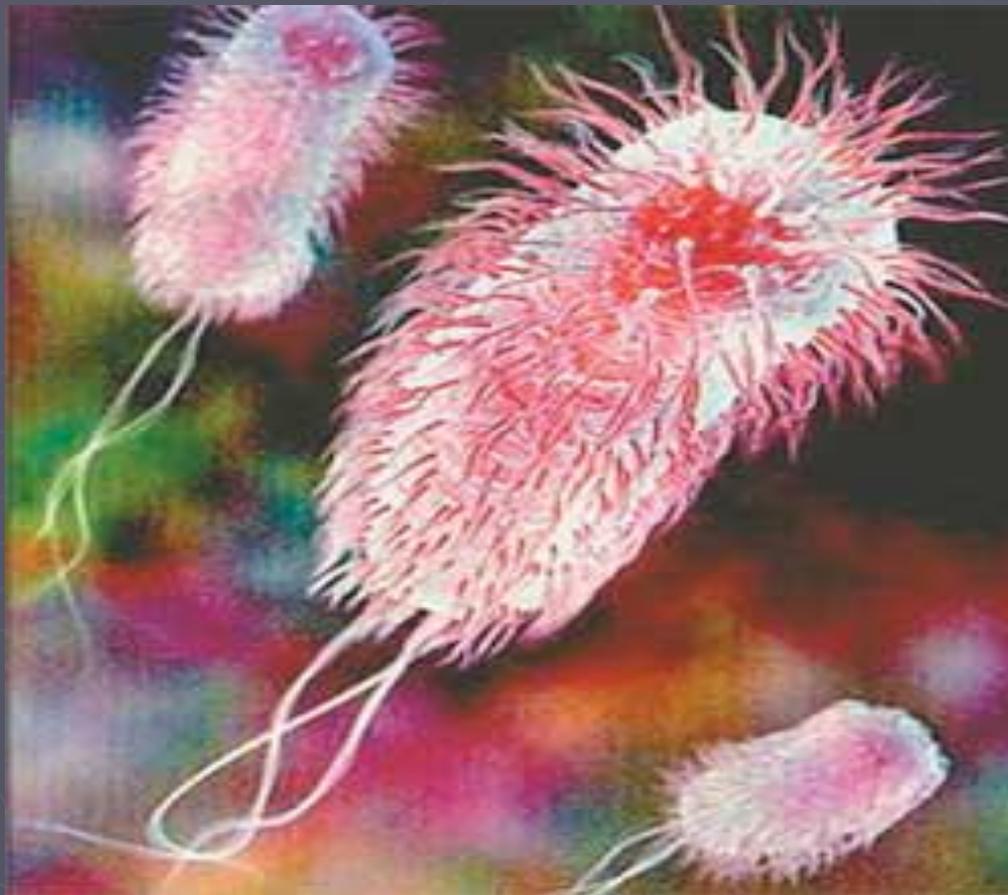


Род ЛИСТЕРИЯ LISTERIA



- ▶ Листерии впервые были выделены в 1926 г. англ. микробиологом Мюрреем во время эпизоотии у лабораторных животных в питомнике Кембриджского университета



- ▶ у всех заболевших кроликов отмечался моноцитоз

- ▶ Мюррей назвал м/о *Bacterium monocytogenes*
- ▶ В 1929 г. листерии были выделены от овец (одного из основных хозяев листерий) и от человека



- ▶ В 1940 г. м/о был назван **LISTERIA** в честь англ. хирурга Листера

- ▶ **До 80-х** годов листерии у человека выделяли исключительно редко
- ▶ С 1930г. по 1980г. в мире было зарегистрировано всего около 2000 случаев заболевания листериозом
- ▶ Листериоз отмечался в сельской местности - у людей, контактировавших с животными (доярок, пастухов, фермеров)

- ▶ С 80-х годов стали регистрироваться вспышки и спорадические случаи листериоза, связанные с употреблением пищевых продуктов
- ▶ Крупнейшей является вспышка 1985 г. в Лос-Анджелесе, связанная с употреблением сычужного сыра. Было выявлено 142 больных, из них 48 – погибло
- ▶ С тех пор листериоз стали рассматривать, как одну из пищевых инфекций

▶ **Листерия** –
зооантропоноз

▶ Возбудитель
выделяют от более,
чем 100 видов
животных –
домашних (овец,
коз, коров, свиней),
грызунов; птиц;
рыб; моллюсков;
насекомых (клещей,
блох)



- ▶ У животных отмечают :
- ▶ аборт,
- ▶ маститы,
- ▶ поражения нервной системы,
- ▶ септич. явления
- ▶ Возможно здоровое носительство



