

И. А. БАКУЛОВ, Д. А. ВАСИЛЬЕВ, Д. В. КОЛБАСОВ,
Е. Н. КОВАЛЕВА, И. Ю. ЕГОРОВА, Ю. О. СЕЛЯНИНОВ

ЛИСТЕРИИ И ЛИСТЕРИОЗ



УЛЬЯНОВСК
2014

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
УЛЬЯНОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ им. П. А. СТОЛЫПИНА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, Д. В. Колбасов,
Е. Н. Ковалева, И. Ю. Егорова, Ю. О. Селянинов

ЛИСТЕРИИ И ЛИСТЕРИОЗ

УЛЬЯНОВСК

2016

УДК 619:616.981.136

ББК 48.73

И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, И. Ю. Егорова, Ю. О. Селянинов. Листерии и листериоз. Монография. — 2-е изд., испр. и доп. — Ульяновск, НИИЦМиБ, 2016. – 334 с.

ISBN 978-5-905970-87-0

В монографии представлены результаты исследований по листериозу более чем за полвека, полученные коллективом научной школы академика РАСХН И. А. Бакулова, а также материалы зарубежных исследователей.

Издание второе исправленное и дополненное.

Рецензенты

СЕМЕНОВ Александр Михайлович — доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

АЛЕШКИН Андрей Владимирович — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского»

ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE
OF VETERINARY VIROLOGY AND MICROBIOLOGY
ULYANOVSK STATE AGRICULTURAL ACADEMY n.a. P. A. STOLYPIN
RESEARCH-AND-DEVELOPMENT INNOVATIVE CENTER
OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

I. A. Bakulov, D. A. Vasylyev, D. B. Kolbasov,
E. N. Kovaleva, I. Y. Egorova, Y. O. Selyaniniov

LISTERIA AND LISTERIOSIS

ULYANOVSK

2016

UDC 619:619.981.136

LBC 48.73

I. A. Bakulov, D. A. Vasylyev, D. B. Kolbasov, E. N. Kovaleva,
I. Y. Egorova, Y. O. Selyaniniyov. *Listeria and Listeriosis. Monograph.*
— 2nd edition, revised and enlarged. — Ulyanovsk. RDICMB, 2016.
— 334 p.

ISBN 978-5-905970-87-0

The monograph presents results of research on Listeriosis received through a more than half a century investigation performed by the team of researchers of the scientific school of the RAAS academician I.A. Bakulov, and the materials of foreign scholars.

Second edition revised and enlarged.

Reviewers

SEMYONOV Alexandr Michaylovitch — doctor of biological sciences, professor, senior research scientist of the department of microbiology of biological faculty of FSBEI HE «Moscow State University named after M.V. Lomonosov»

ALYOSHKIN Andrey Vladimirovitch — doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory of clinical microbiology and biotechnology of FBIS «Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G. N. Gabrichevsky»

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ

БАКУЛОВ Игорь Алексеевич

доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАСХН,
заслуженный деятель науки РФ

ВАСИЛЬЕВ Дмитрий Аркадьевич

доктор биологических наук, профессор, заведующий
кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии
и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

КОЛБАСОВ Денис Владимирович

доктор ветеринарных наук, профессор, директор
Всероссийского научно-исследовательского института
ветеринарной вирусологии и микробиологии

КОВАЛЕВА Елена Николаевна

кандидат биологических наук, доцент кафедры
микробиологии, вирусологии, эпизоотологии
и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

ЕГОРОВА Ирина Юрьевна

доктор ветеринарных наук, доцент, заведующий
лабораторией бактериологии Всероссийского
научно-исследовательского института ветеринарной
вирусологии и микробиологии

СЕЛЯНИНОВ Юрий Олегович

доктор биологических наук, профессор, заведующий
лабораторией экспериментальной микробиологии
Всероссийского научно-исследовательского института
ветеринарной вирусологии и микробиологии



Игорь Алексеевич БАКУЛОВ
Герой Социалистического Труда,
лауреат Государственной премии СССР,
доктор ветеринарных наук, профессор,
академик РАСХН, заслуженный деятель науки РФ

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

Прошло более 100 лет со времени первого описания листериоза. Значение этой инфекции в патологии людей и животных не только не уменьшилось, а даже возросло.

Все первые публикации связаны с обнаружением болезни у кроликов (Лусе во Франции, 1892; Д. Гюльферс в Швеции, 1911) у морских свинок и кроликов (Мюррей, Уэбб и Свэнн в Англии, 1926) у крысоподобного грызуна (Г. Пири в Южной Африке, 1927). В 1931 г. Д. Джилль установил эту болезнь у овец, в 1932 г. Тен-Бритч – у птиц, в 1934 г. Джонс и Литлль – у крупного рогатого скота, в 1936 г. Т. П. Слабоспицкий – у поросят, в 1948 г. Сенкеруд – у лошадей, в 1949 г. Н. Г. Трегубова – у лисиц, в 1964 г. Н. А. Литвинов – у песцов, затем у соболей М. Е. Еремеев, у нутрий – С. Е. Сорина. Кроме того, П. М. Свинцов и другие в 1946г. при микроскопическом исследовании крови свиней, используемых для изготовления кристалвиолет вакцины против чумы свиней, обнаруживали не известные ранее небольшие грамположительные палочки, которые в то время именовали Х-палочками. Впоследствии оказалось, что это были листерии.

Первые сообщения о листериозе у людей связаны с именами Аткинсона (Австралия, 1915), Дюмонта и Котони (Франция, 1918). Вопросы таксономии и классификации были частично решены уже к 1940 году – Г. Пири дал наименование возбудителю болезни - *Listeria monocytogenes*, которое было утверждено Международной Классификационной комиссией и используется до сих пор.

Официальная регистрация болезни, как нозологической единицы, в нашей стране проводится с 1956 года у животных, а у людей с 1992 года.

С 50-х годов XX столетия началось интенсивное изучение листериоза в большинстве стран мира. Этому способствовали Международные конференции, совещания, а главное – Международные Симпозиумы по листериозу (ISOPOL), которые стали проводиться с 1957 года регулярно каждые 4 года, к настоящему времени состоялось уже 14 Симпозиумов.

Был создан подкомитет Всемирной Ассоциации микробиологических обществ по таксономии листерий и эризипелотрикс, в который вошли наиболее видные исследователи листериоза. Особо следует отметить огромный вклад в изучение листериоза выдающегося немецкого ученого-микробиолога Х. Зеелигера (1920-1997), который возглавлял этот Подкомитет и был вдохновителем и организатором проведения Международных Симпозиумов по листериозу. В числе крупных ученых, занимавшихся этой проблемой, следует назвать Д. Джонс (Англия), Ж.Рокурт (Франция), И. Иванова (Болгария), Б. Раловича (Венгрия). Более 15 лет нашу страну представлял в Подкомитете И. А. Бакулов, затем до 2005 года, В. М. Котляров.

Дальнейшие исследования были ознаменованы выделением по всей планете новых штаммов листерий как следствие появлением новых видов: *Listeria grayi* (1966), *Listeria murrayi* (1971), *Listeria innocua* (1979), *Listeria welshimeri* (1983), *Listeria seeligeri* (1983), *Listeria ivanovii* (1984). В это период большое внимание было уделено разработке диагностики листериоза и, в первую очередь, выделению и изучению возбудителя. В СССР был налажен сбор всех выделенных на местах штаммов, их повторная идентификация и типизация во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ). Было разработано «Наставление по лабораторной диагностике листериоза животных» (1971), затем совместные медико-ветеринарные рекомендации (1987), и, наконец, Сборник санитарных и ветеринарных правил (1996). Все это позволило резко снизить процент диагностических ошибок. Советскими исследователями были детально изучены морфология листерий, разработаны методы культивирования, предложены элективные среды, изучены биохимические особенности этих микроорганизмов (П. М. Свинцов, П. П. Сахаров, Е. И. Гудкова, П. С. Соломкин, В. В. Сливко, Н. Г. Трегубова, А. Л. Корнилова, Ю. А. Малахов, И. А. Бакулов, К. Н. Шлыгина, Н. С. Огнева, Г. В. Борисова, А. А. Триполитова, А. А. Аннагиев, В. М. Котляров, З. Н. Меньшикова, В. Е. Белоусов, О. В. Кривоносова, А. А. Цыганова и многие другие).

Изучение серологических свойств листерий позволило разработать схему антигенной структуры листерий (Патерсон, Донкер-Вот, Зеелигер, Д. Джонс), что значительно облегчило идентификацию и типизацию выделяемых штаммов. С этой же целью у нас в стране были получены групповые антигены и специфические сыворотки для серотипизации листерий, разработан не прямой метод иммунофлуоресценции для диагностики листериоза (И. А. Бакулов, В. М. Котляров, 1968). Позднее был предложен специфический антиген для постановки РСК при листериозе (И. А. Бакулов, В. М. Котляров, Д. А. Васильев и др.). Предложены для диагностики листериоза методы иммунофер-

ментного анализа (ИФА) (И. А. Бакулов, Д. А. Васильев и др.), полимеразно-цепной реакции (ПЦР) (И. Л.Обухов, Д. А. Васильев и др.).

В процессе изучения полиморфизма и изменчивости листерий был установлен феномен образования L-форм под действием антибиотиков, воспроизведено экспериментальное заражение L-формами ягнят и выделены L-формы листерий при естественном течении болезни у животных (И. А. Бакулов, В. М. Котляров, Г. А. Котлярова 1968, Т. Я. Зеленцова 1979).

Большое теоретическое и практическое значение имели исследования по изучению явления бактериофагии при листериозе и разработке практического применения этого феномена. Известны ранние публикации М. К. Щегловой (1957-1963), Сворда и Пикета (1961). Группой под руководством И. А. Бакулова (Н. А. Копырина, Т. И. Кольпикова, В. М. Котляров, 1987-1990) разработаны методы идентификации листерий с помощью бактериофага, выявления возбудителя в патологическом материале и в различных объектах внешней среды с помощью реакции нарастания титра фага. Внедренные в практику бактериофаги успешно используются медицинскими и ветеринарными лабораториями.

Исследователи, занимавшиеся проблемой листериоза, неоднократно делали попытки создать средства специфической профилактики этой инфекции. Многочисленными опытами на лабораторных и сельскохозяйственных животных было доказано, что гипериммунные листериозные сыворотки и выделенные из них гаммаглобулины не обладают защитными свойствами при листериозе. Работами А. Армстронга, С. Сворда (1961), А. Нжоку-Оби, Осболда (1962) Макканеса (1962) было показано, что невосприимчивость к листериозу у животных определяется клеточными факторами. Моноциты от иммунизированных против листериоза животных подавляли внутриклеточное размножение листерий.

Для специфической профилактики листериоза изготавливались и испытывались инактивированные и живые вакцины, но до сих пор надежного, безопасного и эффективного защитного препарата не получено. Тем не менее, в некоторых странах листериозные вакцины применялись достаточно широко (И. Иванов, Болгария). В нашей стране для профилактики листериоза использовалась вакцина из штамма АУФ, но в дальнейшем она была снята с производства, так как были получены убедительные данные о недостаточной эффективности этого препарата.

Для лечения листериоза у животных были предложены антибиотики тетрациклинового ряда (И. А. Бакулов, 1960), ампициллин, гентамицин и др.

С самого начала изучения листериоза большое внимание уделялось эпизоотологии и эпидемиологии болезни. Оба этих направления тесно связаны. Силами отечественных и зарубежных исследователей была изучена рас-

пространенность листериоза на земном шаре в различных странах мира, в т.ч. в СССР и в России. Подробно проводилось изучение восприимчивости животных многих видов. Помимо сельскохозяйственных и домашних животных, листерии были выделены при бактериологических исследованиях многих диких животных, представителей различных отрядов: грызунов, хищных, парнокопытных, насекомоядных, рукокрылых, воробьиных, куриных, гусиных, попугаев, сов, хищных птиц.

Были определены основные источники возбудителя инфекции, пути выделения листерий во внешнюю среду, способы заражения, пути распространения болезни, характер течения инфекции, периодичность, сезонность, повторяемость, заболеваемость, смертность, летальность. В этих исследованиях принимали участие многие отечественные ученые: И. А. Бакулов, В. М. Котляров, И. И. Гуславский, С. П. Карпов, Я. П. Лысенко, В. Л. Адамович, В. И. Гершун, Н. С. Огнева, Н. Г. Олсуфьев, Л. А. Поманская, Л. Ф. Пустовая, И. П. Волгин, И. Г. Бузмакев, Г. Г. Юрков и другие, а также многие зарубежные исследователи: О. Асахи, Р. Аа, А. Люка, Донкер-Вот, Д. Джилль, М. Грей, И. Иванов, М. Кхан, Ж. Ларсен, Х. Зеелигер, П. Дарье, К. Елизарова, Е. Кампельмахер, Д. Бленден, С. Ортель, Х. Трайн, Х.Тамм и другие.

Особая опасность листериоза возникла в конце XX века, в связи с установленной контаминацией пищевых продуктов листериями. В связи с этим листериоз получил наименование «пищевой инфекции» (И. А. Бакулов., Д. А. Васильев, 1991) и медицинские специалисты нашей страны с 1992 стали признавать его как эпидемическую инфекцию. В частности ими установлены группы риска у людей – листериоз беременных, новорожденных, пожилых и лиц, для лечения которых использовали препараты и методы, подавляющие защитные способности организма (при пересадке почек и т.д.). У животных к группе риска отнесен целый вид - овцы. Этот этап изучения листериоза – как пищевой инфекции длится и в настоящее время, приобретая все большую актуальность. Был зафиксирован ряд крупных вспышек листериоза людей с высоким уровнем смертности при употреблении пищевых продуктов животного и растительного происхождения (молоко и молочные продукты, сыры, мороженое, квашеная капуста). Эти случаи акцентировали внимание общественности и подчеркнули важность контроля за производством, сбытом и употреблением пищевых продуктов в связи с возможной их контаминацией листериями. Случаи выделения листерий из пищевых продуктов были и до упомянутых вспышек, однако они рассматривались скорее как казус и медики не стремились их обобщать, систематизировать и изучать. В настоящее время листерии обнаруживаются в пищевых продуктах с постоянным нарастанием и это обусловлено не только улучшением методов индикации, но

и биологическими особенностями листерий связанными с новыми технологиями приготовления и хранения пищевых продуктов. В России в связи с этим налажена система контроля за качеством пищевых продуктов отечественного и зарубежного происхождения. Огромное внимание уделяется разработке средств и методов быстрой индикации листерий в пищевых продуктах и методы их обеззараживания.

В 1967 году была опубликована монография (И. А. Бакулов «Листерииоз сельскохозяйственных животных», 1967), посвященная листериозу – инфекционной бактериальной болезни, поражающей сельскохозяйственных, домашних и диких животных различных видов, а также человека. В ней были представлены обобщенные данные зарубежных и отечественных учёных, по этому вопросу, а также результаты собственных исследований. Издание этой книги способствовало привлечению внимания специалистов биологов, эпидемиологов, ветеринарных специалистов к улучшению диагностики, мер борьбы и профилактики.

Надо отметить, что за прошедшее время интерес к листериозу не уменьшился, а возрос. Об этом говорит значительное увеличение количества публикаций по этой проблеме, увеличение числа научных учреждений и специалистов, занимающихся изучением этой болезни, расширение числа стран, в которых стали проводить исследования по проблеме листериоза.

Листерииоз привлек внимание биологов, бактериологов, эпидемиологов, эпизоотологов не только как болезнь, но и как удобная биологическая модель для решения ряда теоретических и практических вопросов иммунологии, генетики бактерий, молекулярной биологии, фармакологии и других. Разработанные за прошедшее время новые методы исследований позволили открыть новые страницы в изучении биологии листерий.

Не смотря на сравнительно длительный период изучения этой болезни, многие вопросы листериоза остаются не решёнными и непонятыми. В частности, еще не в достаточной мере изучены: возбудитель болезни, его биологические характеристики, экология. Не достаточно отработано культивирование штаммов листерий, не предложены оптимальные параметры по определению патогенности листерий, и определения наличия иммунитета при использовании различных противолистерийозных препаратов, не установлено полное видовое различие листерий на генетическом уровне. Не достаточно изучен механизм патогенеза болезни. Необходимо дальнейшее совершенствование диагностики болезни и индикации возбудителя, в особенности в пищевых продуктах. Не разработана рациональная система профилактики и борьбы с листериозом животных и человека.

Все выше описанное заставило нас заняться сбором и обобщением материалов по листериозу, опубликованных в печати, написать книгу с исполь-

зованием данных собственных исследований, полученных за 60 лет научно-исследовательской работы в этом направлении.

В работе над книгой мы использовали литературу по листериозу, опубликованную в отечественной и зарубежной печати. К 1967 году листериозу были посвящены монографии: П. П. Сахарова и Е. И. Гудковой «Листереллезная инфекция» (1950), В. В. Сливко «Листеллёз сельскохозяйственных животных» (1954 г.), Seeliger H.P.R. «Листериоз» (первое издание на немецком языке в 1955 г.), Seeliger H.P.R., Cherry W.B. «Листериоз у людей» (1957), Seeliger H.P.R. «Листериоз» (2-е издание 1958), П. П. Сахарова и Е. И. Гудковой – второе издание «Листереллезная инфекция» (1959), П.С. Соломкин «Листеллёз сельскохозяйственных животных» (1959), издание Seeliger H.P.R. «Листериоз» (1958) было переведено на русский язык в 1959 г., а в 1961 эта книга была переведена на английский язык, в 1965 г. издана книга А. А. Ан-нагиева по листериозу и тогда же книги А. А. Триполитовой и Г. В. Борисовой «Листериоз» (1965 г.), М.А. Бараненкова «Листериоз животных» (1965), M.L. Gray, A.H. Killinger «Листерии и листериоз» (1966).

За последующие 40 лет после издания монографии И. А. Бакулова «Листериоз сельскохозяйственных животных», опубликованы монографии: Р. В. Гребенюк и др. «Роль диких животных и кровососущих членистоногих в эпизоотологии листериоза» (1972), В. И. Гершуна «Листериоз сельскохозяйственных животных» (1981), В. Ralovich «Listeriosis research» (1984), Н. М. Калишина «Листериоз крупного рогатого скота» (1986), Г.А.Котляровой «Формы гетероморфизма *Listeria monocytogenes* и их значение при листериозной инфекции» (1989), И. А. Бакулова, Д. А. Васильева «Листериоз как пищевая инфекция» (1991), книги Elliot. T. Ryser «*Listeria. Listeriosis and Food Safety*» (1999) и И. С. Тартаковского и др. «Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика» (2002). Все эти работы, а также материалы докторских диссертаций отечественных и зарубежных авторов, защищенных в этот период: И. И. Гуславский «Эпизоотологические особенности листериоза и усовершенствование мер борьбы» (1980), Lammers J. S. «*Erstellung einer Pruforschrift fur Listeria-Lebendimpfstoffe*» (ФРГ, 1983), Д. А. Васильев «Теоретическое обоснование и разработка основных направлений в профилактике пищевого листериоза» (1994), Ericsson H. «*Methods based on molecular biology for characterization and detection of Listeria monocytogenes*» (1997), Loncarevic S. «*Listeria monocytogenes with special reference to food and human listeriosis*» (1998), Waak. *Listeria monocytogenes: Doct.dissert. -Sweden* (2002) были проанализированы в данной монографии.

Предлагаемая книга рассчитана на внимание со стороны практических врачей, а также научных работников, ведущих исследования в области борьбы с инфекционными болезнями человека и животных.

Авторы будут щедро вознаграждены за свой труд, если эта книга окажет помощь в деле профилактики и ликвидации инфекционных болезней, а также заранее приносят благодарность всем, высказавшим свои замечания по этой работе.

Д. А. Васильев

*д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Ушёл из жизни первый автор и инициатор этой книги Игорь Алексеевич Бакулов. С 1956 года когда ему утвердили тему кандидатской диссертации и всю свою дальнейшую научную жизнь он продолжал заниматься листериозной тематикой. Игорь Алексеевич свою первую монографию по листериозу – «Листериоз сельскохозяйственных животных», на основе которой ему присуждена степень доктора наук, выпустил в 1967 году, обобщив в ней результаты своей десятилетней деятельности в этой области. Результаты исследований по листериозу следующих 40 лет полученные учениками Игоря Алексеевича (В. М. Котляров, Г. А. Котлярова, З. Н. Меньшикова, О. В. Кривоносова, Н. А. Капырина, Т. Я. Зеленцова, Т. И. Кольпикова, Д. А. Васильев) под его непосредственным научным руководством, обобщены в монографии «Листерии и листериоз» изданной в 2008 году.

Прошло более семи лет после издания указанной книги, но интерес к данной инфекции только возрастает, открываются новые грани её коварства. Присылают запросы на изданную книгу. Всё это обосновало необходимость переиздать данную монографию. Немаловажным фактором было и стремление авторов вновь вспомнить своего учителя и увидеть его фамилию совместно со своими именами.

И. А. Бакулов родился 13 августа 1925 г.

Трудовую деятельность начал в ноябре 1941 г. слесарем, работал радистом. Служил в рядах Советской Армии с 1943 по 1954 гг. В 1944 г. окончил Камышловское пехотное училище и был командиром взвода на 4-ом Украинском фронте. В 1951 г. с отличием и золотой медалью окончил Военноветеринарный факультет при Московской ветеринарной академии. После демобилизации работал главным ветврачом молочного хозяйства. С 1956 по 1959 гг. аспирант кафедры эпизоотологии Московской ветеринарной академии, затем ассистент, доцент этой кафедры. С 1962 по 1963 гг. инструктор отдела ЦК КПСС. С ноября 1963 г. директор ВНИИВВиМ. Под его руковод-



Подкомитет по таксономии листерий международного союза микробиологических обществ (International Union of Microbiological Societies). Состав подкомитета. Справа налево: первый ряд – И. Иванов (Болгария), Х. Зеелигер (Германия), Л. Бозилова (Болгария), Г. Велшимер (США), Д. Джонс (Англия), С. Ортель (Германия); второй ряд – И. А. Бакулов (Россия), М. Вудбайн (Англия), М. Трущинский (Польша), Б. Ралович (Венгрия), А. Куртье (Франция), Р. Дикштра (Голландия) (Болгария, София, 1977 г.).

ством был построен, оснащен и укомплектован институт. С 1990 г. советник при дирекции ВНИИВВиМ.

Научная деятельность И. А. Бакулова посвящена микробиологии и эпизоотологии. Ему принадлежат многочисленные исследования в области общей эпизоотологии и географической эпизоотологии: проведена большая работа по классификации инфекционных болезней и по внедрению унифицированной эпизоотологической терминологии. Большой вклад сделан в дело изучения географии болезней зарубежных стран, впервые в стране им в соавторстве по этим вопросам выпущена монография. Он являлся ведущим эпизоотологом в нашей стране. Провел исследования по изучению сибирской язвы, результатом которых было создание вакцины из штамма 55-ВНИИНВиМ; микоплазма КРС, усовершенствование методов диагностики данного заболевания. Активное участие И. А. Бакулов принимал в разработке и внедрении в практику аэрозольного метода иммунизации животных. В области санитарной микробиологии — усовершенствования систем обеззараживания сточных вод. Участвовал в изучении африканской чумы свиней, катаральной лихорадки овец, везикулярной болезни свиней, КПП крупного рогатого скота, пастереллеза оленей, ВГБК. Лично и в соавторстве опубликовал свыше 500 работ, в т. ч. монографий, учебников и пособий — 44. Имел 64 авторских свидетельств на изобретения и патента. Научная школа И. А. Бакулова включает 44 кандидата наук и 14 докторов.



Участники международного симпозиума по пищевым инфекциям человека и животных (Россия, 1995 г.).

По учебникам и учебным пособиям, написанным И. А. Бакуловым лично и в соавторстве более 30 лет готовят в ВУЗах и техникумах специалистов по эпизоотологии и ветеринарной микробиологии. Являлся членом редколлегии ветеринарной энциклопедии, ветеринарного энциклопедического словаря, научным консультантом большой советской и сельскохозяйственной энциклопедий. Активно участвовал в работе редсовета журнала «Доклады РАСХН» редколлегии журнала «Ветеринария», секции «Инфекционная патология животных» отделения ветеринарной медицины РАСХН», диссертационных советов ВНИИВВиМ, УГСХА. Долгие годы Игорь Алексеевич входил в состав подкомитета по таксономии листерий Международной ассоциации Микробиологических обществ, был консультантом МЭБ по болезням диких животных.

Герой Социалистического Труда. Награжден орденами: Ленина, Октябрьской Революции, Отечественной войны II степени, Трудового Красного Знамени, Знак Почета», За заслуги перед Отечеством IV и III степени, 15 медалями а также дипломом Почета и медалями ВДНХ и ВВЦ.

*Д. А. Васильев
д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

ЧАСТЬ I

ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛИСТЕРИОЗА

ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Первое описание *Listeria monocytogenes*, было опубликовано Е. Murray и др. в 1926 году. Вероятно, в более ранних сообщениях было описано выделение листерий, из них наибольшее доверие внушает сообщение Hulpens. Однако авторы этих сообщений не создали из своих изолятов постоянной коллекции, поэтому в дальнейшем проведение исследований или сравнительного анализа со штаммами, выделенными позднее, было невозможным.

В 1924 году Е. Murray и др. наблюдали шесть случаев внезапной гибели молодых кроликов в зверопитомнике Отдела патологии Кембриджского университета. Еще более многочисленные случаи имели место в течение последующих 15 месяцев. Особенности проявления болезни и возрастающая смертность способствовали организации исследований. В то время авторы писали: «Как естественная, так и экспериментальная болезнь обладают любопытными характерными особенностями, анализ которых привел нас к заключению, что возбудитель либо ранее не был описан, либо был описан неадекватно, поэтому информацию о нем нельзя найти в литературе. Как бы то ни было, мы считаем возможным дать ему название. Основной его особенностью является выработка мощного моноклеарного лейкоцитоза. Это – наиболее важная и наиболее любопытная характерная особенность, открытая нами, поэтому микроорганизм, описанный в настоящей статье, мы назвали «*Bacterium monocytogenes*». Вопрос о наименовании рода является более сложным, и мы еще не достигли успеха, пытаюсь связать изучаемый нами микроорганизм со многими другим родами, представленными в Руководстве по таксономии в бактериологии Берджи (1925). В настоящее время мы предлагаем использовать неопределенный термин *Bacterium*, поскольку, если с существующим в настоящее время хаосом будет покончено и классификация, утвержденная Американским обществом бактериологов, будет усовершенствована, то это будет достигнуто только благодаря сотруд-

ничеству, поэтому, имея в виду эту цель, мы не можем использовать термин *Bacillus*».

В 1927 году в ходе исследования необычных случаев гибели, наблюдавшихся среди песчанок в окрестностях Йоханнесбурга, Южная Африка, J. H. Pirie открыл новый микроорганизм, который вызывал заболевание, определённое им как «болезнь реки Тигер». Он назвал этот новый инфекционный агент «*Listerelia hepatoiytica*» по следующим причинам: «Возбудителем является грамположительная бацилла, для наименования которой, исходя из вызываемого ею в высшей степени мощного патологического эффекта, я предлагаю специальный термин «*hepatoiytica*», а для наименования рода – «*Listerelia*», в честь лорда Листера, одного из наиболее выдающегося исследователей в области бактериологии, имя, которого не было увековечено в бактериологической номенклатуре».

Оба первооткрывателя: E. Murraу и J. H. Pirie отправили обнаруженные ими штаммы в Государственную коллекцию типовых культур (Институт Листера, Лондон). Доктор Ленинхэм, директор коллекции, был поражен сходством этих двух микроорганизмов и связался с авторами. Поскольку идентичность их была очевидна, они приняли решение назвать этот вид бактерии «*Listerella monocytogenes*».

Однако в 1939 году Арбитражная комиссия Международного комитета по систематике в области бактериологии отвергла название рода «*Listerella*», поскольку ранее, в 1906 году, оно было использовано для обозначения представителей мицетозойных – слизевиков в честь Артура Листера (младшего брата лорда Листера) и для обозначения вида фораминиферы – представителя морских простейших в 1933 году в честь Джозефа Джексона Листера (отца лорда Листера). Как отмечал Гиббонс в 1972 году, случай, когда одно и то же имя было выбрано для обозначения трех совершенно различных групп микроорганизмов для увековечения заслуг отца и двух его сыновей, является уникальным. В следующем, 1940 году, Пири предложил название *Listeria*.

Ранее и даже впоследствии для обозначения *Listeria monocytogenes* использовались многочисленные названия: *Bacterium monocytogenes hominis* и позднее *Listerella hominis* – Найфельдтом, который считал их возбудителями инфекционного мононуклеоза; *Corynebacterium parvulum* – Шульцем и др. в 1934 году, *Listeria ovis* – Гиллом в 1937 году, *Listeria bovina*, *L.gallinaria*, *L.cunniculi* и *L.gerbilli* – Найфельдтом; *Erysipelothrix monocytogenes* – Уилсоном и Майлсом в 1946 году.

В отличие от некоторых патогенных агентов, ответственных за вспышки инфекционных заболеваний, оставлявшие заметный след в истории человечества в течение веков, как, например, *Vibrio cholerae* или *Yersinia pestis*,

L.monocytogenes и листериоз не имеют давней истории. Болезнь официально начинает свой отсчет в 1924 году. Первый подтвержденный диагноз был поставлен солдату, больному менингитом, в конце I Мировой войны (ретроспективная идентификация данного штамма); до указанного случая заболевания, подтвержденные результаты наблюдений отсутствуют. Вместе с тем, интересным представляется предположение одного из историков о том, что *L.monocytogenes*, возможно, послужили причиной 17 неудачных беременностей королевы Анны в 17 веке.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОЗИЦИЯ РОДА *LISTERIA*

Родство представителей рода *Listeria* с другими бактериями оставалось неясным до 1970-х годов. Отсутствовавший в первых трех изданиях Руководства по таксономической бактериологии Берджи, опубликованных в 1923, 1925 и 1930 годах, род *Listeria* был включен в трибу *Kurthia* семейства *Corynebacteriaceae* в следующем издании 1934 года. В шестом и седьмом изданиях (опубликованных соответственно в 1948 и 1957 годах) род *Listeria* все еще значился представителем *Corynebacteriaceae*, тогда как в следующем издании (1974) *Listeria* рассматривался как род неопределенного происхождения и вместе с *Erysipelothrix* был отнесен к семейству *Lactobacillaceae*. Наконец, *Listeria* вместе с *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* и *Caryophanon* в Руководстве по систематике бактериологии Берджи были отнесены к «обычным (regular) неспорообразующим грамположительным ветвям». Как же можно объяснить эти повторяющиеся реклассификации? Исходя из морфологического сходства (грамположительная, неспорообразующая ветвь) род *Listeria* долгое время ассоциировался с коринеформной группой бактерий. Однако с последующим введением и развитием нумерической таксономии, хемотаксономии, ДНК/ДНК гибридизации и, позднее, секвенирования рибосомной РНК (рРНК) филогенетическая позиция рода *Listeria* была определена более ясно.

С развитием компьютерных методов обработки большого количества данных нумерическая таксономия дала возможность проведения первых попыток глубокого изучения филогенетической позиции *Listeria* среди грамположительных бактерий. В ходе первых исследований *Listeria* была причислена к коринеформным бактериям и актиномицетам и, следовательно, располагалась либо с коринебактериями, либо в неопределенной позиции.

С другой стороны, начиная с 1969 года при проведении сравнительного анализа *Listeria* с различными представителями кисломолочных бактерий, были описаны более естественные родственные связи. Близкородственное положение этих микроорганизмов было четко продемонстрировано в 1975 году путем проведения расширенного нумерическо-таксономического комплексного исследования, осуществленного Джонсом, исследовавшим 173 характеристики 233 штаммов различных родов, включая как коринеформные, так и молочнокислые бактерии. Уточненная позиция *Listeria* позднее исследовалась Уилкинсоном и Джонсом (1977) и Ферезу и Джоносом (1988). Исходя из вышеупомянутых работ, стало ясно, что *Listeria* отличаются от всех других известных родов, включая *Erysipelothrix* и *Brochothrix thermosphacta* (ранее *Microbacterium thermosphactum*), и что он является близкородственным *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Таким образом, Уилкинсон и Джонс предположили, что *Listeria*, *Gemella*, *Brochothrix*, *Streptococcus* и *Lactobacillus* относятся к семейству *Lactobacillaceae*. Несмотря на небольшую неточность в отношении позиции по более близкому таксономическому родству, в особенности *Brochothrix*, некоторых лактобацилл и *Corynebacterium*, выводы, сделанные на основе нумерического анализа данных по большому количеству фенотипических характеристик, явились предшественниками современной филогенетической классификации рода *Listeria*.

В решении вопроса о филогенетической позиции рода *Listeira* особенно полезным оказался ряд генотаксономических маркеров, более четко демонстрирующих его специфичность по сравнению с коринеформными бактериями, и сходство с молочнокислыми бактериями, выявленное в ходе нумерических таксономических исследований. Процентное содержание G+C в ДНК изолятов *L.monocytogenes* находится в пределах 36 – 42 %, что свидетельствует о том, что *Listeria* относятся к группе грамположительных бактерий с низким (7 %) процентным показателем содержания G+C в ДНК.

Из клеточной стенки *L.monocytogenes* были выделены липотейхоевые кислоты (амфильные полимеры цитоплазматических мембран). Эти кислоты состоят из гидрофильных полиглицерофосфатных цепей, ковалентно сцепленных с глико- и фосфатидилгликолипидами, гидрофильными компонентами этих молекул, и демонстрируют структурные аналоги с липотейхоевыми кислотами из других бактерий. Несмотря на то, что липотейхоевые кислоты, может быть, имеют четкую структурную несхожесть в своих гидрофильных и липофильных компонентах, известно, что данная липотейхоевая кислота является весьма устойчивой характерной чертой и, таким образом, может использоваться в качестве таксономического маркера. В отношении *Listeria* присутствие определенных липотейхоевых кислот служит дополнительным подтверждением того, что данный род яв-

ляется биохимически отчетливо выраженным таксоном. Кроме того, липотейхоевые кислоты отсутствуют у коринеформных бактерий, но обнаружены у представителей *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*, это свидетельствует о том, что *Listeria* и эти микроорганизмы должны относиться к одной группе. За исключением одного сообщения, полученные данные указывают на отсутствии в листериях свободных миколовых кислот, специфичные для грамположительных бактерий с высоким процентным содержанием G+C в ДНК. Присутствие респираторных менахинонов (menaquinons) метиловой подгруппы подтверждают близкое родство *Listeria* и *Brochothrix* и относительно более значительную несхожесть с лактобациллами. Исследование профилей РНК с низкой молекулярной массой также подтверждает своеобразие *L.monocytogenes* среди других грамположительных таксонов.

Результаты секвенирования рРНК 16S свидетельствовали о том, что сублиния *Listeria* – *Brochothrix* приблизительно в равной степени дистанцирована от сублиний *Bacillus* и *Enterococcus* – *Corynebacterium*. Исходя из вышеуказанных данных и хемотаксономических свойств, можно считать, что:

а) *Listeria* является филогенетически отдаленным от *Lactobacillus* и не должен включаться в семейство *Lactobacillaceae*;

б) сублиния *Listeria* – *Brochothrix*, вероятно, заслуживает того, чтобы ее выделили в отдельное семейство, *Listeriaceae*. Эта значительная несхожесть *Lactobacillus* и *Listeria* была подтверждена методом секвенирования рРНК 23S, причем *Listeria* обладала наибольшим сходством с *Bacillus* и *Staphylococcus*.

Собранные на протяжении трех последних десятилетий данные ясно показывают, что *Listeria* является четко выраженным таксоном, обладающим рядом характерных свойств, отличающих его от сопредельных таксонов. Как явствует из результатов многочисленных исследований фенотипических и хемотаксономических свойств – низкое процентное содержание G+C в ДНК, отсутствие миколовых кислот и присутствие липотейхоевой кислоты с секвенированием рРНК, это не коринеформные бактерии. Вместе с тем, точная филогенетическая позиция данного рода остается спорной. Несмотря на то, что в целом достигнуто согласие в том, что ближайшим соседом *Listeria* является *Brochothrix*, его связь с другими грамположительными бактериями с низким содержанием G+C в ДНК, и особенно с *Lactobacillus*, требует дальнейшего исследования.

МЕЖРОДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ

По тинкториальным свойствам представителей рода *Listeria* чаще всего можно принять за бактерии родов: *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* и *Kurthia*. В таблице 1.1. приведены свойства, наиболее часто используемые бактериологами при дифференцировании микроорганизмов рода *Listeria* от бактерий других родов так же грамположительных, не образующих спор, имеющих форму палочек.

Коккобацилярные формы рода *Listeria* похожи на стрептококки, но эта проблема решается с помощью реакции на каталазу.

Листерии легко отличить от членов рода *Kurthia* по ферментации различных сахаров – виды *Kurthia* в реакциях ферментации, либо образуют небольшое количество кислоты, либо вообще её не образуют.

Культуру листерий дифференцируют от бактерий *Erysipelothrix* по реакции на каталазу, хорошему росту на обычных питательных средах, образованию колоний с заметным сине-зелёным блеском на триптозном агаре при исследовании под микроскопом методом косого освещения, подвижности, более сильной сахаролитической активности, гидролизу эскулина и гиппурата натрия. Есть отличия *Listeria* и *Erysipelothrix* по антигенному составу.

