

Елена Васильевна Соколова

Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии, Россия, Нижний Новгород

E-mail: sokol.e1ena@yandex.ru

Екатерина Константиновна Псарева

Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии, кандидат биологических наук, Россия, Нижний Новгород

E-mail: ekaterinapsareva@gmail.com

Ирина Юрьевна Егорова

Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, заведующая лабораторией диагностики и мониторинга, заместитель директора по диагностическим исследованиям, доктор биологических наук, Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский

E-mail: iegorova@list.ru

Павел Аркадьевич Журилов

Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии, Россия, Нижний Новгород

E-mail: zhurilov95@bk.ru

Евгений Андреевич Потемкин

Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии, Россия, Нижний Новгород

E-mail: jeka892904622952@gmail.com

Светлана Александровна Ермолаева

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, заведующая лабораторией экологии возбудителей инфекций, доктор биологических наук, Россия, Москва

E-mail: drermolaeva@mail.ru

Светлана Сергеевна Мешкова

Красноярский государственный аграрный университет, профессор кафедры экологии человека, доктор биологических наук, доцент, Россия, Красноярск

E-mail: dixi1972@yandex.ru

ДЕТЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *LISTERIA* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Листериоз – инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое бактериями рода Listeria. В настоящее время различные производители ПЦР тест-систем предлагают наборы реактивов для качественного и количественного методов детекции в биологическом материале исключительно L. monocytogenes. В настоящей статье описан универсальный протокол для идентификации этиологических агентов листериоза – L. monocytogenes и L. ivanovii. Метод позволяет детектировать непосредственно микроорганизмы рода Listeria с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на основе амплификации фрагментов генов, кодирующих факторы патогенности бактерий перечисленных видов. При скрининге коллекционных штаммов были выбраны уникальные фрагменты генов-мишеней inlA и smcL, кодирующих интерналин A L. monocytogenes и сфингомиелиназу C L. ivanovii соответственно. На основании подобранных нуклеотидных последовательностей праймеров были подобраны опти-

мальные условия для детекции возбудителей листериоза с помощью ПЦР-РВ. Установлен порог чувствительности обнаружения патогенных бактерий рода *Listeria*. Для *L. monocytogenes* он составил 3×10^2 , а для *L. ivanovii* 3×10^3 бактериальных клеток в 1 мл. Определена специфичность ПЦР-РВ для детекции *L. ivanovii* и *L. monocytogenes* на основе генов *smcL* и *inlA*. Для этого помимо штаммов *L. ivanovii* и *L. monocytogenes* были использованы штаммы нескольких видов листерий (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*), а также изоляты других родов бактерий. Описанный протокол является родоспецифичным для выявления штаммов рода *Listeria*, в том числе *L. monocytogenes*, а также позволяет обнаруживать непосредственно *L. ivanovii* с помощью видоспецифичной мишени.

Ключевые слова: ПЦР-РВ, листериоз, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, интерналин А, сфингомиелиназа С.

Elena V. Sokolova

Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center of Virology and Microbiology, post-graduate student, junior staff scientist of the laboratory of molecular biology, Russia, Nizhny Novgorod

E-mail: sokol.e1ena@yandex.ru

Ekaterina K. Psareva

Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center of Virology and Microbiology, staff scientist of the laboratory of molecular biology, candidate of biological sciences, Russia, Nizhny Novgorod

E-mail: ekaterinapsareva@gmail.com

Irina Yu. Egorova

Federal Research Center of Virology and Microbiology, head of the laboratory of diagnostics and monitoring, deputy-director for diagnostic testings, doctor of biological sciences, Russia, Vladimir Region, Petushinsky district, s. Volginsky

E-mail: iegorova@list.ru

Pavel A. Zhurilov

Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center of Virology and Microbiology, post-graduate student, junior staff scientist of the laboratory of molecular biology, Russia, Nizhny Novgorod

E-mail: zhurilov95@bk.ru

Evgeny A. Potemkin

Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute – Branch of Federal Research Center of Virology and Microbiology, post-graduate student, junior staff scientist of the laboratory of molecular biology, Russia, Nizhny Novgorod

E-mail: jeka892904622952@gmail.com

Svetlana A. Ermolaeva

Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N. F. Gamalei of the Ministry of Health of the Russian Federation, the head of the laboratory of ecology of causative agents of infections, doctor of biological sciences Russia, Moscow

E-mail: drermolaeva@mail.ru

Svetlana S. Meshkova

Krasnoyarsk State Agrarian University, professor of the chair of ecology of the man, doctor of biological sciences, associate professor, Russia, Krasnoyarsk

