

УДК [616.98:579.869.1]-078+579.869.1.083.1

Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика

И.С. Тартаковский

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Представлена современная концепция эволюции роли листерий в инфекционной патологии человека за более чем 70-летний период. Анализируются основные факторы, определяющие заметный рост заболеваемости листериозом в последние годы: контаминация и активное размножение листерий в продуктах питания, повышение восприимчивости к листериям у групп риска на фоне нарушений клеточного иммунитета. Рассматриваются особенности внутриклеточного паразитизма и экспрессии

факторов патогенности листерий. Анализ различных методических подходов к диагностике листериоза свидетельствует о ведущей роли бактериологических методов выделения и идентификации *L. monocytogenes* на основе современных селективных сред и необходимости их быстрого внедрения в практику клинических лабораторий и центров санэпиднадзора.

Ключевые слова: листерии, эпидемиология, факторы патогенности, микробиологическая диагностика.

Listeriae: the role in infectious diseases and laboratory diagnostics

I.S. Tartakovski

Institute of Epidemiology and Microbiology named under N.F. Gamaleya, RAMS

Current approaches covering the role of listeriae in infectious diseases for more than 70 years are given in this article. The main factors causing evident upgrowth of morbidity are analysed. The most prominent of them are: contamination and active reproduction of listeriae in food products, increase of susceptibility in risk groups due to abnormality cellular immunity. Intracellular parasitism features and distinctions of listeriae pathogenity are exami-

ned. The analysis of various methodical approaches to diagnosis of listeriosis shows the leading role of bacteriological methods of *L. monocytogenes* isolation and identification that are based on usage of selective media. The introduction of these methods into the work of laboratories and epidemiology surveillance centers is strongly advisable.

Keywords: listeriae, epidemiology, pathogenity, microbiological diagnosis

Листерии давно известны микробиологам, эпидемиологам и клиницистам всего мира. Еще в 1926 г. Е.С. Мургау и соавт. выделили данный возбудитель во время эпизоотии лабораторных живот-

ных в питомнике Кембриджа [1]. Название *Listeria monocytogenes* было дано в 1940 г. в честь английского хирурга D. Lister (1827–1912), разработавшего метод антисептики, и одновременно указывало на наличие моноцитоза, характерного для заболевших кроликов и морских свинок. В 1929 г. листерии впервые выделены от больного человека, а также от овец – одного из основных хозяев листерий, с которыми соприкасается человек [2].

Можно выделить три основных этапа во взаимоотношении листерий и человеческой популяции.

Контактный адрес:
Тартаковский Игорь Семенович
230981, Москва, ул. Гамалеи, 18
Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф.Гамалеи РАМН
Тел.: (095)190-25-81, 193-63-71.
Факс: (095)190-74-01.
Эл. почта: 1570.g23@g23.relcom.ru

Первый – до 50-х годов, когда в мире было выявлено не более 70 случаев листериоза, как правило, у людей, непосредственно контактировавших с зараженными животными (работники скотобоев, фермеры-животноводы, доярки).

Второй – 50–70-е годы. Число случаев листериоза достигает нескольких тысяч. Эта инфекция рассматривается как весьма опасный зооноз с высокой летальностью, но большинство случаев по-прежнему связаны с сельскохозяйственными регионами и употреблением сырого молока, контактом с большими животными, в том числе с грызунами.

Третий – 80-е годы – по настоящее время.

Многочисленные эпидемические вспышки и спорадические случаи листериоза в высокоразвитых странах мира (США, Великобритания, Швейцария, Канада, Франция) были связаны с употреблением готовых продуктов пищевой индустрии (сыры, особенно мягкие, мясные полуфабрикаты, салаты и др.), после чего данное заболевание стали рассматривать как одну из важных пищевых инфекций в мире [3, 4].

Листериоз, как и ранее, не является широко распространенной инфекцией. По количеству выявленных случаев он значительно уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам, но превосходит их по летальности и тяжести клинического течения. Так, из 2518 больных листериозом, выявленных в США в 1997 г., у 20% наступил летальный исход, а госпитализация больных требовалась в 92% случаев [5].

В Российской Федерации заболеваемость листериозом официально регистрируется с 1992 г. Число выявленных больных невелико (30–60 случаев ежегодно). Как правило, диагностика листериоза связана либо с работой ветеринаров, либо с энтузиазмом отдельных исследователей [6, 7]. Отсутствие эффективной системы санитарно-эпидемиологического надзора за листериозом и неудовлетворительное качество лабораторной диагностики обусловили "своеобразный вакуум" между реальной ролью листерий в инфекционной патологии человека и практическими исследованиями в этой области клинической микробиологии в России.

Эпидемиологические и клинические особенности листериоза

Наиболее полно место и роль листерий в инфекционной патологии человека можно охарактеризовать со следующих четырех позиций.

1. Листерии как возбудители сапрозоонозной инфекции. До 80-х годов XX века листериоз рассматривался как типичный зооноз с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя [8, 9].

Возбудитель листериоза выделен от более 90 видов диких и домашних животных, птиц, рыб, моллюсков, насекомых и клещей. Листерии – частый компонент фекальной микрофлоры многих млекопитающих [10]. Традиционным источником инфекции для человека служат сельскохозяйственные животные и грызуны.