Листерии можно отличить от большинства лактобацилл по наличию у первых положительной реакции на каталазу. Существуют, однако, каталазо-положительные лактобациллы и некоторые штаммы листерий, являющиеся каталазоотрицательными. Бактерии рода *Listeria* очень медленно растут или вообще не растут на среде MRS (de Mann et al. 1960), на которой очень хорошо растут лактобациллы. Исследования показали, что штаммы *Listeria*, культивируемые при комнатной температуре подвижны, а большинство лактоба-

Таблица 1.1. Межродовая дифференциация листерий

Род	Тест или признак					
	Подвижность, t °C	Требования O ₂	Рост при 37 °C	Каталаза	Продукцирование H ₂ S	Кислота из глюкозы
<i>Brochothrix</i>	–	Факультативные	–	+	–	+
<i>Erysipelotrix</i>	–	Факультативные	+	–	+	+
<i>Listeria</i>	+ 20 – 25 °C	Факультативные	+	+	–	+
<i>Lactobacillus</i>	–	Факультативные	+	–	–	+
<i>Kurtia</i>	+	Строгие аэробы	+	+	–	–

цилл не подвижны. При микроскопическом исследовании методом косого освещения колонии лактобацилл на триптозном агаре не имеют сине-зелёного оттенка. Различие между двумя родами заключается также в ферментации. Серологически род *Listeria* и род *Lactobacillus* отличаются друг от друга.

ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA*

Морфология

Listeria – грамположительная палочка небольшого размера (0,4-0,5 мкм диаметром и 0,5-2 мкм длиной) правильной формы с закругленными концами. Клетки располагаются по отдельности или в виде коротких цепочек, могут образовывать V- и Y-образные структуры, либо замкнутые линии (palisades). Иногда клетки коккоподобные и их можно легко принять за стрептококки. В старых культурах некоторые клетки теряют способность к сохранению грам-красителя и ошибочно принимаются за *Haemophilus*. В старых и грубых (rough) культурах, а также после осмотического шока появляются длинные, тонкие филаментозные клетки. *Listeria* не вырабатывают спор и не образуют капсул, но в ряде случаев способны выделять капсулоподобное вещество.

Вследствие образования у них перитрихальных жгутиков *Listeria* при культивировании при 20-25 °С обладают подвижностью (при 37 °С подвижность отсутствует либо весьма незначительна). Препараты в висячей капле свежих культур в триптозно-фосфатном бульоне, инкубированные при 20 °С, проявляют характерную беспорядочную подвижность: клетки начинают совершать вращательные движения и извиваться, скорость движений возрастает, при этом они становятся эксцентрическими, после чего неожиданно и быстро расходятся в разных направлениях. Культивирование с введением материала путем прокалывания в полужидкой среде вызывает типичную картину роста, напоминающую зонтик или перевернутую елочку, расположенную приблизительно в 0,5 сантиметра от поверхности, что объясняется микроаэрофильным характером дыхания данного микроорганизма. Отмечено, что *L.monocytogenes* и *L.innocua* заметно отличаются по подвижности и выработке флагеллина при температуре 37 °С: штаммы *L.monocytogenes* практически неподвижны и вырабатывают флагеллин в малом или не поддающемся обнаружению количестве, тогда как штаммы *L.innocua* часто подвижны и вырабатывают флагеллин в значительных количествах.

Культивирование

На питательном агаре после 24-часового инкубирования листерий образуются колонии диаметром 0,2-0,8 мм, ровные, точкообразные, голубовато-зеленоватого цвета, полупрозрачные, слегка приподнятые, с мелкой текстурой поверхности и ровной кромкой. Через 5-10 суток четко очерченные колонии могут иметь диаметр 5 мм и больше. При исследовании культур *Listeria*, выращиваемых в течение 18-24 часов при 37 °С, под бинокулярным микроскопом при непрямом освещении, у ровных колоний отмечают типичную сине-зеленую радужность (iridescence). Даже в случае, когда популяция контаминантов довольно высока, а популяция листерий низкая, *Listeria* тем не менее, поддаются распознаванию. Иногда могут наблюдаться грубые R-формы (rough) колонии. Преобразование гладких S-форм (smought) колоний в грубые является необратимым. Наблюдаются различия по вирулентности между грубыми и гладкими колониями. Описано образование мелких колоний штаммами, выращенными на эскулин-содержащем агаре.

Listeria хорошо культивируются на большинстве обычно используемых бактериологических сред. Скорость роста возрастает при добавлении доступного к ферментации сахара, в особенности глюкозы. На планшетной культуре *Listeria* обладают особенно резким кислым запахом, возможно, вызываемым образованием спиртов, карбоксильных и гидроксильных кислот. В бульоне среда становится мутной после 8-24-часовой инкубации при 37 °С. Интенсивный (profuse) рост всегда наблюдается вблизи поверхности среды, что указывает на склонность листерий к ускоренному росту при показателях кислородного потенциала (oxugen tension) ниже такового в воздухе. Предельные показатели температуры, пригодной для роста, составляют +1-2 °С и 45 °С. Однако имеется сообщение о факте размножения в курином бульоне и пастеризованном молоке при продолжительном инкубировании при температуре в пределах от -0,1 до 0,4 °С. При пониженных температурах рост происходит медленно, например, в обезжиренном молоке при +4 °С время жизни поколения составляет 30-40 часов. Данное свойство впервые было использовано Gray M.L. и др. для селективного обогащения контаминированного образца в условиях холода. В бульоне листерии обычно растут при показателе рН 4,4-9,6, оптимальный уровень рН 7,0. Рост может происходить в средах, содержащих 10 % (вес/объем) NaCl, при более высоких концентрациях солей имеет место переживание. Переживание при низком показателе рН и высокой концентрации солей в сильной мере зависит от температур.

Метаболизм и биохимические свойства

Listeria являются аэробными, микроаэрофильными, факультативно анаэробными, каталаза-положительными (изредка наблюдаются каталаза-отрицательные штаммы) и оксидаза-отрицательными бактериями. *Listeria* являются гомоферментативными. Все штаммы растут на средах, содержащих глюкозу, в аэробных условиях с образованием лактата, ацетата и ацетоина (acetoine) в качестве конечных продуктов. Ацетоин в анаэробных условиях не вырабатывается. В анаэробных условиях рост поддерживают только гексозы и пентозы, в аэробных – рост некоторых штаммов поддерживают мальтоза и лактоза, но не сахароза. Катаболизм глюкозы происходит по метаболическому пути Эмбдена-Мейерхофа, как в аэробных, так и в анаэробных условиях. *L.monocytogenes* импортирует глюкозу фосфоэнолпируват-зависимой фосфотрансферазной системой с высоким аффинитетом. Все штаммы являются положительными в реакциях Voges-Proskauer и с метиловым красным. Кислота также вырабатывается из амигдалина, целлобиозы, фруктозы, маннозы, салицина, мальтозы, декстрина, альфа-метил-Б-глюкозида и глицерина. Выработка кислот из галактозы, лактозы, мелезитозы, сорбитола, крахмала, сахарозы и трегалозы изменчива. Кислота почти никогда не вырабатывается из адонитола, арабинозы, дульцитол (dulcitol), эритритола, гликогена, инозитола, инулина, мелибиозы, раффинозы и сорбозы. Фенилламиндиаминаза-, орнитин-, лизин- и аргинин-декарбоксилазы не образуются. H_2S и индол не образуют, мочевины не гидролизуют в слабой степени, восстанавливают нитраты до нитритов.

Все виды *Listeria* фенотипически весьма сходны, однако поддаются дифференциации с применением следующих тестов: на гемолиз, выработку кислот из D-ксилозы, L-рамнозы, альфа-метил-Б-маннозида и маннитола. Черты фенотипического сходства согласуются с высокой геномной гомологией между различными видами.

Ключевой характеристикой при определении вида изолятов и, несомненно, характеристикой, наиболее сложной в плане обнаружения, является гемолиз. В ходе совместных исследований в области идентификации *Listeria* Хиггинс и Robinson B.B. отмечали, что высокая процентная доля ошибок при идентификации *L.seeligeri* и *L.ivanovii* обусловлена неточным прочтением результатов САМР-теста¹ и гемолиза. Изоляты *L.monocytogenes* и *L.seeligeri* образуют узкие, слегка прозрачные (clearing) зоны бета-гемолиза. *L.ivanovii* образуют широкие, четко очерченные зоны бета-гемолиза. На-

¹ Первоначально САМР-тест описан Кристи, Аткинсоном и Мюнх-Петерсоном, наблюдавших данное явление лизиса со стрептококком в 1944 году, отсюда и название теста – по первым буквам фамилий указанных авторов.

против, *L.innocua*, *L.welshimeri* и *L.grayi* (sub. gray и sub. murrayi) не являются гемолитическими. *L.innocua* в определенных средах способны образовывать зону гемолиза с зеленоватым оттенком. *L.monocytogenes* лизируют эритроциты овец, лошадей, КРС, морских свинок, кролика, поросят и человека. Разработаны различные методы выявления гемолитической активности, особенно необходимые для работы слабо гемолитическими штаммами (*L.seeligeri* и некоторыми изолятами *L.monocytogenes*), включающие в себя исследование гемолиза под колонией, продолжительное инкубирование (48 часов), инкубирование в течение нескольких часов при +4 °С, использование тонкослойных пластин кровяного агара, нескольких сред, тесты в пробирках (tube tests) и методики на основе микропланшетов с использованием эритроцитарных суспензий, добавление в кровяной агар экзосубстанции из *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* или *L.ivanovii* и CAMP-тест с использованием *S.aureus* и *R.equi*. Положительные реакции CAMP-теста проявляются в виде образования выраженной зоны бета-гемолиза в соседствующих областях роста исследуемых штаммов *L.monocytogenes* и *L.seeligeri* с *S.aureus* и *L.ivanovii* с *R.equi*. Имеются сообщения о противоречивых результатах прочтения данных CAMP-теста с *R.equi*. Типичный положительный результат CAMP-теста с использованием *R.equi*, наблюдающийся с *L.ivanovii*, имеет лопатообразную форму зоны гемолиза. Напротив, в случаях, когда данный тест дает положительный результат с *L.monocytogenes*, образующаяся форма зоны гемолиза напоминает луковичу. Указанная картина отражает либо различие в способности штаммов *R.equi* к взаимодействию с *L.monocytogenes* по причине количества секретируемого штаммами *L.monocytogenes* листериолизина О, либо различие в способности штаммов *R.equi* к секретированию холестеролоксидазы. Как бы то ни было, данный тест не является решающим вне зависимости от того, положительный он или нет, поскольку *L.monocytogenes* и *L.ivanovii* можно легко дифференцировать по выработке кислот из D-ксилозы, L-рамнозы и альфа-метил-маннозида. Экзосубстанцией *L.monocytogenes*, участвующей в CAMP-реакции с *S.aureus* и *R.equi*, служит листериолизин О. Экзо-субстанции *S.aureus* и *R.equi* – соответственно сфингомиелиназа С и холестеролоксидаза.

Листериолизин О является основным фактором вирулентности *L.monocytogenes* и три гемолитических вида, *L.monocytogenes*, *L.ivanovii* и *L.seeligeri* обладают, как это недавно было показано, кластером генов вирулентности. Однако патогенными как в естественных, так и в экспериментальных условиях являются два вида – *L.monocytogenes* и *L.ivanovii*, при этом *L.ivanovii* в основном ответственны за выкидыши у животных (овец). Кроме того, до настоящего времени не установлена прямая зависимость в эксперименте суммарного выделения гемолизина и вирулентности, так же как

гемолитическая активность штаммов *L.monocytogenes*, выделенных от больных, далеко не всегда коррелировала с тяжестью течения болезни. Таким образом, наличие патогенности нельзя связывать лишь с фактом выявления гемолитической активности. Есть сведения о выделении негемолитических изолятов *L.monocytogenes*. Такие изоляты и ряд штаммов с низкой гемолитической активностью были непатогенны или слабо патогенны.

Предложены дополнительные тесты, главным образом предназначенные для дифференциации *L.monocytogenes* и *L.innocua*, включающие обнаружение активности фосфолипазы С, гидролиз D-аланина-р-нитроанилида и гидролиз нафтиламидного субстрата (метод «API Listeria»).

Изучение филогенетической позиции рода *Listeria* началось в то время, когда для исследования грамположительных бактерий применялись нумерические фенотипические исследования. Эти исследования имели первостепенную важность для доказательства того, что листерии не являются представителями коринеформных бактерий. Полученные при этом данные были подтверждены каталогизацией рПНК 16S. Уточненное положение рода *Listeria* среди грамположительных бактерий с низким процентным содержанием G+C в ДНК в дальнейшем было установлено с помощью данных секвенирования 16S и 23S рПНК. Нумерические таксономические исследования выявили определенную гетерогенность в пределах данного рода с точным видовым содержанием, установленным с помощью ДНК/ДНК-гибридизации и рПНК-секвенирования. Исходя из результатов исследования генома, данный род содержит шесть видов, подразделяющихся на две сублинии по родству. Современное состояние таксономии *Listeria* является результатом исследований, проведенных в лабораториях разных стран мира, с применением всевозможных методик при координации Международной комиссии по таксономии листерий. Большая часть этих работ была выполнена в течение последних трех десятилетий (в настоящее время количество публикаций в данной области уменьшается). К счастью, к тому времени, когда проблема пищевого листериоза стала проблемой здравоохранения и оказала сильное экономическое воздействие на развитие пищевой индустрии, различия между *L.monocytogenes* и непатогенными видами уже были установлены. Это позволило сосредоточить усилия на пищевой продукции, контаминированной *L.monocytogenes*, поскольку продукты, контаминированные другими видами листерий, для здравоохранения интереса не представляют. В настоящее время необходимость в разработке новых средств изучения эпидемиологии листериоза, мониторинга инфекции вновь возродили интерес к вопросу о классификации штаммов *L.monocytogenes* и их таксономической принадлежности.

Таксономия рода *Listeria*

В течение многих лет род *Listeria* считается мономорфным, состоящим только из одного вида *L.monocytogenes*. В 1948 году был добавлен вид *L.denitrificans*. Что касается исследования филогенетического родства *Listeria*, то внедрение методов молекулярной биологии позволило лучше оценить разнообразие, существующее в пределах рода *Listeria*, в составе которого находятся шесть видов: *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.welshimeri*, *L.seeligeri*, *L.grayi* (у *L.grayi* подвиды – sub. gray, sub. murray).

В числе методов, используемых с целью проведения сравнительного анализа штаммов, серотипирование являлось основным и решающим методом выявления видовой структуры рода *Listeria*. До 1960 года *Listeria* выделялись в основном из образцов патматериалов и таким образом, другие виды, кроме *L.monocytogenes*, не выделялись. Первая антигенная схема была разработана J. S. Paterson, описавшим четыре серовара. Эту схему позднее расширили Н. Р. R. Seeliger, J. Donker-Voet, при этом были добавлены новые серовары. В 1962 Иванов выделил атипичные штаммы *L.monocytogenes*, из аборт-материала овец, и, исходя из наличия у них высокой гемолитической активности и новой схемы антигенной структуры (серовар 5), предложил отнести их к новому виду *L.bulgarica*. Спустя несколько лет, благодаря разработке селективных сред, из различных источников окружающей среды были выделены многие другие штаммы. В период между 1965 и 1980 годами Н. Р. R. Seeliger собрал и серотипировал сотни штаммов, при этом, согласно наблюдениям, многие из них являлись негемолитическими, характеризующимися определенными антигенными свойствами (серовары 6a и 6b, ранее известные как 4f и 4g, и необозначенные серовары) и явно непатогенными. В 1981 году он предложил называть эти штаммы *L.innocua*. Таким образом, применение фенотипических методов, методов серотипирования и изучения гемолитической активности, позволило показать, что вид *L.monocytogenes*, получивший определение в восьмом издании Руководства по таксономии бактерий Берджи, является гетерогенным и состоит из нескольких различных видов.

Результаты первых экспериментов по ДНК/ДНК гибридизации, проведенной Стюартом и Н. J. Welshimer в 1974 году, показали, что *L.monocytogenes* является гетерогенным. Тем не менее, количество ДНК-гибридизационных групп в их коллекции штаммов нельзя было установить, поскольку меченой являлась лишь одна ДНК *L.monocytogenes*; кроме того, не были указаны серовары. В 1982 году были предприняты дальнейшие исследования по ДНК/ДНК гибридизации с использованием большого количества

штаммов различного происхождения, направленные на выяснение вопроса о геномной гетерогенности так называемых *L.monocytogenes* и оценку обоснованности выделения новых видов *L.bulgarica* и *L.innocua*, в то время не получивших официального утверждения. Среди штаммов, ранее идентифицированных как *L.monocytogenes*, было выявлено, пять генетических групп.

Генетическая группа 1 с типовым штаммом *L.monocytogenes*, соответствующим *L.monocytogenes* в строгом смысле слова включала штаммы, относящиеся к сероварам 1/2a, 1/2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7.

Генетическая группа 2 включала штаммы с высокой гемолитической активностью, которые относились к серовару 5, подтверждая предположения Иванова о принадлежности этих штаммов к отдельному виду с наименованием «*L.bulgarica*»; в 1985 году они получили название *L.ivanovii*. Дальнейшие исследования штаммов данного вида с использованием мультилокусного энзимэлектрофореза, ДНК/ДНК-гибридизации и рестрикции гена рРНК, позволили описать два подвида: *L.ivanovii* подвид *ivanovii* (рибоза-положительный) и *L.ivanovii* подвид *londoniensis* (рибоза-отрицательный).

Генетическая группа 3 содержала штаммы сероваров 4ab, 6a, 6b и необозначенные серовары, которые не обладали гемолитической активностью и патогенностью для мышей, включая два штамма, ранее предлагаемые Н. Р. R. Seeliger в качестве референс-штаммов *L.innocua*. Данная группа штаммов соответствовала *L.innocua*, и этот вид был официально утвержден.

Генетическая группа 4 содержала негемолитические штаммы серовара 6a и 6b. Эти штаммы вырабатывали кислоту из D-ксилозы и являлись непатогенными для мышей и, таким образом, соответствовали группе штаммов, ранее описанных у Groves и Welshimer (1977). Группе были присвоены статус вида и название *L.welshimeri* в 1983 году.

Генетическая группа 5 включала в себя гемолитические и непатогенные штаммы различных сероваров (1/2c, 4c, 4d, 6b и необозначенные серовары) и впоследствии была названа *L.seeligeri*.

Полученные результаты были подтверждены в экспериментах по ДНК/ДНК-гомологии (оптический метод) в 1993 году. Нумерические таксономические исследования подтвердили, что *L.monocytogenes*, получившие определение в восьмом издании Руководства по таксономической бактериологии Берджи, не являлись одним-единственным таксоном. Тем не менее, данный метод имеет ограниченную чувствительность в отношении бактерий, отличающихся небольшим количеством характеристик, при этом данные исследования малоэффективны при определении гетерогенности. Любопытно, что эта новая геномная классификация была проверена с использованием мультилокусного энзимэлектрофореза (исследовано 18 ферментных локу-

сов). Исследование матричного кластера генетических дистанций у парных электрофоретических типов показало, что каждый из видов *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.welshimeri* и *L.seeligeri* соответствовал одному-единственному, не перекрывающемуся другими, кластеру.

Длительная дискуссия по поводу таксономической позиции *L.grayi* и *L.murrayi* началась тогда, когда исследования ДНК/ДНК гомологии Стюарта и Велшимера, проведенные в 1974 году, продемонстрировали низкое ДНК-родство *L.monocytogenes* с *L.grayi*, и *L.murrayi*; высокую геномную гомологию между *L.grayi* и *L.murrayi*. Эти данные подтверждались нумерическими фенотипическими исследованиями. Как результат – предлагалось поместить *L.grayi* и *L.murrayi* в новый род *Murraya* с *M.grayi* в качестве типового вида, разделенного на два подвида: *M.grayi* подвид *grayi* и *M.grayi* подвид *murrayi*. Следствием данного предложения, не получившего официального признания в Утвержденном перечне наименований бактерий, явилось возникновение следующих двух вопросов: а) относятся ли *L.grayi* и *L.murrayi* к роду *Listeria*? и б) относятся ли *L.grayi* и *L.murrayi* к одному виду?

L.grayi, *L.murrayi* и *L.monocytogenes* обладают рядом сходных черт: во всех нумерических таксономических исследованиях они группируются в кластер, обладают липотейхоевой кислотой, тейхоевой кислотой полирибитол-фосфатного типа, пептидогликаном гамма-варианта A1, негидрогенизированными менахинонами типа МК-7 и одинаковыми цитохромами (a 1 bdo). Тем не менее, другие характерные особенности служат подтверждением несхожести данной пары *L.grayi* и *L.murrayi* в пределах рода *Listeria*: небольшая разница в процентном содержании G+C ДНК (42 % против 36-38 %), ряде биохимических реакций, характере замены липотейхоевых кислот, небольшие различия в полипептидных профилях белков, составе клеточных жирных кислот, антигенной структуре, и низкие показатели ДНК-гомологии. Наконец, 16S рРНК-олигонуклеотидная каталогизация *L.murrayi* помещала его рядом с *L.monocytogenes*. Эти данные вместе с таковыми, свидетельствующими о значительном фенотипическом сходстве с *L.monocytogenes*, не давали оснований к исключению *L.murrayi* (и близкородственного вида *L.grayi*) из рода *Listeria*.

Близкое родство *L.grayi* и *L.murrayi* подтверждалось различными исследованиями: по результатам нумерического таксономического исследования, мультилокусного энзимэлектрофореза и исследований ДНК/ДНК-гибридизации эти два вида формируют единственный четко выраженный кластер. Кроме того, они обладают рядом общих хемотаксономических свойств, отличающих их от других видов *Listeria*: аналогичные показатели состава оснований ДНК, одинаковая замена липотейхоевых кислот, сходные структуры клеточных жирных кислот и жирных альдегидов и общая антигенная структура, несмо-

тры на небольшие различия. Они отличаются друг от друга только по способности восстанавливать нитраты (nitrate reduction). Наконец, проведенные повторное исследование геномного родства *L.grayi* и *L.murrayi* с использованием ДНК/ДНК-гибридизации и мультилокусного анализа свидетельствовало о том, что они должны рассматриваться как представители одного и того же вида – *L.grayi*. Эти данные согласуются с результатами секвенирования рРНК 16S и 23S и структурой полипептидных профилей.

Несмотря на то, что в настоящее время известен лишь один изолят вида *L.denitrificans*, имеется очень большое количество статей, в которых рассматривается его таксономическая позиция. Еще в 1966 году нумерическое таксономическое исследование показало, что *L.denitrificans* группировался с определенными коринеформными бактериями, что было подтверждено позднее. Результаты хемотаксономических исследований и ДНК/ДНК-гибридизации в дальнейшем подчеркивали фенотипические различия, существующие между *L.denitrificans* и другими представителями рода *Listeria*. В 1987 году каталогизация рРНК 16S подтвердила, что данный вид не является представителем рода *Listeria* и относится к коринеформной группе бактерий. В связи с чем он был перенесен во вновь созданный род *Jonesia* и в настоящее время признан в качестве *Jonesia denitrificans*.

Таким образом, род *Listeria* содержит шесть видов: *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.welshimeri*, *L.seeligeri* и *L.grayi*, которые включают в себя две близкородственные, но явно различные линии: одна содержит

Таблица 1.2. Внутривидовая дифференциация рода *Listeria* (Д. А. Васильев, 1991)

№ п/п	Тест или признак	Виды рода <i>Listeria</i>					
		<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.grayi</i> / <i>L.murrayi</i>
1	β-гемолиз	+	+	–	+	–	–
2	CAMP-тест (<i>S.aureus</i>)	+	–	–	+	–	–
3	CAMP-тест (<i>Rh.equi</i>)	– (±)	+	–	–	–	–
4	Образование кислоты:						
	декстрин	–	–	–	–	–	+
	галактоза	–	–	–	–	–	+
	Д-лактоза	–	–	–	–	–	+
	манит	–	–	–	–	–	+
	манноза	+	–	+	–	+	–
	рамноза	+	–	–	–	–	–
	крахмал	–	–	–	–	–	+
	Д-ксилоза	–	+	–	+	+	–
5	Тест Voges-Proskaur	+	+	+	+	+	+
6	Гидролиз гиппурата	+	+	+	–	–	–
7	Гидролиз лецитина	– (±)	+	–	–	–	–
8	Патогенность для белых мышей	+	+	–	–	–	–

L.grayi (sub.*grayi* и sub.*murrayi*), другая – *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.welshimeri* и *L.seeligeri*. Виды, находящиеся в пределах второй линии, можно подразделить на две группы:

- а) *L.monocytogenes* и *L.innocua*,
- б) *L.ivanovii*, *L.seeligeri* и *L.welshimeri*.

ВНУТРИРОДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ

В настоящий момент считается, что только два вида листерий – *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* являются патогенными и представляют опасность для макроорганизма. Так как в нашей стране нет видовых серологических диагностикумов, мы считаем целесообразным, привести характеристику каждого вида листерий для их бактериологической идентификации (таблица 1.2.).

1. Вид *L.monocytogenes*. Это неспорообразующие, короткие палочки, правильной формы, диаметром 0,4-0,5 мкм и длиной 0,5-2,0 мкм с закруглёнными концами. При микроскопии листерий в мазках можно увидеть их групповое расположение, параллельное, вдоль длинной оси. В мазках из инфицированного патологического материала или из жидкой среды встречаются листерии кокковой формы диаметром 0,4-0,5 мкм и длиной 0,4-0,6 мкм. Они могут быть ошибочно приняты за стрептококки. В более зрелых или необработанных культурах могут встречаться формы в виде волокон длиной до 6-20 мкм. Окраска по Граму положительная, но в старых культурах клетки теряют способность к сохранению окраски по Граму. Некислотоустойчивы.

Листериязная палочка во время культивирования при комнатной температуре всегда подвижна. При температуре 37 °С жгутики, как правило, не образуются и листерии оказываются неподвижными или слабоподвижными.

Листериязная культура данного вида является аэробной и факультативно анаэробной. Температурный диапазон роста от 1 до 44 °С. Однако культура остаётся жизнеспособной и при более высоких температурах (до 70-71 °С). Температурный оптимум 25-37 °С. Листерии этого вида способны расти и размножаться в диапазоне рН от 6,0 до 9,0, но сохраняют свою жизнеспособность при величине рН 5,0-11,0. Оптимальные показатели рН для роста – 7,0-7,4. В аэробных условиях, на питательном агаре при оптимальном температурном диапазоне, 24-48-часовые культуры растут в виде розинчатых колоний диаметром 0,5-1,5 мм, круглой формы, полупрозрачные

в виде капли, выпуклые с ясно очерченной поверхностью и сплошной гранью. При обычном освещении колонии обладают серо-голубоватым цветом. Размер 3-7-дневных колоний достигает диаметра 3,0-5,5 мм с непрозрачным центром и неправильной формы. В полужидкой среде 0,25 %-ного агара суточный рост идёт вдоль укола. В МПБ рост идёт медленно, но через 28-48 часов появляется нежное, опалесцирующее помутнение. Через 7 дней бульон просветляется, а на дне пробирки образуется осадок, который при встряхивании образует поднимающуюся вверх косичку. Бактерии обладают гемолитической активностью. Слабая или едва выявляемая гемолитическая активность может быть усилена использованием бактерии-синергиста (*S.aureus*) в CAMP-тесте. Листериязная культура в большинстве случаев является каталазоположительной и оксидазоотрицательной, но необходимо учитывать, что если питательные среды содержат низкие концентрации мясного или дрожжевого экстракта, то возможна отрицательная каталазная реакция. Активность каталазы подавляется и на средах, содержащих высокую (более 10 %) концентрацию глюкозы. Листерии этого вида дают положительные реакции с метил-ротом и Voges-Proskaur. Они не разжижают желатин, не гидролизуют казеин и молонат. Индол не продуцируют, на обычных питательных средах не образуют сероводород. Метаболизм сахаров сопровождается образованием кислоты, но не газа. Листерии могут расти в средах, сложного состава, содержащих до 20 % NaCl, при 16 % содержании в среде поваренной соли (рН 6,0) остаются, жизнеспособны в течение года.

Необходимо отметить, что хотя вышеперечисленные свойства листерий достаточно типичны, возможны отклонения, связанные с составом питательных сред и выделением новых штаммов листерий.

Штаммы вида различаются по антигенному составу и включают следующие серовары: 1/2а, 1/2в, 1/2с, 3а, 3в, 3с, 4а, 4ав, 4с, 4d, 4е и серовар 7. Экспериментально патогенен для мышей и морских свинок. Проба Антона положительная. Этот вид широко распространён в природе. Его выделяют из сточных вод, почвы, силоса, представителей аквафауны, из фекалий здоровых животных и людей. У человека и животных его выделяют при клинических признаках болезни. Вызывает менингит, энцефалит, септицемию, эндокардит, аборт, абсцессы и гнойные поражения местного характера.

2. Вид *L.ivanovii*, названный в 1985 году в честь Ивана Иванова – болгарского микробиолога.

Морфологическая особенность заключается в отсутствии жгутиков, вследствие чего штаммы вида неподвижны. Наблюдается ярко выраженный гемолиз с двойными или тройными зонами, если листерию этого вида выращивают на агаре с содержанием дефибринированной крови овец или

лошадей (5 % объём/объём). Положительная CAMP-реакция наблюдается при использовании *R.equi* и отрицательная со *S.aureus*. Из Д-маннитола, L-рамнозы или X-метила-Д-маннозида кислота не образуется. Все исследованные штаммы принадлежат к серовару 5. Этот антигенный состав в штаммах других видов рода *Listeria* не обнаружен. *L.ivanovii* патогенен для мышей, показатель ЛД50 для некоторых бактерии этого вида колеблется между 1×10^5 - 3×10^6 КОЕ. Патогенен для животных, особенно для суягных овец. Листериию этого вида выделяли также из организма здорового животного, человека – носителя, из окружающей среды и очень редко из организма человека в клиническом проявление болезни.

3. Вид *L.innocua*, назван в 1981 году в виду своей безвредности (*innocus* – безопасный).

Морфология бактерий аналогична *L.monocytogenes*. Не вызывает гемолиза на средах, содержащих 5 или 10 % (объём/объём) крови овец, кроликов, лошадей или человека. Большинство изученных штаммов образуют кислоту из рамнозы. Все исследованные до сих пор штаммы имеют атигенный состав серогруппы 6 (серовары 6а и 6в).

В экспериментах на животных этот вид был не патогенен для мышей и морских свинок при внутрибрюшинном введении микробной взвеси с содержанием 10^{10} м.т./мл.

Проба Антона отрицательная. Выделяют из почвы, растений, фекалий человека и животных, из птичьего помёта. Никогда не выделяли из патологического материала от человека и животных.

4. Вид *L.welshimeri*, назван в 1983 году в честь американского бактериолога Н. J. Welshimer.

Морфология аналогична бактериям вида *L.monocytogenes*. На кровяном агаре гемолиза не обнаруживают, CAMP-реакции с *S.aureus*, *R.equi* – отрицательные. Типовой штамм из L-рамнозы и Д-маннитола кислоту не образует.

Штаммы, которые в настоящее время относят к этому виду, принадлежат к серовару 6а или 6в. Антигенный состав типового штамма такой же, как у серовара 6в. Серовары 6а и 6в встречаются также в *L.innocua*, а некоторые штаммы *L.seeligeri* имеют антигенный состав серовара 6в.

Этот вид экспериментально не патогенен для мышей. Его выделяют из проб почв, гниющей растительности в США; вероятно, он широко распространён в природе.

5. Вид *L.seeligeri*, назван в 1983 году в честь Н. Р. R. Seeliger – немецкого бактериолога.

Морфология, как и у вида *L.monocytogenes*. Гемолитическая активность слабо выражена. CAMP-реакция положительная при использовании *S.aureus*

и отрицательная с *R. equi*. Кислота образуется из Д-ксилозы, не образуется из Д-маннитола и L-рамнозы.

Штаммы, относимые в настоящее время к этому виду, имеют антигенный состав сероваров 1/2в, 4с, 4d (которые встречаются также у *L. monocytogenes*) и 6в (который обнаруживается у некоторых штаммов *L. ivanovii*, *L. welshimeri*). Типовой штамм принадлежит к серовару 1/2в. В опытах был не патогенен для мышей. Его выделяют из растений, почвы и фекалий животных в Европе; вероятно, широко распространён в природе.

6. Вид *L. grayi* sub. *grayi*, назван в 1966 году в честь М. Gray – американского бактериолога, известного своими работами по листериозу.

Культурально-морфологические свойства аналогичны *L. monocytogenes*. При изучении на средах (триптон-соевый агар) небольших колоний (0,2 мм) в не прямых лучах света обнаруживают тот же самый сине-зелёный оттенок, как у *L. monocytogenes*. После более длительной инкубации колонии становятся оранжево-красными, особенно по краям. Гемолиз не вызывают. Температура оптимального роста 30-37 °С. Температурные границы роста 1-45 °С. Гибнут при 60-градусном нагревании в течение 30 минут. Каталазо-положительны, оксидазо-отрицательны. Требуются органические факторы роста. Растут при pH 5,0-9,0, при pH 9,6 рост не наблюдается. Штаммы вида чувствительны к пенициллину, стрептомицину, хлорамфениколу, эритромицину, новобиоцину, неомицину; резистентны к сульфаниламиду, полимиксину к сульфату колостина и к налидиксовой кислоте. Культура не растёт на среде Lardner (1966). Медленный рост может происходить на среде MPS (Mann et al., 1960). Ферментативный метаболизм глюкозы приводит к образованию молочной кислоты и некоторых других продуктов. Из эскулина, амигдалина, циллобиозы, декстрина, галактозы, глюкозы, лактозы, фруктозы, мальтозы, маннита, маннозы, салицина, крахмала, трегалозы образуется кислота, а не газ. Кислота обычно не образуется из адонита, арабинозы, дульцита, эрритрита, гликогена, инозита, унилина, мелибиозы, мелецитозы, рафинозы, рамнозы, сорбита, сахарозы и ксилозы. В лакмусовом молоке обнаруживается слабая кислота и незначительная редуктаза. Реакция метиловым красным и реакция Voges-Proskauer положительная. Гиппурат натрия не гидролизует. Гидролиз крахмала не постоянен. Твин 20 гидролизует медленно (14 дней). Твин 80 не гидролизует. Медленно образует дезоксирибонуклеазы, рибонуклеазы и фосфатазы. Сульфатаза не образуется. Ксенатин, тирозин и хитин не расщепляются. Целлюлоза, желатин, казеин и молоко не гидролизуются. Индол не образует. Мочевину не гидролизует. Некоторыми штаммами образуются небольшие количества H_2S (обнаруженные с помощью реакции со свинцовой бумагой).

Серологически отличается от членов рода *Listeria*. Антигенный состав идентичен *L.grayi* sub. *murrayi*. Не патогенны для мышей при внутрибрюшинной или внутримозговой инъекции, но клетки в концентрации 5×10^8 могут быть токсичны для мышей.

Непатогенны для беременных кроликов после внутривенного введения. Проба Антона отрицательная. Выделяют из фекалий шиншиллы. Естественная среда не известна.

7. Вид *L.grayi* sub. *murrayi*. Учитывая, что во многих публикациях и справочниках этот подвида рассматривается как самостоятельный вид и дифференцируется по фенотипическим свойствам, мы приводим его характеристику. Данный подвида назван в 1971 в честь Е. Murray – одного из исследователей листерий.

Культурально-морфологические и биохимические свойства аналогичны *L.grayi* sub. *grayi*. При микроскопии культур, выросших на поверхности триптозного агара небольшие колонии (0,2 мм) имеют тот же самый зелёно-синий оттенок, как и *L.monocytogenes*. После 2-х дневной инкубации у более крупных колоний обнаруживается оранжево-красный оттенок (Н. Welshimer et al. 1971). При 22-25 °С на питательном агаре, содержащем глюкозу, у колоний появляется жёлтый пигмент.

В отсутствии глюкозы пигмента не обнаруживают. Не обладают гемолитической активностью. Оптимальная температура роста 30-37 °С. Серологически отличаются от вида *L.monocytogenes*. Антигенный состав идентичен антигенному составу *L.grayi* sub. *grayi*.

Проба Антона отрицательная. Непатогенны ни при внутривенном введении кроликам, ни при внутрибрюшинной инъекции 10^8 клеток мышам, массой 18-20 г. Выделили из гниющих листьев злаковых (маис); естественной средой обитания, вероятно, являются почва и растения.

Таким образом, собранные на протяжении трех последних десятилетий данные ясно показывают, что *Listeria* является четко выраженным таксоном, обладающим рядом характерных свойств, отличающих его от сопредельных таксонов.

В настоящее время для идентификации *Listeria* и внутриродовой дифференциации используются различные анализы на основе миникультур или энзим-мульти тестов, поскольку традиционные методики культивирования с целью идентификации листерий являются трудоемкими и требуют много времени. Разработаны следующие современные тест-системы: API 50 CH, API-ZYM, API 20 STREP, API *Listeria*, API *Coryne*, Micro-ID *Listeria*, Mast ID, RAPID CORYNE, RAPID ID 32 Strep и метод микротитрования в планшете. Информация, полученная на основе API ZYM, API 20 STREP и RAPID ID 32 Strep, позволяет дифференцировать изоляты на уровне рода, тогда как API

Listeria, Mast-ID, API Coryne и API 50 CH в большей мере приемлемы для идентификации, как рода, так и вида².