E-mail: dixi1972@yandex.ru

**THE DETECTION OF THE GENUS *LISTERIA* PATHOGENIC BACTERIA
BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION**

Listeriosis is an infectious disease in humans and animals caused by bacteria of the genus Listeria. Currently, different PCR test systems manufacturers offer reagent kits for the qualitative and quantitative

detection methods exclusively of *L. monocytogenes* in biological material. In the study a universal protocol for the identification of bacterial strains, etiological agents of listeriosis – *L. monocytogenes*, and *L. ivanovii* is described. The method allows finding microorganisms of the genus *Listeria* using real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) based on the genes fragments amplification encoding the pathogenicity factors of these species bacteria. Screening for collection strains selected unique fragments of the *inlA* and *smcL* target genes encoding *L. monocytogenes* internalin A and *L. ivanovii* sphingomyelinase C, respectively. The optimal conditions for the listeriosis pathogen detection using Real-time PCR were established based on the primers selected nucleotide sequences. The sensitivity of the genus *Listeria* pathogenic bacteria Real-time PCR was established. For *L. monocytogenes*, it made 3×10^2 , and for *L. ivanovii* 3×10^3 bacterial cells in 1 ml. The specificity of Real-time PCR for *L. ivanovii* and *L. monocytogenes* strains detection was defined on the basis of genes of *smcL* and *inlA*. For this purpose besides the strains of *L. ivanovii* and *L. monocytogenes* the strains of several types of *Listeria* (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*), and also isolates of other genus of bacteria were used. The described protocol is genus specific for the identification of the genus *Listeria* strains, including *monocytogenes*, and also allows finding *L. ivanovii* with the help of genus specific target directly.

Keywords: Real-time PCR, listeriosis, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, internalinA, sphingomyelinase C.

Введение. Листериоз – инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое грамположительными факультативно-анаэробными бактериями рода *Listeria*. Проявляется в форме фебрильного гастроэнтерита, поражает ЦНС (менингит, менингоэнцефалит), может привести к септицемии, выкидышу или мертворождению. Несмотря на низкий уровень заболеваемости, количество летальных исходов среди заболевших достигает 20–30 % [1–3]. Современная классификация рода *Listeria* основана на полногеномном секвенировании и филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, и включает в себя 20 признанных видов [4–5]. Этиологическими агентами листериоза признаны *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*, так как они обладают выраженными факторами патогенности, способствующими развитию заболевания. Наиболее опасным возбудителем считается *L. monocytogenes*, поскольку представляет угрозу для жизни как человека, так и животных, в то время как *L. ivanovii* выделяют не так часто. Данный вид инфицирует животных, в редких случаях человека. В организм бактерии проникают в основном через кишечник и поражают внутренние органы (печень, головной мозг, селезенку и др.) благодаря наличию в кровотоке [6–9].

Для детекции возбудителей листериоза в РФ преимущественно применяют бактериологические и серологические методы. Для более точ-

ного и быстрого установления диагноза наиболее эффективно использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10]. В настоящее время различные производители ПЦР тест-систем предлагают наборы реактивов и оборудование для обнаружения в биологическом материале исключительно *L. monocytogenes*, что не нацелено на определение *L. ivanovii*.

Цель работы. Описание протокола для идентификации штаммов *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*, а также иных видов с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на основе генов, кодирующих основные факторы патогенности бактерий рода *Listeria*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В настоящей работе исследовано 29 штаммов бактерий рода *Listeria*, 1 референс-штамм рода *Bacillus* из фондов «Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» ФГБНУ ФИЦВиМ, выделенных в период с 1964 по 2005 г. от разных источников, преимущественно сельскохозяйственных животных и человека, а также гетерологичные микроорганизмы родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella* – изолированные от насекомых и холоднокровных животных (табл.1).