Данные отечественных и зарубежных исследователей последних лет свидетельствуют об исключительно широких адаптивных способностях листерий, позволяющих им размножаться в сапрофитической среде в различных природных субстратах (растительных, почвенных, водных). Листерии способны к размножению в широком диапазоне температуры (4–45°C), pH (4,8–9,0) и влажности, в присутствии NaCl (20%) и 15% CO₂. Высокая метаболическая пластичность листерий обуславливает возможность перехода их от сапрофитической фазы к паразитической и наоборот. Эти обстоятельства наряду с традиционными представлениями о связи листерий с теплокровными животными позволяют рассматривать листериоз как типичный сапрозооноз [11].

2. Роль листерий в перинатальной и неонатальной патологии. Наибольшую опасность листериозная инфекция представляет для беременных женщин и новорожденных. Она обуславливает выкидыши, мертворождение, развитие пороков плода, а также менингиты, сепсис и пневмонию у новорожденных.

В США листериоз у беременных женщин составляет около 27% от общего числа заболевших этой инфекцией и около 60% случаев – у лиц в возрасте 10–40 лет [12]. Для листерий, как и для других факультативных внутриклеточных паразитов (легионеллы, микобактерии), главную роль играет клеточный иммунитет. Снижение уровня клеточного иммунитета во время беременности, особенно в поздние сроки, обуславливает повышение восприимчивости к листериозной инфекции у данной группы риска [13, 14].

Листериозная инфекция может развиваться на протяжении всего периода беременности, хотя большая часть случаев приходится на третий триместр. Болезнь, как правило, протекает как средней тяжести течения гриппоподобная инфекция. У роженцев, имевших в анамнезе нарушения функции иммунной системы, листериоз протекает особенно тяжело (диарея со спазмами мышц живота, рецидивирующими болями) и приводит к гибели плода. Парадоксально, но поражение центральной нервной системы – наиболее распространенная клиническая форма листериоза – у беременных выявляется крайне редко. Более 20% случаев перинаталь-

ного листериоза завершается внутриутробной гибелью плода.

При неонатальном листериозе выделяют листериоз с ранним и поздним началом.

Листериоз с ранним началом как результат внутриутробной инфекции проявляется в 1–2-е сутки после рождения в форме сепсиса. Аспирация инфицированной амниотической жидкости может привести к поражению легких. Летальность достигает 50%.

Листериоз с поздним началом развивается в среднем через 10–12 дней после рождения и протекает, как правило, в форме менингита. Эта форма наиболее характерна при внутрибольничных вспышках листериоза в родильных домах. Летальность составляет 20–25% [15].

3. *Листерии как возбудители оппортунистической инфекции.* Для листериоза характерен широкий спектр клинических проявлений. Чаще всего выявляют клинические формы, связанные с поражением центральной нервной системы, проявляющиеся менингитом или менингоэнцефалитом. Преобладают острые, реже подострые формы. Заболевание характеризуется лихорадкой, возможно развитие лимфаденита и конъюнктивита. Моноцитоз выявляется не более чем у 30–40% больных [12, 16].

Эндокардиты составляют 5–10% случаев листериозной инфекции у взрослых [17]. Острый гастроэнтерит описывают при эпидемических вспышках листериозного сепсиса и при поражении нервной системы. У ранее здоровых людей листериозный гастроэнтерит крайне редок [18].

В последние 10–15 лет наиболее значительный рост числа случаев листериоза отмечается у лиц пожилого возраста на фоне сопутствующих заболеваний, иммуносупрессивной терапии. На фоне сопутствующих заболеваний или иммуносупрессивной терапии выявляют такие клинические проявления листериоза, как инфекция кожи, абсцессы печени и селезенки, пневмония, миокардит, остеомиелит, воспаление суставов и др.

Частота случаев оппортунистического листериоза не уступает, а, по данным ряда исследователей, превосходит таковую при перинатальной и неонатальной патологии. Наиболее часто листериоз развивается на фоне онкологических заболеваний, почечной или сердечной недостаточности, диабета.

Листерии не являются ведущими возбудителями при ВИЧ-инфекции. Но у этой группы пациентов листериоз встречается в 150–300 раз чаще, чем в общей популяции [3, 12].

Разнообразные клинические проявления листериоза на фоне снижения клеточного иммунитета при лимфомах, СПИДе, беременности, иммуно-

супрессивной терапии наряду с экспериментальными данными подтверждают ведущую роль клеточного иммунитета в развитии листериозной инфекции [13, 19, 20].

4. *Листерии как возбудители пищевой инфекции.* До 80-х годов XX века наибольшее практическое значение имела профессиональная заболеваемость работников животноводческих и птицеводческих хозяйств или случаи заболеваний, связанных с непосредственным контактом с грызунами. В последние десятилетия большинство крупных эпидемических вспышек листериоза с высоким процентом летальных исходов обусловлены потреблением пищевых продуктов, прежде всего сыра, других молочных продуктов и салатов, в меньшей степени – мясных, куриных и рыбных изделий [4, 21, 22, 23].

Крупнейшей и наиболее известной является вспышка листериоза в 1985 г. в Лос-Анджелесе (США), связанная с употреблением в пищу сычужного мексиканского сыра, контаминированного *L. monocytogenes*, серотип 4в. Всего было выявлено 142 больных листериозом, из них 48 – со смертельным исходом, 130 – с перинатальной и неонатальной патологией. Эта и другие вспышки, менее значительные по своим масштабам, но также с высокой летальностью исходов (20–44%), показали, что в самой технологии приготовления ряда продуктов содержится опасность контаминации листериями и их размножения до высоких концентраций.