Listeria marthii (mar'thi.i. N.L. gen. masc. n. marthii назван в честь профессора Elmer H. Marth, за его научные исследования и вклад в изучение бактерий вида *Listeria monocytogenes*).

L.marthii проявляет характерные для бактерий рода *Listeria* биологические свойства, как сообщают Rocourt & Buchrieser (2007). Клетки мелкие, грам-положительные палочки с закругленными концами. Хорошо растут на наиболее часто используемых бактериологических средах. Диапазон температур для роста 1-45 °С (оптимальный рост при 30-37 °С). Подвижные, не спорообразующие, аэробы и факультативные анаэробы. Форма роста по типу «зонтика», появляющаяся на 3-5 мм ниже поверхности укола в полужидкую среду, возникает при 20-30 °С, неподвижны при инкубировании при 37 °С. Колонии не проявляют гемолитической активности на поверхности и в толще агара по месту укола в SBA, РБА после инкубации в течение 18-24 ч при 37 °С. Колонии 0,2-0,8 мм в диаметре, гладкие, голубовато-серые, полупрозрачные, со слегка поднятой тонкой текстурой поверхности после инкубации в течение 24 ч при 37 °С. Колонии с характерным сине-зеленым радужным переливом, типичным для листерий при просмотре под непрямым светом. Положительная реакция на каталазу, гидролиз эскулина, продуцирование H₂S и тест с метиловым красным; отрицательная реакция на оксидазу; устойчивы к действию хлорида натрия; расщепление D-глюкозы, лактозы и мальтозы; не характерно взаимодействие с D-ксилозой, D-маннитом, сахарозой и L-рамнозой, редукция нитрата, уреазная активность, продукция индола и расщепление желатина.

Типичный штамм FSL S4-120 T (5J3452 T 5H3507 T 5ATCC BAA-1595 T 5BEIR NR 9579 T 5CCUG 56148 T) выделен из образцов окружающей среды, собранных в Национальном лесу Фингер-Лейкс, Нью Йорк. Три дополнительных штамма *L.marthii* зарегистрированы в хранилище BEIR, Манассас, штат Вирджиния.

Listeria rocourtiae (ro.cour'ti.ae. N.L. fem. gen. n. rocourtiae назван в честь Jocelyne Rocourt, французского бактериолога, чьи работы оказали существенное влияние на таксономию бактерий рода *Listeria*).

Клетки – короткие палочки, 0,4-0,5 мм в диаметре и 1-2мм в длину с закругленными концами. Грам-положительные. Не кислотоустойчивые. Не образуют капсулу. Не образуют споры. Подвижные при культивировании в диапазоне 4-30 °С. Аэробные и факультативно анаэробные. Колонии голубовато-серые при нормальной освещенности и с характерным сине-зеленым блеском при осмотре под непрямым светом. После 48 часов инкубации в трипто-казеин-соевом агаре при 30 °С, колонии 0,5-1,0 мм в диаметре, круглые, полупрозрачные и со слабо выпуклой текстурированной поверхностью. Продуцируют кислоту из глицерина, эритритола, рибозы, D-ксилозы, адонитола, галактозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, рамнозы, дульцита, инозитола, маннитола, сорбитола, метил-D-глюкозида, N- ацетилглюкозамина, амигдалина, арбутина, салицина, целлобиозы, мальтозы, лактозы, мелибиозы, растворимого крахмала, трегалозы, D-раффинозы, гликогена. Кислота не продуцируется из D-арабинозы, L-арабинозы, L-ксилозы, метил-ксилозы, метил-D-маннозида, сахарозы, инулина, мелецитоза, ксилитола, L-фукозы, D-туранозы, D-ликсозы, D-тагатозы, D-фукозы, D-арабитола, глюконата. Типичный штамм не является гемолитическим, авирулентный, CAMP-тест отрицательный.

Типичный штамм CIP 109804 T (5DSM 22097 T 5Allerberger 700284/02 T) был выделен с нарезанных листьев салата в Зальцбурге, Австрия, в 2002 году. Салат выращивали и обрабатывали в деревне недалеко от Зальцбурга.

2 На наш взгляд (Д. А. Васильев), последние 6 позиций в роде листерий, указанные в нижеприведенном обзоре с трудом можно дифференцировать в отдельные виды.

Listeria fleischmannii (fleisch.man'ni.i. N.L. gen. masc. n. fleischmannii of Fleischmann, назван в честь ученого в области сельскохозяйственной микробиологии профессора Wilhelm Fleischmann).

Клетки – короткие палочки, одиночные или в виде коротких цепочек (0.4-0.6 мм в диаметре и 0.7-1.2 мм длиной), грамположительные. Аэробные и факультативно анаэробные. После инкубации на BHI или TSB agar в 37 °C в течение 24 ч образуют колонии 0,4-1,0 мм в диаметре, полупрозрачные, круглые, слабовыпуклые с целыми краями и гладкой поверхностью. Колонии голубовато-серые при нормальной освещенности, голубоватые при просмотре через проходящий свет. Неподвижные, но содержат центральную часть гена флагеллина flaA. Восстанавливают нитраты, осуществляют гидролиз гиппурата и эскулина, вырабатывают сероводород. Негемолитические, не содержат гены вирулентности. Устойчивы к клиндамицину и налидиксовой кислоте. Могут быть дифференцированы от всех других видов рода *Listeria* по своей уникальной способности ферментировать D-маннитол и D-ксилозу.

Типовой штамм LU2006-1 T (5DSM 24998 T 5LMG 26584 T), выделен из твердого сыра в западной Швейцарии в 2006 году. Содержание G+C ДНК типа штамма составляет 39,0 % (HPLC).

Listeria booriae (boo'ri.ae L. fem. gen. n. назван в честь Kathryn Boor, ученого в области пищевой микробиологии, в USA, за вклад в понимание биологии бактерий рода *Listeria*).

Клетки прямые, грам-положительные палочки. Не кислотоустойчивые. Не образуют капсулу. Не образуют споры. Колонии непрозрачные, белого цвета, плоские, рост на всей поверхности BHI и LMPM. На LMPM не образуют голубой ореол. На MOX колонии выпуклые. Растут в диапазоне 4-41°C, оптимум между 30-41°C. Неподвижные при любых температурах. Сбраживают до кислоты мелибиозу, L-арабинозу, D-арабитол.

Типовой штамм, FSL A5-0281 T, был выделен с непивной контактной поверхности на заводе по переработке молока в северо-востоке США и хранится в DSMZ (DSM 28860 T), и BCCM (LMG 28311 T). По результатам секвенирования генома содержание G+C ДНК типа штамма составляет 45,2 %.

Listeria weihenstephanensis (wei.hen.ste.phan.en'sis. N.L. fem назван в честь места, где штамм был выявлен – Freising/Weihenstephan на юге Германии).

Клетки – палочки, 0.4-0.5 мм в диаметре и длиной 2.0-4.5 мм с закругленными концами. Спор и капсул не образуют. Колонии на TSA 1,0-2,5 мм в диаметре, полупрозрачные, круглые, гладкие, беловатого цвета, слабовыпуклые со слегка неправильными краями. Оптимальный температурный диапазон роста 28-34°C. Изоляты растут в PC бульоне при 3°C в течение 10 дней. Клетки слегка подвижны при температуре культивирования 15-30°C. Оптимальный рост при pH 7-8. При просмотре в проходящем свете колонии на TSA переливчато синие. Возможен рост в питательном бульоне, содержащем до 6,5 % (вес/объем) NaCl. Положительный тест на каталазу и метиловый красный, отрицательный на оксидазу, индол, в реакции Фогес-Проскауэра, использование экзогенного цитрата, H₂S и гидролиз мочевины. Возможна редукция нитратов в нитриты. Негемолитические и CAMP-тест-отрицательный. Биохимические тесты со стрипами API *Listeria* (аэробная инкубации при 30°C, 24 ч) показывают негативные результаты для ариламидазы, аманнозидазы, подкисления D-рибозы, глюкозы 1-фосфат и D-тагатозы, положительные результаты наблюдаются для гидролиза эскулина, подкисления D-арабитола, D-ксилозы, L-рамнозы и метилового α-D-глюкопиранозида. На основании результатов API 50 CH тест-системы, после 14 дней анаэробной инкубации, кислоту ферментируют из глицерина, D-рибозы, D-ксилозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, L-рамнозы, инозита, D-маннита, метил-α-D-глюкопиранозида, N-ацетилглюкозамина, амигдалина, арбутина, эскулина, салицина, целлобиозы, мальтозы, лактозы, трегалозы, крахмала, гликогена, ксилитола, гентиобиозы, D-арабитола и калий 5-кетоглюконата. Кислота не ферментируется из эритрита, D-арабинозы, L-арабинозы, D-галактозы, L-ксилозы, D-адонита, L-сорбозы, метил β-D-ксилопиранозида, дульцита, D-сорбита, метил D-маннопиранозида, мелибиозы, сахарозы, инулина, мелецитозы, рафинозы,

туранозы, D-ликозы, D-тагатозы, D-фукозы, L-фукозы, L-арабитола, глюконата или 2-кетоглюконата калия.

Типовой штамм WS 4560 T (5DSM 24698 T 5LMG 26374 T), изолированы от *Lemna trisulca* из пруда Postweiher в Wolnzach/Pfaffenhofen. Штамм WS 4615 (5DSM 246995LMG 26375), который был выделен из того же места, второй штамм вида.

Listeria floridensis (flo.ri.den'sis. N.L. fem. Назван в честь территории Флориды, штат в США, где бы выделен штамм).

Клетки 0.661.3–1.9 мм; длина/ширина – 2.7. Грам-положительные палочки, прямые с закругленными концами. Не растут при температуре 7 °C и ниже. Оптимальная температура роста 37–41 °C. Неподвижны при 4, 22, 30 или 37 °C. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, каталаза-положительные, CAMP-тест отрицательный. Не редуцируют нитраты и нитриты. В настоящее время единственный вид рода *Listeria* неспособный редуцировать нитраты. Уникальный API *Listeria* числовой профиль (2 710) наблюдается для изолятов.

Типовой штамм, FSL S10-1187 T (5DSM 26687 T 5LMG 28121 T 5BEI NR-42632 T), был выделен из проточной воды во Флориде, США. По результатам секвенирования генома содержание G+C ДНК типа штамма составляет 41,8 %.

Listeria aquatica (a.qua'ti.ca. L. fem. найденный в воде, в честь этого назван).

Клетки 0.6–0.761.5–2.4 мм; длина/ширина – 3.2. Грам-положительные, прямые палочки с закругленными концами. Не растут при температуре 7 °C и ниже. Оптимальная температура роста 37–41 °C. Неподвижны при 4, 22, 30 или 37 °C. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, кроме штамма FSL S10-1181. Каталаза-положительные, CAMP-тест отрицательный. Редуцируют нитраты, отсутствует возможность редукции нитритов. В настоящее время единственный вид рода *Listeria* неферментирующий мальтозу. Среди неподвижных видов рода *Listeria* уникален способностью ферментировать D-тагатозу. Уникальный API *Listeria* числовой профиль (6 731) наблюдается для изолятов и FSL S10-1181.

Типовой штамм, FSL S10-1188 T (5DSM 26686 T 5LMG 28120 T 5BEI NR-42633 T), был выделен из проточной воды во Флориде, США. По результатам секвенирования генома содержание G+C ДНК типа штамма составляет 40,9 %.

Listeria cornellensis (cor.nel.len'sis. N.L. fem. назван в честь Cornell, университет, где было выполнено большинство научных исследований, которые привели к открытию видов, описанных в данном разделе).

Клетки 0.4–0.762.4–3.8 мм; соответственно, соотношение длина/ширина – 5.3. Грам-положительные, прямые палочки с закругленными концами. Оптимальная температура роста 37–41 °C. Неподвижны при 4, 22, 30 или 37 °C. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, каталаза-положительные, CAMP-тест отрицательный. Отсутствует возможность редукции нитритов, возможно восстановление нитратов. При филогенетических и генотипических различиях, этот вид по фенотипическим характеристикам схож с видом *L.grandensis*. Среди неподвижных видов рода *Listeria* *L.cornellensis* и *L.grandensis* - L-рамнозы-отрицательны в API 50 CH теста (выполненных при 37 °C); тем не менее, API *Listeria* тест (инкубирование при 34 °C) показывает подкисление L-рамнозы для *L.grandensis* и для одного из двух тестируемых штаммов *L.cornellensis*. Оперон, ответственный за ферментацию рамнозы присутствует в геноме *L.grandensis* TTY A1-0212 T, но отсутствует в геноме *L.cornellensis*. Можно предположить зависимость ферментации рамнозы от температурного диапазона культивирования бактерий. Штаммы вида *L.cornellensis* могут дополнительно отличаться от штаммов вида *L.grandensis* слабой ферментацией лактозы. API *Listeria* числовой профиль 2 330 наблюдается для двух известных штаммов (TTY A1-0210 T и FSL F6-0970) этого вида; этот профиль связан с видом *L.ivanovii* в соответствии с руководством API *Listeria* (bioMe'rieux; версия 04/2007).

Типовой штамм, TTY A1-0210 T (5DSM 26689 T 5LMG 28123 T 5BEI NR-42630 T), был выделен из воды в Колорадо, США. По результатам секвенирования генома содержание G+C ДНК типа штамма составляет 42,5 %.

Listeria grandensis (gran.den'sis. N.L. fem. Назван по названию округа Grand, где штамм был выделен).

Клетки 0.6-0.762.0-3.1 мм; соответственно, соотношение длина/ширина – 4.0. Грам-положительные палочки, прямые с закругленными концами. Оптимальная температура роста 30-37 °С. Неподвижны при 4, 22, 30 или 37 °С. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, каталаза-положительные, CAMP-тест отрицательный. Отсутствует возможность редукции нитритов, возможно восстановление нитратов. Необходима дифференциация от *L. cornellensis*. Уникальный API *Listeria* числовой профиль (2 730) наблюдается для изолятов.

Типовой штамм, TTU A1-0212 T (5DSM 26688 T 5LMG 28122 T 5BEI NR-42631 T), был выделен из воды в Колорадо, США. По результатам секвенирования генома содержание G+C ДНК типа штамма составляет 43,0 %.

Listeria riparia (ri.pa'ri.a. L. fem. Назван в честь реки или ручья).

Клетки 0.5-0.762.3-3.7 мм; соответственно, соотношение длина/ширина – 4.8. Грам-положительные палочки, прямые с закругленными концами. Оптимальная температура роста 37-41 °С. Неподвижны при 4, 22, 30 или 37 °С. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, каталаза-положительные, CAMP-тест отрицательный. Отсутствует возможность редукции нитритов, возможно восстановление нитратов. Могут быть дифференцированы от других неподвижных видов рода *Listeria* сочетанием аманнозидазной активности и способности к ферментированию L-рамнозы, D-галактозы и L-арабинозы. Уникальный API *Listeria* числовой профиль (6 710) наблюдается для изолятов (FSL S10-1204 T и FSL S10-1219).

Типовой штамм, FSL S10-1204 T (5DSM 26685 T 5LMG 28119 T 5BEI NR-42634 T), был выделен из проточной воды во Флориде, США. По результатам секвенирования генома содержание G+C ДНК типа штамма составляет 41,9 %.

Listeria newyorkensis (new.york.en'sis. N.L. fem. назван по принадлежности к штату Нью-Йорк в США, где штамм данного типа впервые обнаружен).

Клетки прямые, грам-положительные палочки. Не кислотоустойчивые. Не образуют капсулу. Не образуют споры. Колонии непрозрачные, белого цвета, плоские, рост на всей поверхности BHI и LMPM. На LMPM не образуют голубой ореол. На MOX колонии выпуклые. Растут в диапазоне 4-41 °С, оптимум между 30-37 °С. Неподвижные при любых температурах. Положительная реакция в тестах на каталазу, метилового красного и восстановления нитратов. Отрицательная реакция в тестах на гемолиз, восстановления нитритов, Фогес-Проскауэра. Не окисляют ксилит или D-фукозу. Могут быть дифференцированы от других видов рода *Listeria* по отсутствию реакции Тея-маннозидазы, неспособностью окисления D-арабитола и способностью окислять D-рибозу, D-галактозу и L-арабинозу.

Типовой штамм, FSL M6-0635 T, был выделен с непищевой контактной поверхности на заводе по переработке морепродуктов в северо-восточной части США и хранится в DSMZ (DSM 28861 T) и BCCM (LMG 28310 T). По результатам секвенирования генома содержание G+C ДНК типа штамма составляет 45,2 %.

Описаны и более сложные методы, некоторые из которых способны помочь в определении вида атипичных изолятов. Это секвенирование рПНК 16S, сиквенс-анализ внутренних транскрибированных спейсерных локусов 16S-23S, риботипирование, произвольная амплификация полиморфной ДНК, ПЦР на основе последовательности повторяющегося элемента (repetitive element sequence-based PCR), мультилокусный энзим-электрофорез, определение ферментативного профиля с применением флюорогенных субстратов, исследование продуктов ферментации, газожидкостная хроматография

с захватом электрона с пульсирующей частотой (frequency-pulsed electron-capture), инфракрасный спектральный анализ Фурье и метод определения термограммы.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИСТЕРИОЗА

Морфология. Наиболее типичной для клеток *Listeria monocytogenes* является палочковидная с закругленными концами форма.

Однако листериям свойственна значительная полиморфность: в зависимости от условий культивирования они способны принимать кокковидную или овоидную формы.

Ранее, до разработки селективных питательных сред, это обстоятельство нередко вводило в заблуждение врачей-бактериологов, которые в посевах из органов павшего животного обнаруживали формы листерий, близкие к коккам. Чтобы избежать ошибок, необходимо было сделать несколько последовательных пересевов культуры на питательных средах и вырастить ее при комнатной температуре – листерии при этом приобретали типичную палочковидную форму.

Мы также установили различие в форме клеток в зависимости от температуры инкубации, хотя, существовало мнение (Гартвиг, 1958), что температура инкубации и вид питательной среды не влияют на величину листерий. По нашим наблюдениям, в культурах, выращенных при комнатной температуре, преобладали палочковидные формы, в то время как в культурах, выращенных при 37 °С, чаще встречались кокковидные и овоидные формы. Эти результаты мы подтвердили с помощью световой и электронной микроскопии.

При определенных условиях культивирования листерии приобретали способность проходить через бактериальные фильтры. Так, например, еще в 1962 году Ф. З. Амфитеатров и К. А. Шишкина на основании опытов по фильтрации 1-120-суточных бульонных культур листерий пришли к выводу о возможности существования «фильтрующихся форм» у листерий. Дальнейшие исследования доказали наличие у листерий так называемых L-форм, возникающих под действием факторов физической, химической или биологической природы.

Листерии хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красками. По Граму они окрашиваются положительно (темно-фиолетовый цвет). Возможно

биполярное окрашивание листерий, которое Н. Р. R. Seeliger (1961) связывает с различной скоростью обесцвечивания средней части и концов микробной клетки.

Грамположительная окраска свойственна, как правило, молодым культурам листерий. В 2-5-дневных культурах часть клеток легко обесцвечивается спиртом и поэтому возможно окрашивание грамотрицательно. С 14 дня почти все клетки в культуре листерии могут окрашиваться грамотрицательно.

По нашему мнению, изменение окраски листерий по мере старения культуры связано с гибелью и аутолизом бактериальных клеток. Чем старше культура, тем больше в ней погибших клеток, соответственно больше клеток, окрашивающихся грамотрицательно. Особенно часто это наблюдалось в культурах, выращенных при температуре 37 °С, в то время как микробные клетки, выращенные при температуре 20 °С, имели грамположительную окраску.

В зависимости от возраста культуры клетки листерий отличаются по своим электронно-микроскопической плотности и строению. В молодых культурах большинство клеток однородны и окрашены в темный цвет. При окраске по Граму клетки из этих культур окрашивались резко положительно. В старых культурах обнаруживали клетки с неоднородной электронно-микроскопической плотностью, средняя часть клеток выглядела в виде гранулярной массы. В мазках, окрашенных по Граму, клетки из этих культур были нечетко окрашенными или целиком грамотрицательными.

Бактериологу нужно помнить об этих свойствах листерий при их идентификации и дифференциации от других видов микробов.

В листериях не обнаружены включения серы, железа, жира, не выявлено наличия метакрохроматических зерен волютина. Кислотоустойчивостью листерии не обладают, спор не образуют.

Подвижность. Отличительной особенностью листерий является их подвижность – ценный дифференциально-диагностический признак, позволяющий отличать листерии от сходных по тинкториальным свойствам рожистых бактерий. Подвижность возбудителя листериоза своеобразная – кувыркающиеся, вращательные движения в сочетании с поступательными.

Однако подвижность можно уловить лишь при соблюдении определенных условий культивирования. Дело в том, что подвижность листерий наиболее хорошо выражена в молодых (6-12-часовых) культурах, выращенных при комнатной температуре (20-22 °С). Листерии, выращенные при 37 °С, как правило, лишены подвижности, и лишь единичные клетки сохраняют таковую.

Проведенные нами электронно-микроскопические исследования показали четкие различия в наличии и отсутствии жгутиков у листерий, выра-

Таблица 1.3. Устойчивость возбудителя листериоза во внешней среде

Объекты внешней среды	Продолжительность сохранения жизнеспособности	Исследователь
Почва	В период весна-лето до 33 дней, осень-зима	М. А. Бараненков, 1963
	До 5 месяцев, летом до 33, зимой до 72 дней	М. М. Халимбеков, 1956
	Около двух лет	В. Warnecke, 1963
Почва, загрязненная навозом	Весной до 33 дней, летом до 20 дней, осенью до 55 дней, зимой до 115 дней	М. А. Бараненков, 1963
Песок	До 10 месяцев	В. Warnecke, 1963
Вода	При температуре 35-37°C до 346 дней, 15-20°C до 299 дней, 2-8°C до 737 дней	Л. А. Поманская, 1961
	Летом от 70 дней до 15-20 месяцев	М. А. Бараненков, 1963 А. В. Селиванов, Г. А. Гриницина, 1961
Лед	709-928 дней	Л. А. Поманская, 1961
	5,5 месяцев	М. А. Бараненков, 1963
Овес	До 105 дней	В. И. Попов, 1960
	До 10 месяцев	Г. А. Гриницина, 1964
Замороженный овес	До 1009 дней	Л. А. Поманская, 1961
Отруби	До 105 дней	В. И. Попов, 1960
	От 5 до 12 месяцев	А. В. Селиванов, 1961
Комбикорма	До 10 месяцев	Г. А. Гриницина, 1962
Сено	До 134 дней	В. И. Попов, 1960
	До 8 месяцев	Г. А. Гриницина, 1962
	От 40 до 180 дней	М. М. Халимбеков, 1956
Мясо-костная мука	До 134 дней	В. И. Попов, 1960
Навоз	В весенне-летний период 2-4 месяца, в осенне-зимний период 5-7 месяцев	А. В. Селиванов, Г. А. Гриницина, 1961
	Летом до 22, зимой до 60 дней	М. М. Халимбеков, 1956
Трупы в земле	От 45 дней до 4 месяцев	М. А. Бараненков, 1963
Шкуры	Неконсервированные до 90 дней, консервированные солью до 62 дней	М. А. Бараненков, 1963

щенных при 22 °С и 37 °С соответственно. Исследование этих же культур методом висячей капли подтвердило почти полную неподвижность листерий в случае термостатного культивирования и хорошо выраженную подвижность в случае культивирования при 22 °С.

Число жгутиков у листерий, по данным различных исследователей, колеблется от 1 до 5.

Подвижность листерий также зависит от продолжительности инкубации культуры, характера среды и ее рН. По мере удлинения срока инкубаций подвижность листерии снижается, а наиболее активное движение наблюдалось

у листерий, выращенных на жидких и полужидких средах. Все сказанное выше о подвижности листерий необходимо учитывать при проведении бактериологического исследования на листериоз. Таким образом, методически неверно проведенное исследование на подвижность может служить причиной неправильных выводов о принадлежности выделенного микроба.

Устойчивость к факторам внешней среды. *L.monocytogenes* могут длительное время сохранять свою жизнеспособность во внешней среде и размножаться в мертвых тканях при низкой температуре, установлена возможность размножения листерий в почве. Число микробов возрастало за 6 суток при 18-20 °С во влажной почве (влажность 32 %) в 1530 раз и в более сухой (влажность 25 %) – в 3164 раза в речной воде, в воде прудов и других водоемов. Поэтому загрязненные листериями водоемы опасны в эпизоотическом и эпидемическом отношениях. Данные по устойчивости листерий, во внешней среде представлены в таблице 1.3.

Листерии сохраняются в кале и моче овец от 5 до 12 месяцев. Прямые или рассеянные солнечные лучи убивают их в течение 2-15 суток. В кошаре при колебании температуры от минус 4 до 24 °С, влажности 30-98 %, скорости ветра 0,063-0,160 м/сек, освещенности 5-585 люкс листерии сохранялись на стенах, полу, яслях, щитах до 8-10 месяцев, в решетках до 14 месяцев; на выгульном дворе до 15-45 суток, зимой до шести месяцев.

Листерии погибают под действием 5 % раствора лизола или креолина через 10 минут; 2,5 % растворы формалина или едкого натра убивают их через 20 минут, марганцовокислый калий в 2,5 % концентрации – через 5 минут, раствор риванола 1:250 – через 1 час, раствор сулемы 1:1000 – через 5 минут, раствор хлорной извести при содержании 100 мг активного хлора в 1 л – в течение одного часа, 200 мг в течение 30 минут, 400 мг в течение 10 минут.

Листерии хорошо развиваются в стерильном овечьем молоке при температуре от 4 до 20 °С; устойчивы к тепловой обработке сыра; в кислом молоке сохраняют жизнеспособность до 48 часов при температуре 18-20 °С и более 6 дней при 10 °С. В пробах молока и сыворотки листерии сохраняются около двух лет.

Приведенные данные свидетельствуют о весьма значительной устойчивости листерий во внешней среде и по отношению к различным физико-химическим факторам. Очень важны сведения о возможности размножения листерий в почве и воде. Все эти наблюдения имеют чрезвычайно важное эпизоотическое и эпидемическое значение, объясняют причины стационарности болезни (повторяемость в неблагополучных пунктах в течение нескольких лет подряд) и должны учитываться при проведении профилактических мероприятий.

Устойчивость листерий к воздействию физико-химических факторов

а) **Температурный фактор.** Интерес к температурной устойчивости листерий имеет практическое значение. По данным И. С. Тартаковского и др. (2002) наибольшее число исследований посвященных изучению терморезистентности листерий, обусловлено определению режимов пастеризации молока, необходимых для гибели микроорганизма. Особенно большое внимание, тема привлекла после вспышки листериоза в Новой Англии (США), когда при употреблении в пищу пастеризованного молока, контаминированного листериями, заболело 49 человек и 14 из них скончалось (D. Fleming, 1985). Ретроспективный анализ литературы дает ряд противоречивых сообщений о термоустойчивости листерий. Рекомендуемые в настоящее время FDA (США) режимы пастеризации молока, составляющие 71,7 °С в течение 15 минут или 62,8 °С в течении 30 минут, считаются достаточными для полной инактивации листерий. J. Potel (1951) сообщил, что листерии в молоке выдерживают температуру 80 °С в течение 5 минут.

R. Bearn (1958) указывал, что листерии при концентрации 5×10^4 м.т./мл выдерживают температуру 61,7 °С в течение 35 минут. J. Donker-Voet (1962) приводит данные о том, что инактивация листерий в молоке происходит при 73 °С в течение 15 сек. J. Bradshaw (1985) исследовал термоустойчивость эпидемического штамма листерий при его концентрации 10^{10} м.т./мл молока. Автор термически обрабатывал данную суспензию в герметически закрытых пробирках из бромсиликатного стекла и пришел к выводу, что листерии не выдерживают режима пастеризации (72,7 °С – 15 сек.). К аналогичным выводам пришли и C. Donnelly et al. (1986, 1987).

В последнее время ряд ученых утверждает, что способность листерий выживать при температуре пастеризации связана с внутриклеточным персистированием листерий в макрофагах или нейтрофилах. Оригинальные исследования были проведены группой V. Binning et al. (1986, 1988). Они изучали термоустойчивость внутриклеточных и свободно находящихся листерий в молоке коров. Внутриклеточно расположенные листерии получали путем их фагоцитоза фагоцитами молока (88 % – полиморфно-ядерные лейкоциты – ПЯЛ, 8 % – макрофаги, 4 % – лимфоциты). Исходная концентрация свободно суспендированных и внутриклеточных листерий равнялась 10^6 м.т. в 1 мл молока. По результатам параллельных экспериментов с прогреванием образцов при температурах 57,8; 62,8; 66,1; 68,9; 71,7; 74,7 °С авторы пришли к выводу, что внутриклеточное расположение листерий не повышает их терморезистентность. Однако эти исследователи отмечали относи-

тельную эффективность пастеризации при 62,8 °С в течение 30 минут, и недостаточную эффективность данного процесса при 71,7 °С в течение 15 сек.

Группа М. Doyle (1987) также изучала воздействие температурного фактора на устойчивость листерий в молоке. Исследователи указывают, что в 11 опытах из 12 в каждом полиморфноядерном лейкоците находилось в среднем 1,5-9,2 клетки листерий. Продукт прогревался в диапазоне 71,7 – 73,9 °С в течение 16,4 сек. и температурном диапазоне 76,4 – 77,8 °С в течение 15,4 сек. Полученные результаты свидетельствуют, что в 6 из 9 опытов с нагреванием в диапазоне 71,7 – 73,9 °С листерии оставались жизнеспособны. Авторы пришли к выводу, что режим пастеризации 71,7 °С – 15 секунд не инактивирует листерии.

J. Garayzabal et al. (1986) сообщили, о выделении листериозной палочки из пастеризованного молока (режим 78 °С – 15 сек.). Авторы исключают возможность контаминации и считают, что данный режим пастеризации не инактивирует листерии. Листерии не погибают в молоке при 60 – 67,5 °С, хотя именно этот режим чаще всего используется при изготовлении мягких сыров. Видимо с этим связаны вспышки листериоза при употреблении мексиканского и других сортов мягких сыров.

По данным итальянских исследователей (Qulntavalla S. et al., 1989) необходима экспозиция от 10,5 до 14,3 минуты при температуре 65°С для снижения количества указанных бактерий на 70 %. Испанские исследователи (F. Suares et al., 1989) утверждают, что пастеризация позволяет инактивировать культуру листерий. По сообщениям канадцев (J. Farber et al., 1988) пастеризация молока при 60-67,5 °С является неэффективной. К аналогичному выводу пришли и французские исследователи (J. Lamare et al., 1989). Они отмечают, что при 72 °С термическая устойчивость листерий снижалась лишь после экспозиции в 1,6 минуты. Способность листерий выживать после пастеризации молока остается до конца не выясненной и требует дальнейшего изучения. Слабо изучены и вопросы инактивирующего воздействия высокой температуры на мясные продукты, полученные от больных листериозом животных. Так, по данным Р. Karaioannpplan (1980) листерии выживают в мясных фрикадельках в течение 15 минут при прогревании до 85 °С. S. Carpentez (1989) изучал выживаемость листерий в мясе птицы, подвергнутой тепловой обработке с последующим длительным хранением (до 4-х недель) при температуре от 4 до 10 °С. Образцы были подвергнуты вакууму паковке из газонепроницаемой пленки. По его данным в образцах, подвергнутых тепловой обработке до 71,1 °С листерии выживают. Хранение образцов при указанных температурных параметрах способствовало увеличению количества популяции листерий. Примерно к такому же выводу пришли и канадские исследователи (J. Farber et al., 1989), утвержда-

ющие, что готовые ферментированные мясные продукты, обработанные посолочными веществами, и подвергнутые термообработке по стандартным режимам могут содержать листериозную культуру. Учитывая возросшее применение в быту микроволновых печей ряд исследователей (B. Ling et al., 1989; M. Harrison et al., 1989) изучали действие микроволновой обработки пищи на рост и развитие листерий. Установлено, что обработка мяса в СВЧ печах мощностью 700 Вт, при использовании ряда температурных параметров до показателя 82,2 °С не избавляла пищевой продукт от контаминации листериями, а последующее ее содержание в пределах 10 °С приводило к увеличению числа бактерий. При температурном показателе в 87 °С и экспозиции в 15 минут количество жизнеспособных листерий снижалось до 10 КОЕ/г. После завершения цикла приготовления пищи согласно инструкции (38 мин.), когда температура поверхности тушки цыпленка достигла 80 – 99 °С (внутри тушки температура составляла 78 °С) количество жизнеспособных клеток снижалось, но полного избавления продукта от листерий не наступало.

М. П. Бутко (1983) сообщает, что при варке колбасных батонов диаметром 35-50 мм листерии погибают через 75 мин. и не менее чем через 90 мин., если диаметр колбасы составляет 65 мм. При температуре 75-85 °С в кусках мяса от животного, больного листериозом, при их весе до 2,5 кг и толщине до 10 см, листерии инактивируются после одночасовой варки.

б) Влияние концентрации NaCl. Н. Stenberg (1955) установил факт устойчивости листерий к высоким концентрациям поваренной соли. Так листерии сохраняют жизнеспособность в бульоне с 6 % NaCl более года, в органах заражённых животных при хранении их в 6 % растворе хлористого натрия до 2 месяцев, в бульоне при 24 % содержании поваренной соли до 22 дней. По данным Ю. А. Малахова (1960) в мясе, хранившемся в 24 % растворе NaCl, листерии сохраняли жизнеспособность до 400 дней. Будко М.П. сообщает, что в мясе, находящемся в рассоле, содержащем до 30 % NaCl, 0,05 % нитрата Na и 0,25 % нитрата K, листерии сохраняли жизнеспособность в течение 2 месяцев при температуре хранения 4 °С. По данным J. Prentice (1989) в 25 % растворе NaCl листерии выживают до 132 суток.

в) Величина pH. При консервировании продуктов питания, в том числе мяса и мясопродуктов показатели концентрации хлористого натрия, pH, температуры взаимосвязаны и оказывают решающее действие на результаты консервирования. M. Shahamat et al. (1980), изучая влияние указанных параметров, а также ингибирующее воздействие нитрата натрия на листериозную клетку пришли к выводу, что антимикробное действие вышеприведённых веществ и факторов на листериозную палочку начинает проявляться уже в присутствии 3 % NaCl, pH-5,5 и низких температурах.

Группа J. Gare (1987) изучала выживаемость листерий в говяжьем фарше, хранящемся при температуре 4-8 °С. Пробы контаминировали микробной суспензией в дозах 5×10^5 – 5×10^7 КОЕ на 1 г и упаковывали в кислородопроницаемую и кислородонепроницаемую плёнку при стандартных показателях pH мясного фарша от здорового животного (5,5-5,8). Наблюдения проводились в течение 14 дней. Авторы пришли к выводу, что в мясном фарше листерии могут выживать в условиях охлаждения, не уменьшая числа жизнеспособных клеток, на протяжении всего времени исследования. O. Konner et al. (1986) также изучали влияние температуры, поваренной соли и величины pH на листериозную культуру. Установлено наличие роста листерий в капустном соке при температуре 30 °С и NaCl до 1,5 %. При 5 °С, pH – 5,6 и 5 % соли рост бактерий был в течение всех 25 дней наблюдения. При снижении pH до 4,4 рост листерий прекращался на 3-й день. При температуре 5 °С и pH 4,8 скорость отмирания листерий была меньше, чем при температуре 30 °С. Авторы пришли к выводу, что листерии хорошо растут при значении pH меньшем, чем те, которые считаются минимальными для их роста. Данные исследования по контаминации и сохранности листерий в капустном соке были проведены после вспышки листериоза в Канаде в 1981 году, когда заболел 41 человек. Причиной вспышки послужил салат из капусты, обсемененной листериозной палочкой (W. Schlech, 1983). Эти данные в определённой степени совпадают с результатами исследований ранее проведённых В. И. Гершуном (1979). Он утверждает, что в силосном соке с показаниями pH 4,2-5,2 листерии сохраняются 5-20 дней, а при величинах pH 5,7-9,6 они остаются жизнеспособными до 24 месяцев.

Помимо широкого диапазона устойчивости к температуре, изменениям величины pH, концентрации солей, не меньшее значение имеет резистентность листерий к другим факторам, что наряду со способностью к росту в аэробных условиях позволяет листериям размножаться в широком диапазоне условий внешней среды и продуктах длительного хранения.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Культивирование листерий на искусственных питательных средах

Листерии растут при свободном доступе кислорода воздуха на обычных (МПА, МПБ) питательных средах. Однако по отношению к кислороду их правильнее характеризовать как факультативные анаэробы, в связи с тем, что было отмечено хорошее развитие листерий при уменьшенном содержании кислорода и при замене кислорода углекислотой. Если же создать строго анаэробные условия без добавления углекислоты, то рост листерий резко замедляется, вплоть до полного прекращения. П. М. Свинцов (1946) наблюдал рост листерий на бульоне Китт-Тароцци в эксикаторе при давлении в 8 мм ртутного столба.