Использованные коллекционные штаммы бактерий

| Штамм | Источник выделения | Регион выделения | Год |
|--|--------------------|-----------------------|------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> K-23 | Человек | Москва | 1988 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 57 | Человек | Москва | 1971 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 24618 | Человек | Москва | 1971 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 5 ch | Человек | Тульская область | 1975 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 29 ch | Человек | Тульская область | 1999 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 1-67 | Овца | Алтайская область | 1972 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 14P | Овца | Алтайская область | 1969 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 4-G | Овца | Казахстан | 1970 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 33 | Овца | Читинская область | 1975 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 170 | Корова | Хабаровская область | 1974 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 257 | Корова | Новгородская область | 1971 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 1-CAH | Корова | Сахалинская область | 1971 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 3453 | Свинья | Москва | 1965 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 406 | Свинья | Казань | 1964 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 324 | Свинья | Москва | 1965 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 4-40 | Лошадь | Москва | 1947 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 3501 | Коза | Москва | 1965 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 944 | Мышь | Московская область | 1958 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 134/3 | Продукты питания | Тульская область | 2005 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 1300 | Продукты питания | Тульская область | 2005 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 | Т.Ш.* | | 2000 |
| <i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119 | Т.Ш. | | 2000 |
| <i>Listeria ivanovii</i> NCTC 11846 | Т.Ш. | | 2000 |
| <i>Listeria ivanovii</i> 7842 | Референс-штамм | | 1985 |
| <i>Listeria innocua</i> 6A | Референс-штамм | | 1981 |
| <i>Listeria innocua</i> NCTC 11288 | Т.Ш. | | 2000 |
| <i>Listeria innocua</i> SLCC 3379 | Т.Ш. | | 2000 |
| <i>Listeria seeligeri</i> SLCC 5921 | Т.Ш. | | 2000 |
| <i>Listeria welshimeri</i> | Т.Ш. | | 2000 |
| <i>Escherichia blattae</i> | Таракан | Нижегородская область | 2019 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Ящерица | Нижегородская область | 2019 |
| <i>Salmonella enterica</i> | Змея | Нижегородская область | 2019 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | Референс-штамм | | |

* – Т.Ш. – типовой штамм, передан профессором Jose Antonio Vazquez-Boland.

Культивирование бактерий и выделение ДНК для постановки ПЦР-РВ. Культуры микроорганизмов выращивали в дрожжевом триптон-соевом бульоне (ДТСБ) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия) в течение суток при температуре 37 °С. После этого осуществляли пересев на плотную питательную среду, содержащую агар

ДТСА, инкубировали 24 часа при 37 °С. Полученная культура была использована в дальнейшем для получения бактериальной ДНК с помощью лизоцима, который служит для разрушения бактериальной стенки, и протеиназы К, которая отделяет ДНК от разрушенных бактериальных стенок. Затем пробы кипятили при

100 °С 10 минут для полной инактивации ферментов. Для постановки ПЦР-РВ использовали 1 мкл полученного лизата. Для оценки чувствительности готовили пробы штаммов с разной концентрацией. С этой целью при помощи денситометра DEN-1 (BioSan, Латвия) установили оптическую плотность, равную 1 единице по стандарту мутности МакФарланда, что соответствует 3×10^8 бактериальных клеток в 1 мл. Для постановки реакции использовали серию разведений от 3×10^8 до 3×10^1 м.т. в 1 мл.

Конструирование праймеров. Для идентификации патогенных листерий были определены 2 видоспецифичных гена-мишени: для *L. ivanovii* – ген *smcL*, который кодирует фермент сфингомие-

линазу С, а для *L. monocytogenes* – ген *inlA*, кодирующий белок интерналин А. Полные нуклеотидные последовательности были найдены через базу данных GenBank (Y09477.2; M67471.1). Рабочие последовательности праймеров сконструированы с помощью сервиса GenScript (<https://www.genscript.com>), их соответствие для разных клональных групп внутри вида было проверено с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (табл. 2). Проверка самокомплементарности и вероятности образования шпилек осуществлялась через программу LaserGene Primer Select (DNASTAR, <https://www.dnastar.com/software/lasergene>).

Таблица 2

Последовательности олигонуклеотидов для детекции *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* методом ПЦР-РВ

| Ген-мишень | | Последовательность |
|-------------|---|-----------------------------|
| <i>inlA</i> | F | 5'-AACCAAAGGCACCAACGAAA-3' |
| | R | 5'-TTGTTGTAGGCGGTGTGTTTC-3' |
| <i>smcL</i> | F | 5'-TGCACAAGCGGACTATATGA-3' |
| | R | 5'-TCCCAATTACGGGTGTTTGA-3' |

Проведение ПЦР-РВ. Постановку ПЦР-РВ проводили с использованием 5xqPCRMix – HS SYBR (ООО «Евроген», Москва). Реакционную смесь готовили согласно инструкции производителя. Для отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду. В качестве положительного контроля применяли ДНК штамма *L. monocytogenes* «EGDe», содержащего четко выраженную последовательность интерналина А, а также референтные штаммы *L. monocytogenes* «АТСС 19115» и *L. ivanovii* «АТСС 19119». Подготовленные пробы амплифицировали в приборе «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 94 °С – 2 мин, (92 °С – 30 с; 58 °С – 30 с; 72 °С – 30 с) × 45 циклов; 72 °С – 2 мин. Оценку результатов проводили по значению порогового цикла (Ct), при котором кривая флуоресценции пересекала базовую линию [11]. Для подтверждения достоверности результатов постановку реакций повторяли 3 раза.