Значение пищевого пути передачи листериоза хорошо иллюстрируют данные Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США), показавшие, что 11% всех продуктов, хранящихся в домашних холодильниках, контаминированы листериями. У 64% больных листериозом в холодильнике был найден по меньшей мере один продукт, контаминированный листериями. В 33% случаев выделенные штаммы *L. monocytogenes* от больных, а также из продуктов, хранившихся в холодильнике, имели идентичный молекулярно-генетический профиль при рестрикционном анализе пульс-электрофорезом. Наконец, более 30% спорадических случаев листериоза в США были связаны с хранившимися в холодильнике мягкими сырами или полуфабрикатами мясных продуктов [24].

Проблема пищевого листериоза помимо медицинского приобретает и существенное социально-экономическое значение. Изъятие зараженных партий продуктов из торговли, ограничение их ввоза и вывоза, остановка производства наносят ущерб в сотни миллионов долларов США и европейским странам – экспортерам сыра и мясных продуктов [17, 25, 26].

В литературе нет данных о контагиозности при

листериозе. Зараженный человек или носитель инфекции может быть источником только при возникновении неонатальной и перинатальной патологии. Наблюдается вертикальная передача от матери к плоду, возможно заражение новорожденного при прохождении через родовые пути. Листерии выделяют из 5–6% образцов кала здоровых людей [9,10].

При листериозе у взрослых инкубационный период варьирует от 11 до 70 дней. Заражающие дозы листерий, поступающие с пищей, неизвестны, но в эксперименте на приматах требовалось не менее 10^9 КОЕ *L. monocytogenes* для воспроизведения инфекции [12].

Терапия больных листериозом

При листериозе терапия выбора является сочетание ампициллина [взрослые – 8–12 г/сут в 4 введения; дети – 200 мг/(кг·сут) в 4 введения] и гентамицина [5 мг/(кг·сут) в 3 введения] в течение 2–6 нед в зависимости от клинических проявлений. При наличии противопоказаний к ампициллину используют монотерапию ко-тримоксазолом – 15 мг/(кг·сут) в 3 введения [1, 27, 28].

Биология и факторы патогенности листерий

Listeria monocytogenes – небольшая грамположительная неспорообразующая палочка, факультативный анаэроб, хемоорганогетеротроф.

Листерии ферментируют глюкозу, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Оптимальная температура роста – 30–37°C, хотя листерии как психрофильные микроорганизмы могут расти в широком диапазоне температуры, начиная от +4°C. При

температуре 20–25°C листерии подвижны за счет образования немногочисленных перитрихальных жгутиков. При температуре 37°C жгутики, как правило, не образуются, и листерии неподвижны [29].

Из шести известных в настоящее время видов листерий (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*), только *L. monocytogenes* патогенна для человека и животных, а *L. ivanovii* – для животных (табл.1). Хотя известно не менее 16 сероваров *L. monocytogenes*, большая часть случаев заболеваний связана с сероварами 4b, 1/2a, 1/2b [9, 58]. Фаготипирование позволяет определить 60–80% выделенных клинических штаммов.

Научный аспект интереса к листериям связан с тем, что эти бактерии стали одной из наиболее популярных моделей изучения внутриклеточного паразитизма [30, 31].

Все этапы взаимодействия с эукариотической клеткой и внутриклеточной репликации листерий достаточно хорошо изучены. Они включают:

- взаимодействие листерий со специфическими рецепторами эукариотической клетки;
- активную индукцию фагоцитоза, в результате которой бактерия оказывается в первичной фагосоме, окруженная однослойной мембраной;
- лизис первичной вакуоли;
- деление в цитоплазме эукариотической клетки;
- полимеризацию актина, необходимую для передвижения бактерии по цитоплазме с образованием характерного "актинового хвоста";
- проникновение в соседнюю клетку путем продавливания мембраны и образования "пальцеобразной" инвагинации в соседнюю клетку;

Таблица 1. Дифференцирующие признаки видов рода *Listeria*

Признаки	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
β-Гемолиз	+	–	–	+	+	–
САМР-тест (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	–	–	–	+	–
САМР-тест (<i>Rhodococcus equi</i>)	+	–	–	+	–	–
Образование кислоты из:						
маннитола	–	+	–	–	–	–
α-метил-D-маннозида	+	+	+	–	–	+
L-рамнозы	+	+	d	–	–	d
растворимого крахмала	–	+	–	–	–	–
D-ксилозы	–	–	–	+	+	+
Гидролиз гипсурата	+	–	+	+	–	–
Восстановление нитрата	–	+	–	–	–	–
Патогенность для мышей	+	–	–	+	–	–

Обозначения: "+" – 90% и более штаммов положительные; "–" – 90% и более штаммов отрицательные; d – 11–89% штаммов положительные; пробел означает, что определений не проводили; "+" – вариабельный результат.

Таблица 2. Факторы патогенности *L. monocytogenes*

Белок	Молекулярная масса, кДа	Ген	Функция
PrfA	27	<i>prfA</i>	Регуляция транскрипции генов вирулентности
Листерииолизин О	58	<i>hly</i>	Лизис первичной и вторичной фагосом
РІСА (фосфатидилинозитол – специфичная фосфолипаза С)	36	<i>plcA</i>	Лизис фагосомы
Лецитиназа	33	<i>plcB</i>	Лизис вторичной фагосомы
Металлопротеаза	57	<i>mpl</i>	Посттрансляционная модификация лецитиназы
ActA	67	<i>actA</i>	Полимеризация актина
Интерналин, InlB	88,65	<i>inlA, inlB</i>	Индукция фагоцитоза

– лизис вторичной вакуоли, окруженной двойной мембраной;

– новый цикл деления в соседней клетке.

