

Е.А. Зайцева, Р.Н. Диго

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИСТЕРИОЗА

Учебное пособие



Владивосток
Медицина ДВ
2016



Издательство «Медицина ДВ»
690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 4
Тел.: (423) 245-56-49. E-mail: medicinaDV@mail.ru

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Тихоокеанский государственный медицинский университет

Е.А. Зайцева, Р.Н. Диго

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИСТЕРИОЗА

Учебное пособие



Владивосток
Медицина ДВ
2016

УДК 616.98-078(075.9)

ББК 52.649.226я73

3 177

*Издано по рекомендации редакционно-издательского совета
Тихоокеанского государственного медицинского университета*

Рецензенты:

И.С. Тартаковский – д.б.н., профессор кафедры инфектологии
и вирусологии первого МГМУ им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Л.Н. Федянина – д.м.н., профессор кафедры
фундаментальной медицины Школы биомедицины
Дальневосточного федерального университета
Министерства образования Российской Федерации

Зайцева, Е.А.

3 177 Микробиологическая диагностика листериоза : учебное пособие /
Е.А. Зайцева, Р.Н. Диго. – Владивосток : Медицина ДВ, 2016. – 96 с.
ISBN 978-5-98301-082-6

В данном пособии представлены материалы о современных и классических методах, используемых для выявления, идентификации и типирования листерий. Изложены сведения о микроскопии бактерий для определения морфологических и культуральных особенностей листерий, представлены современные требования и рекомендации по теоретическим аспектам и практической значимости бактериологического метода диагностики листериоза в научно-исследовательской работе и клинической практике.

Учебное пособие составлено по программам подготовки кадров высшей квалификации – программам ординатуры и аспирантуры, по специальностям Бактериология и Микробиология.

УДК 616.98-078(075.9)

ББК 52.649.226я73

ISBN 978-5-98301-082-6

© Е.А. Зайцева, Р.Н. Диго, ТГМУ, 2016

© «Медицина ДВ», 2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГРМ	– гидролизат рыбной муки
КАМП-тест	– метод Christie-Atkins-Munch-Peterson
МПА	– мясо-пептонный агар
МПБ	– мясо-пептонный бульон
ПБЛ	– питательный бульон листериозный
ПЦР	– полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

Листериоз остается малоизвестен в практическом здравоохранении, хотя история изучения возбудителя насчитывает более ста лет. Эта инфекция встречается на всех континентах, в странах с различными социально-экономическими и климатическими условиями.

До 80-х гг. XX столетия листериоз не привлекал к себе большого внимания исследователей, поскольку заболеваемость им была невысокой, проявлялась в разных странах несколькими десятками случаев в год.

Положение с заболеваемостью листериозом коренным образом изменилось в 80-х гг., когда в передовых зарубежных странах (США, Великобритания, Франция, Испания, Италия, Германия и др.) начали возникать эпидемические вспышки листериоза пищевого происхождения с тяжелым клиническим течением и летальностью до 24-40%.

В Российской Федерации заболеваемость листериозом официально регистрируется с 1992 года и до настоящего времени продолжает оставаться на невысоком уровне, выражающемся 40-100 случаями в год при отсутствии эпидемических вспышек. В связи с тем, что листериоз является в настоящее время все еще редко диагностируемым заболеванием и не всегда регистрируется, истинная распространенность этой инфекции среди людей неизвестна.

Редкая регистрация листериоза связана с недостаточным уровнем как клинической, так и лабораторной диагностики. Этим объясняется актуальность проблемы листериоза. Она связана и с увеличением количества иммуносупрессивных больных, людей со сниженным Т-клеточным звеном иммунитета, которых наиболее часто поражает этот возбудитель. Прежде всего это – беременные женщины, люди, страдающие онкологическими заболеваниями; инфицированные вирусом иммунодефицита (ВИЧ-инфекция); лица, длительное время получавшие антибактериальные, кортикостероидные препараты; люди пожилого и старческого возраста, у которых регистрируются наиболее тяжелые формы болезни – септическая и менингоэнцефалитическая; дети до 1 года. В последние годы категорию риска дополняет большая группа молодых лиц – наркоманов, зависимых от внутривенно вводимых наркотиков. Во всех этих случаях присоединяющийся листериоз часто является последним

звеном, приводящим к смертельному исходу. Поэтому в России возникла естественная необходимость активизировать работу по лабораторной диагностике листериоза и усилить ее в направлении повышения профилактики инфекции.

В этой связи становится весьма актуальным применение и усовершенствование селективных, дифференциальных питательных сред для изоляции и идентификации листерий из биологических материалов и окружающей среды, для разработки новых подходов к их типированию с целью выявления наиболее значимых, вирулентных штаммов листерий в инфекционной патологии. Представленные в данном учебном пособии материалы способствуют решению этих вопросов. Эти материалы включают цветные фотографии (сделанные авторами и заимствованные) различных сред, рекомендованных ГОСТ и международным стандартом ISO 11290-1, для изоляции и типирования листерий, широко используемых, как в нашей стране, так и за рубежом, а также собственные авторские разработки.