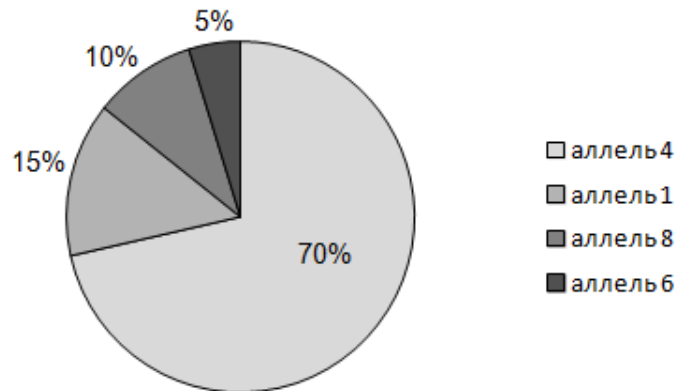
Результаты исследования и их обсуждение. Скрининг штаммов *L. monocytogenes* на наличие гена, кодирующего белок интерналин А.

Возбудители листериоза имеют характерные факторы патогенности, способствующие проникновению бактерий в эукариотические клетки высокой выживаемости и межклеточному распространению. Среди них важную роль играют белки семейства интерналинов. Гены, кодирующие эти токсины, содержат лейцин-богатые повторы (LRR), облегчающие адгезию и инвазию [9, 12]. Выбор гена *inlA* в качестве мишени для *L. monocytogenes* обусловлен данными о его принципиальной роли в вирулентности данного вида. Ген *inlA* кодирует белок интерналин А, который опосредует инвазию эпителиальных клеточных линий кишечника за счет взаимодействия с рецептором Е-кадгерина на базолатеральной поверхности клеток [13].

Ранее анализ выявленных генов, кодирующих белки класса интерналинов, в том числе *inlA*, показал, что среди 59 исследованных штаммов, выделенных преимущественно от сельскохозяйственных животных на территории бывшего СССР, превалирующим является аллель 4 гена *inlA* [14]. В настоящем исследовании при скрининге 20 штаммов *L. monocytogenes* выявлены четыре аллельных варианта гена

inlA. Доминирующим являлся аллель 4, который обнаружен у 70 % изолятов (рис.). В связи с этим подбор праймеров для представления

протокола в настоящем исследовании производился на основе аллеля 4 участка гена, кодирующего интерналин А.



Распространение аллелей участка гена *inlA* исследованных штаммов *L. monocytogenes*

Оценка специфичности разработанного протокола по детекции патогенных видов бактерий рода *Listeria*. С помощью программы ClustalX2 было проведено сравнение участка гена *inlA* для амплификации в системе ПЦР-РВ с другими аллельными вариантами. Фрагмент, ограниченный выбранными праймерами, включал в себя 149 пар нуклеотидов и являлся консервативным для всех аллельных вариантов гена интерналина А у штаммов *L. monocytogenes*. Уникальный для *L. ivanovii* фрагмент гена *smcL* имел длину 128 пар нуклеотидов (табл. 2).

Для оценки специфичности на основе генов *smcL* и *inlA* использовали штаммы нескольких видов листерий (*L. ivanovii* и *L. monocytogenes*,

L. innocua, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*), а также изоляты других родов бактерий (табл. 3). При амплификации в системе ПЦР-РВ с участком гена *smcL* реакция прошла положительно со всеми исследуемыми штаммами *L. ivanovii* (табл. 3). Полученные данные позволяют сделать вывод, что разработанный протокол по детекции *L. ivanovii* является видоспецифичным. При постановке аналогичной реакции с участком гена *inlA* реакция прошла положительно как у *L. monocytogenes*, так и у других видов листерий. Однако отрицательный результат у бактерий других родов подтверждает высокий уровень специфичности детекции генома листерий.