▶ Основной резервуар возбудителя в природе — грызуны

▶ С-х. животные чаще всего заражаются через воду, корма, загрязнённые выделениями грызунов



- ▶ Листерии очень устойчивые микроорганизмы
- ▶ Длительно сохраняются в окружающей среде:
 - ▶ до 3-х лет в почве
 - ▶ в воде – 2-3 года
 - ▶ в кормах животных (фураже, силосе), в пищевых продуктах – многие месяцы

- ▶ Температурный диапазон роста от 1 до +44° (размножаются в условиях холодильника)
- ▶ Листерии остаются жизнеспособными и при более высоких температурах (до 60°)
- ▶ Не погибают при замораживании
- ▶ Температурный оптимум - 25-37°
- ▶ Растут в диапазоне pH от 6 до 9
- ▶ Оптимальная pH 7,0-7,4
- ▶ Выдерживают высокие концентрации соли – 15-24%

Пути заражения

- ▶ Листерии проникают в организм через слизистую пищеварительной системы, дыхательных путей глаз, зева
- ▶ **1.Пищевой путь** - при употреблении инфицированных пищевых продуктов (молока, сыра, мяса, рыбы, салатов, соков и пр.)
- ▶ **2.Трансмиссивный путь** - при укусе насекомых (клещей, блох)

- ▶ **3. Контактный (от больных животных)**
- ▶ **4. Аэрогенный (редко)**
- ▶ **5. Трансплацентарный путь**
- ▶ **6. Заражение в родах**

Формы листериоза

- ▶ Инкубационный период от 10 до 60 дней
- ▶ Формы:
- ▶ 1. **Ангинозная форма** – лихорадка, ангина, конъюнктивит, увеличение лимфоузлов
- ▶ 2. **Менингиты, энцефалиты**
- ▶ 3. **Эндокардиты**
- ▶ 4. **Септическая форма**

- ▶ **5. Пищевая инфекция** - проявляется тошнотой, рвотой, болями в животе, поносом, повышением температуры до 38–39 градусов
- ▶ Нередко через 3–4 дня состояние больного резко ухудшается, появляются признаки поражения ЦНС (менингит, энцефалит)

- ▶ От человека человеку практически не передается
- ▶ Для всех форм - высокий моноцитоз
- ▶ Заболеваемость листериозом низкая:
- ▶ в США регистрируют до 3000 случаев в год
- ▶ на Украине до 30 случаев в год
- ▶ Высокая смертность – 20%-40%

Классификация

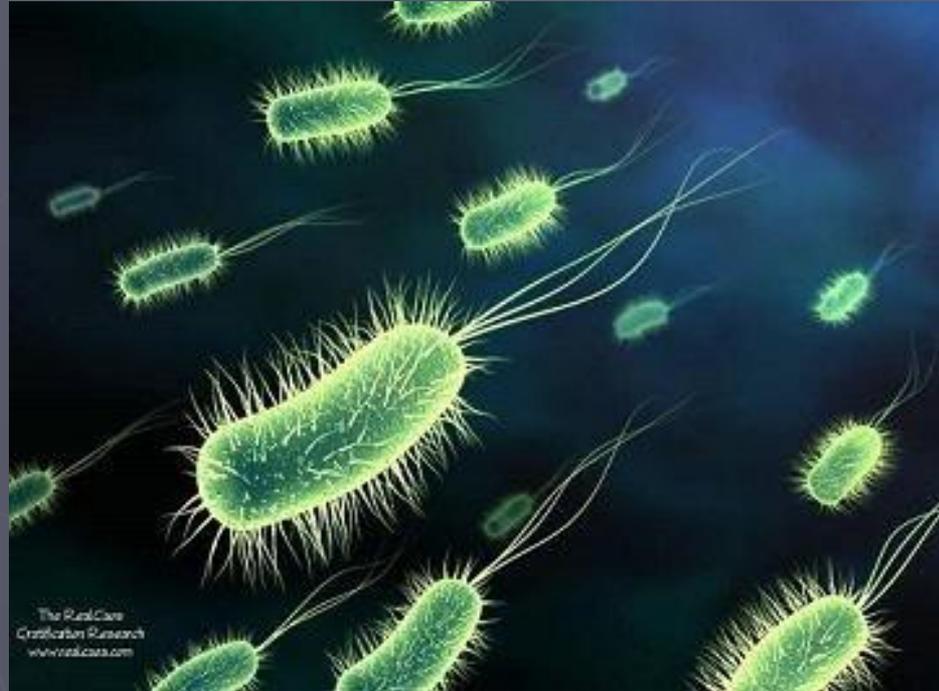
- ▶ Род Листерия по Берджи относится к 19 группе – Гр+ неспорообразующие палочки правильной формы
- ▶ Включает 7 видов
- ▶ В патологии человека и животных имеет значение 3 вида:
 - ▶ 1. **L. monocytogenes** – 90-95% патологии
 - ▶ 2. **L. ivanovii** - 5-10%