Учебное пособие предназначено для ординаторов и аспирантов, обучающихся в системе послевузовского профессионального образования по специальностям Бактериология и Микробиология.

1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЛИСТЕРИОЗЕ

1.1. ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛИСТЕРИОЗА

Бактерии рода *Listeria* широко распространены в природе. Эти микроорганизмы, обладая обширными адаптационными возможностями, способны обитать как в организме человека и теплокровных животных, так и в разнообразных объектах окружающей среды (в почве, воде, растениях).

Возбудитель листериоза хорошо адаптирован к влажным, богатым гумусом почвам с реакцией среды близкой к нейтральной. Листерии активно размножаются в почве весной и осенью. Зимнее промерзание почвы не оказывает отрицательного влияния на их жизнеспособность, а высокие летние температуры возбудитель может переживать в L- и R-формах.

Обладая уникальными экологическими возможностями, листерии имеют широкий круг хозяев, существенно отличающихся друг от друга как филогенетически, так и экологически.

Листерииозный микроб выделен из различных видов диких и домашних млекопитающих – овец, коз, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, собак, кошек, птиц, рыб, ракообразных, членистоногих и насекомых. Они найдены у зайцев, леммингов, лисиц, песцов, енотов. Чаще всего *L. monocytogenes* обнаруживается у овец, реже – у свиней и крупного рогатого скота. Лошади могут быть носителями не только *L. monocytogenes*, но и других видов листерий. Животные заражаются через воду и корма, инфицированные листериями, от грызунов или их трупов. Определенную роль в поддержании стационарных очагов болезни играют кровососущие насекомые, особенно пастбищные клещи. Заражаясь от грызунов и других больных животных, они способствуют распространению инфекции, передавая бактерии другим животным.

Листерии могут персистировать в кишечнике практически здоровых людей и животных (от 5 до 90% особей являются носителями микроба). В результате широкого распространения в природе, листерии стали частью микробной экосистемы окружающей среды в местах приготовления и обработки пищевых продуктов, и поэтому они могут попадать в различные продукты питания, а, следовательно, в организм человека.

Листерииоз до 1960 г. у людей был редкостью. Однако в 80-х годах 20-го столетия о листериозе стали говорить как о пищевой инфекции. Были зафиксированы крупные вспышки листериоза людей с высоким

процентом смертельных исходов (30-40%) при употреблении пищевых продуктов животного и растительного происхождения. С этого времени ежегодно в мире регистрируются тысячи заболевших листериозом. Эта инфекция встречается на всех континентах земного шара, о чем свидетельствуют заболевания людей в Европе, Азии, Африке, Южной и Северной Америке.

Отчасти это сопряжено с изменением рациона питания, появлением новых технологий, связанных с производством «удобных продуктов питания», которые не всегда гарантируют санитарное качество пищи. Еще одна причина распространения данного заболевания – постоянно разрастающаяся сеть пунктов общественного питания – кафе, ресторанов, закусочных, столовых, бистро и др. Нельзя исключить еще одну причину возможного создания очага листериоза – это бесконтрольное использование стоков мясоперерабатывающих предприятий, использование органических удобрений от животных, являющихся носителями листерий и т.д.

Выявлены спорадические случаи листериоза человека, отдельные локальные вспышки этого заболевания и случаи контаминации продуктами питания в ряде стран Африки, Азии и Южной Америки. В США ежегодно диагностируется около 1850 спорадических случаев. Чаще всего спорадические случаи листериоза обнаруживают у детей до одного года (более 50%) и у лиц старше 60 лет (около 30 %). В Великобритании ежегодно выявляют около 300 случаев листериоза как среди взрослых, так и среди новорожденных. Широкое распространение листерий в объектах окружающей среды, многообразие клинических проявлений затрудняют установление этиологии и проведение эпидемиологического анализа спорадических случаев листериоза.

Из шести известных видов листерий потенциально патогенными для человека и животных считаются два – *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*.

Механизмы заражения людей многообразны. Инфицирование человека листериями происходит преимущественно алиментарным путем через различные продукты питания (сыры, молоко, мясо, рыбу, овощи и т.д.) на любом этапе их получения, обработки и хранения без участия животных в цикле передачи.

Листерии обнаружены в молоке и молочных продуктах, мясе животных и птиц, овощах, салатах и морских продуктах. Ведущую роль среди них играют молочные продукты, главным образом, непастеризованное или некачественно пастеризованное молоко и изготовленные из него мягкие и рассольные сыры.