Известен ряд биологически активных молекул и поверхностных белков листерий, играющих важную роль на различных этапах взаимодействия с эукариотической клеткой (табл. 2).

Лучше всего изучен листериозин О – порообразующий тиолазависимый гемолизин с молекулярной массой 58 кДа. Листерииозин, "главный фактор" патогенности листерий, обладает выраженным токсическим эффектом при заражении лабораторных животных, вызывая их гибель. При взаимодействии с эукариотической клеткой листериозин О участвует в лизисе вакуоли (первичной и вторичной), обеспечивая свободное деление листерий в цитоплазме.

Фосфатидилинозитол – специфичная фосфолипаза С (РІСА), белок с молекулярной массой 36 кДа. Участвует в лизисе мембраны первичной вакуоли вместе с листериозином О.

Фосфатидилхолин – специфичная фосфолипаза С (РІСВ), лецитиназа с молекулярной массой 33 кДа. Фермент видоспецифичен для *L. monocytogenes*, участвует в лизисе вторичной вакуоли.

Помимо более изученной мембранолитической функции перечисленных ферментов имеются данные об их регуляторной функции на уровне сигнальной трансдукции мембранных белков эукариотической клетки.

Металлопротеаза (*mpl*) – полипептид с молекулярной массой около 60 кДа. Благодаря металлопротеазе неактивная форма лецитиназы с молекулярной массой 33 кДа переходит в активную форму с молекулярной массой 29 кДа.

На этапах инвазии выявлена роль нескольких поверхностных белков. Интерналин А (*InlA*), белок с молекулярной массой 88 кДа, участвует в инвазии эпителиальных клеток. Интерналин В, белок клеточной стенки с молекулярной массой 65 кДа, необходим для инвазии клеток гепатоцитов, но не эпителия кишечника. По-видимому, экспрессия *inlA* и *inlB* отражает специфику клеточного тропизма листерий. На этапе инвазии важную роль играет главный внеклеточный белок Р60. Это муреингидролаза, необходимая также для клеточного деления и выявляемая у всех видов рода *Listeria*.

Способность листерий индуировать полимеризацию актина обеспечивает возможность активного движения возбудителя по цитоплазме клеток. В этом процессе участвует поверхностный белок *actA* с молекулярной массой 67 кДа, индуцирующий полимеризацию актина.

Гены, кодирующие известные факторы вирулентности, расположены на фрагменте хромосомы размерами около 10 тыс. пар нуклеотидов [32]. Функционально они объединены в 4 оперона (рис. 1), транскрипция которых полностью (ген *plcA* и гены *mpl – actA* оперона) или частично (*hly* и *inlAB*) находится под контролем регуляторного белка PrfA [33, 34]. Сам ген *prfA* может транскрибироваться как с двух собственных PrfA-независимых промоторов, так и в составе бицистронного транскрипта, индуцирующегося на промоторе гена *plcA*. Это позволяет PrfA контролировать свою собственную экспрессию.

Гены патогенности листерий активируются, по-видимому, только в результате получения сразу нескольких внешних сигналов, свидетельствующих о

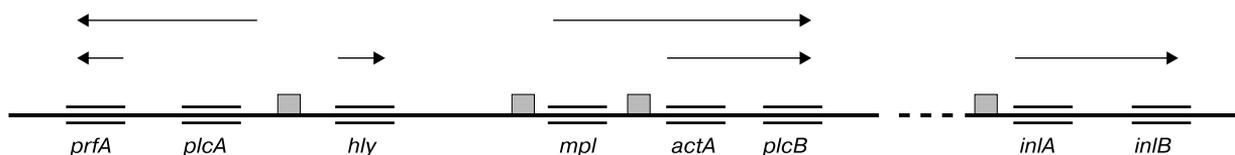


Рис. 1. Схема PrfA-регулона (стрелками обозначены единицы транскрипции, квадратами – сайты связывания PrfA)

попадании возбудителя в эукариотический организм. Работа в области генетики листерий в настоящее время во многом связана с изучением путей передачи внешних сигналов, в том числе с идентификацией низкомолекулярных веществ, контролирующей активность регуляторного белка PrfA.

Способность перемещаться по цитоплазме клетки за счет полимеризации актина и переходить из клетки в клетку, "продавливая" мембрану, позволяет патогенным листериям преодолевать барьеры слизистой оболочки кишечника без контакта с антителами, комплементом и нейтрофилами. Поступая в кровяное русло, возбудитель может перемещаться в различные места, поражая преимущественно мозг и плаценту.

Лабораторная диагностика

Листерии не относятся к числу микроорганизмов, культивирование которых представляет какие-либо трудности. Для этого можно использовать широкий спектр питательных сред – мясопептонный агар, агар Хоттингера, кровяной агар, триптически-соевую среду и т. д.

До начала 80-х годов окраска мазков из клинического материала, выделение культуры на известных средах в сочетании с серологическими методами исследования являлись основными компонентами лабораторной диагностики листериоза. Однако рост числа спорадических случаев и эпидемических вспышек листериоза способствовал выявлению многочисленных уязвимых мест традиционной диагностики.

Так, в клинических образцах возбудитель морфологически может быть сходен с дифтероидами и различными кокками. Известны случаи ложной идентификации *L. monocytogenes* в качестве коринебактерий, энтерококков и стрептококков и наоборот. Выделение "дифтероидов" из крови или ликвора позволяет клиницисту заподозрить в этом микроорганизме *L. monocytogenes*, но не более того. При листериозном менингите окраска мазков из ликвора позволяет выявить возбудитель не более чем в 40% случаев.