- ▶ 3. ***L. seeligeri*** – вызывает заболевание у человека исключительно редко
- ▶ Остальные виды и *L. seeligeri* являются почвенными сапрофитами и могут встречаться в пищевых продуктах

Морфология

- ▶ Листерии – мелкие Гр+ палочки с закругленными концами
- ▶ Размерами в ширину 0,5-1 мкм, в длину 1-3 мкм, иногда кокковидной формы
- ▶ Склонны к полиморфизму, в старых культурах образуют нитевидные формы до 20-100 мкм длиной

- ▶ Подвижны при 20°-25°C
- ▶ Имеют 1 или несколько жгутиков
- ▶ При 37°C - неподвижны
- ▶ Факультативные анаэробы



- ▶ В мазке располагаются беспорядочно
- ▶ **Могут располагаться в виде частокола или V и Y формы, напоминая коринебактерии**



MedUniver.com
Все по медицине...

Рис. 3.86. Мазок из чистой культуры *L. monocytogenes*.
Окраска по Граму

Культуральные свойства

- ▶ Листерии не относятся к числу микроорганизмов, культивирование которых представляет какие-либо трудности
- ▶ Для посева на листерии можно использовать широкий спектр питательных сред – МПА, сывороточный и кровяной агар, триптиказо-соевый агар и т. д.

- ▶ Растут на простых средах, но медленно, поэтому к МПА добавляют
- ▶ глюкозу (1%)
- ▶ или глицерин (2%)
- ▶ Оптимальная среда глюкозо (1%), глицерино (2%), сывороточный (3-5%) агар

- ▶ На глюкозо-глицерин-сывороточном агаре колонии нежные, прозрачные голубовато-серые, круглые, выпуклые до 3 мм
- ▶ Рост через 24 часа

- ▶ На МПА с 1% глюкозы образуют мелкие (0,5-2 мм) голубовато-серые круглые выпуклые колонии - росинки
- ▶ В первые сутки колонии еле заметны
- ▶ Характерный рост отмечается через 48 часов
- ▶ На КА через 24 часа образуют голубовато-белые колонии до 2 мм с бета или альфа гемолизом

- ▶ При длительном культивировании могут образовываться R- формы - шероховатые, с утолщённым краем, диаметром 1-3 мм
- ▶ S-R-переход сопровождается снижением гемолитической активности и потерей вирулентности
- ▶ На средах с глюкозой дают характерный запах творога или кислого молока

- ▶ **В жидких средах** листерии дают равномерное помутнение, осадок
- ▶ Осадок слизистый, плотный, иногда поднимается в виде косички
- ▶ **В полужидких средах** листерии дают характерный рост по уколу, более обильный у поверхности с образованием «купола» и спускающегося вниз хвостика (зонтик)

- ▶ Рост спорадических случаев и вспышек листериоза способствовал выявлению многочисленных уязвимых мест традиционной диагностики
- ▶ Так, в мазках листерии морфологически могут быть сходны с дифтероидами и Гр+ кокками

- ▶ Выделение возбудителя из контаминированного клинического материала и продуктов питания оказалось малоэффективным без селективных компонентов
- ▶ В 80-е годы были созданы селективные среды значительно повышающие эффективность выделения и сократившие сроки идентификации *L.monocytogenes*

Основные селективные компоненты, используемые при выделении листерий

- ▶ **Хлорид лития**
- ▶ Теллурит калия
- ▶ Налидиксовая кислота
- ▶ Акрифлавин
- ▶ Циклогексимид
- ▶ Антибиотики (цефтазидим,
полимиксин В)
- ▶ Эскулин