Таблица 3

Специфичность подобранных праймеров для детекции *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*

| Штамм | Праймеры для <i>inlA</i> | Праймеры для <i>smcL</i> |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 3 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 | + | – |
| <i>Listeria monocytogenes</i> K-23 | + | – |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 3453 | + | – |
| <i>Listeria ivanovii</i> NCTC 11846 | + | + |
| <i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119 | + | + |
| <i>Listeria ivanovii</i> 7842 | + | + |
| <i>Listeria innocua</i> 6A | + | – |
| <i>Listeria innocua</i> NCTC 11288 | + | – |
| <i>Listeria innocua</i> SLCC 3379 | + | – |

| 1 | 2 | 3 |
|-------------------------------------|---|---|
| <i>Listeria seeligeri</i> SLCC 5921 | + | – |
| <i>Listeria welshimeri</i> | + | – |
| <i>Escherichia blattae</i> | – | – |
| <i>Citrobacter freundii</i> | – | – |
| <i>Salmonella enterica</i> | – | – |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 3366 | – | – |

Низкий уровень видоспецифичности при постановке амплификации с геном *inlA* подтверждает данные Rossi F. [15], что фактор вирулентности *L. monocytogenes inlA* может присутствовать также у штаммов *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* и *L. seeligeri*. Кроме того, консервативные области *inlA*, выбранные в качестве мишени, могут отражать консерватизм белков семейства интерналинов у рода *Listeria*, таким образом, представленные результаты могут быть связаны с особенностями нуклеотидных последовательностей лейцин-богатых повторов, которые характеризуют семейство интерналинов [13].

Определение чувствительности. Для определения аналитической чувствительности выявления генов *smcL* и *inlA* методом ПЦР-РВ на основе подобранных условий использовали серию разведений референтных штаммов *L. ivanovii* «ATCC 19119» и *L. monocytogenes* «ATCC 19115». В результате установлено, что при максимальной концентрации образцов *L. ivanovii* (3×10^8 м.т/мл) фрагмент гена *smcL* детектировался на 24-м цикле, а минимальный порог обнаружения наблюдался на 39-м цикле при 3×10^3 м.т/мл. При содержании в образце от 3×10^2 и 3×10^1 м.т/мл накопления продукта амплификации не происходило. Таким образом, чувствительность детекции *L. ivanovii* составила 3×10^3 м.т/мл. Применительно к *L. ivanovii* представленный метод является уникальным, поскольку в настоящее время не представлено ПЦР наборов для идентификации этого вида микроорганизмов.

Для бактерий вида *L. monocytogenes* промежуток детекции находился в пределах 22–35-х циклов амплификации при различных концентрациях от 3×10^8 до 3×10^2 м.т/мл. Установленное значение для *L. monocytogenes* не уступает заявленному в ПЦР наборах для выявления данной патогенной бактерии, представленных на российском рынке.

Выводы

1. Установлены участки генов-мишеней для амплификации специфическими праймерами гена *smcL*, кодирующего фермент сфингомиелиназу С *L. ivanovii* и гена *inlA*, кодирующего белок интерналин А *L. monocytogenes*.

2. Подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР в реальном времени при детекции участков генов-мишеней. Рабочая концентрация праймеров составила 7 пмоль/мкл, а температура отжига 58 °С.

3. Определен порог чувствительности выявления возбудителей листериоза при помощи ПЦР в реальном времени. Для *L. ivanovii* минимальная концентрация при детекции составила 3×10^3 , а для *L. monocytogenes* – 3×10^2 бактериальных клеток в 1 мл.

4. Определена специфичность подобранных праймеров для обнаружения бактерий рода *Listeria* методом ПЦР в режиме реального времени. Установлено, что родовая специфичность праймеров для гена *inlA* составляет 100 % среди исследованных микроорганизмов, видовая специфичность праймеров для гена *smcL* также составила 100 % для вида *L. ivanovii*.

Литература

- Herrador Z., Gherasim A., López-Vélez R. et al. Listeriosis in Spain based on hospitalisation records, 1997 to 2015: need for greater awareness // Euro Surveill. 2019. Vol. 24, № 21. P. 1–10.
- Dreyer M.; Thomann A.; Böttcher S. et al. Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water // Vet. Microbiol. 2015. Vol. 179. P. 69–75.
- Choi M. H., Park Y. J., Kim M. et al. Increasing Incidence of Listeriosis and Infection-associated