Из всех пищевых продуктов именно сыры чаще всего заражены листериями и представляют наибольшую опасность как фактор пере-

дачи инфекции для человека. Наиболее часто листерии выделяют-ся из определенных видов сыров: с красной слизью; твердых сыров, особенно – белых ноздреватых, покрытых красной оболочкой, и, так называемых, «сыров с голубой плесенью». Сливочное масло также может обеспечивать среду для сохранения и роста бактерий рода *Listeria*, включая *L. monocytogenes*.

К числу субстратов, способствующих поддержанию роста *L. monocytogenes*, которые попадают из окружающей среды, относятся нарезанные овощи, мягкие сыры, поверхность мясных продуктов. Из овощей листерии чаще контаминируют картофель и редис.

Многочисленные случаи выделения листерий установлены из сыро-го мяса забитых животных (говядина, свинина, баранина) и домашней птицы. Обнаруживаются *L. monocytogenes* в вареных сосисках, сыровя-ленных и сырокопченых мясопродуктах, готовых к употреблению про-дуктах из птицы, полуфабрикатах для еды «быстрого приготовления».

L. monocytogenes выделяются из широкого спектра морепродук-тов – замороженных креветок, лобстеров, консервированного и све-жего крабового мяса, копченой и маринованной рыбы и т.д. Живая рыба может заражаться патогенными листериями в местах естествен-ного обитания в экологически неблагополучных районах, где сточные бытовые воды и стоки животноводческих ферм, содержащих листе-рии, сбрасываются без очистки непосредственно в районы вылова рыбы. Тепловая обработка рыбного сырья позволяет освободить его от патогенных листерий. Однако при холодном копчении соль и коп-тильный раствор способствуют размножению листерий. Поэтому чаще всего *L. monocytogenes* выделяются из рыбы холодного копчения. Причиной высокой степени зараженности конечной продукции коп-тильных производств является и вторичная контаминация рыбы на производстве в ходе технологического процесса.

Имеется ряд продуктов, где листерии не обнаруживаются – это йогурты (промышленного производства), твердые сыры, шоколад, мармелад, печенье, сырые яблоки и томаты. К настоящему времени выявлены и изучены далеко не все пищевые продукты, которые могут служить потенциальными источниками заражения, и далеко не все возможные механизмы контаминации этих продуктов.

Кроме пищевого, возможен аэрогенный путь заражения при об-работке животного сырья (шерсти, щетины, кожи, шкур, пера, пуха). Встречается контактный путь передачи листерий – через порезы и ссадины на коже при попадании в них различных выделений боль-ных животных. Возможна передача бактерий от человека к человеку,

описаны случаи заражения половым путем. С конца 20 века листериоз стали рассматривать как внутрибольничную инфекцию.

Наибольшему риску заражения листериозом подвергаются беременные женщины, их плоды и новорожденные. Беременные женщины заболевают листериозом в 20 раз чаще, чем другие здоровые люди. Риск развития листериоза более высок при многоплодной беременности. Листерии имеют своеобразный тропизм к мочеполовой системе женщин и, особенно к тканям эмбрионов.

Большую опасность листериоз представляет для лиц с низкими показателями Т-клеточного звена иммунитета, при этом 90% заболевших нуждаются в госпитализации. Это люди, страдающие онкологическими заболеваниями; инфекцией, вызванной вирусом иммунодефицита (ВИЧ); лица, длительное время получавшие антибактериальные, кортикостероидные препараты. Чаще листериозом болеют люди с нарушениями иммунитета в результате предшествующих болезней. В последние годы категорию риска дополняет большая группа молодых лиц – наркоманов, зависящих от внутривенно вводимых наркотиков. Во всех этих случаях присоединяющийся листериоз служит последним звеном, приводящим к смертельному исходу. Наблюдаемое в последнее время увеличение доли лиц пожилого возраста и людей с той или иной формой иммунной недостаточности приводит к увеличению числа тех, кто относится к группе повышенного риска заражения листериозом.

Заболеваемость листериозом может носить профессиональный характер среди работников животноводческих и птицеводческих хозяйств, а также цехов первичной переработки на мясо- и птицекомбинатах. К группе риска следует отнести звероводов, пастухов, чабанов, зооветперсонал, которые заражаются листериями в процессе ухода за больными животными, помощи при родах, соприкосновения с абортрованными плодами и т.д.

1.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Согласно определителю бактерий Берджи род *Listeria* относится к 19-й группе микроорганизмов – грамположительные неспорообразующие палочки правильной формы. В настоящее время выделяют 6 видов бактерий, относящихся к роду *Listeria* – *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*.

Строение клеточной стенки *L. monocytogenes* типично для грамположительных бактерий. Ее основой является пептидогликан, в состав которого входят углеводы, теихоевые кислоты, липопотеины и поверхностные белки.