Селективные и дифференциально-диагностические среды

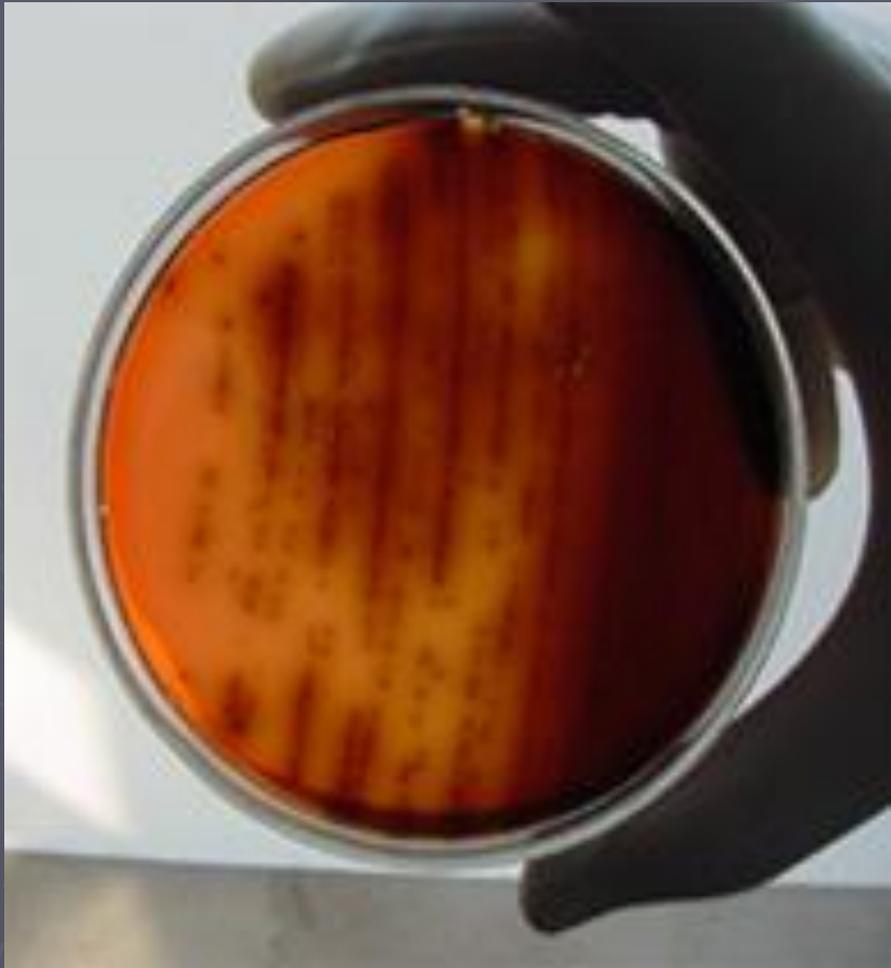
- ▶ МПА + 0,05% теллурита калия + 2% глицерина + 1% глюкозы. Добавление 5-10% сыворотки крови улучшает рост листерий. Образуют колонии черного цвета
- ▶ Наибольшее распространение для выделения листерий получили Оксфорд агар и PALCAM агар

RALCAM - агар

- ▶ Состав - полимиксин, акрифлавин, лития хлорид, цефтазидим, эскулин, маннит, глюкоза, цитрат железа, фенол.-красный
- ▶ Среда красного цвета
- ▶ Листерии гидролизуют эскулин, который реагируя с цитратом железа образует коричнево-черный комплекс

- ▶ Через 24 ч. листерии образуют колонии диаметром 1-2 мм серо-зеленого цвета с черным ободком и черным центром
- ▶ Большинство м/о подавляется
- ▶ Стафилококки и энтерококки образуют оранжевые и желтые колонии (за счет ферментации маннита) без почернения