Выделение возбудителя из клинического материала и продуктов питания оказалось малоэффективным без селективных компонентов и методов. Поэтому в 80-е годы были созданы селективные среды и методы, значительно повышающие эффективность выделения и сократившие сроки идентификации *L. monocytogenes* [35].

Анализ серологической структуры листерий показал, что она крайне неудобна для диагностики. Серотипы листерий не являются видоспецифическими. Они могут быть общими для разных

видов листерий, независимо от их патогенности для человека. В сочетании с традиционной для серологических методов исследования относительно низкой чувствительностью и специфичностью, ретроспективным характером диагностики и широким распространением бактерионосительства при листериозе этот недостаток значительно снижает область применения серологических методов.

Специфика антигенной структуры листерий повлияла и на разработку экспресс-методов диагностики листериоза и выявления возбудителя в продуктах питания. Молекулярные методы экспресс-диагностики листериоза разрабатываются с большей интенсивностью, чем иммунологические. Тем не менее в практике отечественных бактериологов серологические методы остаются основными. Они чаще всего используются как методы лабораторной диагностики листериоза.

Серологические методы диагностики

В табл. 3 представлено распределение серотипов среди видов листерий. *L. monocytogenes* имеет одну или несколько общих антигенных детерминант с другими видами листерий, кроме *L. welshimeri*. Поэтому само по себе установление серотипа без применения иных методов не позволяет установить диагноз инфекции, вызванной *L. monocytogenes*.

Наиболее перспективным для серологической диагностики представляется определение антител к секретизируемому фактору патогенности листерий – листериозину O [36]. Но даже эту более специфичную методику авторы рекомендуют использовать только для выявления неинвазивных бессимптомных форм болезни при эпидемических вспышках листериоза.

В России для серологической диагностики используют препараты для РСК, выпускаемые НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (г. Покров, Владимирская обл.), и РНГА, разработанные Омским НИИ природно-очаговых болезней [40, 56].

В качестве особенности отечественной серологической диагностики следует отметить, что серовары с 1/2a по 3С, используемые в международной классификации, объединены в первую серогруппу, а остальные серовары – во вторую [40]. На наш взгляд, данная группа методов сохраняет практическое значение лишь при проведении сероэпидемиологических обследований и санитарно-гигиенических мероприятий на животноводческих объектах для профилактики листериоза у животных и обслуживающего персонала.

Таблица 3. Серология видов рода *Listeria*

Вид	Серотипы
<i>L. monocytogenes</i>	1/2A, 1/2B, 1/2C, 3A, 3B, 3C, 4A, 4/AB, 4B, 4C, 4D, 4E, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4AB, 6A, 6B
<i>L. welshimeri</i>	6A, 6B
<i>L. seelegeri</i>	1/2B, 4C, 4D, 6B

Бактериологическая диагностика и идентификация листерий

При подозрении на листериоз у больных исследуют кровь и ликвор – при септической форме, менингитах и менингоэнцефалитах, синовиальную жидкость – при воспалении суставов, остеомиелите, меконий – при заболеваниях новорожденных, околоплодную жидкость, плаценту, отделяемое родовых путей – у женщин, родивших мертвых или больных детей.

Выделение культуры *L. monocytogenes* и ее идентификация являются необходимыми для окончательного подтверждения диагноза листериозной инфекции.

Для выделения листерий из клинического материала и продуктов питания используют селективные факторы. Наибольшее значение имеют температурный фактор и селективные добавки [3, 35, 37].

Метод холодого обогащения при температуре +4°C, основанный на психрофильности листерий, весьма эффективен, но из-за длительных сроков инкубации (10–60 дней) не может быть рекомендован для клинической диагностики. В современных схемах выделения листерий обычно используют инкубацию при температуре 30°C в течение 24–48 ч в бульоне с селективными добавками для обогащения исследуемого образца.

Среди широкой гаммы селективных агентов, использовавшихся в разное время для выделения листерий, наибольшее значение сохраняют ингибиторы сопутствующей микрофлоры и дифференцирующие индикаторы, представленные в табл. 4.

Наибольшее распространение для выделения листерий получили Оксфорд агар и PALCAM агар [37, 38].

В состав *Оксфорд агара* входят следующие селективные добавки (в г/л):

- эскулин – 1,0,
- цитрат железистого аммония – 0,5,
- хлорид лития – 15,0,
- циклогексимид – 0,4,
- колистин – 0,02,
- акрифлавин – 0,005,

Таблица 4. Основные селективные агенты, используемые при выделении листерий

- Теллурид калия
- Налидиксовая кислота
- Хлорид лития
- Акрифлавин
- Эскулин
- Красители (фенилрот)
- Антибиотики (цефтазидим, полимиксин В)
- Циклогексимид

цефотетан – 0,002,
фосфомицин – 0,01.

В состав *PALCAM агара* входят (в г/л):

- эскулин – 0,8,
- цитрат железистого аммония – 0,5,
- хлорид лития – 15,0,
- акрифлавин – 0,005,
- полимиксин В – 0,01,
- цефтазидим – 0,02,
- фенилрот – 0,08.

В качестве обогатительного бульона обычно используют различные варианты триптиказо-соевого бульона с дрожжевым экстрактом и селективным компонентом, включающим солянокислый акрифлавин (0,02–0,01 г/л), налидиксовую кислоту (0,05–0,01 г/л) и циклогексимид (0,05–0,01 г/л).

Схемы выделения листерий в зависимости от степени контаминации и количества листерий в исследуемом материале включают либо непосредственный высев на селективный агар, либо обогащение исследуемого образца на селективном бульоне при температуре 30°C в течение 24–48 ч с последующим высевом на селективный агар.

