Анализ на чувствительность обычно проводится для бактериальных патогенов, вызывающих инфекцию и требующих противомикробного лечения, и при этом идентификация возбудителя недостаточна для прогнозирования результата лечения.

Для лечения инфекции *L. monocytogenes* восприимчивость к противомикробным препаратам прогнозируема, и терапия широко применяется на эмпирической основе. Анализ на восприимчивость является ценным инструментом для проведения эпидемиологических исследований или для оценки новых противомикробных препаратов.

### 3.4 Методы выделения подтипа

Большая часть регуляторного выявления *L. monocytogenes* не требует какого-либо специфического подтипа изолята. Однако схемы подтипов могут быть использованы при расследовании вспышек, отслеживании состояния окружающей среды и надзоре за состоянием здоровья населения.



*Listeria monocytogenes* может быть протипирован с помощью ряда различных подходов, включая серотипирование, фаготипирование, анализ ферментов рестрикции ДНК (либо с использованием высокочастотных режущих ферментов и обычного гель-электрофореза для разделения фрагментов, либо с помощью разведенных энзимов и электрофореза в гель-импульсном поле (PFGE) (для разделения фрагментов), а также типирование на основе секвенирования нуклеиновых кислот, анализ микрочипов.

#### 3.4.1 Серотипирование и геносеротипирование (группа ПЦР)

Штаммы *L. monocytogenes* могут быть отнесены к 13 различным серотипам (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e и 7) на основании комбинации их соматических (O) и жгутиковых (H) антигенов, согласно процедурам, Силигер и Хеине. Серотипирующие антигены распространены среди *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* и *L. welshimeri*. Хотя все они считаются потенциально патогенными, большинство (> 95 %) культур патогенных для человека относятся к трем серотипам 1/2a, 1/2b и 4b. По сравнению с другими методами подтипирования, серотипирование имеет слабую дифференциацию, но может быть использовано для облегчения исключения культур, которые не являются причинами возникновения вспышки или спорадического случая, среди людей.

Серотипирование можно заменить методом на основе ПЦР, разработанным Доумис и др. (2004), который нацелен на четыре фрагмента ДНК *prs*, ORF2110, ORF2819, *lmo1118*, *lmo0737*. Этот метод геносеротипирования в настоящее время признан и подтвержден на международном уровне. Все виды *Listeria*, кроме *L. rocourtiae*, обладают амплифицируемым фрагментом гена ПЦР серогруппы *Pa*, включая штаммы серотипов 1/2a и 3a (амплификация фрагментов ДНК *prs* и *lmo0737*); ПЦР-серогруппа *Pb* включает штаммы серотипов 1/2b, 3b и 7 (амплификация фрагментов ДНК *prs* и ORF2819); ПЦР серогруппы *Pc* включает штаммы серотипов 1/2c и 3c (амплификация фрагментов ДНК *prs*, *lmo0737* и *lmo1118*); ПЦР-серогруппа *Iv* включает штаммы серотипов 4b, 4d и 4e (амплификация фрагментов ДНК *prs*, ORF2819 и ORF2110). Наконец, ПЦР-серогруппа *L* включает штаммы других серотипов *L. monocytogenes* и других видов, кроме *L. rocourtiae*.

#### 3.4.2 Клеточная линия

После серотипирования *L. monocytogenes* можно разделить на три линии, из которых линия I включает серотипы 1/2b, 3b, 4b, 4d и 4e; линия II включает серотипы 1/2a, 1/2c, 3a и 3c; и линия III включает серотипы 4a, 4c и атипичные 4b. Статус линии серотипов 4ab и 7 остается неясным из-за ограниченной доступности таких штаммов. В пределах линии III, три генетически отличных подгруппы (IIIА, IIIВ и IIIС) идентифицированы после сравнительного анализа последовательностей генов *act A* и *sig B*. Фенотипически штаммы линии IIIА обладают, как и типичные *L. monocytogenes*, способностью ферментировать рамнозу, тогда как штаммы линии IIIВ и IIIС заметно дефицитны по утилизации рамнозы. Линии I и II участвуют в документированных случаях листериоза человека, а линия III редко связана со вспышками, несмотря на их частое выделение их проб пищевой продукции и окружающей среды. Изоляты линии I и II, по-видимому, одинаково распространены у животных.

#### 3.4.3. Анализ рестрикционной эндонуклеазы хромосомной ДНК

Анализ рестрикционной эндонуклеазы (REA) хромосомной ДНК является методом подтипирования *L. monocytogenes*. Поскольку эти ферменты являются высокоспецифичными при распознавании нуклеотидных последовательностей, полученные в результате фрагменты расщепления ДНК, различающиеся по размеру и электрофоретической подвижности, отражают геномные различия, что приводит к специфическим «характерными признаками» среди других родственных штаммов. Из-за специфичности рестрикционной эндонуклеазы, метод является высоко воспроизводимым.

## СТ РК 3509-2019

При комбинировании REA с гибридизацией Саузерн с использованием хромосомно-меченных образцов, выявляются только определенные рестрикционные фрагменты, связанные с соответствующими хромосомными участками, что значительно сокращает количество анализируемых фрагментов ДНК. Этот метод известен как анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP). Когда используются рибосомные образцы РНК/ДНК, выявляются только конкретные рестрикционные фрагменты, связанные с хромосомными локусами для рРНК. Этот метод известен как риботипирование, и он широко используется для подтипирования *L. monocytogenes*, главным образом за счет использования рестрикционной эндонуклеазы EcoRI. Тем не менее, методика оказалась менее разборчивой, чем фаготипирование, REA или электрофорез с мультилокусным ферментом (МЕЕ).

Когда рестрикционные эндонуклеазные ферменты, используются для расщепления нереализованной хромосомной ДНК, такой как ApaI, SmaI, NotI и AscI, получаются очень большие фрагменты. Из-за своего размера эти большие фрагменты не разделяются при проведении электрофореза в агарозном геле. Однако путем периодического изменения ориентации электрического поля на геле посредством импульсов крупные фрагменты могут «ползти» через агарозную матрицу и разделяются в соответствии с различиями в размерах. Этот метод известен как гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE). PFGE является высокочувствительным методом для подтипа *L. monocytogenes*. PFGE особенно полезен для субтипирования культур серотипа 4b, которые удовлетворительно не субтипируются большинством других методов субтипирования.

### 3.5 Биологическое исследование

Биологическое исследование проводится на 2-3 белых мышах (массой 18 г). Суспензия из головного мозга и внутренних органов или культур вводится животным под кожу или внутривенно в дозе 0,3-0,5 мл. При положительной биопробе животные погибают через 2-6 суток после заражения. Из внутренних органов павших животных делают мазки отпечатки и высевы на питательные среды. Наблюдение за подопытными животными осуществляется в течение 14 суток.

---

УДК 636.2

МКС 65.020.30 (NEQ)

**Ключевые слова:** Листерия моноцитогенная, листериоз. лабораторный методы, идентификация агента, серологический тест.

---

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3509-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





Басуға \_\_\_\_\_ ж. Қол қойылды. Пішімі 60x84 1/16  
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «Kz Times New Roman»,  
«Times New Roman»

Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы \_\_\_\_\_ дана. Тапсырыс \_\_\_\_\_

---

«Қазакстан стандарттау және сертификаттау институты»  
республикалық мемлекеттік кәсіпорны  
010000, Нұр-Сұлтан қаласы, Мәңгілік Ел даңғылы, 11 үй  
«Эталон орталығы» ғимараты  
Тел.: 8(7172) 27-08-14, 44-64-50