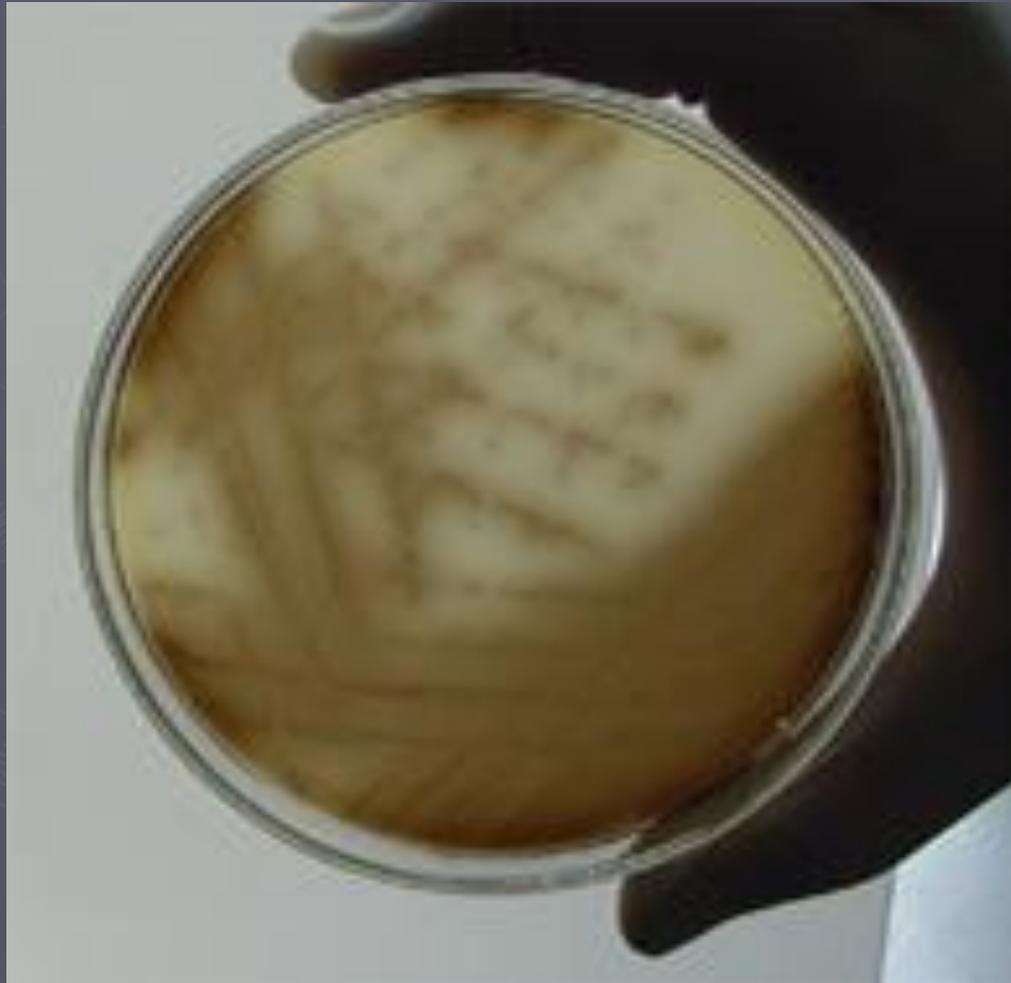
Рост *Listeria monocytogenes* на селективном агаре PALCAM



Оксфорд-агар (и бульон)

- ▶ Состав – литий, эскулин, глюкоза, цитрат железа, акрифлавин, колистин, фосфомицин
- ▶ Среда темно-янтарного цвета
- ▶ Через 24-48 часов вырастают колонии серого цвета до 2 мм с темным ореолом
- ▶ В бульоне – помутнение, потемнение, осадок

Рост *L. monocytogenes* на Оксфордском агаре



- ▶ В качестве сред обогащения обычно используют различные варианты триптиказо-соевого бульона с дрожжевым экстрактом и селективными компонентами
- ▶ Бульон **Фрезера**

Среды разработанные ИМИ им. И. И. Мечникова

- ▶ **Среда обогащения для бактериальных форм листерий (СОБФЛ)** – МПБ, LiCl, налидиксовая к-та, глюкоза
- ▶ **Среда обогащения для L-форм листерий (СОЛФЛ)** (+ NaCl, 5% сыворотки)
- ▶ **ЛНЭАЛ** - селективный агар для листерий
- ▶ **ЛНЭАЛ-L**- селективный агар для L-форм

Биохимические свойства

- ▶ Каталаза +
- ▶ Оксидаза -
- ▶ Ферментируют с образованием кислоты (без Г) глюкозу, мальтозу, рамнозу, эскулин, салицин
- ▶ Не ферментируют маннит
- ▶ Индол-
- ▶ H₂S -
- ▶ Мочевину не гидролизуют
- ▶ МК и ФП+

Антигены

- ▶ **У листерии** выделяют О- и Н- антигены
- ▶ По структуре 14 соматических О-Аг и 5 Н-АГ выделено 16 сероваров: 1/2а, 1/2в, 1/2с, 3а-с, 4а-d, 5, 6, 7.
- ▶ Три серовара (1/2а, 1/2в, 4в) вызывают 90% всех случаев **листериоза человека**
- ▶ Имеются **диагностикумы для РИФ, ИФА**