На Оксфорд агаре вырастают черные колонии *L. monocytogenes*, окруженные черным ореолом. На PALCAM агаре колонии листерий серо-зеленые с черным вогнутым центром. Для них также характерен черный ореол на красном фоне агара. Последующий анализ характерных колоний, утилизирующих эскулин (в результате чего и происходит почернение среды), позволяет на основании ограниченного числа тестов идентифицировать культуру *L. monocytogenes* [25, 35].

Помимо теста на подвижность методом укола в полужидкий агар при комнатной температуре (листерии подвижны при температуре 18–25°C и неподвижны при 37°C) особое значение имеют тесты, позволяющие идентификацию *L. monocytogenes* совместить с дифференциацией от других непатогенных для человека листерий (табл. 5, рис. 2). *L. monocytogenes* формирует рамнозу и не утилизирует ксилит и маннит, обладает β -гемолитической активностью на кровяном агаре. Весьма информативен CAMP-тест, в котором культура *L. monocyto-*

Таблица 5. Основные характеристики, используемые для дифференциации *Listeria monocytogenes* от других видов листерий

Признак	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Ферментация:						
маннитола	-	-	-	-	-	+
ксилозы	-	+	+	-	+	-
рамнозы	+	-	-	+/-	+/-	+/-
Бета-гемолиз	+	+	+	-	-	-
САМР-тест – усиление гемолиза около штриха:						
<i>Rhodococcus equi</i>	-/+	+	-	-	-	-/+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-
Патогенность для человека	Высокая	Низкая	Низкая	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

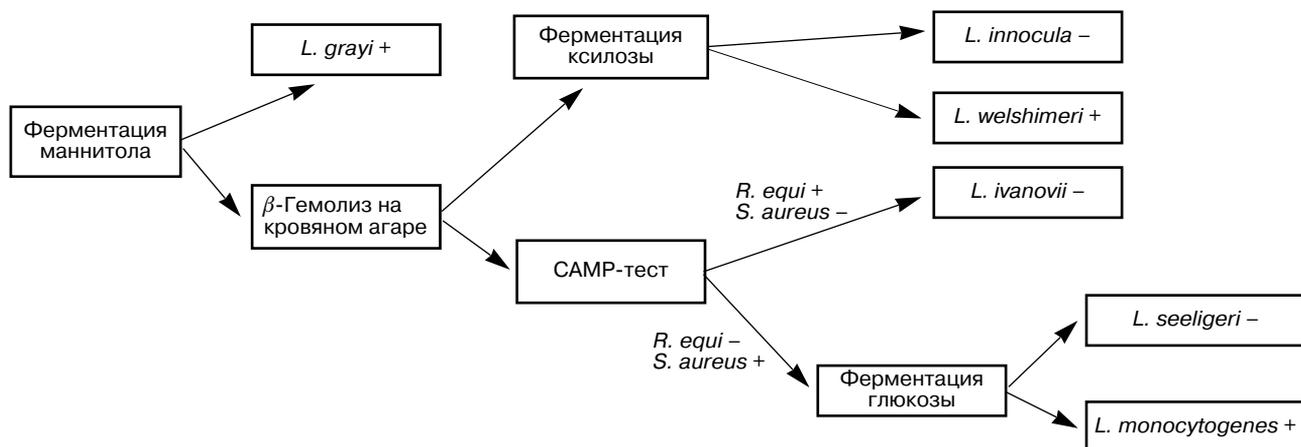


Рис. 2. Схема идентификации видов *Listeria* spp.

genes дает положительную реакцию, образуя зону усиления гемолиза с гемолитическим штаммом *Staphylococcus aureus* и, в большинстве случаев отрицательную с *Rhodococcus equi* на чашках с кровяным агаром.

Для идентификации листерий в качестве дополнительных тестов используют агглютинацию с поливалентной листериозной сывороткой и фаготипирование с помощью диагностического набора типовых листериозных бактериофагов (L2A и L4A), лизирующих 60–80% выделенных культур листерий [40].

Для ускоренной идентификации листерий можно использовать идентификационные системы API *Listeria* (Биомерье, Франция) и их аналоги. В связи со значительными недостатками серо- и фаготипирования листерий большое внимание уделяется молекулярному типированию штаммов *L. monocytogenes*. Применение пульс-электрофореза и полимеразной цепной реакции (ПЦР) представляется наиболее перспективным для типирования вирулентных штаммов листерий, хотя их использование в рутинной бактериологической практике пока ограничено [41–45].

Методы экспресс-диагностики

Практически весь спектр современных методических подходов пытались использовать для ускоренного выявления листерий: иммунофлюоресценцию, иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, радиоиммунологический метод, ДНК-зонды, ПЦР, проточную цитометрию и др. [46–51]. Однако в клинической диагностике листериоза они не нашли применения.

Основная область использования экспресс-методов – выявление листерий в продуктах питания. Однако и здесь приоритет в соответствии с международными и национальными регламентами стран – экспортеров продовольствия принадлежит классической бактериологии, хотя в дальнейшем поиск новых высокоспецифичных антигенных и нуклеотидных маркеров может изменить ситуацию.

Определенное значение для клинической диагностики листериоза имеют автоматизированные идентификационные системы, в которых инкубация в бульоне сочетается с биохимической и биофизической идентификацией возбудителя. Поскольку, как правило, *L. monocytogenes* встречается

в исследуемом материале реже многих других условно-патогенных микроорганизмов, ее идентификация требует специальной программы, соответствующей питательной среде и особого внимания к результатам утилизации углеводов и N-ацетил- β -глюкозаминидазной реакции [52].