Наилучший рост листерий отмечается при температуре 37 °С. Однако Ю. А. Малахов (1960) считает, что оптимальной температурой для выращивания листерий является 30-31 °С, а не 37 °С. Установлено также, что листерии хорошо растут при комнатной температуре (20-22 °С), но их рост появляется позднее и бывает более слабым, чем при выращивании этих же штаммов при 37 °С. Через 3-4 дня интенсивность роста становится такой же, как и при двухдневном выращивании в термостате. Н. Р. R. Seeliger (1961) считает температуру 20 °С наиболее подходящей для физиологического развития микробов. Как уже указывалось раньше, при этой температуре подвижность листерий выражена значительно сильнее, чем при выращивании культуры в термостате при 37 °С. Установлена способность листерий размножаться при низких температурах. При температуре от минус 0,5 до 4 °С листерии дают хороший рост, хотя и замедленный в сравнении с выращиванием при температуре 37 °С (колонии листерий обнаруживают через 10-14 дней культивирования при температуре 4 °С). Верхняя граница роста листерий лежит между 42 и 44 °С.

Листерии способны расти на искусственных питательных средах при колебании рН от 5,0 до 8,0. Оптимальный рН для выращивания листерий 7,0-7,4. Наиболее удобны для выращивания возбудителя листериоза печеночные среды с добавлением глюкозы (1 %), глицерина (2-3 %), триптозы, сыворотки крови, яичного белка. Также к факторам роста листерий относятся органически связанные сера, гистидин, цистин, лейцин, изолейцин, аргинин, метионин, валин, цистеин, рибофлавин, биотин, тиамин, липоевая кислота. Интенсивный рост листерий отмечали на картофельном агаре с добавлением глюкозы и глицерина.

На обогащенных средах листерии растут значительно быстрее, чем на простых питательных средах рост их более скудный, и особенно трудно бывает получить первые генерации микробов при выделении их из патологического материала. Штаммы, несколько раз проведенные через обогащенные среды, в дальнейшем хорошо растут на простых питательных средах. Однако, было установлено, что вирулентность листерий, выращенных на средах с 1 % глюкозы, для мышей, в 4-9 раз меньше, по сравнению с вирулентностью листерий, культивируемых на средах с 0,2-0,6 % глюкозы.

Результаты экспериментов показали, что увеличение концентрации глюкозы в среде роста вызывает снижение активности ферментов в клетках (дегидрогеназы, каталазы), что указывает на связь вирулентности листерий с их окислительной способностью. Имеются данные о более интенсивном росте в присутствии железа вирулентных штаммов, чем авирулентных. В качестве исходных источников углерода и азота необходимы глюкоза и глютамин. Для нормального роста листерий на питательных средах необходимо наличие витаминов, в особенности рибофлавина, тиамина и биотина. Рост стимулируется Fe^{3+} и фенилаланином. По сообщению A. D. Larson (1965), отдельные штаммы листерий при выращивании нуждались в жирных летучих кислотах как в питательных веществах.

Рост на твердых средах

На мясопептонном агаре (МПА) в первые сутки роста обнаруживаются мелкие (0,2-0,5 мм в диаметре), прозрачные в проходящем свете, слегка выпуклые колонии. Со временем колонии несколько увеличиваются в размере (до 1-3 мм в диаметре), становятся более плоскими и приобретают сероватый оттенок при падающем свете.

Если посев производился пастеровской пипеткой, то иногда в первые сутки роста на поверхности агара наблюдали тонкую нежную пленку, как бы легкое потускнение. Такую пленку бывает сравнительно трудно заметить. На вторые сутки рост листерий легко обнаруживается в виде иризирующего налета на поверхности агара, а при увеличении – в виде морщинистой пленки.

На мясопептонном, печеночном и картофельнопептонном агарах с 1 % глюкозы и 3 % глицерина листерии растут пышно, в виде серо-белых колоний или налета. На глицериновом картофеле отмечается слабый рост в виде слизистого налета. На кровяном агаре обнаруживаются колонии, окруженные узкой прозрачной бесцветной зоной гемолиза.

При изучении характеристик роста, обнаруживают колонии листерий нескольких типов. Наиболее типичными для листерий и чаще всего встречающимися следует считать колонии S-формы – круглые, выпуклые, с ровными краями, блестящей поверхностью, прозрачные в первые сутки роста;

диаметр их обычно в пределах 1 – 1,5 мм. Эти колонии легко снимаются с агара. Как пишет Н. Р. R. Seeliger (1961), на кровяном агаре отдельные колонии S-формы могут достигать 6 мм в диаметре. При этом у них образуется утолщенная периферическая зона, центр несколько западает.

При длительном хранении на искусственных питательных средах культуры листерий диссоциируют – появляются колонии различных форм, причем эти изменения идут от гладких S-форм к шероховатым R-формам через ряд промежуточных стадий (SR, RS и др.).

Мы выделили культуру листерий R-формы из мозга овцы, которую длительное время лечили биомицином. Л. А. Поманская (1964) сообщила о выделении листерий R-формы из селезенки мертворожденного ребенка, а также из трупа степной пеструшки, погибшей в виварии. Эти факты говорят о возможности циркуляции измененных штаммов листерий в природе.

Колонии R-формы имеют шероховатые, неровные, как бы изъеденные края, несколько большие размеры, зернистую сухую консистенцию, трудно снимаются с агара. Микробные клетки из таких колоний иногда располагаются в виде цепочек, нитей, проявляют сильную склонность к спонтанной агглютинации, при пересеве их на бульон образуют пленку и зернистый осадок. Выделенный нами штамм листерий в R-форме обладал пониженной вирулентностью и только после пассажа через мозг мышей приобрел способность вызывать положительную конъюнктивальную реакцию у морских свинок. Л. А. Поманская (1964), однако, указала, что основные биохимические свойства R-культур по сравнению с S-культурами не изменились, снизилась лишь вирулентность и повысилась агглютинабельность. По степени диссоциации (соотношение колоний S- и R-форм) она наблюдала практически недиссоциирующие (0,25 R-колоний на 1000 S-колоний), слабо (3,2 R-колоний на 1000 S-колоний) и сильно диссоциирующие (34 R-колоний на 1000 S-колоний) культуры. После хранения одного штамма во льду в течение года при посеве на агар количество колоний R-формы увеличилось втрое, по сравнению с исходным.

По вопросу реверсии R-формы в S-форму единого мнения нет. Зеелигер (1961) сомневался в возможности такой реверсии. По его мнению, в культурах R-формы всегда присутствуют в небольшом количестве колонии S-формы, и преобладание их при последующих пересевах нельзя считать за реверсию. Такого же мнения придерживалась Л. А. Поманская (1964). В культуре, где было лишь 4 – 5 % колоний S-формы, после годового хранения в холодильнике она обнаружила 100 % колоний S-формы. Она рассматривает этот факт не как реверсию, а как простое отмирание измененных клеток.

С этим мнением согласны далеко не все исследователи. Да и сама Л. А. Поманская наблюдала случаи, когда после заражения белой мыши селекцио-

нированной R-культурой в посеве из селезенки выявлялось до 35 % колоний S-формы.

Приведенные факты свидетельствуют о значительной изменчивости листерий и о возможности циркуляции в природе таких измененных штаммов, в связи с чем работникам бактериологических лабораторий следует обратить особое внимание на это обстоятельство при постановке диагноза на листериоз.

Рост в жидких средах

Мясопептонный бульон (МПБ) в первые сутки роста листерий слегка мутнеет. Помутнение, как правило, равномерное, при встряхивании такой пробирки наблюдаются так называемые муаровые волны. Эти волны часто настолько нежны, что их можно видеть только при рассматривании пробирки на темном фоне. Через некоторое время (10-15 дней) бульон в пробирке светлеет, а на дне ее образуется слизистый осадок, который при встряхивании поднимается косичкой, которая с трудом разбивается в равномерную муть.

Штаммы R-формы в первые сутки роста также вызывают легкое помутнение бульона, на поверхности которого образуется тонкая пленка. В дальнейшем бульон просветляется, однако осадок в отличие от посевов штаммов в S-форме носит не слизистый, а крошковидный или хлопьевидный характер.

Н. Р. R. Seeliger (1961) справедливо замечает, что интенсивность роста листерий в жидких средах зависит от посевной концентрации. Обильный посев дает быстрое появление роста. При посеве небольшого количества микробов рост идет медленно или вообще не наступает. Это обстоятельство следует учитывать при проведении посевов из патологического материала: рекомендуются обильные посевы на искусственные питательные среды, а также предварительное обогащение материала (выдерживание патологического материала в холодильнике при температуре 4 °С в течение 4-8 недель).

На мясопептонном желатине (МПЖ) при посеве уколом культуры листерий растут в виде штыка только по ходу укола, не наблюдается никаких отростков, а также разжижения желатина. Это свойство листерий является очень ценным для дифференциации от возбудителя рожи – *Erysipelothrix rhusiopathiae*, который растет на МПЖ в виде ламповой щетки и, кроме того, разжижает желатин. Однако если в желатин добавить глюкозу, то листерии тоже формируют нитчатые щеткообразные ответвления. Следует отметить, что рожистые микробы дают щеткообразный рост как на простом, так и на обогащенном желатине, листерии – только на обогащенном.

На полужидком (0,2 %) мясопептонном агаре при посеве уколом листерии растут в виде сплошного столбика, что является подтверждением их подвижности.

Листерии способны лизировать эритроциты, однако эта способность проявляется не всегда. Наиболее хорошо выражена она у культур листерий в S-форме.

Культуры листерий в колониях R-формы вызывают слабый гемолиз. Гемолитическая способность выражена по отношению к эритроцитам человека, лошади, крупного рогатого скота, овец и кроликов. Н. Р. R. Seeliger (1961) писал, что гемолиз эритроцитов вызывали все свежие культуры, выделенные из патологического материала. П. М. Свинцов (1946) указывал, что гемолитическая способность у листерий повышается по мере пересевов на питательных средах.

Гемолиз на кровяном агаре выражается в виде прозрачной бесцветной зоны вокруг колоний – гемолиз типа β .

Возбудители рожи свиней редко вызывают гемолиз типа α (зеленоватая зона вокруг колоний). Разрушение эритроцитов можно наблюдать и при посеве листерии на жидкие кровяные среды.

Н. Р. R. Seeliger (1961) связывал растворение эритроцитов с образованием листериями гемолизина, который образовывался и на средах, не содержащих кровь. Фильтрат таких сред вызывал лизис эритроцитов.

Было установлено, что разные штаммы обладают различной способностью экспрессировать гемолизин. Скорость его образования и количество зависели от характера среды, температуры и времени инкубации. Выявлена белковая природа гемолизина и наличие в его структуре связи S–S, которая являлась гемолитически неактивной. Под влиянием действия цистина и других восстановителей группа S–S переходила в гемолитически активную группу SH. С помощью электрофореза у гемолизина выявлены две фракции: одна напоминает гамма-глобулины, другая близка к альбуминам.

В работе Е. М. Jenkins, А. N. Njoku-Obi, Е. W. Adams (1964) описано получение очищенных препаратов гемолизина из вирулентных и невирулентных штаммов листерий. Гемолизин листерий термостабилен, чувствителен к протеолизу при обработке трипсином, обладал антигенными свойствами.

М. Füzi, J. Pillis (1962) установили, что штаммы листерий регулярно вызывали помутнение агаровой среды, содержащей 5 % яичного желтка, при инкубации в течение шести дней при температуре 37 °С. Способность образовывать значительные помутнения у отдельных штаммов совпадала с их выраженной гемолитической активностью. Штаммы, вызывающие слабое помутнение, проявляли слабую гемолитическую активность. По мнению авторов, эта реакция была связана с действием ферментов листерий.

Характерной особенностью листерий является их способность вызывать почернение среды с эскулином (глюкозид из коры каштана *Aesculus hippocastani*), в то время как возбудитель рожи не изменяет цвета среды.

Урбахи Шабинский (1955) сообщил, что листерии размножаются в куриных эмбрионах, причем хороший рост был отмечен в белке и желтке. И. А. Бакулов и др. (1965) также успешно культивировали листерии на куриных эмбрионах, получая во всех случаях чистую культуру, типичную по своим свойствам.

Подбор селективных сред для листерий

Длительное время существовали объективные методические трудности, возникающие у бактериологов при выделении и типировании листериозных бактерий. Так, например, М. Gray (1964) указывал, что по заявлению отдела здравоохранения штата Массачусетс (США) только 55 % лабораторий правильно идентифицировали высланную им контрольную листериозную культуру. По данным К. Шлыгиной (1970) из 144 культур, поступивших в ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи для идентификации, только 39 % являлись листериозными. По сообщению В. М. Котлярова (1973) только 60 % штаммов, присланных во ВНИИВВиМ как листериозные, соответствовали этой бактериальной культуре.

Дажесамое раннее сообщение о листериозе у кроликов показало трудности и нерегулярные результаты при выделении и типировании *L.monocytogenes*. Многие последующие исследования, направленные на выделение бактерий рода *Listeria* из проб, сильно контаминированных конкурентными микроорганизмами, тоже подчёркивали указанные проблемы (Н. Seeliger 1961, 1986, М. Guay, А. Killinger 1966, Н. Welshimer 1981).

В одном из первых исследований чистых культур и проб от овец и кроликов М. Gray (1950) обнаружил, что лишь минимальная задержка роста *L.monocytogenes* и грамположительных кокков происходит в средах содержащих 0,05-0,1 % теллурита калия. Колонии *L.monocytogenes* отличали по черным центрам и характерным сине-зеленым краям при микроскопии по методу Генри. Перенос культур в бульон с теллуритом или без него через 24 часа инкубации при 37 °С позволял проводить предполагаемую дифференциацию *L.monocytogenes* пока относительное количество конкурентных микрококков было низким. Теллурит калия один или чаще в комбинации с другими ингибиторами впоследствии использовался в других составах сред как селективный агент (С. Lehnert 1964, М. Khain 1973, Bravenieta 1973).

В 1951 году К. Shimizu с сотр. сообщили об использовании 5-нитро-2 фуруримед-аминогуанидина Hd («гуанофурацин») в конечных концентрациях 1:8000 – 1:15000 как селективного агента для выделения *L.monocytogenes* из проб назальных выделений или феций овец. Пытаясь повысить селективность и снизить задержку роста *L.monocytogenes*, С. Bride и Girard (1960),

описали использование обогащенного бульона, содержащего нитрофуразон («фурацин» конечная концентрация 1:100 000), с последующим посевом на селективную, содержащую кровь среду, состоящую из фенилэтанол-агаровой основы с 0,05 % хлористого лития и 1 % глицина в качестве селективных агентов.

Пробы инкубировали в обогащенном бульоне при 37 °С в течение 18 часов, а затем наносили на селективную среду еще на 24-48 часов при 37 °С. В опытах со смешанными культурами *E.coli*, *P.aeruginosa*, *P.vulgaris*, *St.pyogenes*, последние не росли после инкубации в обогащенном бульоне и переносе в селективную питательную среду. *L.monocytogenes* росли в виде серых колоний, не обнаруживающих зон гемолиза; *B.subtilis*, *St.faecalis* вырастали в меньшем количестве и отличались от *L.monocytogenes* по биохимическим свойствам. Через 26 лет эту основную среду на обогащенном бульоне с модификациями оригинальной среды (Me Bride) Мак Брайда-Жиарда включили в стандартный референс-метод в США (J. Lovett 1987).

Несомненно, чаще всего предлагаемым селективным агентом для выделения *L.monocytogenes* была налидиксовая кислота. В первом сообщении Beerens et al., (1966) описывал селективный рост *L.monocytogenes*, стрептококков и *Erysipelothrix* на питательной среде, содержащей 40 мкг/мл налидиксовой кислоты. После этого многие другие исследователи использовали налидиксовую кислоту в разных вариантах селективных питательных сред для *L.monocytogenes*.

Многие из этих сред содержали другие ингибиторы, включая различные неорганические соли, например, хлористый литий, ацетат таллия и трехокись хрома и бихромат калия. Для снижения роста *St.faecalis* Despirres (1971) предложил селективный бульон, содержащий помимо 40 мкг/мл налидиксовой кислоты, 3 мкг/мл полимиксина В и 0,02 мкг/мл метиленового голубого. Эта среда была эффективной для выделения *L.monocytogenes* из фекальных проб, взятых от матерей заражённых плодов или заражённых детей. Акридин или акрифлавин и другие краски (включая индиго-кармин, метиленовый голубой, пиронин, тионин) так же часто вводились в селективные среды для *L.monocytogenes*.

После обогащения высоко контаминированных проб в бульоне, содержащем 3 токсических соли металла, тионин, налидиксовую кислоту и амфотерицин В. Mavrothalassitis (1977) предложил перенос культуры на дифференцирующий агар, содержащий пиронин и дополнительно краску феназин, галлоцианин. Существуют вариации в дозировке красок, используемых в сравнительных исследованиях. В каждом случае следует титровать отдельные партии реагентов, чтобы определить эффективные селективные концентрации, не задерживающие рост *L.monocytogenes*.

Другие неоднородные ингибирующие соединения включают тиогликолат и тиоцианат. Тиогликолат также был применен в «обогачительно-транспортной» среде (J. Bockemuhl, 1974). Одним из самых оригинальных ингредиентов, предложенных для селективной питательной среды был прополис, материал используемый пчёлами для выстилания стенок сот. Эта питательная среда содержала также налидиксовую кислоту, полимиксин В, этакридин и индигокармин и обладала повышенной селективностью для *L.monocytogenes* в смешанных культурах по сравнению со средами без прополиса.

Более поздние составы сред представляли комбинации налидиксовой кислоты, полимиксина В и акрифлавина в качестве ингибирующих агентов.

Таблица 1.4. Неселективные питательные среды для выделения бактерий рода *Listeria*

Название среды	Область применения
Питательный агар / питательный бульон	В качестве основных или специальных сред
Триптон-соевый агар / триптон-соевый бульон	В качестве основных сред для культивирования широкого круга микроорганизмов, выделение листерий из биологических жидкостей, предварительного подращивания
Дрожжевой триптон-соевый агар / дрожжевой триптон-соевый бульон	Обнаружение листерий, выделение их из биологических жидкостей, пересев подозрительных колоний для последующей идентификации, освещение по Генри
Основа колумбийского кровяного агара (1 % агар)	В качестве основы для приготовления кровяного, шоколадного агаров, а также различных селективных и дифференциальных сред
Среда для выявления подвижности листерий	Выявление подвижности листерий при различных температурах
Основа лецитиназного агара	Определение лецитиназной активности листерий

Таблица 1.5. Селективные питательные среды для выделения и идентификации бактерий рода *Listeria*

Название среды	Область применения
Бульон Фрезера с селективными добавками	Для выделения (и подсчета) листерий из пищевых продуктов и кормов для животных
Основа бульона вторичного обогащения для листерий с селективными добавками	Для выделения листерий из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, культивирования и обогащения
Хромогенный агар для идентификации листерий с селективными добавками	Для быстрого обнаружения и идентификации листерий различных видов (esp. <i>L.monocytogenes</i>)
Бульон обогащения для листерий, модифицированный	Для селективного обогащения видов <i>Listeria</i>
Среда обогащения для листерий (среда UVM)	Обогащение при выделении из клинического материала
Агар (ПАЛКАМ) с селективными добавками	Для селективного выделения и идентификации листерий
Бульон (ПАЛКАМ) с селективными добавками	Для селективного обогащения и идентификации листерий
Основа Оксфордской среды для листерий с селективными добавками	Для выделения листерий из образцов патологического, клинического материала и продуктов питания
Основа ALOA агара для листерий	Для быстрого обнаружения и идентификации различных видов листерий

После наблюдения Larson и сотр.(1985), касающегося резистентности штаммов *L.monocytogenes* к моксалоكتаму in vitro, W. Lee et al. включили этот антибиотик широкого спектра (20 мкг/мл) в модифицированный агар Мак Брайда-Жиарда. Они специализировались на выделении *L.monocytogenes* из проб говядины и мяса других видов животных, в которых большую проблему представляет обильный рост как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Ими же обнаружено, что увеличение в 10 раз концентрации хлористого лития по сравнению с оригинальными прописями (т.е. до 5 мг/л) и замена глицинангидрида (10 мг/мл) на глицин приводили к меньшей ингибции роста штаммов *L.monocytogenes*. Интересно, что о значении глицинангидрида впервые упомянули R. Bearns et al. ещё 1959 г. до публикации своего сообщения в следующем году. Они рекомендовали фенилэтаноловую агаровую основу, содержащую 10 мг/мл глицинангидрида и 0,5 мг/мл LiCl, а для контаминированных материалов (фекалии, почва, материалы вскрытия и т.п.) 200 мкг/мл циклогексимида («Актидион»).

Jaу (1987) сообщил о питательной среде, названной CPN агаром, обладающей ещё большей селективной способностью. Питательная среда содержит налидиксовую кислоту, фенилэтанол и I циклогексанидин в качестве ингибиторов и Tris для получения конечного pH 8,2. Колонии *L.monocytogenes* в чистых или смешанных культурах были крупнее (2 мм вместо 1 мм) на CPN, чем на агарах Мак Брайда.

J. Lovett (1987) также выявлены высокие селективные свойства при использовании модифицированной среды Мак Брайда и Жиарда, содержащей циклогексанид, глицинангидрид, 0,5 мг/мл LiCl, но без крови.

В последние годы большое распространение в качестве селективных сред (с добавлением эскулина) для выделения листерий получили Оксфорд и PALKAM агары. Основа Оксфордской среды для листерий с добавками рекомендуется для быстрого обнаружения и идентификации различных видов листерий. На Оксфорд агаре через 24 часа на зеленоватом фоне вырастают очень мелкие, едва заметные, сероватые колонии. Через 48 часов колонии заметно увеличиваются в размере, становятся серыми с коричневато-черными включениями внутри и потемнением среды вокруг колоний.

Агар ПАЛКАМ (Полимиксин (Polyuxin) Акрифлавин (Acriflavine) Литий (Lithium chloride) Цефтазидим (Cefazidine) Эстутин (Esculin) Маннит (Mannitol) предложен Van Netten et al. (1989), используется для селективного выделения и идентификации листерий. На ПАЛКАМ-агаре через 24 часа вырастают мелкие, едва заметные серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии, диаметром 1 мм, часто с черным центром. Колонии окружены характерным темным ореолом на красном фоне агара. Через 48 часов колонии вырастают до 1,5-2,0 мм в диаметре с характерным вогнутым центром,

сохраняя окраску и темный ореол вокруг. Посевы инкубируют при 30 °С в течение 48 часов. Рост листерий сопровождается потреблением эскулина и почернением колоний, что позволяет на основании ограниченного числа тестов идентифицировать культуру *L.monocytogenes*.

Для выделения листерий из клинического материала, продуктов питания, большое значение имеет процедура обогащения. На общем микробном фоне количество листерий в исследуемом материале может быть невелико т.к. скорость роста листерий уступает многим условно-патогенным бактериям. Поэтому процедура обогащения часто является необходимым условием выделения культуры листерий из исследуемого материала. Основа бульона Фрезера с селективными добавками используется как первичная, так и вторичная среда обогащения для выделения, культивирования и подсчета листерий. Рост листерий на этом бульоне проявляется почернением среды через 24-48 часов при 37 °С. В практике с успехом применяются и другие питательные среды, представленные в таблицах 1.4. и 1.5.

Широкое применение при выделении листерий нашли среды, в состав которых в качестве селективной добавки входит эскулин в сочетании с цитратом железистого аммония. Цвет среды в результате реакции продуктов гидролиза эскулина с цитратом железистого аммония меняется, что приводит к потемнению бульона. Данные селективные реагенты входят в состав бульона Фрезера, бульона UVM, селективного обогатительного бульона для выделения листерий, рекомендованных стандартом ISO 10560-93.

Помимо сред с эскулином для обогащения используют триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом, в котором в качестве селективной используют акрифлавин и налидиксовую кислоту. Применение селективных сред значительно повысило эффективность выделения листерий из клинического материала и продуктов питания по сравнению с ранее применявшимися средами.

Усовершенствованные и «быстрые» методы выделения листерий

Разработано множество методов, увеличивающих процент выделения листерий и ускоряющих процесс идентификации.

Несмотря на широкий интерес к параметрам, обеспечивающим хороший рост бактерий, и средам, большинство исследователей соглашается, что самым чувствительным методом выделения *L.monocytogenes* из проб, сильно контаминированных конкурентными микроорганизмами, остается модифицированный метод холодного обогащения, первоначально предложенный М. Gray et al. (1948). Он основан на том, что *L.monocytogenes* не только

выживают, но и размножаются в диапазоне от -1 до +4 °С. Рекомендовано периодическое субкультивирование листериозных культур в обогащенном бульоне при 4 °С до нескольких месяцев. Считалось, что это единственный культуральный метод успешного выделения изолята в случаях, когда микроорганизмы первоначально были обнаружены при микроскопии. Целесообразно напомнить, что действительные механизмы эффективности холодового обогащения остаются гипотетическими. Вероятно, они включают комбинацию персистенции и роста клеток *L.monocytogenes*, гибель конкурентов и пониженное или понижающее влияние неизвестных «ингибиторов», присутствующих в сложных пробах, таких как зараженная ткань, фекалии или пробы из окружающей среды. Несмотря на высокую чувствительность, очевидно, что холодовое обогащение, в общем, непрактично для всех исследований, за исключением исследований продолжительного характера.

Mc Brain (1986), W. Lee (1989) продемонстрировали положительные результаты по выделению *L.monocytogenes* из разных видов мяса последовательным культивированием в среде LEB при 30 °С в течение 24 часов с последующим разведением 1:100 в LEB с 25 мкг/мл акрифлавина и, наконец, субкультивированием при 30 °С в модифицированной питательной среде Мак Брайда с максалактамом. Продолжительность процедуры составляет 48 часов культивирования в обогащенных бульонах, 24 часа на селективной пластине и 24-48 часов для подтверждения видовой принадлежности колоний. Авторы сообщают о выделении *L.monocytogenes* из 70 % проб измельченной говядины, 43 % свиных сосисок и 48 % мяса домашних птиц (всего из 62 проб всех типов). Наличие *L.monocytogenes* в мясе не является новым фактом, но эти высокие цифры положительных проб выдвигают на первый план необходимость в усовершенствованной методологии. В действительности значение такой контаминации для здравоохранения остается неясным. Слишком строгие требования, вплоть до полной свободы от *L.monocytogenes* всех продуктов определено не практично. Однако, новые методы позволяют проводить исследования в более широком масштабе, что вырисовывает картину действительного распространения микроорганизма в разных продуктах и его связь с болезнью.

Doyle и Schoeni (1986, 1987) сравнили эффективность холодового обогащения, метод Ловетта (1987) и свой собственный ускоренный селективный метод обогащения для выделения *L.monocytogenes* из феций, тканей экспериментально зараженных животных и из сыров. Их метод обогащения включал 24-часовое подращивание в триптозном бульоне, содержащем овечью кровь, полимиксин В, акрифлавин и налидиксовую кислоту. Важно, что образцы выращивали в атмосфере с пониженным содержанием кислорода. Оба исследования показали недостаточную эффективность

существующих на то время культуральных методов. При исследовании мягкого сыра *L. monocytogenes* выделились не с первого раза приблизительно из 21 % проб.

Методы подготовки пищевого продукта для бактериологического исследования на листерии и схемы посева на питательные среды

Растительные продукты

А. Первый способ (Рекомендации D. Ноо et. al., 1987)

Исследуемый растительный продукт режут на кусочки не больше 1 см в длину. Полученные и подготовленные образцы весом не менее 500 г сохраняют при температуре +4...+6 °С в течение всего срока исследования. Образцы продукта исследуют в день приготовления, а также на 9, 25, 39, 64 дни хранения (при отсутствии положительных результатов в ходе предшествующих исследований).

Подготовленный образец весом 100 г соединяют с 200 мл физиологического раствора в полиэтиленовом мешочке и встряхивают в течение 1-2 минут. Далее промывающую жидкость и ее серийно разведенные растворы засевают на плотные селективные питательные среды и культивируют при 30 °С в течение 48 часов.

Б. Второй способ (Рекомендации L. Benchat et. al., 1987)

Исследуемый растительный продукт делят на порции по 20 г и соединяют со 100 мл питательного бульона в колбах, объемом 250 мл. Полученные образцы исследуют в день приготовления, а также через 14 и 30 дней, сохраняя данную суспензию при температуре 4...6 °С.

В начале исследования смесь в колбе встряхивают 2-3 минуты, затем отобранную пробу серийно разводят и засевают на плотные селективные питательные среды.

Молочные продукты

А. Первый способ (Рекомендации управления пищевой промышленности и медицинских препаратов США «FDA» 1987)

Пробы (если это твердый молочный продукт, например сыр, то пробы, берут с поверхности и изнутри и мелко измельчают) в количестве 25 г помещают в 225 мл жидкой питательной среды, культивируют при 30 °С. Через 24 часа и 7 дней 1 мл среды с бактериями разводят в 9 мл 0,5 % КОН и наносят на плотную питательную среду (например «MLA»). Культивируют при тех же режимах с последующим изучением выросших колоний.

Б. Второй способ. Усовершенствованный метод выделения листерий из сыра (Рекомендации Yosef Ahmed E. et al., 1988)

Образцы сыра, взятые из разных мест, гомогенизируют в течение 2 минут в смесителе и смешивают в соотношении 1:10 с 2 % водным раствором цитрата тринатрия при температуре 40 °С и высевают на селективный агар с последующим изучением выросших колоний.

Мясные продукты

А. Первый способ (Рекомендации «Руководства по ВСЭ и гигиене производства мяса и мясных продуктов», М. 1983)

Берут пробы массой 200-250 г, режут на кусочки, растирают, засевают на плотные или жидкие питательные среды. Культивируют в течение 24-48 часов при 37 °С с последующим изучением выросших колоний.

Б. Второй способ (Рекомендации «Инструкции по лабораторной диагностике листериоза животных и людей», М. 1987)

Из исследуемых образцов готовят суспензию на физиологическом растворе в соотношении 1:5 и из нее делают посевы на твердые питательные среды. Рекомендуется часть исследуемого материала, с добавлением в него 15-50 ЕД/мл полимиксина В, поместить в холодильник при 4 °С. При отрицательном результате первичного посева из сохраняемого материала в течение 30 дней через каждые 10 дней проводить дополнительные посевы с ежедневным просмотром в первые 3-4 дня.

В. Третий способ (Рекомендации МСХ США)

Исследуемый мясной продукт в количестве 25 г измельчают и помещают в 225 мл жидкой питательной среды (рекомендуют «LEB»), встряхивают 2 минуты и инкубируют в течение 24 часов при 30 °С. Полученную бактериальную суспензию разводят 1:10 в 0,5 % КОН и наносят на твердую питательную среду (рекомендуют «LPM») с последующим культивированием в тех же режимах. Как дополнительную операцию рекомендуют 0,1 мл бактериальной суспензии поместить в 10 мл среды «LEB», культивировать 24 часа с последующим высевом на среду «LPM» и дальнейшем изучением выросших колоний.

Г. Четвертый способ (Рекомендации McClain D., Lee W. 1987)

Исследуемый мясной продукт мелко измельчают, 25 г помещают в 225 мл бульона (рекомендуют «LEB»), инкубируют 24 часа при 30 °С, далее 0,1 мл полученной первичной культуры засевают в 10 мл среды «LEB», содержащей 25 мг акрифлавина и инкубируют 1 день при 30 °С. Затем 1 мл данной вторичной культуры бактерий в среде «LEB» с акрифлавином смешивают с 4,5 мл 0,25 % раствора КОН в 2 % растворе NaCl в течение 1 минуты. Обработанную таким образом вторичную культуру микроорганизмов высевают на агар «ФРМ». Через 1 день возможно изучение колоний.

Д. Пятый способ (Рекомендации Федеральным отделом здравоохранения ФРГ, Fentel R. 1992)

Первый способ

- 25 г (мл) продукта + 225 мл селективной среды;
- 48 ч при 30 °С;
- посев на PALCAM-агар;
- 48 ч инкубации при 37 °С, изучение колонии

Второй способ

- 10 г (мл) продукта + 90 мл раствора; гомогенизация;
- количественное обнаружение – тест присутствия: 10 мл гомогената + 100 мл селективного бульона;
- десятикратное разведение 48 ч при 30 °С;
- перенос 0,1 мл на плотные селективные среды – PALCAM;
- 48 ч инкубации при 37 °С, изучение колоний.

Каждый из указанных методов подготовки пищевых продуктов и проведения бактериологического исследования не лишен недостатков и поэтому в некоторых лабораториях применяемые методики дают хорошие результаты, в других – нет. Это можно объяснить различным качеством применяемых компонентов. Определенная громоздкость рекомендованных схем проведения бактериологических исследований обусловлена стремлением, получить максимально достоверный ответ на вопрос о контаминации пищевых продуктов листериями.

КЛЕТОЧНОЕ СТРОЕНИЕ ЛИСТЕРИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТКИ

Listeria monocytogenes, являясь грамположительной бактерией, обладает клеточной структурой, характерной для микроорганизмов этой группы. Первые работы, направленные на изучение субмикроскопического строения листериозной клетки, появились в конце 50-х годов XX века (Н. Hartwig et al., 1950; Н. Hartwig, 1958; Е. Roots, 1958). Однако детальное исследование ультраструктурной организации листерий началось серией работ, появившихся в 1963 году (М. Edwards, 1963; М. Edwards, R. Stewens, 1963; R. Norh, 1963; S. Grund, 1963, 1964).

Анализируя результаты исследований вышеуказанных авторов, и следующие работы, можно прийти к следующим выводам. Листериозная клетка состоит из клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, нуклеоида. Клеточная стенка листерий имеет гладкую, слегка

извилистую конфигурацию и типичное для грамположительных бактерий трехслойное строение. Внешний и внутренний слой более плотные и относительно тонкие, толщиной в 30-35 А. Средний слой более широкий, губчатого строения толщиной в 90-120 А, в толще его проходят поперечные каналы. Общая толщина клеточной стенки варьирует в пределах 200-280 А. S. Ortel (1972) согласен с указанными исследователями в том, что клеточная стенка листерий имеет 3 слоя и толщина 2-х крайних темных слоев равна 30-35 А, но толщину светлого, промежуточного слоя он определяет в 240 А, при общей толщине клеточной стенки, примерно в 340 А. По-видимому, толщина клеточной стенки листерий имеет штаммовые различия. Об этом свидетельствуют результаты исследований З. Н. Меншиковой (1970). Согласно ее данным, общая толщина клеточной стенки у вирулентных листериозных штаммов 9-127, 9-129 достигает 200-250 А, при толщине двух крайних слоев по 30-35 А и среднего слоя 79-90 А. У слабо-вирулентного листериозного штамма «А» общая толщина клеточной стенки достигала 400 при толщине двух крайних слоев по 70-100 А и промежуточного слоя 180-200 А.

Цитоплазматическая мембрана отделена от клеточной стенки пространством шириной 30-45 А. В этом пространстве проходят многочисленные поперечные мостики, которые соединяют клеточную стенку и внешний плотный слой цитоплазматической мембраны (B. Ghosh, R. Murray, 1967). Сама цитоплазматическая мембрана также имеет 3-х слойное строение. Внешний и внутренние слои варьируют по толщине от 25 до 37 А, а средний слой от 20 до 25 А. Общая толщина цитоплазматической мембраны составляет 85 и 100 А (B. Ghosh, K. Carroil, 1968; S. Ortel, 1977).

Однако результаты исследований структуры цитоплазматической мембраны разноречивы. Такие исследователи, как Т. Kawata (1963), R. North (1963), З. Н. Меншикова (1970), не отрицают 3-х слойного строения цитоплазматической мембраны, но утверждают, что толщина всех слоев одинакова и колеблется в пределах 30-35 А. По данным М. Edwrds (1963) цитоплазматическая мембрана состоит из 3-х плотных слоев (каждый толщиной около 25 А) и двух светлых (толщиной равной 30 А каждый). Позднее B. Ghosh, R. Murray (1967) и B. Ghosh et al., (1968) не подтвердили эти данные и предположили, что авторы в структуру цитоплазматической мембраны включают промежуточный слой, отделяющий ее от клеточной стенки.

Все упомянутые выше авторы отмечают наличие в цитоплазме листерий инвагинаций цитоплазматической мембраны. Эти структуры имеют разнообразную форму: пластинчатую, ламелярную, везикулярную, смешанную. При описании этих внутрицитоплазматических мембранных структур авто-

ры дали им различные наименования. Так, М. Edwards et al., (1963) называли их плазмолемосомами, тем самым, подчеркивая их связь с цитоплазматической мембраной. S. Grund (1963) назвал такие же структурные компоненты тубульными телами. В настоящее время эти цитоплазматические мембранные структуры получили общепринятое название – мезосомы. Большинство исследователей подчеркивали везикулярную форму мезосом, как наиболее характерную для внутрицитоплазматических мембранных структур листерий.

Цитоплазма листерий заполнена плотными гранулами, размер которых равен 100-200 А и совпадает с размером бактериальных рибосом (Т. Kaweta, 1963). Содержащийся в цитоплазме ядерный аппарат характеризуется фибрилярной нуклеоплазмой, толщиной, примерно, в 0,2-0,5 нм. Такие фибриллы могут быть длинными нитями ДНК (Т. Kaweta, 1963; М. Edwards et al., 1963; S. Ortel, 1972).