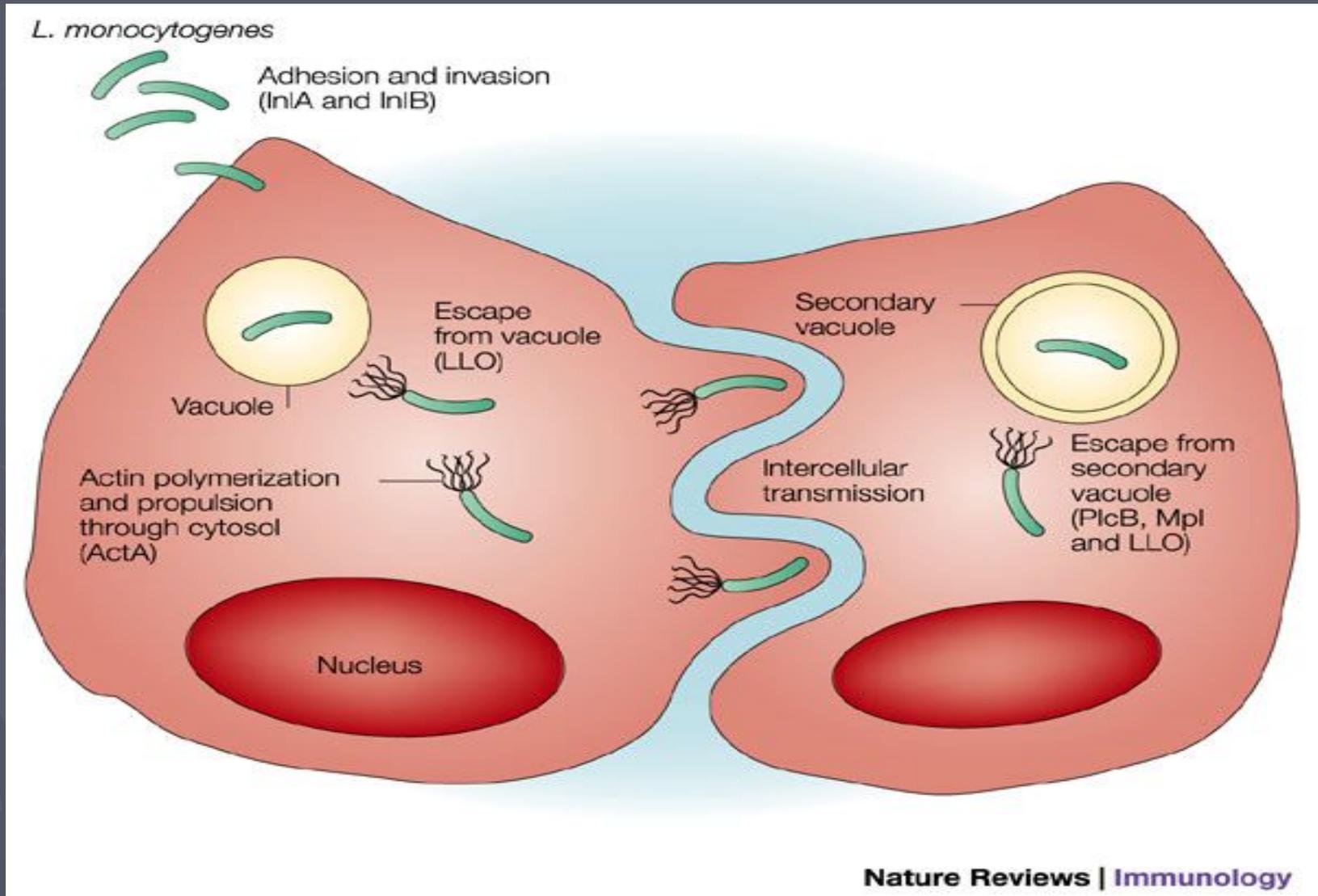
Факторы патогенности

- ▶ **Листерин О** –гемолизин, обладает токсическим эффектом. Способствует размножению листерий в фагоцитах
- ▶ **ЛПС** – эндотоксин (листерия единственная Гр+ бактерия, которая имеет ЛПС сходный с Гр- ЛПС)
- ▶ **Ферменты патогенности** (лецитиназа, фосфолипаза и др.)

Этапы взаимодействия с клеткой организма

- ▶ Лизис первичной вакуоли
- ▶ Деление в цитоплазме клетки
- ▶ Полимеризация актина, необходимая для передвижения листерий по цитоплазме
- ▶ Проникновение в соседнюю клетку путем продавливания мембраны и образования инвагинации в соседнюю клетку
- ▶ Новый цикл деления в соседней клетке.

Проникновение в соседнюю клетку



Лабораторная диагностика

► Кровь

1. Засевают в количестве 10 мл в 100 мл селективной среды (Оксфорд-бульон, Фрейзера, СОБФЛ)
2. В случае отсутствия - в МПБ с 1% глюкозы
3. 0,5 мл из бульона засевают на плотную селективную среду. В случае отсутствия на МПА+1% глюкозы+2% глицерина.