На наш взгляд, при анализе клинического материала (ликвора, крови, околоплодной жидкости, плаценты) перспективно применение ПЦР с использованием праймеров на основе последовательностей гена листериина O (*hly*) или фосфолипазы (*plcA*). Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет выявить возбудитель в течение нескольких часов [53].

Хотя фрагмент хромосомы, на котором расположены гены, кодирующие факторы патогенности *L. monocytogenes*, используемые в ПЦР, сходен с аналогичным фрагментом *L. ivanovii* и *L. seeligeri*, в наших экспериментах мы не наблюдали перекрестных реакций [54]. Однако опыт применения ПЦР при анализе клинического материала недостаточен для практических рекомендаций по его использованию в качестве основного метода диагностики.

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют о "многоликой" роли листерий в инфекционной патологии человека и необходимости дальнейшего совершенствования санитарно-эпидемиологического надзора и лабораторной диагностики листерииоза в России.

На наш взгляд, быстрый прогресс в этой области может быть достигнут преимущественно в результате объединения усилий в организаторской работе бактериологов, эпидемиологов и специалистов в

области гигиены питания на следующих ключевых направлениях:

1) налаживание производства отечественных селективных сред для выделения листерий (PALCAM агар, Оксфорд агар, накопительный бульон) и других реагентов, необходимых в современных схемах выделения и идентификации *L. monocytogenes* в соответствии с международными стандартами;

2) регламентация общепринятых методов выделения и идентификации возбудителя соответствующими документами Министерства здравоохранения РФ;

3) регламентирование показателя *L. monocytogenes* для сыра и продуктов животного происхождения в качестве гигиенического требования, предъявляемого к качеству и безопасности пищевых продуктов, и внедрение его в практику текущего санитарно-эпидемиологического надзора; критерий безопасности – *L. monocytogenes* не допускается в 25 г продукта [55];

4) осуществление комплекса мероприятий, по профилактике листерииоза у беременных, включающих бактериологическое обследование на листерииоз, особенно в случаях отягощенного акушерского анамнеза, выполнение рекомендаций по питанию, исключающих потребление продуктов, в которых наиболее вероятно размножение листерий (мягкие и рассольные сыры типов камамбер, рокфор, брынза, а также продукты пищевой индустрии для быстрого питания, например гамбургеров, не прошедших длительной термообработки перед употреблением), мониторинг за листериями в акушерских стационарах для профилактики внутрибольничного листерииоза.

Литература

- Murray E.G., Webb R., Swann. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus bacterium monocytogenes. J Pathol Bacteriol 1926; 29:407-39.
- Gray M.L. Killinger. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bact Rev 1966; 30:309-82.
- Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev 1991; 55: 476-511.
- Listeriosis is on the increase – says commission. Dairy Ind Int 1989; 9:9.
- Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., et al. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infect Dis 1999; 5:607-26.
- Бакулов И.А., Котляров В.М., Шестиперова Т.И. Эпидемиологические и эпизоотологические аспекты листерииоза. Журн микробиол 1994; 5:100-5.
- Тартаковский И.С., Палей О.С., Опочинский Э.Ф. и др. Листерии в инфекционной патологии человека – современная концепция. ЗНиСО 1994; 3:1-4.
- Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Сб сан вет правил. М., 1996.
- Seeliger H.P. *Listeria* and Law in "Listeria 1992, ISOPOZ XI". Copenhagen 1992; 1-6.
- Schuchat A., Swaminathan B., Broome C.V. Epidemiology of Human Listeriosis. Clin Microbiol Rev 1991; 4:169-83.
- Литвин В.Ю., Емельяненко Е.Н., Пушкарева В.И. Патогенные бактерии, общие для человека и растений: проблемы и факты. Журн микробиол 1996; 2:101-4.
- Lorber B. Listeriosis. Clin Infect Dis 1996; 24:1-11.
- Kaufmann S.H. Immun intracell Bacteria 1993; 11: 129-63.
- Mac Donald T., Carter P.B. Cell-mediated immunity to intestinal infection. Infect Immunol 1980; 28:516-23.