Вопрос о наличии капсулы у листерий в настоящее время остается открытым. Большинство исследователей отмечают отсутствие видимой капсульной оболочки у листерий. Однако Paterson (1939) среди бескапсульных клеток наблюдал и клетки, имеющие капсулу. К. Gaeger et al. (1954) обращают внимание на капсульное вещество, появляющееся в культурах, выращенных при низких температурах (4 °С). Они также впервые отметили, что культуры, выращенные при низкой температуре, были антигенно более активны и вирулентны. О более высокой вирулентности листериозных культур выращенных при низких температурах сообщают и L. Wood et al. (1977).

Эти сообщения могут являться косвенным подтверждением наличия капсульного вещества у листерий при определенных условиях их культивирования. Согласно исследованиям С. Smith et al. (1962) листериозная клетка может иметь капсульную оболочку, которая выглядит в виде непрерывного, имеющего постоянный размер и форму, слоя вокруг клетки. Авторы также установили, что при выращивании листерий на обычных питательных средах капсулу можно выявить лишь у единичных клеток, а при культивировании на 1 % соевом агаре с 10 % сыворотки и 5 % глюкозы капсулу наблюдали у всех микробных клеток. На обычных средах капсулы выявлялись как исключение. Однако другим исследователям (М. Edwards et al., 1963; Н. Seeliger et al., 1968) не удалось наблюдать капсулы у этого вида микроорганизма. Согласно данным «Краткого определителя бактерий Берджи» листериозная клетка не имеет капсульной оболочки.

Таким образом, в настоящее время достаточно полно изучено клеточное строение листерий, хотя и остались некоторые дискуссионные вопросы.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA*

Ещё в 60-х годах, в самом начале исследований структурных компонентов листерий было установлено, что клеточная стенка этих бактерий имеет плотную, многослойную структуру, содержащую пептиды, полисахариды и липиды и ответственна за специфичность О-антигенов *Listeria*.

Keeler и Gray (1960) первыми получили клеточную стенку листерий и изучили ее состав. Полученные ими результаты говорят о том, что она содержит гексозу, гексозамин, белок и ионы (P, Ca, Fe). Аминокислотный состав фракций клеточной стенки включает: аланин, глутаминовая кислота, Е-диаминопимелиновая кислота, аспарагиновая кислота и лейцин. Ullmann и Cameron (1969) в клеточной стенке *L.monocytogenes* серотипов 1, 2, 3, 4а и 4в обнаруживали мураминовую кислоту, глюкозамин, глутаминовую кислоту, аланин, диаминопимелиновую кислоту, рамнозу, глюкозу. Галактозамин составлял менее 1 % в серотипах 1 и 2, галактоза в серотипе 1 и манноза в серотипах 1, 2 и 3. Серотипы 1 и 2 преимущественно содержали глюкозамин и рамнозу, серотип 3 галактозу, рамнозу и глюкозамин, тогда как серотипы 4а и 4в глюкозу и галактозу. Рамноза присутствовала в серотипах 1, 2, а галактоза и глюкоза в серотипах 4а и 4в соответственно. Соматические антигены серотипа 1 и 2, ранее считавшиеся идентичными, по-видимому, отличаются и, кроме того, антигенное родство между серотипами 4а и 4в менее выражено.

Согласно Mann (1969), несмотря на разные количества галактозы, глюкозы, ксилозы, маннозы, глюкозамина и мураминовой кислоты, они являются основными компонентами клеточной стенки *Listeria* различных серотипов. Рамноза, галактозамин также обнаруживаются, но лишь у представителей определенных серотипов.

В своих исследованиях структуры клеточной стенки *Listeria* Tinelli (1969) обнаружил глутозамин, аланин, мураминовую кислоту, глутаминовую кислоту и диаминопимелиновую кислоту. Кроме того, были найдены следы мезина, аспарагиновой кислоты и глицина. Гликопептидная фракция составляла 25 % стенки, а органические фосфаты, рибитол, рамноза, небольшое количество глюкозы, тейхоевой кислоты, неидентифицированного полиозида и липидов (фосфатидил-этаноламин) составляли остальную часть стенки. Он выделил пептидную фракцию с N-терминальным L-аланином из аутолизата клеточной стенки *Listeria*, фракция которой состояла из L-аланина; глутаминовой кислоты, диаминопимелиновой кислоты и Д-аланина в структуре димерного типа.

Позднее Stivastava и Siddique (1973) описали количественный химический состав пептидоглика на *Listeria*. В его гидролизате были обнаружены гексо-

за, рамноза, диаминопимелиновая кислота, мураминовая кислота, глюкозамин, и 16 аминокислот. Delvallez et al. (1979) очистили поверхностный специфический растворимый антиген (обозначенный антиген 2) *Listeria*, общий для всех серотипов *L.monocytogenes* и *L.grayi*. В дальнейшем Carlier et al. (1980) очистили этот антиген с помощью гель-фильтрации и электрофореза в ПААГ до 97 % гомогенности установив, что Ag₂ является гликопротеином с изоэлектрической точкой ~ 4,2 и не обладает ферментной активностью.

Отмытая цитоплазматическая мембрана, свободная от цитоплазматического материала осмотически лизированного протопласта *Listeria*, была исследована Ghoch и Carroll (1968). Препарат содержал 55-60 % белка, 1 % рибонуклеиновой кислоты, 0,1 % дезоксирибонуклеиновой кислоты, 1,3-2,3 % углеводов, 0,17-0,38 % аминокислот, 0,2-0,4 % рамнозы, 3,5-4,0 % фосфора, 10,5-12,0 % азота и 30-35 % липидов. Аминокислотный состав мембраны отличался от такового клеточной стенки – серосодержащие аминокислоты в ней отсутствовали. Глюкоза, галактоза, рибоза и арабиноза составляют углеводороды мембраны. Мембранный липид состоит из 80-85 % фосфолипидов и 15-20 % нейтрального липида – фосфолипид фосфатидил-глицеринового типа. Rainess et al. (1968) изучили 33 штамма 10 серотипов *L.monocytogenes*. Каждый из штаммов характеризовался наличием высокого процента C12 – насыщенной жирной кислоты, имеющей структуру разветвлённой цепи. Основными элементами являлись насыщенные C14, C16 и C17 – разветвлённые цепи жирных кислот. Другие насыщенные кислоты (C15, и C22), находятся в концентрациях менее 10 %. Некоторые жирные кислоты могли быть обнаружены в очень небольших количествах. Carroll et al. (1968) при изучении липидов *Listeria* установили, что эта бактерия содержит 6-7 % (сухой вес) растворимых в хлороформе липидов. Диглицериды составляют большую часть фракции нейтрофильных липидов. Полярные липиды в основном состоят из фосфолипидов фосфатидил-глицеринового типа и гликолипида, содержащего глюкозу и галактозу. Основные классы липидов содержат те же жирные кислоты, хотя не в той же пропорции. Преобладают жирные кислоты с разветвлёнными цепями (C15, C17), изоокислоты и прямолинейные кислоты присутствуют в меньшем количестве, ненасыщенных кислот не обнаружено.

Toolayon et al., (1969) изучили влияние культуральной среды и температуры культивирования на содержание липидов в клетках 5-ти разных штаммов *L.monocytogenes*. По их результатам бактериальные клетки *Listeria* при пониженных температурах производят больше липидов, чем при повышенных.

Mara et al. (1971, 1973), Julak и Mara (1973) наблюдали, что содержание липидов в клетках *Listeria* выше при их культивировании в триптозно-соевом

бульоне, чем в бульоне Todd-Hewitt или просто триптозном. Глюкоза стимулирует рост, но не влияет на общее содержание липидов. Напротив, глицерин повышает содержание липидов и жирных кислот в клетках *Listeria*. Эти авторы отмечают также важность биологических свойств (вирулентность, синтез (продукция) гемолизина), а также серотип разных штаммов *Listeria* для конечной модели их липида и содержания жирных кислот.

L-ФОРМЫ ЛИСТЕРИЙ

L-формы *L.monocytogenes* были впервые выделены Suchanova и Patocka в 1957 г. после чего большое число исследователей получали формы без клеточной стенки из различных серотипов *Listeria* (Brem и Eveland 1967, 1968, 1969, Edman et al. 1968, Welshimer и Neredith 1972). В нашей стране основные исследования по L-формам листерий были проведены во Всесоюзном НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии под руководством И. А. Бакулова и НИИЭМ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея под руководством С. В. Прозоровского. Г. А. Котлярова и сотр. (1968) получили стабильные L-формы *Listeria* и исследовали ультраструктуру протопластов, а также процесс L-трансформации (Константинова Н.Д. и сотр. 1977).

Н. Д. Константинова и сотр. (1980) изучали процесс реверсии L-форм *L.monocytogenes*. Установлено, что во время реверсии плотность цитоплазмы увеличивалась, размер нуклеотида становился меньше, а клетки удлинялись. Клеточная стенка ревертантов была тоньше, а внешний слой с большой электронной плотностью был менее выражен, чем в первоначальной культуре. Brzin наблюдал сферопласто-подобные формы на солевом агаре (Brzin 1973, 1975). L-формы листерий были экспериментально получены и подробно изучены с помощью световой и электронной микроскопии большой группой исследователей: А. Brem, W. Eveland (1968), Н. Д. Константинова (1975, 1977) В. В. Выюцкий и Г. А. Котлярова (1982), Н. А. Зигангирова и соавт. (1985). Ими показано, что по структуре они практически не отличаются от L-форм других грамположительных бактерий.

L-колония у листерий является, по-видимому, многоклеточной системой, все элементы которой взаимосвязаны. Пенициллиновые формы несбалансированного роста легко переходили в L-форму, тогда как литиевые или полученные под воздействием УФ лучей, в L-формы не трансформируются и легко реверсируют в палочки. Согласно результатам Ralovich (1984), нет никакой морфологической разницы между L-колониями вирулентных и не-

вирулентных штаммов *L.monocytogenes*, полученных в одних и тех же условиях (неопубликованные данные).

Patocka и сотр. (1963) было сделано предположение о том, что L-формы могут свободно проникать через плацентарный барьер, на основании чего ими впервые была выдвинута гипотеза о возможной роли L-форм *Listeria* в патогенезе при листериозе беременных женщин. Авторы наблюдали тонкие кокковидные и гранулярные тельца в живых тканях и макрофагах. Suchanova et al. (1958) писали следующее: «Вероятно, в этом патологическом процессе мелкие и даже фильтрующиеся формы *Listeria* тоже существенны». В 1974 г. Blender опубликовал некоторые догадки по поводу характера листериозной инфекции. Он предположил, что инфекция имеет латентную фазу, когда в организме хозяина обитают лишь L-формы, без каких-либо клинических признаков. Под влиянием стресса резистентность хозяина снижается и первоначальное равновесие между L-формами и защитными механизмами организма изменяется в результате чего проявляется болезнь.

Эксперименты Г. А. Котляровой с сотр. (1973) опровергли это предположение. Она вводила ягнятам внутривенно стабильные L-формы *Listeria*; все 25 опытных животных заболели с клиническими симптомами, очень напоминающими таковые при естественном заражении. 10 животных имели неврологические нарушения и погибли. L-формы сохранялись в организме животных в течение 2,5 месяцев. Их можно было выделить главным образом из мозга, причем не было замечено ни реверсии L-форм в бактериальную форму, ни роста *Listeria*. Этот эксперимент послужил прямым подтверждением патогенности L-форм *Listeria*.

С. В. Прозоровский и сотр. (1977) L-формами листерий заражали кроликов. Патологические изменения напоминали наблюдаемые после введения бактериальных форм и, в основном, локализовались в центральной нервной системе (ЦНС) и печени. Инфекция сопровождалась моноцитозом. В 1979 г. ими сделано сообщение о первых летальных случаях инфекции у человека, вызванной L-формами *L.monocytogenes*. L-формы *Listeria* были выделены от 3-х погибших детей: новорожденного, 5-ти и 6-ти месячного возраста, соответственно. От первого ребенка удалось выделить как бактериальную, так и L-форму *Listeria*, от других лишь L-форму *Listeria*.

В 1981 г. С. В. Прозоровский и сотр. сообщили, что введение стабильных L-форм листерий кроликам и ягнятам вызывает поражение центральной нервной системы – развивается энцефалит, а также гранулемы печени; наблюдается моноцитоз в крови. В головном и спинном мозге павших животных выявлялись дистрофически-некротические изменения: отек, набухание, цитоллиз и кариоллиз нервных клеток. Отмечено также поражение стенок сосудов и внутренних органов.

В работах И. А. Бакулова, Т. Я. Зеленцовой (1977, 1978, 1979) приводятся сведения об исследовании L-форм *L.monocytogenes* меченых С14. У мышей после внутрибрюшинного введения L-форм, им не удалось выделить L-формы из 960 проб, взятых от 160 заражённых мышей. После инъекции в организме быстро «распространялась» радиоактивные метки. К концу первого дня максимальная радиоактивность была отмечена в почках, селезёнке, печени, лёгких, сердце и мозге. Её можно было определить в почках и лёгких на 4-й день, а в мозге на 7-й день. Заметная активность сохранялась по 28 суток.

При изучении роли L-форм листерий в патогенезе этой инфекции на белых мышах и ягнятах, которых заражали стабильной культурой L-форм *Listeria monocytogenes*, меченной изотопами С14 и Н3, было выявлено, что распределение в организме меченных радиоактивными изотопами L-форм существенно отличалось от такового у меченных глицином, которые вводили контрольным животным. Последний быстро проникал во все органы, но через 24 часа выводился из организма. Основными местами локализации L-форм были клетки лимфоидно-ретикулярного типа: лимфоузлов, селезенки, печени, костного мозга и клетки извитых канальцев почек, в которых они сохранялись до 28 суток. Был подтвержден тропизм L-форм листерий к ткани головного мозга (в белом веществе и в клетках зернистого слоя мозжечка они сохранялись до 92 суток). Введение ягнятам меченых L-форм не сопровождалось клиническими проявлениями и лишь у единичных животных наблюдалось немного угнетенное состояние и отказ от корма.

Так как в выделениях зараженных ягнят радиоактивность не регистрировалась, это указывало на то, что L-формы не элиминировались из организма, длительно сохраняясь в органах и тканях и поддерживая латентные очаги. По мнению Т. Я. Зеленцовой (1979) именно это обстоятельство объясняет особенности болезни, сезонность, проявление в виде спорадических случаев, реже в виде вспышек, а обострение листериоза с проявлением выраженных клинических признаков.

Однако, по данным И. А. Бакулова, С. В. Прозоровского и др. (1973), L-формы листерий не вызывают гибель куриных эмбрионов и конъюнктивальную реакцию у морских свинок (проба Антона).

И. А. Бакулов и соавт. доказали, что нестабильные и стабильные L-формы листерий постоянно выделяются от животных при естественном течении листериоза (И. А. Бакулов, Т.Я. Зеленцова, 1980).

В серии работ L. Michailova et al. (1992, 1993) рассматривали взаимодействие листерий с фагоцитами на электроннооптическом уровне. Показано, что L-формы *L.monocytogenes* располагаются в макрофагах белой крысы, но не фагоцитируются, так как фаголизосомы не образуются. При инфи-

цировании крыс обычными формами листерий фагоцитоз наблюдается. Возможно, это обстоятельство объясняет способность листерий длительно персистировать в организме. G. A. Kotlyarova et al. (1982) показали, что инокуляция белым мышам вируса лейкемии Раушера вместе с L-формами листерий вызывает эритролейкемию Раушера, что связано с иммунодепрессивным действием L-форм листерий. Как известно листериоз нередко развивается у больных при наличии опухолей, болезней крови, а также у лиц, получающих иммунодепрессанты и гормоны.

Методы обнаружения L-форм листерий

Методы обнаружения L-форм листерий включают посевы патологического материала на питательные среды микробиологические исследования и идентификацию выделенных культур иммунофлюоресцентным или иммунопероксидазными методами.

Микробиологическое исследование

Из органов и тканей делают посевы на среды, обычно используемые для выделения бактериальных форм листерий (мясопептонный или мясопептонный печеночный агар (МПА, МППА) или бульон (МПБ, МППБ) с добавлением 1 % глюкозы и 2-3 % глицерина, pH 7,2-7,4) на полутвердые и жидкие L-среды для культивирования L-форм листерий в условиях лаборатории – 1,3 % МПА (МППА) и бульон, содержащие 2% хлорида натрия и 2 % нормальной лошадиной сыворотки без консерванта. При отрицательном результате первичного посева рекомендуется сохранять патологический материал в холодильнике при 4 °C в течение 30 дней и проводить повторные исследования через каждые 10 дней. Посевы инкубируют в течение 3-4 суток при 30 °C или 37 °C. При отсутствии роста срок наблюдения увеличивают до 1-1,5 месяцев, но посевы при этом выдерживают при комнатной температуре (20-22 °C).

L-формы листерий при первичном посеве из организма могут вырастать не только на L-среде, но и на обычных бактериальных средах, однако их дальнейшие пересевы, как правило, не удаются.

Выросшие на агаре L-колонии листерий при визуальном просмотре похожи на типичные колонии этого возбудителя и в проходящем свете также имеют голубую окраску с зеленоватым оттенком. Однако при просмотре в микроскопе (объектив x10) колонии L-форм имеют не мелкозернистую, характерную для бактериальных колоний, а кружевную структуру. Нередко L-формы листерий формируют классические L-колонии, для которых типи-

чен уплотненный, врастающий в агар центр и более светлая ажурная периферия. Размер колоний варьирует от 0,1 до 1-2 мм. В жидкой среде L-формы также могут расти в виде изолированных колоний.

L-формы листерий обладают каталазной активностью. Выделенные культуры изучают в микроскопе с фазово-контрастным устройством, окрашивают по Граму и исследуют иммунофлюоресцентным или иммунопероксидазным методами.

Для окраски по Граму культуру L-форм наносят на хорошо обезжиренные предметные стекла, подсушивают на воздухе и фиксируют на пламени. Окрашивать по Граму можно изолированные колонии агаровой культуры L-форм, либо бульонную культуру, если в жидкую среду пересевали колонии с агара. Нельзя окрашивать по Граму бульонную культуру (если в среду засевали суспензию органов) и мазки-отпечатки органов, так как при этом возможны артефакты. При окраске по Граму большинство L-форм листерий грамположительны, но могут встречаться и единичные грамотрицательные структуры. Иногда при посеве в бульон изолированных типичных колоний листерий происходит спонтанная трансформация их в L-форму и при окраске по Граму в мазке выявляются различной величины нередко вакуолизированные шаровидные структуры.

При использовании иммуноферментного и иммунопероксидазного методов следует иметь в виду, что их чувствительность L-форм листерий в мазках-отпечатках практически одинакова так как они различаются лишь характером метки антител – в первом случае применяют изотиоционат флюоресцеина (ФИТЦ), а во втором – фермент пероксидазу.

Преимуществами иммунопероксидазного метода является слабое фоновое окрашивание препаратов, возможность их исследования в световом микроскопе, хранение в течение длительного времени, пригодность для одновременного исследования морфологии клеток и их антигенной специфичности.

Для выявления L-форм листерий сферопластного типа с хорошо выраженной клеточной стенкой можно использовать специфическую сыворотку против типичных форм листерий и постановку реакции осуществлять в условиях любой бактериологической лаборатории. L-формы листерий протопластного типа не выявляются антибактериальной сывороткой.

Окраска при непрямом методе флюоресцирующих антител (НМФА)

Для постановки реакции необходимы:

- поливалентная антилистериозная (против листерий 1-ой и 2-ой серогрупп) сыворотка кролика (для выявления типичных и L-форм сферопластного типа) и глобулиновая фракция гипериммунной сыворотки кролика против L-форм листерий протопластного типа;
- антитела диагностические против Ig кролика, меченные ФИТЦ;
- химически чистый ацетон;
- забуференный физиологический раствор pH 7,2 – 7,4;
- глицерин на забуференном физрастворе pH 7,2 – 7,4 (1 часть глицерина нейтрального и 9 частей забуференного физраствора);
- дистиллированная вода;
- нефлюоресцирующее иммерсионное масло или химически чистый диметилфталат;
- тонкие обезжиренные предметные стекла.

Мазки-отпечатки органов высушивают на воздухе и фиксируют в течение 30 минут в химически чистом ацетоне. Мазки из культуры L-форм фиксируют на пламени. После фиксации мазки делят на две группы – на I этапе на одни мазки наносят поливалентную антилистериозную сыворотку кролика (в рабочем разведении), на другие наносят немеченый глобулин сыворотки кролика против L-форм протопластного типа листерий в разведении 1:4 (иммуноглобулины разводят забуференным физраствором pH 7,2–7,4);

- инкубируют во влажной камере при 37 °C в течение 1 часа;
- препараты трижды промывают в забуференном физиологическом растворе (каждое промывание по 10 минут), ополаскивают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе;
- наносят сыворотку против Ig кролика, меченую ФИТЦ, в рабочем (не ниже 1:16) разведении (II этап);
- инкубируют во влажной камере при 37 °C в течение 30 минут;
- препараты в течение 30 минут трижды промывают в забуференном физрастворе, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе;
- на окрашенные препараты наносят глицерин на забуференном физрастворе, накрывают покровным стеклом, на которое наносят нефлюоресцирующее иммерсионное масло и исследуют в люминесцентном микроскопе.

При исследовании материала необходимо ставить контроли, указанные в таблице 1.6.

Препараты-отпечатки органов для уменьшения неспецифического свечения ткани следует окрашивать методом контрастирования. С этой целью на мазки наносят смесь люминесцирующей сыворотки и бычьего альбумина, меченного родамином, в соответствии с Временным наставлением по его применению. Меченый альбумин окрашивает ткани в оранжево-красный цвет.

Целесообразно сочетать просмотр препаратов одного и того же поля зрения одновременно в люминесцентном микроскопе (освещение сверху) и в фазово-контрастном устройстве (освещение снизу).

Для оценки интенсивности свечения используется четырехкрестовая система:

++++ яркая, изумрудно-зеленая люминесценция бактерий или различных по морфологии и величине структур L-форм, часто свечение по периферии более интенсивное;

+++ отчетливо выраженная, достаточно яркая зеленая люминесценция, периферический ободок хорошо выражен;

++ недостаточно яркая желтовато-зеленоватая люминесценция периферический ободок еле заметен;

+ люминесценция слабая, желтая.

Положительным результатом считается люминесценция клеток на 4–3 креста при наличии в каждом поле зрения не менее 2 – 5 специфически светящихся бактерий или полиморфных структур L-форм различной величины.

Таблица 1.6. Контроли, необходимые при постановке НМФА и НМПА

№ п/п	Антиген	Реагент 1-го этапа	Реагент 2-го этапа	Результат
1	Гомологичный			
	а) бактериальная форма	Поливалентная антибактериальная сыворотка кролика	Меченые антитела против глобулинов кролика	Положительный
	б) L-формы протопластного типа	Глобулин сыворотки кролика против L-форм протопластного типа	«	«
2	Гомологичный	Забуференный физиологический раствор	Меченые антитела против глобулинов кролика	Отрицательный
3	Гомологичный	Гомологичные антитела	Забуференный физиологический раствор	«
4	Гомологичный	Нормальные антитела (глобулины) кролика	Меченые антитела против глобулинов кролика	«
5	Гетерологичный			
	а) бактериальная форма (возбудитель рожи свиней)	Поливалентная листериозная антибактериальная сыворотка кролика	«	«
	б) стабильные L-формы стрептококка или стафилококка	Глобулин сыворотки кролика против L-форм листерий протопластного типа	«	«

Окраска по непрямому методу пероксидазных антител (НМПА)

Для постановки реакции необходимы:

- поливалентная антилистериозная (против листерий 1-ой и 2-ой серогрупп) сыворотка кролика и глобулиновая фракция гипериммунной сыворотки кролика против L-форм листерий протопластного типа;
- антитела диагностические против Jg кролика, меченные пероксидазой;
- химически чистый ацетон;
- 0,5 % раствор перекиси водорода в метаноле;
- забуференный физиологический раствор pH 7,2 – 7,4;
- нормальная сыворотка крупного рогатого скота, разведенная физиологическим раствором 1:5;
- 0,05 % свежеприготовленный раствор 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорида (ДАБ), содержащий 0,3 % перекиси водорода. Приготовление раствора ДАБ: 5 мг 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорида растворяют в 10 мл забуференного физиологического раствора и добавляют 0,3 % перекиси водорода в конечном разведении.

Для иммунопероксидазного исследования патологического материала из паренхиматозных органов и головного мозга готовят мазки-отпечатки. После высушивания на воздухе их фиксируют в течение 30 минут в химически чистом ацетоне. Мазки культур L-форм фиксируют на пламени. После фиксации для инактивирования эндогенной пероксидазы препараты обрабатывают свежеприготовленным 0,5 % раствором перекиси водорода в метаноле в течение 30 минут;

- промывают в забуференном физиологическом растворе в течение 15 минут;
- обрабатывают в течение 10 минут нормальной сывороткой крупного рогатого скота, разведенной 1:5 (блокируют неспецифическое фоновое окрашивание ткани), высушивают фильтровальной бумагой.
- мазки делят на две группы – на 1 этапе на одни мазки наносят поливалентную антилистериозную сыворотку кролика в рабочем разведении, на другие – немеченый глобулин антисыворотки кролика против L-форм листерий протопластного типа в разведении 1:4 (разводят глобулины забуференным физиологическим раствором pH 7,2 – 7,4);
- инкубируют во влажной камере при 37 °C в течение 1 часа;
- препараты трижды промывают в забуференном физрастворе (каждое промывание по 10 минут), ополаскивают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе;

- наносят в рабочем разведении сыворотку против Jg кролика, меченную пероксидазой (II этап);
- инкубируют во влажной камере при 37 °С в течение 30 минут;
- промывают забуференным физраствором и окрашивают в течение 10 минут 0,05 % свежеприготовленным, содержащим 0,3 % перекиси водорода, раствором ДАБ;
- препараты в течение 30 минут промывают в проточной воде, заключают в бальзам и просматривают в световом микроскопе. Контроли, необходимые при постановке реакции, указаны в таблице 1.6.

При положительном результате на желтоватом фоне типичные формы и структуры L-форм окрашиваются в коричневый или темно-коричневый цвет.

Предварительный диагноз ставят на основании комплекса эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических и гистологических изменений, а также при наличии возбудителя в мазках-отпечатках органов.

Окончательный диагноз на листериоз устанавливают в случае выделения возбудителя (типичной формы, нестабильной или стабильной L-формы). Стабильные L-формы листерий не способные к реверсии, должны быть идентифицированы иммунофлуоресцентным или иммунопероксидажным методами.

Получение гипериммунных сывороток против стабильных L-форм листерий протопластного типа

Для получения антигена L-формы листерий выращивают в течение 6-7 суток (3 суток при температуре 37 °С, 3-4 суток – при 20-22 °С) в жидкой среде, содержащей 2 % хлорида натрия и 2 % нормальной лошадиной сыворотки без консерванта (противоречия). Бактериальные клетки осаждают центрифугированием в течение 40 минут при 10000 об/мин. Осадок отмывают от остатков среды в физрастворе трехкратным центрифугированием при этом же режиме. Отмытую культуру L-форм разводят физраствором до сметанообразной консистенции (10^9 - 10^{10} КОЕ/мл), инактивируют прогреванием при 56 °С в течение часа и консервируют мертиолатом 1:10000 в конечном разведении.

Для получения гипериммунных сывороток кроликов иммунизируют по схеме Плесчия, предусматривающей 3-х кратное введение антигена с недельными интервалами. Вводят антиген в смеси с неполным адъювантом Фрейнда. Для гипериммунизации используют нулевые сыворотки кроликов, которые дали отрицательные результаты в РА и РДП с клеточными антигенами типичных и L-форм листерий.

Схема гипериммунизации

Первое введение: 1 мл антигена L-форм смешивают с 1 мл подогретого неполного адъюванта Фрейнда. С помощью туберкулинового шприца по 0,02 мл смеси вводят внутрикожно в каждую подушечку 4-х коготков задней лапы кролика. Оставшиеся 1,9 мл вводят внутримышечно в бедро той же лапы.

Второе введение: через 7 дней смесь по той же методике и в той же дозе инъецируют в другую заднюю лапу.

Третье введение: через 14 дней 0,1 мл смеси вводят внутрикожно вдоль позвоночника кролика в пять точек по 0,02 мл в каждую из них. Остальные 1,9 мл инъецируют внутримышечно (в бедро) в ту же лапу, что и при первом введении.

Обескровливают животных через 10 – 12 суток после последней иммунизации при титре антител в РДП с антигеном L-форм 1:4-1:8.

Из гипериммунных сывороток выделяют глобулины, которые используют при исследовании иммунопероксидазным и иммунофлюоресцентным методами.

Выделение глобулиновой фракции гипериммунной кроличьей сыворотки против стабильных L-форм листерий протопластного типа. Для выделения глобулиновой фракции применяют 20 % раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой – 6000 на дистиллированной воде. Перед выделением глобулиновой фракции измеряют pH сыворотки, который должен составлять 7,5. pH до нужной величины доводят растворами соляной кислоты или щелочи.

К иммунной сыворотке (pH 7,5) прибавляют равный объем 20 % раствора ПЭГ и перемешивают. Выдерживают 15 минут и затем центрифугируют 15 минут при 6000 об/мин. Надосадок удаляют, а осадок растворяют в 0,02 М Na-фосфатном буфере с 0,15 М NaCl (pH 7,0), который добавляют до исходного объема сыворотки. К растворенному осадку, вновь добавляют равный объем 20 % раствора ПЭГ и через 15 минут центрифугируют (процедуру растворения осадка в буфере, осаждения 20 % раствором ПЭГ и центрифугирования повторяют еще дважды, т.е. в общей сложности эту манипуляцию проводят трижды). После третьего центрифугирования осадок в четвертый раз растворяют буфером в объеме в 3 раза меньшем, чем исходный. Полученную фракцию глобулинов для освобождения от ПЭГ смешивают с хлороформом в соотношении 9:1. Смесь встряхивают в течение 30 минут, после чего центрифугируют при 10000 об/мин в течение 20 минут. Верхнюю фазу, содержащую глобулины свободные от ПЭГ, отбирают и используют в иммунофлюоресцентном или иммунопероксидазном исследовании.

Рис. 1.1. Листерии под световым микроскопом (мазок из суточной культуры, окраска по Граму, х90)

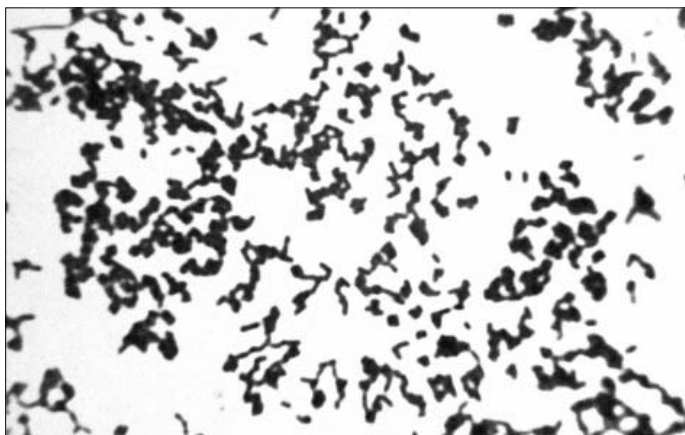


Рис. 1.2. Листерии под электронным микроскопом (х18000), отчетливо видны жгутики у микробных клеток

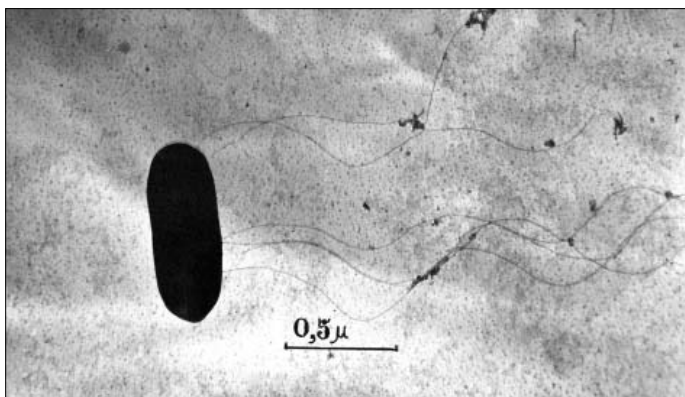
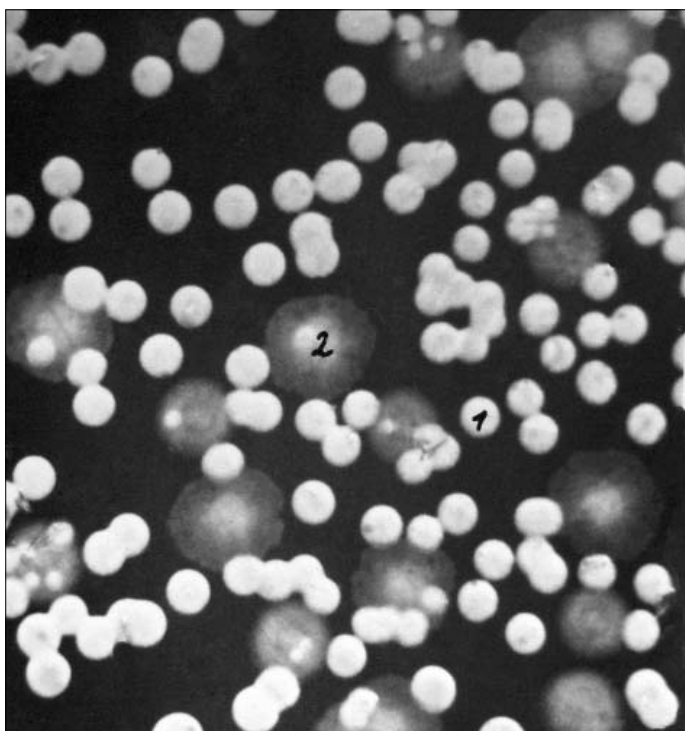


Рис. 1.3. Рост культуры листерий на твердых средах: 1 – колонии S – формы – круглые, с ровными краями; 2 – колонии R-формы – больше по размерам с неровными краями



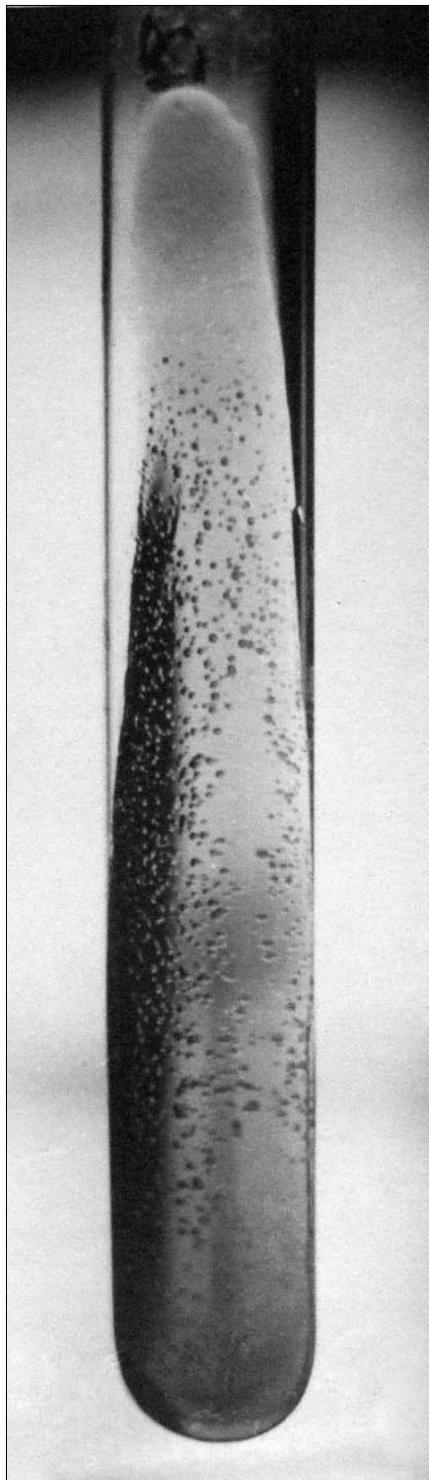


Рис. 1.5. Колонии листерий на скошенном агаре.

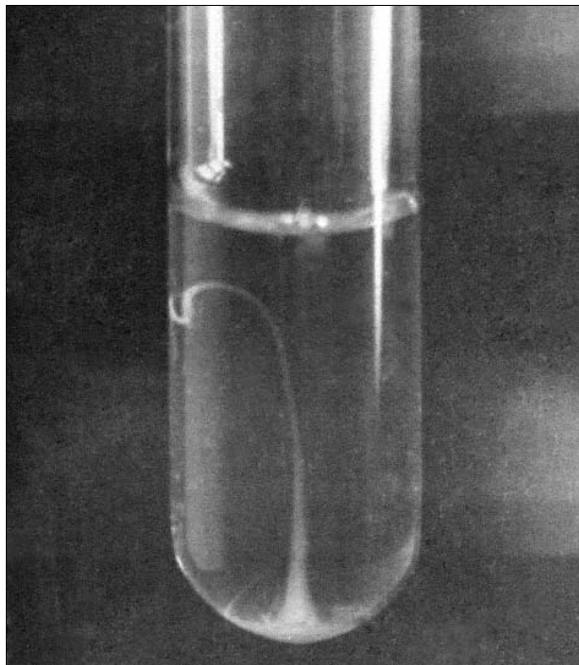


Рис. 1.4. Рост культуры листерий на жидкой среде (мясо-пептонный бульон) – 10-дневный рост листерий, видна косичка, поднимающаяся со дна пробирки при встряхивании.