► **СМЖ** центрифугируют

- из осадка делают мазки, окрашивают

1. по Граму

2. иммунофлюоресцентной
листериозной сывороткой

- посев на плотную селективную среду
(или МПА + глюкоза + глицерин) и 5%
КА

- 2-3 мл в жидкую селективную среду или
МПБ с 1% глюкозы

- ▶ **Моча, околоплодные воды (как СМЖ)**
- ▶ **Отделяемое из зева, носа, глаз и влагалища втирают в плотную селективную среду**
- ▶ **Затем тампон отмывают в 1 мл физ. р-ра и смывную жидкость вносят в 5мл жидкой селективной среды**

► Испражнения, меконий :

- 1г засевают в жидкую селективную среду обогащения в соотношении 1:5-1:10.
- 0,5 мл после суспенд. в жидкой среде засевают на плотные селективные среды

► **Из трупных органов** и тканей делают по 2 мазка-отпечатка и окрашивают

1. по Граму
2. иммунофлюоресцентной сывороткой.

Ткани гомогенизируют с физ. р-ром в соотношении 1:5 и высевают 0,5 мл на плотные и 2 мл в жидкие селективные среды.

Посевы инкубируют при 37° 24-48 ч.

- ▶ **2 этап.** Через 24-48 часов при наличии роста из подозрительных колоний делают мазки, окрашивают по Граму и РИФ
- ▶ С плотных сред пересев на скошенный МПА с 1% глюкозы для накопления чистой культуры
- ▶ Со сред обогащения через 48 часов (независимо от наличия роста) пересев на глюкозо-глицерин-сывороточный агар и на 5% КА (при отсутствии роста через 72 ч. – отрицательный ответ)

- ▶ **3 этап. Идентификация культуры:**
- ▶ Окраска по Граму (короткие Гр+ палочки)
- ▶ Каталаза (+)
- ▶ Определение подвижности – посев в 2 пробирки с полужидким агаром; инкубация при 25 и 37° 48-72 ч. (при 25 всегда подвижны – образуют «зонтик» у поверхности пробирки)
- ▶ Учет гемолиза (чаще бета-гемолиз)
- ▶ Посев на среды Гиса (с ксилозой, рамнозой, салицином)

САМР-тест с гемолитическими штаммами *S. aureus* и *R. equi*

- ▶ *S. aureus* и *R. equi* засевают на КА параллельными штрихами на расстоянии 5 см.
- ▶ Перпендикулярно засевают до 6 штаммов исследуемых листерий на расстоянии 1 см друг от друга и 2 мм от линий стафилококка и родококка.
- ▶ Инкубируют при 37° 24-48 ч.

- ▶ **L. monocytogenes** дает расширение зоны гемолиза возле стафилококка и отсутствие усиления гемолиза у родококка
- ▶ **L. ivanovii** дает расширение зоны гемолиза возле родококка и отсутствие усиления гемолиза у стафилококка
- ▶ При отсутствии в музее культуры родококка разрешается постановка теста только со стафилококком

Дифференциальная диагностика

L. monocytogenes L. ivanovii

▶ Ксилоза	-	+
▶ Рамноза	+	-
▶ САМР-тест	стаф.+	стаф.-
▶ L. monocytogenes	Corynebacterium	
▶ Подвижность	+	-
▶ Рост на селект. ср.	+	-
▶ Салицин	+	-
▶ Эскулин	+	-

Выявление листерий в пищевых продуктах

- ▶ Метод гармонизирован с международным стандартом ISO 11290.
- ▶ Проводится соответственно приказу № 558 от 2006 г. и МУ «Организация контроля и методы выявления в пищевых продуктах и продовольственном сырье»
- ▶ Применяются питательные среды международного образца

▶ **1 день**

- ▶ Готовят навески **25г** продукта и засевают в среду для первичного обогащения - бульон Фрезера с пониженной концентрацией а/б, в соотношении 1:9 (в **225** мл)
- ▶ Инкубируют при 37° 24 часа
- ▶ При появлении роста – потемнение среды

▶ 2 день

- ▶ Независимо от наличия роста 0,1 мл пересевает в 10 мл бульона для вторичного обогащения (б-н Фрезера с полной концентрацией а/б)
- ▶ Инкубируют 24-48 часов при 37°
- ▶ Потемнение среды при появлении роста

▶ **3-4 день**

- ▶ Независимо от наличия роста пересев по 0,1 мл на 2 чашки с плотной селективной средой