15. Gellin B.G., Broome C.V. Listeriosis. JAMA 1989; 261:1313-20.
16. Durand M., Calderwood S.B., Weber D., et al. Actual bacterial meningitis in adults: a review of 493 episodes. N Engl J Med 1993; 328:21-8.
17. Carvajal A., Fredericson W. Fatal endocarditis due to *Listeria monocytogenes*. Rev Infect Dis 1988; 23:976-8.
18. Riedo F.X., Pinner R.W., de Lourdes Tosca M., et al. A point-source food-borne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J Infect Dis 1994; 170:693-6.
19. Пронин А.В., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. и др. Иммунологические и протективные свойства основных белков внешней мембраны *L. monocytogenes*. Журн микробиол 1996; 3:53-6.
20. Mac Kaness G.B. Cellular resistance to infection. J Exp Med 1962; 116:381-406.
21. Linnam M.J., Mascola X., Lou V., et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. N Engl J Med 1988; 319:823-8.
22. Schlech W.F., Lavique P.M., Bortolussi R.A. et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N Engl J Med 1983; 308:203-6.
23. Schwartz B., Hexter D., Broome C.V. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypothesis for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infection. J Infect Dis 1989; 159:680-5.
24. Schuchat A., Dearez K.A., Wonger I., et al. Role of food in sporadic listeriosis. Case-control study of dietary risk factors. JAMA 1992; 267:2041-5.
25. Карликанова Н., Куваева И., Карликанова Г. Листерии в молоке и в молочных продуктах. М.: Углич; 1999.
26. Костенко Ю.Г., Шагова Т.С., Янковский К.С. Листерии – критерий безопасности мясных продуктов. Мясн индустрия. 1997; 3:23-4.
27. Charpenter E., Gerbaand G., Jacquet C., et al. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. J Infect Dis 1995; 172:277-81.
28. Meyer R., Liu S. Determination of the effect of antibiotics in combination against *Listeria monocytogenes*. Diagn Microbiol Infect Dis 1987; 6:199-206.
29. Weaver P.F. Morphological, physiological and biochemical characterization. In: James G.L., editor. Isolation and identification *Listeria monocytogenes*. Atlanta: CDC; 1989. p. 39-43.
30. Portnoy D.A., Chakraborty T., Goebel W., Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infect Immun 1992; 60:1263-7.
31. Sheehan B., Kock S., Dramsis, et al. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infections process. Curr Topics Microbiol Immunol 1994; 192:187-215.
32. Sheehan B., Klarsfeld A., Msade K.T., Cossart P. Differential activation of virulence gene expression by prf A, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. J Bacteriol 1995; 177:6469-76.
33. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий. Мол ген микробиол вирусол 2000; 1:17-9.
34. Ermolaeva S., Belyi Yu., Tartakovsky I. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett 1999; 174:137-41.
35. Hitchins A.D. *Listeria monocytogenes* in: FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. 1995: 1001-13.
36. Greennington R., Darji A., Wehland J., et al. Listeriosis and IrpA. Are mayor protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 1997; 65: 3976-80.
37. Microbiological examination for dairy purposes. Section 3.15 Detection of *Listeria monocytogenes*, ISO standarts 1993; 1-7.
38. Curtis G.D., Mitchell R., King A., Griffing J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol 1989; 8:95-8.
39. Van-Netten P., Perales I., Van-de-Moosdijk A., et al. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and others *Listeria* spp. Int J Food Microbiol 1989; 8:299-316.
40. Лабораторная диагностика листериоза животных и людей, меры борьбы и профилактики. Госагропром, МЗ СССР. М.; 1987.
41. Маракуша Б.И., Дарвинш К., Тартаковский И.С. Характеристика штаммов *L. monocytogenes*, выделенных в России, и их типирование с помощью пульс-электрофореза. Журн микробиол 1996; 3:60-4
42. Brosch R., Chen J., Luchansky J. Pulsed-field fingerprinting of *Listeria*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. Appl Environm Microbiol 1994; 60:2584-92.
43. Czajra I., Bsai N., Piani M., et al. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S & RNA Genes and Intraspecies Discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by Random Amplified polymorphic DNA polymorphisms. Appl Environm Microbiol 1993; 59:304-8.
44. Gilot P., Genicot A., Andre P. Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. J Clin Microbiol 1996; 34:1007-10.
45. Jersek B., Gilot P., Gubina M., et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive elements sequence-based PCR. J Clin Microbiol 1999; 37:103-9.
46. Curiale M.S., Lepper W. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes* in Dairy products, seafoods and meats. JAOAC Int 1994; 77:1472-89.
47. Fitter S., Henzenroeder M., Thomas C.J. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. J Appl Bacteriol 1992; 73:53-9.
48. Jacobsen C.N., Rasmussen I., Jakobsen M. Viability staining and flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes*. J Microbiol Methods 1997; 28:35-43.
49. Peterkin P., Idziak E., Shappe A. Detection of *Listeria*

- monocytogenes* by direct colony hybridization on hydrophobic Grid-membrane filters by using chromogen-labelled DNA probe. Appl Environm Microbiol 1991; 57:586-91.
50. Niederhauser C., Hofelein C., Lu Thy, et al. Comparison of "Gen-Probe" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. Res Microbiol 1993; 144:47-54.
 51. Ralovich B. Detection and epidemiological typing of *Listeria* strains. Diagnostic methods for *Listeria* infection. Acta Microbiol Hungarica 1993; 40:3-38.
 52. Funke G., Peters K., Azarena-Roman M. Evaluation of the Rapid CB plus system for the identification of Coryneform bacteria and *Listeria* spp. J Clin Microbiol 1998; 36:2439-42.
 53. Ермолаева С.А., Маракуша Б.И., Тартаковский И.С. и др. Видоспецифическое выявление *Listeria monocytogenes* методом направленной амплификации ДНК. Мол ген микробиол вирусол 1994, 1;26-30.
 54. Gouin E., Mengaud J., Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen and *Listeria seeligerii*, a nonpathogenic species. Infect Immun 1994; 62:3550-3.
 55. Шевелева С.А., Карликанова Н.Р. О регламентировании показателя *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах и сырье в России. ЗНиСО. 1999; 11:22-5.
 56. Березкина Г.В. Технология получения и обоснование применения диагностикума эритроцитарного листериозного сухого для РНГА. В сб.: Актуальные вопросы медицинской биотехнологии. Томск; 1991. 1:159-61.
 57. Belyi Y., Varfolomeeva N., Tartakovsky I. A simple colony-blot method for identification of *Listeria* in food samples. Med Microbiol 1995; 184:105-8.
 58. Tratt D.I., Robertson I. D., Hampson D.I. Genetic characterization of isolates of *Listeria monocytogenes* from man, animals and food. J Med Microbiol 1993; 38:122-8.