Рис. 1.6. Ультратонкий срез клетки *Listeria monocytogenes* (электронная микроскопия, $\times 210000$): 1 – клеточная стенка, 2 – цитоплазматическая оболочка, 3 – ядерный аппарат, 4 – цитоплазма, 5 – внутрицитоплазматические мембранные системы.

ЧАСТЬ II

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ЛИСТЕРИЙ И СЕРОТИПИРОВАНИЕ

Более 70 лет назад были сделаны первые попытки изучения антигенной структуры листерий. В настоящее время твердо установлено серотиповое различие листерий в связи с их неоднородным антигенным строением.

Применив метод точного анализа соматического (О) и жгутикового (Н) антигенов, заимствованный из практики серологической диагностики салмонеллезов, J. S. Paterson (1939) обнаружил, что листерии имеют сложную антигенную структуру: 5 соматических и 4 жгутиковых антигена. На основании анализа полученных данных он выделил 4 основных серотипа листерий (таблица 2.1.) и пришел к выводу, что связь между серологическим типом и зоологическим видом хозяина отсутствует, так же как нет связи между типовой принадлежностью и географическим распространением.

Уточненная схема антигенов *Listeria monocytogenes* (по Н. Р. Seeliger, G. Linzenmeier (1955) представлена в таблице 2.2.

J. Donker-Voet (1957) серотип 4 разделила на 5 подтипов: а, b, с, d, е (таблица 2.3).

Современная антигенная структура листерий представлена в таблице 2.4.

Методика серологического типирования листерий изложена в работах Н. Р. Seeliger (1961), К. Н. Шлыгиной (1963), Н. С. Огневой (1963), Л. А. Буренковой (1962) и Н. А. Михайлова (1958, 1959).

Для проведения серотипирования листерий необходимо иметь:

- а) О- и Н- (или ОН-) антигены для гипериммунизации животных и насыщения сывороток;
- б) монорецепторные сыворотки.

О-антигены изготавливают путем выращивания культур листерий на печеночном глюкозо-глицериновом агаре при температуре 37 °С в течение 24 часов. Смывают культуру с агара фосфатно-буферным раствором хлористого натрия (рН 7,4) и кипятят в течение 1-2 часов в водяной бане для разрушения Н-антигена (жгутикового). Концентрацию взвеси доводят

Табл. 2.1. Антигенная структура и типовая принадлежность *L.monocytogenes* (J. S. Paterson)

Тип	Жгутиковый антиген (H)	Соматический антиген (O)
1	AB	I II III
2	BD	I II III
3	AB	II IV III
4	ABC	V III

Табл. 2.2. Уточненная схема антигенов *L.monocytogenes* (H. P. R. Seeliger, G. Linzenmeier)

Серотип	Оригинальный номер штамма	Диагностически важные	
		О-факторы	H-факторы
1	7973	I II	A, B
2	5348	I II	B, D
3	5105	II IV	A, B
4a	5214	V a, b	A, B
4b	1071/53	V a, c	A, B, C

Табл. 2.3. Деление 4-го серотипа на подтипы (J. Donker-Voet)

Подтип	Соматический антиген	Жгутиковый антиген
4a	V, VII, IX (III)	A, B, C
4b	V, VI (III)	A, B, C
4c	V, VII (III)	A, B, C
4d	V, VI, VII, VIII (III)	A, B, C
4e	V, VI, VIII, IX (III)	A, B, C

до 3×10^9 м.т./мл, консервируют фенолом в конечной концентрации 0,5 %. Для исключения спонтанной агглютинации О-антигены можно обработать ультразвуком.

H-антигены получают путем попеременного выращивания культуры, вначале в МПБ в течение 14-16 часов при температуре 22-24 °С, затем 5-6 часов при температуре 37 °С. После этого высевают культуру на печеночный глюкозо-глицериновый агар, содержащий 0,03% теллурита калия, и выращивают 16-18 часов при комнатной температуре, затем 6-7 часов при температуре 37 °С и до 72 часов при комнатной температуре. Культуру смывают с агара фосфатно-буферным раствором во флаконы с бусами и шуттелируют 40 часов, затем центрифугируют 30 минут. Надосадочную жидкость инактивируют 0,3 % раствором формалина и используют в качестве антигена.

ОН-антигены получают путем выращивания культуры листерий при комнатной температуре на сильно увлажненном агаре, консервируют 0,3 % раствором формалина или же выращивают культуру листерий в течение 18 – 20 часов при комнатной температуре в фосфатно-буферном МПБ с 1 % глюкозы и консервируют ее 0,25 % раствором формалина.

Табл. 2.4. Антигенная структура листерий (J. S. Paterson, модифицированная и расширенная Н. Р. R. Seeliger, J. Donker-Voet) (Д. А. Васильев, 1994)

Вид	Серovar	О-антигенные факторы															Н-антигенные факторы				
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	A	B	C	D	E
Listeria monocytogenes	1/2 a	■	■	■	■												■	■	■		
	1/2 b	■	■	■	■												■	■	■		
	1/2 c	■	■	■	■												■	■	■		
	3 a	■	■	■	■												■	■	■		
	3 b	■	■	■	■												■	■	■		
	3 c	■	■	■	■												■	■	■		
	4 a			■	■	■		■		■	■						■	■	■		
	4 a b			■	■	■		■		■	■						■	■	■		
	4 b			■	■	■		■		■	■						■	■	■		
	4 c			■	■	■		■		■	■						■	■	■		
	4 d			■	■	■		■		■	■						■	■	■		
	4 e			■	■	■		■		■	■						■	■	■		
	7			■	■	■											■	■	■		
L. ivanovi	5			■	■	■				■							■	■	■		
L. innocua	6 a (4f)			■	■	■											■	■	■		
	6 b (4g)			■	■	■											■	■	■		
L. grayi			■	■	■												■	■	■		
L. murray			■	■	■												■	■	■		

Примечание: *L. seeligeri* серологически неотличима от *L. monocytogenes*, *L. weishimeri* серологически неотличима от *L. innocua* 6 b.

Для получения гипериммунных сывороток кроликам внутривенно вводят антигены с промежутком в 3-4 дня. О – сыворотку консервируют 0,5 % фенолом, Н (ОН)-сыворотку – 50 % глицерином или мертиолятом в разведении 1:10000. Перед гипериммунизацией сыворотку крови кроликов проверяют на наличие листериозных антител. При обнаружении в РА титра выше 1:80 животных не следует использовать в опыте.

Монорецепторные сыворотки получают путем их адсорбции соответствующими антигенами. Для этого к осадку антигена, полученному центрифугированием, добавляют сыворотку, разведенную 1:25. Смесь ставят в термостат с температурой 37 °С на 24 часа и затем 18-20 часов выдерживают при температуре 4 °С. Адсорбцию повторяют до тех пор, пока не получают отрицательную реакцию агглютинации с используемым антигеном. Адсорбцию сывороток следует производить по схеме в таблице 2.5.

Таблица 2.5. Схема проведения адсорбции сывороток

О-фактор сыворотки	I, II	О-сыворотка 1-го серотипа насыщалась ОН-антигеном 4-го типа
	I	О-сыворотка 1-го серотипа насыщалась ОН-антигеном 3-го типа
	IV	О-сыворотка 3-го серотипа насыщалась ОН-антигеном 1-го типа
	V	О-сыворотка 4-го серотипа насыщалась ОН-антигеном 2-го типа
Н-фактор сыворотки	AB	ОН-сыворотка 1-го серотипа насыщалась О-антигеном 1-го типа
	A	ОН-сыворотка 1-го серотипа насыщалась О-антигеном 2-го типа
	D	ОН-сыворотка 2-го серотипа насыщалась О-антигеном 1-го типа
	C	ОН-сыворотка 4-го серотипа насыщалась О-антигеном 4-го типа и Н (или ОН)-антигеном 1-го типа

Техника серологического исследования

Серологическое типирование штаммов проводят с использованием пробирочной или пластинчатой (на стекле) реакции агглютинации. О-агглютинацию в пробирках учитывают после 4-18 часов выдерживания на водяной бане при температуре 50 °С и нескольких часов в холодильнике при температуре 4 °С. Н-агглютинацию учитывают спустя 2-4 часа после инкубации в водяной бане при температуре 50 °С и 15-30-минутной выдержки при комнатной температуре.

Если штамм агглютинируется I, II и I сыворотками, то он принадлежит к типу 1 или 2; типовую принадлежность его устанавливают реакцией Н-антигена с сыворотками А, В и D.

Если штамм агглютинируется I, II сывороткой, но не I сывороткой, то он принадлежит к 3-му типу.

Если штамм не агглютинируется I, II и IV сыворотками, но агглютинируется V сывороткой, то он принадлежит к 4-му серотипу.

J. F. Metzger, C.D. Smith (1962) предлагали проводить серотипирование штаммов *Listeria monocytogenes* методом диффузионной преципитации в агаровом геле с использованием термостабильных антигенов. Антигены для гипериммунизации кроликов готовились путем выращивания штаммов листерий на триптозно-соевом агаре, содержащем 10 % кроличьей сыворотки и 5 % глюкозы. Затем культуры пересекали в бутылки, содержащие 100 мл триптозно-соевого бульона с 10 % сыворотки и 5 % глюкозы. Бутылки с бульоном инкубировали в течение 18 часов при температуре 37 °С на орбитальном шейкере. Выраженные культуры центрифугировали на холоде при 2000 об/мин. Осадок суспендировали в 25 мл фосфатно-буферного солевого раствора (рН 7,2) и прогревали паром в течение 1 часа. Для получения типоспецифических сывороток приготовленных таким образом антигены (каждый серотип отдельно) вводили внутривенно взрослым кроликам в дозах 0,5; 1,0; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,0 мл. Кровь у животных брали через 7 дней после последней инъекции.

В качестве антигена для реакции готовили кислые экстракты из испытуемых штаммов листерий.

С этой целью штаммы выращивали на триптозно-соевом агаре, вносили в бутылки с бульоном, культивировали 18 часов при 37 °С на орбитальном шейкере и затем клеточную массу осаждали центрифугированием при 4 °С (2000 об/мин). К осадку добавляли 5 мл 1/20 Н соляной кислоты в солевом растворе; суспензию помещали в кипящую воду на 10 минут, быстро охлаждали, центрифугировали, собирали, нейтрализовали с помощью едкого натра (рН 7,0) и затем снова центрифугировали. Эти экстракты служили в качестве антигенов для использования в реакции диффузионной преципитации.

Реакцию ставили в 0,85 % очищенном агаре, в котором делали лунки специальным пробойником. Экстракты помещали в центральную лунку, а специфические иммунные сыворотки во внешние лунки. Пробы выдерживали во влажной камере в течение 48 часов при температуре 25 °С. Авторы указывают, что с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле все изученные штаммы удалось разделить на серотипы I, II, III, IVs и IV v, которые соответствовали описанным.

Н. J. Körtling (1964) считал возможным использование для серитипирования листерий так называемой пробы роста. С этой целью в пробирки с бульоном добавляют стерильную агглютинирующую сыворотку. Рост гомологичных штаммов происходит в виде осадка («агглютината») на дне пробирки, надосадочный слой при этом остается прозрачным. Гетерологичные штаммы листерий не агглютинируются и растут во всем объеме бульона, вызывая его равномерное помутнение.

О. В. Петров (1965) разработал серологический метод направленной изменчивости соматической антигенной структуры, позволяющий получать монорецепторные О-сыворотки без использования адсорбции агглютининов. Метод заключается в выращивании типовых штаммов листерий на средах, содержащих агглютинирующую О-сыворотку другого типа, до полного устранения групповых О-антигенов.

Е. И. Гудкова (1959) в результате серологического сопоставления 50 штаммов листерий, выделенных в Советском Союзе, с эталонными культурами 1, 2, 3 и 4-го серотипов установила, что в СССР встречаются все известные (на то время) серологические типы листерий. Н. С. Огнева (1963) при изучении 96 штаммов листерий обнаружила наличие серотипов 1, 2, 3, 4a и 4v. Кроме того, были выявлены штаммы листерий, которые не могли быть отнесены ни к одному из известных серотипов. Она же установила зависимость между вирулентностью и типовой принадлежностью штамма. Самыми вирулентными являлись листерии 1-го серотипа, слабовирулентными

2 и 4в, незначительно вирулентными 3 и 4а. К. Н. Шлыгина (1963) также типировала 84 отечественных штамма листерий, среди которых преобладали листерии 1-го серотипа, реже – 4-го серотипа. Листерии 2-го и 3-го серотипов не установлены. Выявлены также варианты листерий 1-го серотипа. Л. А. Буренкова (1962) типировала 92 штамма листерий, выделенные в Томской, Новосибирской, Московской, Ленинградской и Иркутской областях. 88,6 % штаммов были отнесены к 1-му серотипу. Остальные штаммы имели отклонения в антигенной структуре и поэтому не могли быть отнесены ни к одному из известных серотипов.

Проведенное А. Lucas, Н. Р. Seeliger (1957) серологическое типирование значительного числа штаммов листерий показало, что во Франции, Германии, Чехословакии, Венгрии, Финляндии, Швеции, Голландии и Швейцарии преобладает серотип 1 и лишь некоторые из них принадлежали к серотипу 4в, хотя в США и Канаде к серотипу 4в принадлежало большинство изученных штаммов. Листерии 2 и 3 серотипов встречаются достаточно редко так, штаммы 3-го серотипа выделены в Дании, ГДР, ФРГ и Канаде, а 2-го серотипа от людей в Шотландии.

О. Asahi (1962) сообщил, что из 40 выделенных им в Японии штаммов листерий 26 были идентифицированы как: 1-го серотипа – шесть штаммов, серотипа 4ав – один и серотипа 4в – девятнадцать. Иванов (1962) в период с 1955 по 1961 г. выделил в Болгарии 270 штаммов листерий, из которых 167 были отнесены к 1-му серотипу, 13 – к подтипу 4в, а 90 штаммов автор выделил в новый серотип 5. Штаммы 1-го серотипа были изолированы преимущественно при листериозных энцефалитах, 4-го – при септических формах болезни, 5-го – только из абортированных плодов овец. В связи с тем, что листерии 1, 2 и 3-ого серотипов имеют определенное антигенное родство, автор рекомендовал для практической диагностики пользоваться общим для них антигеном из штаммов 1-го серотипа, т.е. для постановки диагноза необходимо иметь два антигена (1-го и 4-го серотипов), имеющих групповой характер, и соответственно две специфические сыворотки.

Авторами были получены групповые антигены и групповые специфические сыворотки. Результаты проведенных нами экспериментов показали серологическое различие между штаммами листерий, выявляемое в перекрестной реакции агглютинации с гипериммунными листериозными сыворотками к антигенам штаммов различных серогрупп. Изучение антигенных свойств листерий позволило выявить наличие двух серогрупп, что уточняет внутривидовые антигенные характеристики штаммов листерий, необходимые для правильной оценки эпизоотической ситуации. Четкие различия штаммов, относящихся к разным серогруппам, определяются в реакции

агглютинации, при использовании непрямого метода люминесцирующих антител, в конъюнктивной пробе на морских свинках, при исследовании листерий на чувствительность к бактериофагам. Эти положения установлены нами впервые, они имеют большое значение в научном и практических отношениях.

Серологическая диагностика

Для профилактики листериоза сельскохозяйственных животных большое значение имеет прижизненная диагностика, которая позволяет выявлять скрыто больных листериозом животных и листерионосителей. Нельзя исключать и наличие скрытого листериозоносительства у животных в неблагополучных по листериозу зонах. Прижизненная бактериологическая диагностика сложна, поэтому решение проблемы связано в первую очередь с разработкой методов серо- и аллергодиагностики. Особенности антигенных свойств возбудителя листериоза не позволяют сделать серологическую реакцию основным средством постановки диагноза на листериозную инфекцию. Наличие общих антигенных комплексов между *L.monocytogenes* и стафилококками (Н. Р. Seeliger et al., 1958; Н. Welshimer, 1960), кишечной палочкой (J. Rademacherova et al., 1963), *Bac.subtilis* (Е. Neter et al., 1960), *E.isidiosa* (М. Ras et al., 1952), энтерококками (J. Gronroos 1967) объясняет трудности, с которыми сталкиваются специалисты в серологических отделах лабораторий. Многочисленные исследователи обращают внимание на недостаточную специфичность серологических реакций при листериозе. По нашему мнению, серологические исследования должны проводиться с целью выявления скрыто больных и листерионосителей в неблагополучных по листериозу хозяйствах, где наличие заболевания установлено с помощью клинико-эпизоотологических и бактериологических исследований. Первичный диагноз с помощью одних только серологических реакций ненадежен. Н. Р. Seeliger (1961) по этому поводу пишет: «Оценка серологических данных должна проводиться с большой осторожностью и сдержанностью, и при этом наряду с эпидемиологическими особенностями должна учитываться и клиническая картина». Считается, что серологические исследования при листериозе являются вспомогательным средством, представляют ценность только в совокупности с клинической картиной и должны быть подтверждены бактериологическими исследованиями.

Особенно ценными и необходимыми являются повторные серологические исследования, которые позволяют получить данные в динамике и сделать правильные выводы. Выше было указано о необходимости учета различия антигенной структуры листерий и существования нескольких

серотипов. Исследователь, игнорирующий наличие в природе различных серотипов листерий, рискует впасть в серьезную диагностическую ошибку.

С целью диагностики при листериозе сельскохозяйственных животных различными исследователями были испытаны следующие методы: реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК), реакция преципитации (РП), реакция гемагглютинации (РГА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция гемолиза (РГ), реакция угнетения связывания комплемента (РУСК), реакция пассивной сенсibilизации, люминесцентный метод диагностики.

В организме больного листериозом животного накапливаются различные антитела: агглютинины, преципитины, гемагглютинины, комплементсвязывающие антитела. Сроки их появления, максимальное накопление (уровень) и время исчезновения подвержены значительным колебаниям и зависят от многих причин: индивидуальных особенностей организма, свойств возбудителя, формы течения болезни. Разные антитела характеризуют определенные состояния организма. Наличие комплементсвязывающих антител характеризует свежий или обострившийся хронический процесс. При хронических процессах РСК чаще бывает отрицательной, РА дает положительные результаты значительно дольше.

Очевидно, что для серологической диагностики листериоза использование только одной реакции недостаточно. Необходимы многократные исследования сыворотки от подозрительных на листериоз животных параллельно в двух реакциях (РА и РСК). Следует отметить, что не всегда, даже при выраженном клиническом течении листериоза у животных (например, при поражении головного мозга у овец), в крови больных обнаруживаются высокие титры антител. Это связано с длительностью течения болезни: при остром течении антитела не успевают накопиться в достаточных для их обнаружения титрах.

Это связано, прежде всего, с различием методик, которые использовали исследователи. Динамику антителообразования лучше всего изучать при экспериментальном листериозе. Однако различные способы заражения, и, следовательно, разные формы течения болезни делают затруднительной проведение сравнительной оценки полученных результатов, а наблюдения за динамикой уровня антител при естественном течении инфекции немногочисленны.

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

Динамика образования агглютининов. Накопление агглютининов в крови животных, больных листериозом, зависит от способа заражения, особенностей и дозы возбудителя, вида животного и формы течения болезни. Как правило, агглютинины появляются с 5-10 дня после заражения, нарастают к 15-20 дню. Уровень антител снижается с 30 дня и через 60-80 дней в крови антитела не обнаруживаются или регистрируются в низких титрах у отдельных животных. В наших опытах у кроликов при подкожном способе заражения агглютинины появлялись на 5-9-й день. В зависимости от дозы возбудителя титр антител варьировал от 1:100 до 1:1600. Чем выше была доза, тем выше уровень антител в крови кроликов. Максимальное накопление антител обнаруживалось на 14-19-й день с момента заражения. К 30-му дню отмечалось значительное падение уровня антител, у некоторых кроликов к этому времени агглютинины в крови не улавливались. При внутривенном заражении агглютинины в крови кроликов появлялись на пятый день, наивысший титр в РА отмечался на 10-15-й день (1:800-1:3200), спустя месяц титр РА был в пределах 1:25-1:400. В сравнении с подкожным способом заражения титр агглютининов в крови при внутривенном заражении был выше и дольше сохранялся на высоком уровне.

В опытах А. И. Смирнова (1958) агглютинины после заражения кроликов различными способами появлялись на 4-7-й день, постепенно нарастали и достигали максимального накопления к 10-12-му дню после заражения (до 1:1600). Высокие титры держались в среднем около двух месяцев, в дальнейшем шло снижение уровня антител. Через 12-18 месяцев у отдельных животных титр РА был очень низким, большая часть животных реагировала отрицательно. И. А. Попов (1958) при экспериментальном листериозе кроликов также наиболее высокие титры РА (до 1:800) наблюдал на 15-22-й день с момента заражения. А. Ф. Бабкин (1965) обнаруживал появление агглютининов в крови кроликов на 6-9-е сутки с момента заражения.

У экспериментально зараженных листериозом овец мы наблюдали появление агглютининов на пятый день, максимальное накопление антител отмечалось на 10-15-й день с момента заражения (1:1600-1:3200), через месяц титр РА был в пределах 1:25-1:400. А. Ф. Бабкин (1965) обнаруживал агглютинины в крови зараженных овец на 6-11-е сутки, максимальный уровень агглютининов (до 1:3200) регистрировал на 6-17-е сутки, на высоком уровне антитела удерживались 3-9 суток, после чего постепенно титры снижались или в короткие сроки переставали регистрироваться. Белин и Лагрифулл (1943) отме-

чали, что сыворотка крови выздоровевшего от листериоза ягненка давала РА в титрах 1:900, контрольного ягненка – 1:100. Как сообщили Осболд и Соьер (1955), при экспериментальном листериозе у овец титр РА достигал 1:6400. По данным М. И. Яшенкиной (1959), при экспериментальном заражении поросят агглютинины в крови появляются на 5-10-й день и обнаруживаются до 80 дней с момента заражения. Титр РА достигает 1:400-1:800.

О специфичности реакции агглютинации. Вопрос о специфичности РА при листериозе в своё время вызывал дискуссию. Ряд исследователей считали, что листерии вызывают накопление, безусловно, специфических анти-тел и РА является вполне специфичной при листериозе. С другой стороны, имелся ряд высказываний о неспецифической природе РА при листериозе, которые базировались на обнаружении высоких титров РА с листериозными антигенами при обследовании так называемых благополучных хозяйств и клинически здоровых животных (А.К. Строгов 1957, Hood M. 1957). Следует заметить, что ни один из указанных авторов не пытался исключить в данном случае листерионосительства как вероятной причины высоких титров РА у исследуемых животных.

Действительно, приходится считаться с наличием так называемых нормальных антител у здоровых животных, а также с фактами перекрестных серологических реакций между листериями и другими микроорганизмами. В литературе отмечены факты неспецифической агглютинации листерий гетерологичными гипериммунными, а также нормальными сыворотками. Н. Р. Seeliger (1961) установил частичную антигенную общность между листериями и энтерококками. Н. Р. Seeliger и F. Sulzbacher (1956) наблюдали перекрестную агглютинацию между листериями и золотистым стафилококком в высоких титрах. С. Ungureanu, Н. Tubylewicz (1963) установили отчетливую перекрестную зависимость в липидных фракциях *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*. А. П. Егорова (1965) наблюдала положительные серологические реакции с листериозными антигенами при болезнях энтерококковой этиологии.

В наших опытах установлено, что стафилококки, возбудитель рожи свиней могут давать положительные РА с позитивной листериозной сывороткой в низких титрах (не выше 1:100). С другой стороны, некоторые штаммы листерий – 4 из 13 взятых в опыт – давали положительную РА в титре 1:25-1:200 с гипериммунной бруцеллезной сывороткой, 7 из 13 штаммов давали положительную РА в титре 1:25-1:100 с паратифозной агглютинирующей сывороткой типа Гертнера, 6 из 13 штаммов давали положительную РА в титре 1:25-1:50 с гипериммунной рожистой сывороткой.

Дискуссионным был вопрос о том, какие титры РА следует считать диагностическими и какие следует расценивать как неспецифические. Н. Г. Ол-

суфьев и О. С. Емельянова (1954) у овец в неблагополучных по листериозу хозяйствах обнаруживали агглютинины в титрах 1:200-1:400. А. А. Строгов (1957), на основании исследований по РА двух стад овец, благополучного и неблагополучного по листериозу хозяйств, указывает, что свойство сыворотки крови овец давать положительную РА в титре 1:100-1:400 с листериозным антигеном нельзя считать показателем заболевания животных листериозом. И. Иванов (1957) провел серологические исследования крови у экспериментально зараженных и естественно больных листериозом овец и установил, что титр РА 1:400 нельзя считать специфическим, так как он встречается в большом проценте случаев как нормальный титр у овец. Специфическим титром РА у овец, по данным Иванова, следует считать титр выше, чем 1:400. J. Beer, W. Seffner, J. Potel (1957) отметили, что наилучшие результаты были получены с антигеном, приготовленным из выделенных в данном стаде штаммов. В благополучных по листериозу стадах реагировало в титре 1:100 до 80 % животных, поэтому авторы считают, что реакцию агглютинации можно учитывать лишь в комплексе с другими серологическими реакциями (РСК, гемагглютинации).

В. В. Сливко (1954) считал положительными титрами РА для свиней и овец 1:50-1:400, для крупного рогатого скота 1:200-1:800, для кроликов 1:25-1:500, для морских свинок 1:10-1:100, для лошадей 1:200-1:600.

А. И. Смирнов (1958) считает диагностическим титром РА в практических условиях 1:400, так как при этих разведениях он наблюдал совпадение показаний РА и РСК. Положительную РА в титрах 1:25-1:200 при отрицательной РСК можно, по его мнению, объяснить наличием в сыворотке крови животных «нормальных» антител. По данным А. Ф. Бабкина (1965), сыворотки крови овец из благополучного по листериозу хозяйства реагировали положительно по РА в единичных случаях в титре 1:200 (на 2 и 3 креста), в то время как сыворотки крови овец из неблагополучных хозяйств давали положительную реакцию в разведении 1:200 и выше (на 4 креста). Автор расценивает разведение 1:200 с оценкой на 4 креста как диагности-

Табл. 2.6. Результаты исследования овец неблагополучных и благополучных по листериозу хозяйств с помощью реакции агглютинации

Благополучие хозяйства по листериозу	Кол-во животных в опыте	Результаты исследований									
		1:25		1:50		1:100		1:200		1:400	
		Число	%	Число	%	Число	%	Число	%	Число	%
Неблагополучное	113	45	39,7	41	36,2	37	32,7	23	20,3	7	6,1
	130	39	30,0	35	26,8	33	25,3	19	14,6	4	3,0
	801	31	3,9	26	3,3	14	1,7	13	1,6	11	1,3
Благополучное	120	28	23,3	28	23,3	24	20,0	4	3,3	–	–
	288	22	7,6	7	2,4	–	–	–	–	–	–

ческий (положительный) титр, это же разведение с оценкой на 2 и 3 креста расценивается как подозрительная (сомнительная) реакция.

Н. А. Михайлов (1959) считал РА специфичной и пригодной для диагностики листериоза. С целью устранения явлений самоагглютинации он рекомендовал обрабатывать антигены ультразвуком в течение 5-10 минут. Диагностическим титром для свиней автор предлагает считать 1:100, для овец и крупного рогатого скота 1:200 и выше. G. C. Vanini, S.Moro (1964) использовали для постановки реакции агглютинации антиген, полученный с помощью трипсинизации. Авторы сообщили, что такие антигены более стабильны и обладают большей специфичностью. Р. А. Женч (1960) исследовал сыворотки крови 100 собак и пришел к выводу, что титры 1:160 следует оценивать как отрицательные и только более высокие - как положительные титры. А. М. Ханкишиев (1961) считал РА специфичной для крупного рогатого скота в титре 1:200-1:400 и выше с оценкой не менее чем на 2 креста. R. Аа (1961) считал РА в титре 1:320 для овец положительной, 1:160 – сомнительной.

И. А. Бакулов и др. (1960) изучали РА в неблагополучных и благополучных по листериозу овец хозяйствах. Всего исследовано 1452 головы. Реакцию ставили в разведениях 1:25-1:400. Оказалось (табл. 2.6.), что в обеих категориях хозяйств наблюдается значительное количество овец, сыворотка крови которых давала реакцию агглютинации с листериозным антигеном в титрах 1:25-1:100. В благополучных отарах в титре 1:200 реагировали лишь отдельные животные, причем с оценкой реакции на 1-2 креста (3,3 %). Высокие титры (1:400) регистрировали только в неблагополучных по листериозу хозяйствах. У некоторых животных, реагировавших в титре 1:400, наличие листериоза подтверждено бактериологическими исследованиями.

На основании проведенных исследований и изучения литературы по этому вопросу мы пришли к выводу, что реакция агглютинации при листериозе достаточно специфична, однако применять ее следует в неблагополучных по листериозу хозяйствах, там, где наличие заболевания подтверждено клинико-эпизоотологическими и бактериологическими исследованиями. Реакцию агглютинации можно в данном случае применить для оценки распространения болезни в хозяйстве, выявления скрыто больных, листерионосителей и организации мероприятий по борьбе с этим заболеванием. Применение РА с целью первичного установления диагноза в хозяйствах, где диагноз на листериоз не был установлен комплексным методом рискованно, так как это может привести к диагностическим ошибкам.

Разработанная Л. Ф. Николайчук и др. (1974) методика постановки этой реакции повышает её чувствительность и специфичность за счёт учёта в ней 7S, а не 19S антител. Механизм постановки этой реакции сводится к следующему.

Для серологического исследования берут пробы от животных любого возраста, подозреваемых в заболевании листериозом, а также от животных из поголовья, где заболевание подтверждено. От каждого животного берут из яремной вены 5-10 см³ крови в стерильные пробирки или используют кровь, полученную при убое животного.

Из отобранных проб крови получают сыворотку методом отстаивания. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают 30-60 мин. при температуре 20-30 °С, а затем при температуре 4-10 °С. Сыворотка крови должна быть прозрачной, без признаков гемолиза.

Допускается консервировать сыворотку 5 % раствором карболовой кислоты (1-2 капли на 1 см³ сыворотки) или сухой борной кислоты (2 % кислоты к объему сыворотки). Не консервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 6 суток со дня взятия пробы, сыворотки консервированные – в течение 30 суток.

Реакцию агглютинации в диагностике листериоза применяют для исследования сывороток животных с целью обнаружения листериозных агглютинирующих макроглобулиновых (19S) и микроглобулиновых (7S) антител. Результаты РА используют при постановке диагноза в комплексе с другими данными (бактериологическое исследование, эпизоотическая ситуация, клинические признаки, патологоанатомические изменения), а также для выявления скрыто больных и переболевших животных.

Компоненты реакции и условия их применения

Для исследования используют консервированные и неконсервированные сыворотки крови без признаков гнилостного распада и гемолиза.

В реакции применяют антигены, представляющие собой взвесь инактивированных листерий первой и второй серогрупп, выпускаемые в лиофилизированном виде. Перед применением необходимо добавить к ним физиологический раствор рН 7,2 в количестве, указанном на этикетке. Разведенные антигены можно хранить при 4 °С в течение 1,5-2 месяцев. Перед употреблением антигены тщательно встряхивают. Для контроля используют агглютинирующие листериозные сыворотки первой и второй серогрупп, содержащие 19S- и 7S-антитела, а также нормальную (отрицательную) сыворотку.

Для дифференциации 19S- и 7S-антител используют 2-меркаптоэтанол (2-МЭ) или солянокислый цистеин, которые избирательно разрушают макроглобулины (19S).

Постановка реакции агглютинации

Испытуемые сыворотки исследуют параллельно с двумя антигенами. При исследовании сывороток крупного рогатого скота и лошадей, реакцию ставят в разведениях 1:160 и 1:320, овец, коз и свиней – 1:80 и 1:160, кроликов 1:20 и 1:40. Разведения сывороток делают в физиологическом растворе.

Реакцию проводят в объеме 1 мл. При исследовании сывороток кроликов в первую пробирку наливают 0,9 мл физиологического раствора, во вторую – 0,5 мл. Затем в первую пробирку добавляют 0,1 мл сыворотки, перемешивают и переносят 0,5 мл во вторую пробирку. Из второй пробирки 0,5 мл смеси удаляют. Получают разведение сывороток 1:10 и 1:20. Затем в обе пробирки добавляют по 0,5 мл разведенного антигена. Получают разведение сывороток 1:20 и 1:40.

При исследовании сывороток крови крупного рогатого скота и лошадей сначала готовят основное разведение сыворотки – 1:40, для чего в пробирку наливают 0,1 мл сыворотки и 3,9 мл физиологического раствора. Затем из полученного разведения готовят рабочие разведения сыворотки: наливают в две пробирки по 0,5 мл физиологического раствора. В первую пробирку переносят 0,5 мл основного разведения сыворотки, перемешивают и 0,5 мл смеси переносят во вторую пробирку. Затем из нее удаляют 0,5 мл смеси, после чего в обе пробирки добавляют по 0,5 мл разведенного антигена. Получают разведение сывороток 1:160 и 1:320.

При исследовании сывороток крови овец, коз и свиней готовят основное разведение сыворотки – 1:20 (0,1 мл сыворотки +1,9 мл физиологического раствора). Для приготовления рабочих разведений наливают в две пробирки по 0,5 мл физиологического раствора. В первую пробирку переносят 0,5 мл основного разведения сыворотки, перемешивают и 0,5 мл смеси из нее переносят во вторую пробирку. Из второй пробирки удаляют 0,5 мл смеси. Затем в обе пробирки добавляют по 0,5 мл разведенного антигена. Получают необходимое разведение сыворотки 1:80 и 1:160. При постановке реакции с испытуемыми сыворотками одновременно ставят следующие контроли:

- с отрицательной сывороткой в тех же разведениях, как и испытуемые;
- с положительной агглютинирующей сывороткой соответствующего серовара, содержащей 7S-антитела, в разведении до ее предельного общего титра;
- 1 мл разведенного антигена первой серогруппы (одну пробирку) и 1 мл разведенного антигена второй серогруппы (одну пробирку) – для контроля антигена на самоагглютинацию.

Пробирки с испытуемыми и контрольными сыворотками и антигенами выдерживают в термостате 18-20 часов при 37 °С, затем при комнатной температуре в течение 1,5 – 2 часов, после чего учитывают результаты реакции.

Учет и диагностическая оценка реакции

Результаты реакции оценивают в крестах последующей схеме:

++++ полное просветление жидкости при наличии четко выраженного зонтика, который при встряхивании разбивается на мелкие хлопья, комочки;

+++ те же явления, но надосадочная жидкость слегка опалесцирует;
++ просветление жидкости выражено слабее, имеется недостаточно четко сформированный зонтик, при встряхивании разбивается на мелкие хлопья и крупинки;

+ незначительное просветление при наличии зонтика, при встряхивании - мелкие крупинки и комочки;

- отрицательная, отсутствие, просветления и зонтика.

Реакция признается положительной при обнаружении агглютинации с оценкой не менее, чем на два креста в разведениях сыворотки 1:160 для овец, свиней и коз; 1:320 для крупного рогатого скота, лошадей; 1:40 для кроликов. Сыворотки, давшие отрицательную реакцию в указанных разведениях, подлежат дополнительной обработке 2-МЭ или солянокислым цистеином.

Обработка сывороток 2-МЭ

2-МЭ – бесцветная жидкость, обладающая резким запахом, поэтому работу с 2-МЭ проводят в вытяжном шкафу. Рабочий раствор 2-МЭ готовят непосредственно перед применением, разводя исходный препарат дистиллированной водой согласно титру, указанному на этикетке флакона.

Сыворотки крови кроликов разводят физиологическим раствором 1:5 (0,2 мл сыворотки + 0,8 мл физиологического раствора), сыворотки овец, коз и свиней – 1:10 (0,1 мл сыворотки + 0,9 мл физиологического раствора), сыворотки крови крупного рогатого скота и лошадей – 1:20 (0,05 мл сыворотки + 0,95 мл физиологического раствора).

Затем к 1 мл разведенной сыворотки добавляют 1-2 капли рабочего разведения 2-МЭ. Пробирки плотно закрывают резиновыми пробками и помещают в водяную баню (37 °С) на 1 час. После этого сыворотку, обработанную 2-МЭ, разливают в 2 пробирки по 0,5 мл и в одну из них добавляют 0,5 мл разведенного антигена первой серогруппы, в другую – 0,5 мл разведенного антигена второй серогруппы. Получают разведение 1:10 для сывороток кроликов, 1:20 – овец, коз и свиней, 1:40 – для сывороток крови крупного рогатого скота и лошадей.

При постановке реакции с испытуемыми сыворотками одновременно ставят следующие контроли:

- с отрицательной сывороткой в том же разведении, как и испытуемые;
- с агглютинирующей сывороткой, содержащей 19S- антитела, в том же разведении, что и испытуемые;
- с агглютинирующей сывороткой, содержащей 7S – антитела, в разведении до предельного титра 7S – антител;

1 мл разведенного антигена первой серогруппы (одна пробирка) и 1 мл разведенного антигена второй серогруппы (одна пробирка) – для контроля антигена.