- ▶ **1. Оксфорд-агар**

- ▶ **2. PALCAM-агар**

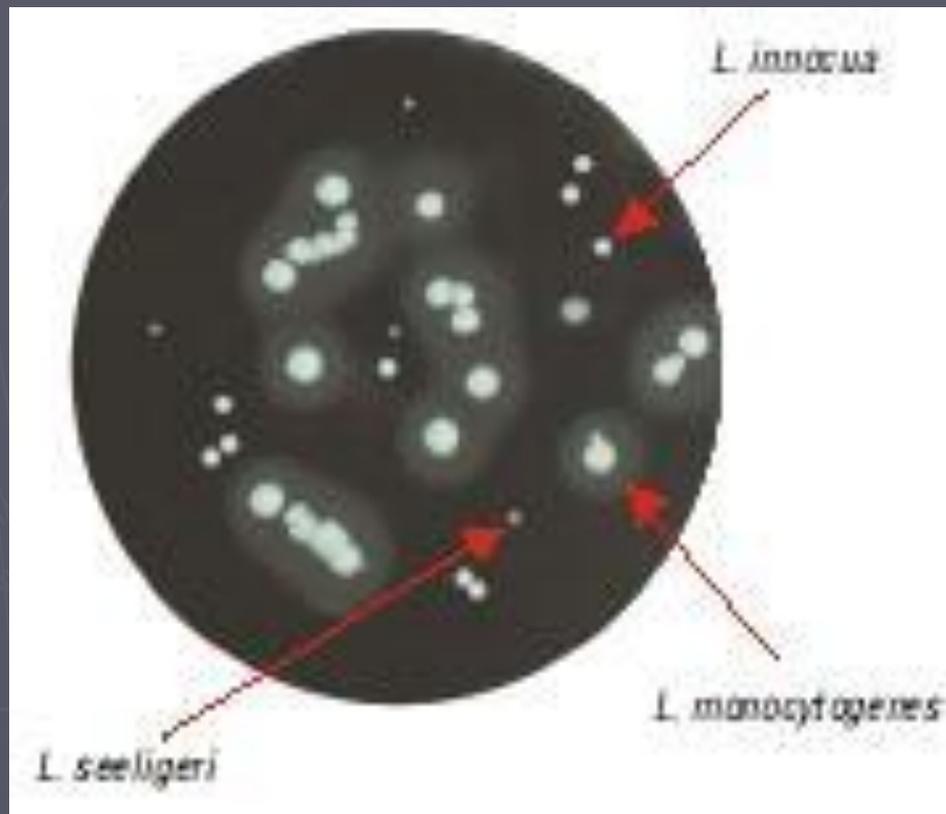
- ▶ Инкубируют при 37° 24-48 часов

- ▶ При отсутствии роста дается отрицательный результат

- ▶ **При наличии роста:**
- ▶ PALCAM-агар – серо-зеленые с черным ореолом
- ▶ Оксфорд-агар – серые с черным ореолом
- ▶ Отбирают 3-5 колоний и пересевают: на ТСЕДА
- ▶ Инкубируют при 37° 24ч.

- ▶ Из чистых культур делают мазки, красят по Граму (короткие Гр+ палочки)
- ▶ Тест на каталазу (+)
- ▶ Определяют подвижность (2 пробирки инкубируют при 25 и при 37 в течение 48-72 часов)
- ▶ Определяют утилизацию маннита (-), ксилозы(-), рамнозы(+)
- ▶ Постановка САМР-теста
- ▶ Определение лецитиназной активности

Лецитиназная активность



На среде с активированным углем и желтком *L. monocytogenes* образует лецитиназу, дает зону помутнения вокруг колнии

L. ivanovii образует лецитиназу на среде с углем и без угля

Ост. листерии лецитиназу не образуют

Тест-система для идентификации листерий Микроген Listeria-ID



► Состав набора:

- 1) Стрипы с лунками – 20 шт.
- 2) Бульон для разведения (флакон стеклянный 3 мл)- 20 шт.
- 3) Реагент Гемолизин для теста на гемолитическую активность (флакон стеклянный 5 мл)- 1 шт.

Субстраты

-  -Эскулин
-  -Маннитол
-  -Ксилоза
-  -Арабитол
-  -Рибоза
-  -Рамноза
-  -Трегалоза
-  -Тагатоза
-  -Глюкоз-1-фосфат
-  -Метил-D-глюкозид
-  -Метил-D-маннозид
-  -Пустая ячейка (тест на гемолиз)

▶ **Применение:**

используется для видовой идентификации чистой культуры листерий

▶ Отбирается отдельная колония, суспендируется в бульоне, раскапывается в лунки

▶ После инкубации 18-24 ч. считывается результат- вид микроорганизма

▶ **Определяемые виды**

▶ *Listeria monocytogenes*

▶ *Listeria ivanovii*

▶ *Listeria seeligeri*

Listeria grayi

Listeria innocua

Listeria welshimeri