- Clinical Outcomes // *Annals of laboratory medicine*. 2018. Vol. 38, № 2. P. 102–109.
4. Orsi R.H.; Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 100 № 12. P. 5273–87.
 5. Sanschagrín S., Yergeau E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons // *J Vis Exp*. 2014. № 90.
 6. Liu D. Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic listeriae // *Microbiol Insights*. 2013. Vol. 6. P. 59–69.
 7. Camejo A., Carvalho F., Reis O. et al. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle // *Virulence*. 2011. Vol. 2 № 5. P. 379–394.
 8. Guillet C., Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechai F., Mamzer-Bruneel M. et al. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii* // *Emerging Infectious Diseases*. 2010. Vol. 16 № 1: P. 136–138.
 9. Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants // *Clin. Microbiol.* 2001. Vol. 14 № 3. P. 584–640.
 10. Бакулов И.А., Васильев Д.А., Ковалева Е.Н. [и др.]. Листерии и листериоз: монография. 2-е изд. Ульяновск: НИИЦМиБ, 2016. 334 с.
 11. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real-Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything // *Front Microbiol.* 2017. Vol. 8 P. 108.
 12. Marino M., Braun L., Cossart P. et al. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. Vol. 97 № 16. P. 8784–8.
 13. Su X., Cao, G., Zhang, J. et al. Characterization of internalin genes in *Listeria monocytogenes* from food and humans, and their association with the invasion of Caco-2 cells. *Gut Pathog.* 2019; 11: 30.
 14. Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A. et al. Retrospective Study of *Listeria Monocytogenes* Isolated in the Territory of Inner Eurasia from 1947 to 1999 // *Pathogens*. 2019. Vol. 8. № 4. P. 1–16.
 15. Rossi F., Amadoro C., Conficoni D. et al. Occurrence, Diversity of *Listeria* spp. Isolates from Food and Food-Contact Surfaces and the Presence of Virulence Genes // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8 № 2. P. 294.

Literatura

1. Herrador Z., Gherasim A., López-Vélez R. et al. Listeriosis in Spain based on hospitalisation records, 1997 to 2015: need for greater awareness // *Euro Surveill*. 2019. Vol. 24, № 21. P. 1–10.
2. Dreyer M.; Thomann A.; Böttcher S. et al. Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water // *Vet. Microbiol.* 2015. Vol. 179. P. 69–75.
3. Choi M. H., Park Y. J., Kim M. et al. Increasing Incidence of Listeriosis and Infection-associated Clinical Outcomes // *Annals of laboratory medicine*. 2018. Vol. 38, № 2. P. 102–109.
4. Orsi R.H.; Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 100 № 12. P. 5273–87.
5. Sanschagrín S., Yergeau E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons // *J Vis Exp*. 2014. № 90.
6. Liu D. Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic listeriae // *Microbiol Insights*. 2013. Vol. 6. P. 59–69.
7. Camejo A., Carvalho F., Reis O. et al. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle // *Virulence*. 2011. Vol. 2 № 5. P. 379–394.
8. Guillet C., Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechai F., Mamzer-Bruneel M. et al. Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii* // *Emerging Infectious Diseases*. 2010. Vol. 16 № 1: R. 136–138.
9. Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants // *Clin. Microbiol.* 2001. Vol. 14 № 3. R. 584–640.
10. Bakulov I.A., Vasil'ev D.A., Kovaleva E.N. [i dr.]. Листерии и листериоз: монография. 2-е изд. Ульяновск: НИИЦМиБ, 2016. 334 с.

11. *Kralik P, Ricchi M.* A Basic Guide to Real-Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything // *Front Microbiol.* 2017. Vol. 8 P. 108.
12. *Marino M., Braun L., Cossart P.* et al. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins* // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. Vol. 97 № 16. P. 8784–8.
13. *Su X., Cao, G., Zhang, J.* et al. Characterization of internalin genes in *Listeria monocytogenes* from food and humans, and their association with the invasion of Caco-2 cells. *Gut Pathog.* 2019; 11: 30.
14. *Psareva E.K., Egorova I.Y., Liskova E.A.* et al. Retrospective Study of *Listeria Monocytogenes* Isolated in the Territory of Inner Eurasia from 1947 to 1999 // *Pathogens.* 2019. Vol. 8. № 4. P. 1–16.
15. *Rossi F., Amadoro C., Conficoni D.* et al. Occurrence, Diversity of *Listeria* spp. Isolates from Food and Food-Contact Surfaces and the Presence of Virulence Genes // *Microorganisms.* 2020. Vol. 8 № 2. P. 294.

Исследование производилось за счет бюджетных средств ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» в рамках выполнения темы научно-исследовательской работы «Молекулярные основы полигостальности возбудителей болезней, общих для человека и животных» (0451-2019-0002).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