Агглютинирующие контрольные сыворотки обрабатывают 2-МЭ так же, как и испытуемые. Отрицательная сыворотка обработке 2-МЭ не подлежит.

Пробирки с контрольными и испытуемыми сыворотками и антигенами выдерживают в термостате 18-20 часов при 37 °С, затем при комнатной температуре 1,5-2 часа, после чего учитывают результаты реакции.

Обработка сывороток солянокислым цистеином

Раствор цистеина готовят непосредственно перед применением. Для получения рабочего раствора цистеина 35,1 мг препарата растворяют в 1 мл 0,2 М NaOH. Для приготовления 0,2 М раствора едкого натра растворяют 8 г реактива в 1 л дистиллированной воды.

Сыворотки крови кроликов разводят в 2,5 раза (0,2 мл сыворотки + 0,3 мл физраствора), сыворотки овец, коз и свиней – 1:5 (0,1 мл сыворотки + 0,4 мл физраствора), сыворотки крупного рогатого скота и лошадей – 1:10 (0,05 мл сыворотки + 0,45 мл физраствора). Затем к 0,5 мл разведенной сыворотки добавляют 0,5 мл рабочего раствора цистеина. Пробирки закрывают резиновыми пробками и выдерживают в течение 18-20 часов в термостате при 37 °С. После этого сыворотку, обработанную цистеином, разливают в 2 пробирки по 0,5 мл, в одну из них добавляют 0,5 мл разведенного антигена первой серогруппы, в другую – 0,5 мл разведенного антигена второй серогруппы. Получают разведение сыворотки 1:10 для кроликов, 1:20- для овец, коз и свиней и 1:40 для крупного рогатого скота и лошадей.

Контроли реакции ставят как при обработке сывороток 2-МЭ с последующим выдерживанием испытуемых и контрольных проб при 37 °С (18-20 часов) и при комнатной температуре (1,5-2 часа).

Учет и оценка реакции после обработки сывороток 2-МЭ или солянокислым цистеином

Реакция признается положительной при обнаружении агглютинации с оценкой не менее, чем на два креста в сыворотках, обработанных 2-МЭ или цистеином, в разведении 1:10 для кроликов, 1:20-для овец, коз и свиней, 1:40 – для крупного рогатого скота и лошадей. При этом контрольная агглютинирующая сыворотка, содержащая 19S-антитела, должна дать отрицательную реакцию в том же разведении, а контрольная сыворотка, содержащая 7S-антитела, – положительную реакцию в разведении до предельного титра 7S-антител. При оценке реакции необходимо учитывать, что цистеин легко окисляется на воздухе, образуя мелкие крупинки, которые можно легко отличить от специфической агглютинации.

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

По данным И. П. Лысенко, А. М. Цымбал и М. З. Кульбачной (1965), специфические комплементсвязывающие антитела в крови зараженных овец появлялись на 6-40-й день после заражения, а исчезали через 7-97 суток после появления. В опытах Г. Г. Юркова (1962) у экспериментально зараженных различными способами овец (алиментарно, внутривенно, аэрозольно) комплементсвязывающие антитела появлялись на 6-20-й день после заражения и удерживались на протяжении 4-18 дней. Как указывал А. Ф. Бабкин (1965), комплементсвязывающие антитела у овец, зараженных внутривенно и интратрахеально, появлялись на 6-14-е сутки, максимальный подъем титра антител (до 1:640) наблюдался на 6-17-е сутки. Титр антител удерживался на таком уровне 3-9 суток, после чего отмечали снижение, а затем полное исчезновение антител из сыворотки крови животных. Наблюдения ряда исследователей свидетельствуют о высокой специфичности РСК при листериозе (А. И. Смирнов, 1958, А. П. Тарасова и др., 1959, О. Г. Шпрингбах, 1957). Однако не все исследователи при использовании РСК получали хорошие результаты. М. М. Халимбеков (1955) сообщил, что результаты РСК у овец получились нечеткие, и от нее пришлось отказаться. Т. Лах (1957) также указывал, что РСК в первые дни заболевания животных листериозом не характерна. М. И. Яшенкина (1959) на основании результатов своих опытов не рекомендует РСК как метод диагностики листериоза у свиней. Нами разработана технология получения специфического антигена для реакции связывания комплемента. В результате испытаний в благополучных и неблагополучных по листериозу хозяйствах были получены четкие результаты применения этого антигена. В лаборатории ВНИИВВиМ налажено производство компонентов для РСК при листериозе и снабжения лабораторий ветеринарно-медицинского профиля.

В настоящее время данный метод прижизненной диагностики листериоза в нашей стране считается общепризнанным, входит в инструкцию по диагностике листериоза.

Реакция связывания комплемента (РСК) с листериозным антигеном применяется для исследования на листериоз сывороток крови всех видов животных и человека.

Применение РСК не исключает применения других методов диагностики листериоза, однако ценность этой реакции состоит в том, что она ускоряет постановку диагноза и позволяет выявлять больных животных, не имеющих выраженных клинических признаков болезни (листериионосителей).

Реакцию ставят в водяной бане в общем объеме 1,0 мл всех компонентов при температуре 37–38 °С.

Компоненты реакции и условия их применения:

- гемолизин с рабочим титром не ниже 1:500; титрование гемолизина по общепринятой схеме проводят периодически 1 раз в 3 месяца, а также при получении каждой новой серии;

- листериозный антиген для РСК; применяют в рабочем титре, указанном на этикетке флакона; срок годности антигена 2 года при условии хранения его в темном прохладном месте (5–10 °С);

- позитивные листериозные сыворотки; используют при титровании комплемента в бактериолитической системе и для контроля реакции в главном опыте после предварительной инактивации в день постановки реакции в разведении 1:10 в течение 30 минут при 56–60 °С (сыворотки крупного рогатого скота и свиней при 56–57 °С, лошадей и овец при 58–59 °С, кроликов – 60 °С).

- нормальные сыворотки заведомо здоровых животных тех же видов, как и испытуемые; применяют при титровании комплемента в бактериолитической системе и для контроля реакции в главном опыте так же, как и позитивные сыворотки после предварительной инактивации при указанном режиме и в таких же дозах;

- комплемент сухой для РСК; применяется в титре, установленном в день постановки реакции путем титрования в бактериолитической системе;

- 2,5 % взвесь эритроцитов барана в физиологическом растворе; лучше применять сенсibilизированные эритроциты (гемолитическую систему). Для сенсibilизации эритроцитов гемолитическую систему (смесь равных объемов 2,5 % взвеси эритроцитов и рабочего разведения гемолизина) выдерживают в водяной бане при 37–38 °С в течение 20 минут; гемолитическую систему применяют в реакции в дозе 0,4 мл;

- физиологический раствор (0,85 %) химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде рН 7,0–7,2.

Титрование компонентов

Перед постановкой главного опыта проводят титрование компонентов реакции: гемолизина и комплемента в гемолитической и бактериолитической системах.

Титрование гемолизина

Гемолизин титруют в разведениях: 1:1000, 1:1200, 1:1500, 1:1800, 1:2000, 1:2500, 1:3000 и т. д., которые готовят из основного его разведения 1:100.

Комплемент используют в реакции в разведении 1:10 или 1:20 по 0,2 мл. Взвесь эритроцитов барана по 0,2 мл. Взамен антигена и сыворотки в пробирки прибавляют по 0,4 мл физиологического раствора. Время течения реакции – 10 минут в водяной бане при температуре 37–38 °С.

При титровании гемолизина ставят следующие контроли:

- гемолизин 1:100 с эритроцитами и физраствором в отсутствии комплемента;
- комплемент с эритроцитами и физраствором в отсутствии гемолизина;
- эритроциты с физраствором в отсутствии гемолизина и комплемента.

Во всех контролях гемолиз эритроцитов должен отсутствовать. Титром гемолизина считается наименьшее количество его, потребное для полного гемолиза 0,2 мл взвеси эритроцитов при комплементе 0,2 мл в разведении 1:10 или 1:20.

Для титрования комплемента и постановки главного опыта гемолизин применяют в рабочем титре, который является четырехкратной дозой по сравнению с предельным титром. Например, если предельный титр равен 1:2000, то в реакции следует применять разведение 1:500, для чего к 1 мл гемолизина приливают 499 мл физиологического раствора (табл. 2.7.).

Титрование комплемента в гемолитической системе

Комплемент титруют в дозах 0,02, 0,04, 0,06 и т. д. (с интервалом по 0,02 мл) до 0,20 мл основного его разведения. В каждую пробирку к недостающему до 0,2 мл количеству основного разведения комплемента добавляют физиологический раствор: в первую пробирку 0,18 мл, во вторую 0,16 мл и т. д. После этого во все пробирки наливают по 0,4 мл физиологического раствора и по 0,4 мл гемолитической системы. Реакция должна сопровождаться контролями компонентов в смеси с эритроцитами (гемолизина, комплемента, физраствора), а также контролем гемолитической системы при максимальной дозе комплемента (0,2 мл основного разведения). После тщательного смешивания компонентов путем встряхивания, штативы с пробирками по-

Табл. 2.7. Титрование гемолитической сыворотки

№ пробирки	Разведенная гемолитическая сыворотка, мл	2,5 % взвесь эритроцитов, мл	Комплемент 1:20, мл	Физиологический раствор, мл	Результат опыта
1	0,2 (1:1000)	0,2	0,2	0,4	Полный гемолиз
2	0,2 (1:1200)	0,2	0,2	0,4	
3	0,2 (1:1500)	0,2	0,2	0,4	
4	0,2 (1:1800)	0,2	0,2	0,4	
5	0,2 (1:2000)	0,2	0,2	0,4	
6	0,2 (1:2500)	0,2	0,2	0,4	Частичный гемолиз
7	0,2 (1:3000)	0,2	0,2	0,4	
8	0,2 (1:3500)	0,2	0,2	0,4	
9	0,2 (1:4000)	0,2	0,2	0,4	
10	0,2 (1:5000)	0,2	0,2	0,4	
Контроль	0,2 (1:100)	0,2	–	0,6	Полная задержка гемолиза
	–	0,2	0,2	0,6	
	–	0,2	–	0,8	

Примечание: В данном примере предельный титр гемолитической сыворотки равен 1:2000, а для реакции следует применять ее в титре 1:500.

мещают на 10 минут в водяную баню при 37 – 38 °С. Титром комплемента в гемолитической системе считается наименьшее его количество, необходимое для полного гемолиза в указанных условиях 0,2 мл взвеси эритроцитов при рабочей дозе гемолизина (табл. 2.8.).

Если титр комплемента в гемолитической системе определяется дозой 0,18 мл и выше (основное разведение 1:20), то титрование в гемолитической системе повторяют, пользуясь основным разведением комплемента 1:10.

Титрование комплемента в бактериолитической системе

В бактериолитической системе комплемент титруют, начиная с дозы на один – два интервала ниже против его титра в гемолитической системе. Если титр комплемента в гемолитической системе определяется дозой 0,08 мл основного разведения, то в бактериолитической системе его титруют в дозах: 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 и т. д. до 0,20 мл того же основного разведения.

Каждую дозу комплемента исследуют с двумя листериозными и с двумя нормальными сыворотками в присутствии антигена (в рабочем титре) и с контролем сывороток без антигена.

Инактивированные в разведении 1:10 листериозные и нормальные сыворотки разливают по 0,2 мл в пробирки соответствующих рядов.

Таким образом, в бактериолитической системе комплемент титруют в 8-ми рядах пробирок (по 9 пробирок в каждом ряду).

Требуемые разведения комплемента целесообразно готовить сразу для всего опыта титрования. С этой целью берут дополнительный ряд пробирок, в который разливают применяемые при титровании дозы комплемента в десятикратном объеме, т.е. – 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 и т. д. до 2,0 мл. Недостающий до 2 мл объем жидкости в пробирках доливают соответствующим количеством физиологического раствора: 1,6; 1,4; 1,2; 1,0 и т. д. Приготовленные таким способом разведения комплемента разливают пипеткой или аппара-

Табл. 2.8. Титрование комплемента в гемолитической системе

1. Комплемент в разведении 1:10 / 1:20	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
2. Физиологический раствор до объема 0,2 мл	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	0,00
3. Сенсибилизированные эритроциты барана (гемолитическая система)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
4. Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
5. Водяная баня при 37-38°С в течение 10 минут										
Результат реакции*:	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примечание: ЗГ – задержка гемолиза, ЧГ – частичная задержка гемолиза, ПГ – полный гемолиз.

том Флоринского в соответствующие опытные пробирки по 0,2 мл: в первые пробирки всех 8-ми рядов из первого разведения (доза основного разведения 0,04 мл), во вторые пробирки всех 8-ми рядов из второго разведения (доза основного разведения 0,06 мл) и т. д. После разлива комплемента, в первые ряды пробирок с листериозными и нормальными сыворотками наливают по 0,2 мл антигена в рабочем титре, во вторые по 0,2 мл физиологического раствора. Компоненты смешивают энергичным встряхиванием штативов и помещают в водяную баню при 37-38 °С на 20 минут (связывание комплемента). Затем во все пробирки наливают по 0,4 мл гемолитической системы, компоненты смешивают и штативы снова помещают в водяную баню при 37-38 °С на 20 минут (фаза гемолиза).

Титром комплемента в бактериолитической системе является минимальное его количество, вызывающее полный гемолиз в пробирках с нормальными сыворотками с антигеном и без антигена, с листериозными сыворотками без антигена, при задержке гемолиза в пробирках с листериозной сывороткой и антигеном в течение 20 минут при 37-38 °С (таблица 2.9.), что принимается за рабочий титр комплемента для главного опыта.

Главный опыт. Разведение комплемента для главного опыта

Количество чистого комплемента, необходимого для всего опыта, определяется по формуле: $2 A \times B/C$ где:

A – титр комплемента, установленный в баксистеме;

B – количество проб, подлежащих исследованию;

C – разведение комплемента.

Например, требуется произвести исследование 100 проб сывороток (с антигеном и без, т.е. 200 пробирок). Титр комплемента в бактериолитической системе 0,10 мл основного разведения 1:10,

Табл. 2.9. Титрование в бактериолитической системе

1. Комплимент в разведении 1:10	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
2. Физиологический раствор до объема 0,2 мл	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	0,00
3. Антиген в рабочем титре (1-й ряд пробирок) или физиологический раствор (2-й ряд пробирок без антигена)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
4. Нормальная сыворотка в разведении 1:10	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
5. Водяная баня при 37-38°С в течение 20 минут									
6. Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Результат реакции:	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примечание: ЧГ – частичная задержка гемолиза, ПГ – полный гемолиз.

Доза чистого комплемента равна 2,0 мл ($2 \times 0,10 \times 100 / 10$). Количество разведенного комплемента для исследования 100 проб равно 40 мл ($0,2 \times 200$), поэтому к 2,0 мл чистого комплемента следует добавить 38,0 мл физраствора.

Основные условия постановки главного опыта

Реакцию ставят в общем объеме 1,0 мл всех компонентов, т.е. каждый компонент применяют в объеме 0,2 мл. Испытуемые сыворотки исследуют с антигеном и без антигена в разведении 1:10 после предварительной инактивации в водяной бане при температуре 56-60 °С и выше, в зависимости от вида животных, в течение 30 минут. Комплемент применяют в установленном титре. Время связывания комплемента в бактериолитической системе 20 минут, реакция гемолиза – 20 минут (в водяной бане при 37-38 °С).

Основные контроли главного опыта:

- отрицательная и положительная (листериозная) сыворотки в разведении 1:10 с антигеном и без антигена;
- антиген на антикомплементарность и гемотоксичность (двойная доза антигена с комплементом в рабочем титре и без комплемента), компоненты смешивают и ставят в водяную баню на 20 минут, после чего добавляют гемолитическую систему по 0,4 мл и снова выдерживают в водяной бане в течение 20 минут;
- гемолитическая система с комплементом и без комплемента;
- комплемент в двойной дозе с эритроцитами без гемолизина.

Учет и оценка результатов реакции

Результаты реакции оценивают по степени задержки гемолиза эритроцитов в крестах 2 раза: первый раз – тотчас после водяной бани, второй раз – через 14-18 часов выдерживания проб при комнатной температуре по следующей схеме:

- ++++ (4 креста) – отсутствие гемолиза эритроцитов, надосадочная жидкость прозрачная;
- +++ (3 креста) – гемолиз 25 % эритроцитов;
- ++ (2 креста) – гемолиз 50 % эритроцитов;
- +(1 крест) – гемолиз 75 % эритроцитов;
- (минус) – полный гемолиз, осадок отсутствует.

Реакцию считают: положительной – при задержке гемолиза эритроцитов на 3-4 креста; сомнительной – при задержке гемолиза на 2 креста; отрицательной – при задержке гемолиза на 1 крест или полном гемолизе эритроцитов.

Животные, с сыворотками крови которых получены сомнительные реакции, подлежат повторному исследованию через 2-3 недели. При повторном получении сомнительной реакции результат исследования считают отрицательным.

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП)

Имеется очень мало данных о применении реакции преципитации для диагностики листериоза. А. Ф. Бабкин (1965) указывал, что у зараженных листериозом кроликов были выявлены преципитины только у троих животных из девяти в период между 15-ми и 41-ми сутками, причем эти кролики переболели значительно тяжелее, чем остальные. Автор указывает, что у экспериментально зараженных овец преципитины появлялись в крови на 6-18-е сутки, причем обычно позже других антител и у тяжело переболевших овец. В опытах были испытаны методика кольцепреципитации и диффузионной преципитации в агаре. Изучение реакций показало их специфичность. Реакция диффузионной преципитации оказалась более простой в постановке и оценке полученных результатов. При исследовании 150 сывороток крови овец из неблагополучных по листериозу хозяйств только в единичных случаях наблюдали положительную реакцию диффузионной преципитации из числа сывороток, реагирующих положительно по РСК.

Н. Р. Seeliger (1961) указывал, что его опыты по применению реакции преципитации при листериозе не дали желаемых результатов. В опытах на животных было установлено, что преципитины появлялись позднее других антител и в очень незначительном количестве. Автор сомневался в возможности использования этого метода для диагностической цели при листериозе. Однако К. Potel (цит. по Н. Р. Seeliger 1961) получил хороший результат при использовании реакции преципитации. Он готовил преципитиноген следующим образом – культуру листерий смывали с агара 5 мл бульонного экстракта и выращивали в течение трех дней при 37 °С. Фильтровали бульон через фильтр Зейтца и этот фильтрат использовали в качестве преципитиногена.

Т. Е. Muraschi, V. N. Tompkins (1963) применили реакцию преципитации в агаровом геле с использованием соматических антигенов листерий для идентификации и типирования возбудителя листериоза. Авторы считали, что эта методика позволяет с большей точностью судить о серологических типах листерий.

РЕАКЦИЯ ГЕМОЛИЗА (РГ)

А.Ф. Бабкин (1965) ставил реакцию гемолиза по той же методике, что и реакцию непрямой гемагглютинации. Через 1,5-2 часа после соединения сенсibilизированных эритроцитов с сыворотками (т.е. после учета РНГА) к смеси добавляли 0,05 мл комплемента. Пробирки встряхивали и выдерживали 1 час на водяной бане при 37 °С. Учитывали результаты по трехбалльной системе: 3 креста – полный гемолиз; 2 креста – четко выраженный гемолиз, незначительный осадок эритроцитов; 1 крест – слабо выраженный гемолиз, осадок эритроцитов хорошо выражен. Реакция в 3 и 2 креста оценивалась как положительная, 1 крест – сомнительная.

У кроликов, зараженных листериозом, гемолизины в крови автор обнаруживал между 10-ми и 15-ми сутками, у овец – на 3-12-е сутки после заражения. При исследовании по реакции гемолиза сывороток крови 833 овец из неблагополучных по листериозу отар положительно реагировали в титре 1:20 - 22 овцы (2,4 %), 1:40 – 40 овец (4,5), 1:80 – 79 овец (8,9 %); из благополучных хозяйств реагировали в титре 1:20 - 4 овцы (2,6 %) и 1:40 – 1 овца (0,6 %). В более высоких разведениях «нормальные» гемолизины не обнаруживались. Автор считает диагностическим титром при учете реакции гемолиза 1:80, а при использовании методики адсорбции – 1:20.

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА)

По наблюдениям Р. П. Карпова (1960), в сыворотке кроликов, иммунизированных гретой и хлороформированной вакцинами, с помощью реакции непрямой гемагглютинации обнаруживали антитела к растворимым антигенам листерий (титр 1:80 - 1:2560). Результаты РНГА не всегда совпадали с данными РА. А. Ф. Бабкин (1965) у зараженных кроликов регистрировал появление гемагглютининов между 10-ми и 15-ми сутками. У экспериментально зараженных овец гемагглютинины появлялись на 3-9 сутки, максимальный подъем титра антител (до 1:320) по РНГА отмечался на 6-12 сутки, удерживался 3-6 суток, после чего наблюдалось снижение, а затем исчезновение гемагглютининов из крови. Автор ставил реакцию непрямой гемагглютинации в объеме 0,6 мл (0,3 мл испытуемой сыворотки и 0,3 мл 1 % взвеси эритроцитов овцы, сенсibilизированных листериозным антигеном). Специфичность реакции была доказана при исследовании различных

гипериммунных сывороток. Однако при исследовании по РНГА сывороток крови овец неблагополучных и благополучных по листериозу хозяйств, границы между титрами специфических и «нормальных» гемагглютининов установить не удалось. Автор делает вывод, о невысокой специфичности этой реакции.

По данным А. А. Триполитовой (1965), естественные антитела к растворимым антигенам листерий содержатся в крови морских свинок, кроликов, лошадей в небольших количествах. Установлено, что 227 из 237 исследованных лошадиных сывороток агглютинировали эритроциты в разведении 1:80, единичные сыворотки давали агглютинацию эритроцитов в разведении 1:160-1:320. Титры сывороток крупного рогатого скота были более низкими (14 из 15 сывороток реагировали в титре 1:20). Автор считает РНГА специфичной.

РНГА с листериозным антигенным инактивированным эритроцитарным диагностикумом (ЭД) применяют при исследовании сывороток крови людей и животных для обнаружения листериозных антител с целью диагностики болезни. РНГА рекомендуется для оперативных и диагностических серологических обследований с целью выявления закономерностей формирования противолостериозного иммунитета у различных групп людей и животных. Определение возрастных, сезонных, профессиональных среднелетних колебаний уровня иммунитета является необходимым для всестороннего анализа напряженности эпизоотического и эпидемического процесса на конкретной географической территории. РНГА используют для дифференциации противолостериозных 19S- и 7S-антител, что дает возможность отличить свежий инфекционный процесс от скрытого бактерионосительства и хронических малосимптомных форм заболевания.

Компоненты реакции и условия их применения

Солевые растворы и их приготовление:

- физиологический раствор (рН 7,0-7,2) для растворения сухой гипериммунной листериозной кроличьей сыворотки: 8,5 г хлорида натрия на 1 л дистиллированной воды;

- 0,15 М фосфатный буферный раствор (рН 7,2) для приготовления исходных разведений исследуемых сывороток 0,2 М раствора солянокислого цистеина и постановки РНГА:

- **раствор 1** – 21,19 г двузамещенного фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), предварительно высушенного в течение 3 суток при 37 °С, растворяют в 1 л дистиллированной воды;

- **раствор 2** -20,41 г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Для получения 100 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2) 76,1 мл раствора 1 смешивают с 23,9 мл раствора 2;

– раствор мертиолата для консервирования исследуемых сывороток: препарат растворяют в дистиллированной воде в соотношении 1:1000. Для консервирования сывороток используют приготовленный раствор мертиолата из расчета 1:10, т.е. конечная концентрация реактива должна составлять 1:10000.

Сухая гипериммунная листериозная кроличья сыворотка, используемая как положительный контроль, характеризующий чувствительность эритроцитарного диагностикума. Сыворотку растворяют физиологическим раствором до ее первоначального объема, указанного на этикетке ампулы.

– 50 % взвесь формализированных бараньих эритроцитов для адсорбции исследуемых сывороток, содержащих антитела к эритроцитам барана.

Сухие контрольные формализированные эритроциты барана, представляющие 0,33 % взвесь после растворения в фосфатном буферном растворе (рН 7,2) в объеме, указанном на этикетке ампулы.

Сухой ЭД, представляющий формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные инактивированным антигеном возбудителя листериоза. Антиген приготовлен из штамма листерий 9-127 первого серовара методом гидролиза предварительно высушенной в ацетоне бактериальной массы в фосфатном буферном растворе (рН 6,4). Сухой ЭД и контрольные к нему эритроциты имеют вид пористой коричневой таблетки, которая при добавлении дистиллированной воды в течение 2 минут образует однородную взвесь коричневого цвета.

Для исследования используют свежие и консервированные сыворотки крови без признаков гнилостного распада и гемолиза.

Для дифференциации 19S- и 7S-антител, позволяющей отличить свежий инфекционный процесс от скрытого бактерионосительства и хронических малосимптомных форм заболевания, а также постинфекционное иммунное состояние от поствакцинального, используют 0,2 М раствор солянокислого цистеина. Его готовят перед использованием: 35,1 мг препарата растворяют в 1 мл 0,2 М раствора едкого натра.

Приготовление 0,2 М раствора едкого натра: 8 г реактива растворяют в 1 л фосфатного буферного раствора (рН 7,2).

Подготовка сывороток к исследованию

Испытуемые сыворотки крови людей и животных разводят 1:5 в пробирках 0,15 М фосфатным буферным раствором (рН 7,2) для выявления наиболее специфичных 7S-антител, а для выявления антител суммарной активности (19S- + 7S-антитела) сыворотки крови кроликов разводят 1:10, сы-

воротки крови людей – 1:40, мелкого рогатого скота и свиней – 1:80, а крупного рогатого скота – 1:160. До постановки РНГА разведенные сыворотки, предназначенные для обнаружения антител суммарной активности, сохраняют при 4 °С.

В пробирки с сыворотками, разведенными 1:5, вносят равный объем 0,2 М раствора солянокислого цистеина, получая исходное разведение 1:10. Эти пробирки закрывают резиновыми пробками и выдерживают при 37 °С 2 часа. После этого, обработанные и необработанные раствором солянокислого цистеина, сыворотки исследуют в РНГА.

Подготовка к работе эритроцитарного диагностикума

Для получения 0,33 % взвеси сенсibilизированных эритроцитов сухой препарат растворяют 0,5 мл дистиллированной воды и к полученному объему добавляют 5,5 мл 0,15 М фосфатного буферного раствора (рН 7,2). Эритроцитарный диагностикум выдерживают 20 минут, хорошо перемешивая, при комнатной температуре.

Постановка РНГА микрометодом

Реакцию ставят в объеме 0,1 мл. В каждую лунку капельницей вносят по 0,05 мл 0,15 М фосфатного буферного раствора (рН 7,2). В первую лунку ряда прибавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки в соответствующем разведении. С помощью микродиллюторов по 0,05 мл сыворотки переносят из первой лунки во вторую, из второй в третью и т. д., т.е. готовят последовательные двукратные разведения. С целью выявления 7S-антител у людей и всех видов животных разведения в лунках должны соответствовать значениям 1:20 и 1:40. Для выявления антител суммарной активности пробы сывороток крови кроликов должны быть разведены до 1:640, а крупного рогатого скота – с 1:320 до 1:640. При получении положительных результатов определяется максимальный титр сывороток. После титрования в каждую лунку вносят по 0,05 мл 0,33 % взвеси ЭД. Панели оставляют при комнатной температуре и через 3-4 часа проводят предварительный учет результатов, а окончательный учет осуществляют на следующий день. Можно учитывать результат однократно после выдерживания панелей при 4 °С в течение 16-18 часов.

Контроли, используемые в реакции:

– контроль ЭД и несенсибилизированных эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации.

Для этого в одну лунку к 0,05 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2) добавляют 0,05 мл 0,33 % взвеси ЭД, а в другую лунку к тому же количеству буферного раствора – 0,05 мл контрольных 0,33 % несенсибилизированных эритроцитов.

– контроль специфичности РНГА для каждой исследуемой сыворотки.

Для этого к 0,05 мл исследуемой сыворотки в наибольшей для данного опыта концентрации добавляют 0,05 мл 0,33 % взвеси несенсибилизированных эритроцитов.

Во всех указанных случаях контроля должны быть отрицательными, т.е. агглютинации не должно быть. В случае положительного контроля исследуемой сыворотки, ее адсорбируют 50 % взвесью формализированных эритроцитов барана.

– контроль чувствительности эритроцитарного диагностикума: титруют в объеме 0,05 мл гипериммунную листериозную кроличью сыворотку до титра, указанного на этикетке ампулы; в каждую лунку добавляют 0,05 мл 0,33 % взвеси ЭД. С учетом результатов серологических реакций в дальнейшем может быть использован ЭД, дающий реакцию с листериозной сывороткой не менее 1/3 ее предельного титра (положительный контроль).

В случае необходимости адсорбции исследуемых сывороток бараными эритроцитами к 1 мл сыворотки добавляют 2 капли (0,1 мл) 50 % взвеси формализированных эритроцитов. Смесь встряхивают и выдерживают 30 минут при 37 °С или 60 минут при 20-22 °С, либо 18 часов при 4 °С. Сыворотку центрифугируют при 1,5 тыс. об./мин. в течение 10 минут или отстаивают, после чего проводят ее повторное исследование в РНГА.

При использовании макрометода РНГА ставят в объеме 0,4 мл. В каждую лунку пипеткой вносят по 0,2 мл 0,15 М фосфатного буферного раствора (рН 7,2). В первую лунку ряда прибавляют 0,2 мл исследуемой сыворотки в соответствующем разведении. С помощью пипеток переносят по 0,2 мл сыворотки из первой лунки во вторую, из второй в третью и т. д. – готовят последовательные двукратные разведения. После титрования в каждую лунку вносят по 0,2 мл 0,33 % взвеси эритроцитарного диагностикума. Учет результатов проводят также как и при микрометоде.

Учет и оценка РНГА

Учет результатов реакции проводят по четырехплюсовой системе:

++++ эритроциты покрывают все дно лунки ровным слоем, наблюдается картина «зонтика» с ровными краями;

+++ эритроциты покрывают дно лунки «зонтиком» несколько меньшего размера;

++ маленький «зонтик» с неровными краями и «пуговкой» в центре;

+ «пуговка» в центре лунки, имеются отдельные зерна агглютината;

- «пуговка» с ровными четко очерченными краями.

Реакция считается положительной, если наблюдается агглютинация на три и четыре плюса.

Оценку результатов РНГА проводят согласно титрам, указанным в таблице 10, с учетом антител суммарной активности и 7S-антител.

Во всех случаях более достоверные результаты могут быть получены при исследовании парных сывороток.

Для определения динамики нарастания антител суммарной активности первое исследование проводят на 8-9 день от начала болезни, а второе – на 16-18 день.

Для определения динамики нарастания 7S-антител первое исследование проводят также на 8-9 день от начала болезни, а второе – через 21-30 дней.

Нарастание титра антител суммарной активности в 4 и более раза, а 7S-антител – в 2 и более раза подтверждает диагноз листериоза. Наиболее специфичные 7S-антитела сохраняются в сыворотке крови людей и животных более трех месяцев, что дает возможность проводить ретроспективный анализ исследуемого материала.

Примерные значения титров антител суммарной активности и 7S-антител по срокам болезни указаны в таблице 2.11.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ

Зарубежными и отечественными исследователями разработан метод диагностики с помощью люминесцирующих антител, предложенный М. М. Kaplan (1950, 1956), для индикации вируса свинки, риккетсий и пневмококковых полисахаридов в тканях. Этот метод сочетает в себе морфологический и серологический методы исследования.

Сущность его состоит в присоединении люминесцирующего органического красителя к белкам гипериммунной сыворотки: гамма-глобулинам и другим глобулиновым фракциям. Окрашенные таким образом антитела вступают в реакцию с соответствующим специфическим антигеном, который обнаруживается по специфическому свечению при просмотре препарата под люминесцентным микроскопом.

Работы по применению метода люминесцирующих антител для ускоренной диагностики листериоза появились около 40 лет назад.

Был проведен ряд исследований (И. А. Бакулов, В. М. Котляров, 1961-1968) также по изучению возможности применения этого метода для ускоренной диагностики листериоза и которые подтвердили его достоинства. В результате опытов определена возможность использования метода люминесцирующих антител в комплексе с другими методами при лабораторной диагностике листериоза.

Схема исследований методом люминесцирующих антител

Для получения гамма-глобулинов использовали гипериммунные листериозные сыворотки (с титром РА до 1:6400), полученные от лошадей и кроликов, а также нормальные сыворотки этих животных. Наиболее эффективной для гипериммунизации кроликов оказалась следующая схема: антиген (концентрация 3×10^9 м.т/мл) вводили внутривенно 5 раз с интервалом 5 дней в дозах 2,5; 4,0; 5,0; 5,0, 5,0 мл; через 6 дней после последней инъекции производили тотальное обескровливание кроликов.

Выделение гамма-глобулинов производили путем осаждения 34 % насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом против молярного раствора хлористого натрия. Содержание белка определяли с помощью рефрактометра. Полученные гамма-глобулины были проверены в реакции агглютинации с листериозным антигеном. Установлено, что титр

Табл. 2.10. Матрица оценки результатов РНГА

Исследуемые сыворотки	Положительные результаты		Сомнительные результаты	
	титр антител суммарной активности	титр 7S-антител	титр антител суммарной активности	титр 7S-антител
Люди	1:640	1:40	1:320	1:20
	1:640	1:20	1:320	–
	1:640	–		1:20
	1:320	1:40	1:160	1:20
	1:160	1:40	1:80	
	1:80	1:40		
	–	1:40		
Крупный рогатый скот	1:640	1:40	1:320	1:40
	1:640	1:20	1:320	1:20
	1:640			
Мелкий рогатый скот	1:640	1:40	1:320	1:20
	1:640	1:20	1:320	–
	1:640	–	1:160	1:20
	1:320	1:40		
	1:160	1:40		
Свиньи	1:640	1:40	1:160	1:20
	1:640	1:20	1:160	–
	1:640	–		
	1:320	1:40		
	1:320	1:20		
	1:320	–		
Кролики	1:160	1:40		
	1:80	1:40	1:40	1:20
	1:80	1:20	1:40	–
	1:80	–	1:20	1:20
	1:40	1:40		

Табл. 2.11. Значения титров антител суммарной активности и 7S-антител

Сроки болезни	Значение титров	
	антител суммарной активности	7S-антител
8-9 день	1:20 – 1:160	0
16-18 день	1:320 и более	0 – 1:40
21-30 день	1:160 и менее	1:20 и более

реакции агглютинации составлял 1:1600 x 1:3200. Таким образом, глобулины не уступали по серологической активности исходным сывороткам, титр РА гамма-глобулинов (в пересчете на равное количество белка) был выше, чем у исходных сывороток.

После этого гамма-глобулины метили с использованием красителя – изоцианат флуоресцеина (отечественный препарат). Окрашенные гамма-глобулины освобождали от несвязавшегося красителя путем диализа против раствора хлористого натрия с карбонатным буфером и обработки порошком, приготовленным из печени белых мышей. В дальнейших опытах для освобождения меченых антител от несвязанного красителя использовали метод многократного переосаждения конъюгата сульфатом аммония, а полученные люминесцирующие сыворотки адсорбировали однократно порошком печени белых мышей с последующей фильтрацией. Каждую серию люминесцирующих сывороток проверяли в пробирочной реакции агглютинации с листериозным антигеном. Кроме того, определяли количество белка в сыворотке и устанавливали рабочее разведение. Было отмечено, что титр РА люминесцирующих сывороток не снижался или снижался незначительно по сравнению с титром исходных гипериммунных сывороток.

Специфичность меченых листериозных сывороток изучали путем окраски ими штаммов листерий и микробов других видов (возбудители рожи свиней, бруцеллеза, пастереллеза, стафилококки). Мазки из микробных культур готовили на хорошо обезжиренных стеклах. После высушивания на воздухе мазки фиксировали метиловым спиртом в течение 10–20 минут. Затем на них наносили 1–2 капли меченой сыворотки в соответствующем разведении. Сыворотку равномерно распределяли по всей площади мазка с помощью стеклянной палочки. Окрашивали препараты в течение 25–30 минут в термостате при 37 °С в закрытых бактериологических чашках с вложенным туда влажным тампоном. После окрашивания препараты трижды в течение 10 минут промывали в 0,15М растворе хлористого натрия для удаления остатка сыворотки. Оптимальное рабочее разведение сыворотки определили сравнительным исследованием мазков, окрашенных неразведенной меченой сывороткой, а также в разведении 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

Микроскопировали мазки при помощи люминесцентного микроскопа МЛ-1 со светофильтрами БС-8, СЗС-7, ФС-1, ЖС-18 под иммерсией при увеличении в 900–950 раз. В качестве иммерсионной среды применяли специальное нефлуоресцирующее масло и буферный глицеринизированный физиологический раствор.

Каждый из взятых нами штаммов многократно окрашивали различными люминесцирующими сыворотками в разных разведениях. Кроме того,

мазки из всех культур окрашивали по Граму. При микроскопическом исследовании было установлено, что микробные клетки листерий, как из бульонных, так и из агаровых культур, при окраске мечеными листериозными сыворотками обладали ярким зеленовато-желтым, золотистым свечением, которое было хорошо выражено по периферии микробной клетки. В центре клетки была отчетливо заметна темная точка. Слабое серовато-зеленоватое свечение других бактерий и тканевых элементов отмечалось лишь при использовании недостаточно разведенных сывороток. Было установлено, что возбудители рожи свиней, пастереллеза и бруцеллеза не окрашивались мечеными листериозными сыворотками. Для контроля мазки из культур листерий окрашивали люминесцентной бруцеллезной и нормальной сыворотками, при этом свечения листерий не наблюдали. Полученные данные указывают на специфичность метода. Для испытания диагностической ценности люминесцирующих антител полученными листериозными и нормальными люминесцирующими сыворотками окрашивали мазки из органов лабораторных животных (белых мышей и морских свинок), экспериментально зараженных листериозом, бруцеллезом, пастереллезом и рожей. Исследовали также суспензии из клещей, снятых с экспериментально зараженного листериозом барана и с зараженных листериозом морских свинок.

При исследовании патологического материала для контроля одновременно производили окраску мазков-отпечатков из этого же материала по Граму, а также бактериологическое исследование. Мазки-отпечатки из органов, кроме того, окрашивали люминесцирующими гамма-глобулинами из нормальных сывороток крови лошадей и кроликов. Было установлено, что листерии в тканях обладали золотисто-желтым свечением, но несколько менее выраженным по сравнению со свечением препаратов, приготовленных из бульонных культур. При окраске мазков-отпечатков из этого же материала мечеными гамма-глобулинами нормальных сывороток свечения не наблюдалось. Бактериологически и окраской по Граму во всех случаях подтверждено наличие в этих органах возбудителя листериоза. В мазках-отпечатках из органов лабораторных животных, павших от пастереллеза и рожи, а также убитых экспериментально зараженных бруцеллезом животных, не наблюдалось свечения микробных клеток, хотя другими методами окраски и бактериологическим путем устанавливалось наличие соответствующих возбудителей. Люминесцентной микроскопией мазков, приготовленных из суспензий клещей, снятых с зараженных листериозом животных, также установлено наличие светящихся микробных клеток.

Таким образом, с помощью данного метода можно точно дифференцировать возбудителя листериоза от возбудителя рожи свиней (а это очень важ-

но для лабораторной диагностики листериоза), а также быстро обнаружить листерии в мазках-отпечатках органов животных, экспериментально зараженных листериозом, и в мазках, приготовленных из суспензий клещей, снятых с больных листериозом животных. Все сказанное говорит о целесообразности применения этого метода для ускоренной диагностики листериоза в комплексе с другими методами.

Кроме того, авторы провели исследование по получению меченых группоспецифических листериозных сывороток. В связи с наличием различных серотипов листерий было бы неправильным игнорировать этот факт при применении метода люминесцирующих антител. Исследованиями Н. Р. Seeliger (1961), И. Иванова (1962) и В. М. Котлярова (1965) было установлено, что вместо сыворотки против всех четырех серотипов можно пользоваться двумя группоспецифическими сыворотками:

1) сыворотка 1-й серогруппы, полученная путем гипериммунизации животных антигеном 1-го серотипа. Она агглютинирует 1, 2 и 3-й серотипы листерии.

2) сыворотка 2-й серогруппы, полученная путем гипериммунизации животных антигеном 4-го серотипа. Она агглютинирует все варианты листерии 4-го серотипа (a, b, c d, e).

Учитывая это обстоятельство, авторами были изготовлены две группоспецифические листериозные сыворотки, выделены из них гамма-глобулины и соединили с изоцианатом флуоресцеина. Для гипериммунизации кроликов готовили О-антигены из штаммов 1-й и 2-й серогруппы. Для этой культуры листерий выращивали на МПА в матрасах в течение 48 часов, затем смывали физиологическим раствором, трижды центрифугировали и снова разводили физиологическим раствором. Затем микробную взвесь выдерживали в водяной бане при 80 °С в течение 30 минут.

Полученными антигенами гипериммунизировали кроликов. Результаты РА с антигенами, изготовленными из штаммов 1-й и 2-й серогрупп с сыворотками крови кроликов представлены в таблице 2.12.

Из приведенной таблицы видно серологическое различие между двумя антигенами листерий, выявленное благодаря постановке перекрестной РА с гипериммунными листериозными сыворотками, полученными путем использования штаммов различных серогрупп.

Из этих сывороток были приготовлены меченные изоцианатом флуоресцеина группоспецифические сыворотки и мазки из различных штаммов листерий. При исследовании в люминесцентном микроскопе оказалось, что лучшее свечение получается при окраске мазков гомологичной меченой сывороткой. При окраске мазков гетерологичной сывороткой свечения совсем не наблюдалось или же регистрировалось едва заметное свечение.

Кроме того, соединили цельную гипериммунную листериозную сыворотку 1-й серогруппы с изоцианатом флуоресцеина. В окрашенных этой сывороткой мазках из культур листерий 1-й серогруппы обнаруживалось яркое свечение микробных тел, а при окраске мазков листерий из штамма 2-й серогруппы отмечалось очень слабое свечение, обнаруживались только тени микробов. Аналогичные результаты получены и при исследовании мазков-отпечатков из органов лабораторных животных, павших от экспериментального листериоза.

Проведенное исследование свидетельствует о необходимости применять меченые сыворотки различных серотипов при люминесцентной диагностике листериоза.

О. А. Полякова (1962) в опытах по идентификации возбудителя листериоза с помощью люминесцирующих антител установила, что степень свечения зависит от физиологического состояния листерий. Автор считает, что наличие тускло светящихся клеток связано с их пониженной активностью и отмиранием, поэтому для проведения исследований необходимо применять культуры в период их активного роста. Интересны исследования W. C. Eveland (1963), который приготовил поливалентную антисыворотку (гипериммунизация смесью культур типа 1, 2, 3, 3в, 4а и 4в), выделил из нее гамма-глобулины и конъюгировал их с изоцианатом флуоресцеина. Полученной меченой сывороткой выявляли листерий при прямом методе исследования спинномозговой жидкости больных листериозом животных. Наличие листерий параллельно подтвердили с помощью бактериологического исследования. J. Z. Biegeleisen (1964) выделял глобулиновые фракции из антисывороток 1, 2, 3, 4а и 4в серотипов листерий и метил их изоцианатом флуоресцеина. Было установлено отсутствие окрашивания листериозными сыворотками гетерологичных видов микроорганизмов, нормальные меченые глобулины также не окрашивали ли-

Табл. 2.12. Результаты перекрестной РА между группоспецифическими сыворотками кролика и антигенами

№ п/п	Серо- группа сыво- ротки	Серо- группа анти- гена	Разведение сывороток									
			1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1: 12800
1	Первая	Вторая	++++	++++	+++	+	—	—	—	—	—	—
2	«	«	++++	++++	+++	—	—	—	—	—	—	—
3	Первая	«	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
4	«	«	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
1	Вторая	Вторая	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2	«	«	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	Первая	«	+	+++	+++	++++	++++	++++	+	—	—	—
4	«	«	+	+++	+++	++++	++++	+++	—	—	—	—

стерий. Меченые сыворотки типов 1, 2 и 3 окрашивали как гомологичные, так и гетерологичные культуры. Культуры листерий серотипов 4а и 4в обладают общими антигенными факторами, однако окрашивались только специфической для данного подтипа меченой сывороткой.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА) ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА

Даже наличие более активного и достаточно специфичного листериозного антигена не освобождал метод РСК от присущих ему недостатков. В связи с этим необходимо было решить вопрос об эффективном методе прижизненной диагностики листериоза, методе, позволяющем в короткие сроки, сразу у значительного количества животных получать достоверные воспроизводимые результаты. Таким требованиям соответствовал метод иммуноферментного анализа (ИФА). Он обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Вышеперечисленные требования обосновали необходимость исследований в указанном направлении. При разработке данного метода учитывалось, что использование ИФА для диагностики бактериальной инфекции затруднено рядом объективных причин, к основным из которых относят чрезвычайно сложную антигенную структуру бактерий в сравнении с вирусами. Однако, учитывая, что в диагностике листериоза отсутствуют достаточно надежные серологические тесты, были проведены опыты по изучению возможности применения с этой целью непрямого метода твердофазного ИФА.

При изучении динамики накопления антител методом ИФА установлено, что на 7-й день после заражения они выявлялись в разведении 1:100, на 14-й 1:1000, на 21-й 1:8000. Диагностическую ценность определяли путём сравнения с общепринятой при листериозе реакцией связывания комплемента. В опытах использовали более 30 сывороток от интактных и экспериментально заражённых кроликов, а также листериозную сыворотку УНИ-ИЭВ для РСК. Все сыворотки положительные в РСК, были положительны и в ИФА, однако их титр был значительно выше. Уровень специфических антител в ИФА достигал 1:8000 и 1:32000, что в 100-200 раз выше, чем в РСК. Коммерческая листериозная сыворотка при рабочем разведении ее для РСК 1:20 имела активность в ИФА 1:1000.

Гетерологичные сыворотки, полученные против возбудителей сальмонеллёза, инфекционного ринотрахеита, рожи, сибирской язвы, вибриоза, туберкулёза, клостридиоза и эшерихиоза, в разведении 1:50 дали отрицательные результаты. Показания спектрофотометра при этом разведении сывороток составляли 0,100 и ниже. Сыворотки, полученные после гипериммунизации кроликов культурой стафилококка, давали перекрёстные реакции до разведения 1:100, а начиная с разведения 1:500, последние полностью исчезали.

Иммуноферментный анализ при определении листериозных антител показал хорошую воспроизводимость.

Результаты ИФА не только коррелируют с показаниями РСК по специфичности, но и значительно превосходят РСК и по чувствительности. Приведённые данные свидетельствуют о возможности использования метода ИФА для диагностики листериозной инфекции.

Наличие перекрёстных реакций с гетерологичными сыворотками вполне объяснимо существованием общих антигенов между листериями и целой группой близкородственных микроорганизмов. Оптимальный подбор используемого нами антигена и высокая чувствительность метода позволили выявлять антитела в разведении до 1:32000, в то время как неспецифические показатели отсекались в первых разведениях 1:50-1:100.

Подытоживая данные вышеописанных экспериментов можно с уверенностью констатировать, что полученные результаты свидетельствуют о том, что:

Метод ИФА обладает высокой чувствительностью, является высокоспецифичным и делает возможным использование его в целях прижизненной диагностики листериоза.

В качестве листериозного антигена при ИФА, целесообразно использовать препарат, полученный из дезинтегрированной листериозной культуры.

В качестве вывода следует указать, что проведённые исследования подтвердили вышеуказанные предположения о возможности и целесообразности применения ИФА для диагностики листериозной инфекции.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА, ИНДИКАЦИИ ЛИСТЕРИЙ В ОБЪЕКТАХ ВЕТЕРИНАРНОГО И МЕДИЦИНСКОГО НАДЗОРА

Для практических лабораторий в настоящий момент предложена ПЦР-тест-система «ЛИСТЕР» для индикации *L.monocytogenes*. В разработке принимали участие коллектив нескольких научных центров, в том числе

лаборатория молекулярной диагностики ВГНКИ совместно с кафедрой микробиологии Ульяновской ГСХА.

На первом этапе проведен поиск нуклеотидных последовательностей генома *Listeria monocytogenes* по базам данных Entrez (Национальный центр биотехнологической информации, Национальная медицинская библиотека, Национальный институт здоровья, США), GeneBank, EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека) и Японской базы данных нуклеотидных последовательностей – DDBJ. Для анализа было отобрано около 400 нуклеотидных последовательностей генов гемолизина LLO, PI-PLC и PC-PLC.

На втором этапе проводили выравнивание отобранных нуклеотидных последовательностей с помощью системы ClastaW Multi Sequence Alignment с целью анализа вариабельности и поиска консервативных участков, необходимых для выбора праймеров.

На третьем этапе изучалась специфичность предложенных праймеров с помощью компьютерных программ FASTA и BLAST on line. В результате этой работы показана гомология выбранных олигонуклеотидов только с генами гемолизина LLO, PI-PLC и PC-PLC и не обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями других групп вирусов, бактерий или последовательностями эукариот. Таким образом, предложенные праймеры, исходя из теоретических расчетов, должны обладать 100 % специфичностью.

Оптимизация условий постановки ПЦР и определение чувствительности ПЦР-анализа, проводились с использованием ДНК, выделенной из штамма УСХИ-1 *Listeria monocytogenes* с известным содержанием бактериальных частиц, определенным бактериологическим методом. Результаты определения и чувствительности метода с использованием образцов крови от инфицированного животного и молока, контаминированного листериями, свидетельствовали о том, что предлагаемый метод ПЦР – анализа и используемая тест система с указанными праймерами, являются специфичными. Чувствительность метода составила 10 бактериальных клеток в 1 мл. Проверку на специфичность и идентификацию *Listeria monocytogenes* проводили в сравнении с другими видами листерий и с различными штаммами других микроорганизмов родов *Erysipelothrix* – 2 штамма, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* группы С и группы R, энтерококки по одному штамму, лактобактерии. Из продуктов в эксперимент были взяты: молоко, масло, творог – контаминированные листериями, из патологического материала – околоплодная жидкость abortировавшей овцы больной листериозом, соскоб с конъюнктивы заражённой морской свинки, соскоб со слизистой больной овцы. На основании полученных результатов при детекции ДНК *Listeria monocytogenes* установлено, что выбранные праймеры обладали вы-

сокой чувствительностью и 100 % специфичностью. Таким образом, в результате проведенных исследований была предложена ПЦР-тест-система, которая может быть использована в практике, как эффективный тест для идентификации *Listeria monocytogenes* и экспресс-диагностики листериоза.

Однако необходимо принимать во внимание, что результаты наших исследований показывают, что данная ПЦР-тест-система, помимо *L.monocytogenes*, выявляет культуру *L.ivanovii*, имеющий высокую степень гомологичных генов и мутантные формы *L.innocua*, несущие в своем гено- типе hly-ген.

Так же в коллекции ГНУ ВНИИВВиМ имеются две культуры *L.innocua*, одна из которых выделена из головного мозга пятнистого оленя, другая из филе тушки норвежской селедки, которые имеют (несут) своем геноме hly-ген, хотя in vitro продукцию гемолизинов не регистрируется.

АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

По данным В. В. Сливко (1965), для диагностики листериоза может быть применен аллергический метод. С этой целью автор изготовил аллерген – двухсуточную бульонную культуру возбудителя листериоза, убитую нагреванием при 100 °С в течение 2 часов. Этот препарат вводили внутривенно по 0,2 мл. У экспериментально зараженных лабораторных животных положительная аллергическая реакция обнаруживалась с пятого дня заболевания. Автор предлагал использовать указанный препарат для прижизненной диагностики листериоза и выявления листерионосительства.

К. Н. Шлыгина (1962) приготовила аутолизаты бульонных культур листерий 1-го и 4-го серотипов. Препарат вводили морским свинкам внутривенно в дозе 0,1 мл. Аллергическая перестройка у зараженных животных обнаруживалась с шестого дня после введения культуры листерий и сохранялась в течение месяца. В положительных случаях реакция проявлялась в виде отчетливой гиперемии и инфильтрации кожи через 18-20 часов после введения аллергена и удерживалась до 48 часов, после чего наступало ее угасание. G. B. Mackaness (1962) установил, что при введении фильтрата культуры листерий в плантарную поверхность лапки мышей, выздоравливающих от первичного заражения листериозом, обнаруживается ярко выраженная реакция туберкулинового типа, которая появлялась через 6-8 часов и достигала своего максимума через 24 часа после введения фильтрата. У контрольных мышей никакой ответной реакции не было.

Однако, несмотря на многочисленные попытки, препараты для аллергической диагностики листериоза до настоящего времени не разработаны.

ПРОБА АНТОНА

Полученные нами результаты изучения связи серогрупповой принадлежности штаммов с проявлением конъюнктивальной реакции у морских свинок выглядят следующим образом: взятые в опыт вирулентные штаммы листерий вызывали реакцию в виде гнойного кератоконъюнктивита. Вызывают реакцию только живые культуры. Возбудитель рожи свиней реакции не вызывал, что является одним из дифференциально-диагностическим признаков.

Сроки наступления реакции, длительность и интенсивность развития воспалительных явлений зависели от вирулентности штаммов листерий – слабовирулентные и авирулентные штаммы реакции не вызывали.

Воспалительный процесс возникал только на том глазу, куда была нанесена культура. Спустя месяц воспалительная реакция исчезала полностью. У морских свинок отмечено накопление антител к листериозному антигену, увеличение содержания гаммаглобулинов и числа моноцитов в крови.

При повторной аппликации листерий на конъюнктиву обоих глаз реакция возникала лишь на том глазу, который ранее обработке не подвергался. Однако реакция на переболевшем глазу не возникала в случае нанесения культуры листерий той же серогруппы, но закономерно возникала при нанесении культуры штамма другой серогруппы (типоспецифический иммунитет). Второй же глаз во всех случаях сохранял чувствительность к листериям любой серологической группы. Длительность местной невосприимчивости колебалась от одного до шести месяцев.

Таким образом, было отработано определение вирулентности культур листерий с помощью конъюнктивальной пробы на морских свинках.

В результате многочисленных исследований, какая-либо связь между объектом выделения возбудителя листериоза, и его серологической характеристикой не выявлена. В связи с этим утратило значение разделение серологических типов листерий на «грызуний», «жвачный» и «лошадиный». Не подтвердились также и наблюдения о том, что листерии в организме животного могут изменять свою серологическую принадлежность.

Определение серологической принадлежности выделенных листериозных штаммов имеет большое значение для выявления эпизоотологических и эпидемиологических связей.

ЧАСТЬ III

ЛИСТЕРИОЗНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

В 1961 году Sword C.P., Pickett M.J. (1961) опубликовали работу, в которой был дан анализ частоты лизогении 123 штаммах листерий, изолированных из различных источников. Традиционные процедуры выделения бактериофагов оказались ненадежными в работе с бактериофагами бактерий рода *Listeria*, так как лизогенные штаммы посредством спонтанного лизиса не всегда выпускали бактериофаги. Однако после того, как их подвергли ультрафиолетовому облучению, данные штаммы продуцировали бактериофаги в величинах до 10^7 PFU/ml. Некоторые штаммы, которые не выпускали бактериофаги, произвели после облучения субстанцию предположительно аналогичную колицинам.

М.К. Щегловой (1969) обнаружены симбиотические фаги у всех 100 % исследованных ею культур листерий. В публикациях С. Sword, М. Pickett (1958), Н. Tubylevich (1963), S. Jasinska (1964) указывается на значительно меньшее число обнаруженных лизогенных штаммов. Такие различия могут быть связаны с методологическими подходами при проведении исследований. Так С. Sword, М. Pickett и Н. Tubylevich после облучения выдерживали культуры при 37 °С. В то же время исследованиями М.К. Щегловой (1962) с достаточной убедительностью продемонстрировано, что пониженная температура (22 °С) является более благоприятной для репродукции листериозного бактериофага. Что касается S. Jasinska, то она облучала культуры, засеянные сплошным газоном на агаровую пластину. Однако доказано, что индуцирующий эффект ультрафиолетовых лучей значительно повышается, если культура во время облучения находится в безбелковой среде.

Для получения листериозных бактериофагов Н. А. Капырина (1973) использовала методику, предусматривающую облучение культур ультрафиолетовыми лучами. В результате проведенных экспериментов латентные фаги были выявлены у подавляющего большинства листериозных культур,

независимо от их биологических свойств, географического происхождения и давности выделения.

Автором при индуцировании 100 штаммов листерий бактериофаги с большим постоянством выделялись от 78 культур, при этом из 71-ой культуры получены стойкие чистые линии листериозных бактериофагов (табл. 3.1).

У 19 бактериальных культур после облучения также образовывали прозрачные лизаты. Причем в первичных посевах из этих лизатов можно было наблюдать образование очень мелких мутных бляшек, которые однако не содержали инфекционных фаговых частиц. По всей вероятности, эти культуры оказались продуцентами дефектных фагов с нарушенной воспроизводительной функцией, но частично сохранившие способность убивать клетки гомологичного вида. Образование зон подавления роста на чувствительном штамме можно отнести за счет действия белковых субстанций, так называемых бактериоцинов, которые были обнаружены и в культуре *L.monocytogenes* (Sword C.P., Pickett M.J., 1958).

Важную роль при определении латентных фагов имеет правильный подбор индикаторных штаммов. В процессе работы Капыриной Н. А. только на 28-ми из 47-ми исследованных в качестве индикаторных штаммов было обнаружено образование негативных колоний. В дальнейшем при испытании культур с соответствующими индикаторными штаммами на присутствие в них свободного фага автором было выявлено, что 26 музейных штаммов *L.monocytogenes* постоянно содержали инфекционные частицы, количество которых для различных штаммов колебалось от 10 до 1000. Появление свободных вирусных частиц, с одной стороны, может быть связано со спонтанной продукцией фагов, вследствие нарушения у небольшой части бактерий лизогенной популяции, под действием, равновесия между профагом и клеткой, сопровождающегося лизисом последней с освобождением определенного количества инфекционных корпускул фагов, активных в отношении гетерологичных штаммов одного и того же бактериального вида. С другой стороны наличие свободных фагов в культуре может быть также результатом псевдолизогении или состояния носительства.

В исследованных культурах, содержащих свободные фаги, после облучения наблюдалось значительное увеличение инфекционных корпускул, о чем свидетельствует соотношение В/Р, которые для свободных фагов составляли $2,5 \times 10^5 - 1,6 \times 10^8$, а для индуцированных – $5 \times 10^3 - 1,8 \times 10^3$. Следовательно, присутствие свободных фаговых частиц в этих культурах явилось результатом спонтанного лизиса бактериальных клеток. Хотя нельзя полностью отрицать наличие в отдельных случаях среди исследуемых штаммов носительства, т.к. не было проведено предварительное освобождение культур от возможного присутствия в них экзогенных частиц бактериофагов.

Табл. 3.1. Индуцированная продукция бактериофагов у листериозных культур (Капырина Н.А., 1973)

№ п/п	Исследуемые штаммы	Наименование полученного фага	Наличие свободного фага		Индуцированная продукция фага		Титр фагов после пассивирования	Штаммы, используемые в качестве индикаторных
			титр	В/Р	титр	В/Р		
1.	2	L9A	–	–	$7 \cdot 10^1$	$2,8 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^9$	56
2.	3	L7A	–	–	$1 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^8$	9-127
3.	7	L12A	–	–	$1,4 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^9$	139
4.	15	L15A	–	–	$1 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^9$	56
5.	34	L36A	–	–	$3,2 \cdot 10^1$	$6,2 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^9$	56
6.	139	L10A	–	–	$2 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^9$	139
7.	324	L13A	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	139
8.	728	L35A	–	–	$2,4 \cdot 10^1$	$8,7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^8$	9-127
9.	766	L16A	$4 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	56
10.	1196	L11A	$1,2 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^9$	56
11.	1197	L12A	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^7$	$8,7 \cdot 10^1$	$4,6 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^8$	56
12.	1213	L18A	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$7 \cdot 10^9$	139
13.	1395	L20A	–	–	$4,1 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^9$	9-127
14.	1324	L19A	$1,2 \cdot 10^1$	$8,3 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^1$	$1,8 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^9$	139
15.	1472	L14A	$3,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	3
16.	1611	L21A	–	–	$5,4 \cdot 10^1$	$3,6 \cdot 10^2$	$9 \cdot 10^9$	139
17.	1621	L22A	–	–	$2,1 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^9$	56
18.	1913	L49A	$4,7 \cdot 10^1$	$2,1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^8$	56
19.	8621	L38A	–	–	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^9$	139
20.	4-40	L24A	$1 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^9$	9-127
21.	74-44	L25A	$7 \cdot 10^1$	$1,4 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	9-127
22.	9-72	L6A	–	–	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{10}$	56
23.	9-127	L5A	$8,4 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	56
24.	9-128	L26A	–	–	$1,6 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^8$	56
25.	129	L27A	–	–	$4 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^8$	56
26.	9-130	L28A	–	–	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^9$	56
27.	15/57	L30A	–	–	$4 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	9-127
28.	16/57	L31A	–	–	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^9$	9-127
29.	17/57	L4A	$3 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^{10}$	9-72
30.	132/134	L32A	–	–	$6 \cdot 10^2$	$3,3 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^9$	9-127
31.	24618	L33A	–	–	$6 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	9-127
32.	3413/86	L34A	–	–	$3 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	9-127
33.	211	L40A	$5 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^8$	56
34.	311	L28B	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^8$	56
35.	911	L29A	–	–	$1,1 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^7$	139
36.	1411	L30B	$3 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^2$	$6,6 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	56
37.	2311	L23A	$1,2 \cdot 10^2$	$8,3 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^8$	9-127
38.	7811	L44A	$4 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^2$	$8,9 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^8$	9-127
39.	8011	L45A	–	–	$2,1 \cdot 10^2$	$9 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^{10}$	56
40.	17811	L46A	$1,3 \cdot 10^1$	$7,6 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	139
41.	21611	L47A	–	–	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-1}$	$4 \cdot 10^8$	9-127

42.	21711	L48A	–	–	$5 \cdot 10^4$	$8,3 \cdot 10^{-1}$	$4 \cdot 10^9$	9-127
43.	A	L50A	–	–	$9 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^9$	9-127
44.	Вет	L8A	$4,2 \cdot 10^1$	$2,4 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^{10}$	56
45.	Куст	L51A	–	–	$1,7 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^9$	9-127
46.	К-1	L52A	–	–	$7 \cdot 10^1$	$2,8 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^9$	9-127
47.	P	L53A	$5 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^3$	$0,3 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	3
48.	X_1	L54A	$3,8 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^1$	$7,4 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^9$	9-127
49.	X_2	L19AM	$3 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	56
50.	ЗВД	L56A	–	–	$2 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^9$	139
51.	МД	L2A	$1,5 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^3$	$0,6 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	9-127
52.	Г11-4	L39A	–	–	$2,5 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^7$	9-128
53.	13МП	L58A	–	–	$1 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^7$	139
54.	МО-9	L59A	–	–	$2,7 \cdot 10^3$	$0,2 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^8$	56
55.	9	L60A	–	–	$9 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^9$	9-127
56.	L.m.750	L61A	–	–	$9 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^9$	9-127
57.	T-1	L62A	–	–	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^9$	9-127
58.	T-3	L63A	–	–	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^9$	9-127
59.	4a	L64A	–	–	10^3	$2 \cdot 10^1$	$7 \cdot 10^{10}$	9-127
60.	4b	L65A	–	–	$3 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^9$	9-127
61.	4c	L66A	$3,1 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^9$	9-127
62.	4d	L7A	$2,4 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^9$	9-127
63.	1221	L69A	–	–	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	139
64.	4686	L3A	–	–	$7 \cdot 10^2$	$2,8 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^8$	9-127
65.	grayi	L1A	–	–	$9 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^9$	9-127
66.	1Г	L68A	–	–	$6 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^9$	9-127
67.	4Г	L55A	–	–	$3 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^9$	56
68.	5Г	L70A	–	–	$1,6 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^9$	9-127
69.	8Г	L71A	–	–	$7 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{10}$	9-127
70.	434	L37A	–	–	$9 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^9$	9-127
71.	39	L67A	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^1$	$1,9 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^9$	139

* В/Р – показатель отношения числа бактериальных клеток (Bacteria) к числу фаговых корпускул (Phage)

Выделение листериозных бактериофагов методом индукции лизогенных культур сопряжено с рядом трудностей. Для достижения поставленной цели необходимо подобрать оптимальные параметры воздействия индуцирующих факторов на бактериальную клетку, определить характер взаимодействия бактериальных клеток и фаговых корпускул.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Морфология негативных колоний

По данным Капыриной Н. А. (1973) при посеве смеси фагов с индикаторными штаммами на поверхности агара наблюдалось образование негативных колоний. Чаще они выглядели мелкими мутными, реже прозрачными или мишеневидной формы – с прозрачным дном, окруженным зоной вторичного лизиса. Нередко на одних и тех же чашках образовывались смешанные формы бляшек, что в какой то мере свидетельствует о присутствии в отдельных штаммах листериозных культур нескольких типов профагов.

Из 26 штаммов листерий ею были выделены фаги, которые уже в первой генерации образовывали хорошо выраженные, довольно прозрачные, по сравнению с остальными, негативные колонии, размер которых составлял 1 – 1,5 мм. Вполне возможно, что в геноме профага, присутствующего в этих штаммах, наряду с индукцией, под действием ультрафиолетовых лучей возникали мутации в группе генов, контролирующих область С (clear – прозрачный, Kaiser, 1957), что, вероятно, и приводило к образованию бляшек подобной морфологии.

Суммируя результаты наблюдений морфологии бляшек у большого числа стабилизированных бактериофагов (71 раса) Капырина Н. А. выделила 5 типов морфологически-различающихся негативных колоний, что позволило разделить фаги по этому признаку на соответствующее число групп:

1. Самую многочисленную группу (37 рас) составили фаги, образующие на газоне индикаторных штаммов (9-127, 56 и 3) довольно крупные прозрачные бляшки 1,5 – 3 мм в диаметре. У многих фагов наряду с крупными колониями на одних и тех же чашках отмечалось незначительное количество более мелких колоний (0,5 – 0,9 мм).

2. 6 фагов на штаммах 139 и 9-72 формировали тоже прозрачные бляшки, но величина их составляла 0,5 – 1,5 мм.

3. 17 фагов на индикаторных штаммах 9-127, 56, 139 и 3 образовывали бляшки с диаметром 0,9 – 1,5 мм. Отличительной особенностью бляшек данной группы являлось наличие четкого ореола вторичного лизиса, тонкой полоской окаймляющего прозрачную часть бляшки.

4. 6 бактериофагов на индикаторных штаммах (9-127, 56 и 139) образовывали бляшки мишеневидной формы с прозрачным дном и широкой зоной вторичного лизиса, размер этих бляшек вместе с зоной вторичного лизиса достигал 0,9 – 1,5 мм.

5. 4 фага на штамме 56 формировали равномерно мутные негативные клоны или колонии с мутным центром, представленным растущими бактериальными клетками лизогенизированного клона и прозрачной периферической зоны. Морфологическая организация колоний подобного типа является характерной для умеренных бактериофагов.

Фаги, исследуемые Н. А. Капыриной (1973) несколько отличались по данному признаку от фагов, описанных М.К. Щегловой (1969), которая разделила исследуемые ею фаги на 5 типов. Большинство фагов коллекции Н. А. Капыриной образовывали довольно крупные прозрачные бляшки без видимой зоны вторичного лизиса. У 4-х фагов негативные колонии имели вид, характерный для умеренного типа бактериальных вирусов. Фаги, выделенные М. К. Щегловой, в основном, образовывали прозрачные бляшки, окруженные зоной вторичного лизиса равной или превышающей диаметр прозрачной части, и только в 4 группу вошли фаги, имеющие мелкие прозрачные бляшки без зоны вторичного лизиса. Отмечены также различия и в величине негативных колоний.

Листерииозные фаги, выделенные Н. А. Капыриной формировали более крупные бляшки, диаметр которых колебался в пределах 0,5 – 3 мм, на отдельных сериях сред они достигали 8 мм против 0,43 – 1,35 мм по данным М.К. Щегловой. Эти различия, вероятно, связаны как с индивидуальными свойствами изучаемых бактериофагов, так и с условиями их культивирования. Данными опытами установлено, что морфология негативных колоний при постоянных условиях является весьма стабильным признаком, чего нельзя сказать в отношении их размеров. Даже на одних и тех же чашках порой можно было наблюдать колонии, различающиеся по диаметру в два раза и более. Подобное разнообразие М. Adams (1961) связывает с замедленным процессом адсорбции и развития фагов в инфицированных клетках. Это заключение вполне справедливо по отношению к медленно адсорбирующим фагам, листерииозные бактериофаги не могут быть отнесены к этой группе, так как уже за 5 – 10 минут они адсорбируются на 76 – 83 %. По всей вероятности различие в размерах бляшек связано с неодинаковой фагочувствительностью отдельных клеток в микробной популяции, или же с различной активностью фаговых частиц, присутствующих в лизате.

Пассирование бактериофагов

Бактериофаги, выделенные Капыриной Н. А. (1973) из облученных листерииозных культур, обладали невысокой активностью. Титры их не превышали $10^1 - 6 \times 10^3$, для большинства фагов они составляли 10^3 частиц в мл. С помощью метода непрерывного пассирования были получены мутантные расы, которые отличались от исходного типа по размерам и морфологии не-

гативных колоний, величине титров, спектру литической активности, а также по способности к лизогенизации.

Изменения фагов, образующих в первой генерации прозрачные бляшки и бляшки с прозрачным дном, окруженным зоной вторичного лизиса, шли в направлении усиления их активности, что проявлялось в увеличении размеров негативных колоний до 1,5 – 3 мм. По-иному протекал эволюционный процесс у фагов, образующих мутные бляшки. В одних случаях наблюдалось равномерное снижение от пассажа к пассажи степени мутности всех бляшек. Как считает М. К. Щеглова подобные изменения связаны с многоступенчатыми мутациями, возникающими в процессе адаптации фага к штамму-хозяину. В других случаях среди мутных бляшек внезапно появились единичные прозрачные колонии, которые, по мнению автора, являются результатом скачкообразных изменений качественных особенностей наследственного материала фага.

В результате проведенной серии опытов Капыриной Н. А. были получены стойкие чистые линии 71-ой расы листериозных бактериофагов. Из них 4 бактериофага, несмотря на длительное пассирование (23 пассажа), формировали на газоне индикаторного штамма равномерно мутные колонии с плотным дном, образованным лизогенизированным клоном бактериальной культуры, окруженным узкой прозрачной зоной, что свидетельствует об устойчивости данных рас умеренных бактериофагов.

У остальных фагов методом селекции материала из изолированно расположенных прозрачных бляшек получены С-мутанты, характерной особенностью которых являлась пониженная способность к лизогенизации листериозных культур. Эти фаги, как правило, на бактериальном газоне формировали прозрачные бляшки с ореолом вторичного лизиса или без него. У некоторых фагов, чаще это были расы, давшие в первой генерации смешанные формы бляшек, наблюдалось образование на одних и тех же чашках единичных мелких мутных негативных колоний, очевидно, связанное с отщеплением у этих бактериальных вирусов небольшого числа корпускул с генотипом исходного варианта.

Морфология фаговых корпускул

Электронно-микроскопическое исследование семи листериозных бактериофагов, проведенное Н. А. Капыриной (1968), показало, что они имеют головку многогранной формы и длинный гибкий хвостовой отросток в виде спирально скрученного тяжа, о чем свидетельствует поперечная испорченность этой структуры. Известно, что гексагональные очертания на плоскости имеют как икосаэдрические, так и октаэдрические многогранники. Экспериментальные данные показывают, что среди бактериальных вирусов, наряду с частицами, имеющими головку в форме икосаэдра обнаружены

фаги с головками в форме октаэдра. Геометрический рисунок пустых головок позволил сделать заключение о том, что листериозные бактериофаги также имеют головку в форме октаэдра.

При определении длины хвостовых отростков у пяти фагов (L 1A, L 2A, L 3A, L 14A и L23A) не выявлено достоверных различий в показателях этих величин, которые составляли 240 – 250 нм.

Бактериофаг L 11A отличался по данному признаку от всех остальных рас. У него длина отростка равнялась 320 нм.

Фаголизат L 4A содержал корпускулы с различной длиной хвостового отростка, составлявшей для одних частиц 190 нм, а для других – 250 нм.

Количество фагов с более коротким отростком было значительно меньше, чем с длинным. Согласно предположениям А.С. Тихоненко с соавт. (1968) присутствие в лизатах частиц, различающихся по размерам или морфологии, может быть следствием размножения фага на лизогенной культуре, когда вирулентный фаг, очевидно, индуцирует профаг, присутствующий в культуре-хозяине. Данная гипотеза, применительно к листериозным бактериофагам не лишена основания, поскольку индикаторный штамм для фага L A4, как было установлено, также является лизогенным.

По данным Н. А. Капыриной в препаратах интактных фагов встречались частицы с двумя хвостовыми отростками. Аналогичные корпускулы у листериозных бактериофагов описаны М. К. Щегловой. Относительно происхождения таких частиц пока еще нет единого мнения.

В результате проведенных исследований авторам не удалось выявить четкой корреляции морфологической организации листериозных бактериофагов с их биологическими свойствами. Так, фаг L 4A, резко отличающийся по биологическим свойствам от остальных рас, отнесенный в самостоятельную группу «В», имел однотипную с некоторыми фагами группы «А» (L 3A, L 1A и L 23A) структуру базальной пластинки. В то же время фаги группы «А», обладающие рядом общих биологических свойств различались по характеру субмикроскопической организации базальной пластинки.

Zink R., Loessner M.J. (1992) сравнивали набор из 22 бактериофагов бактерий рода *Listeria* (21 умеренный и 1 вирулентный) на основе морфологической и белковой композиции. Все 22 бактериофага имели икосаэдральные головки и либо сокращающиеся, либо несокращающиеся хвосты. Они представляли два различных морфотипа. Двадцать фагов принадлежали к семейству *Siphoviridae* и были различимы только по основанию длины хвоста. Два других фага были классифицированы как представители семейства *Myoviridae*, один из которых (A511) должен быть определен как новый вид. Оказалось, что он значительно отличается от других известных фагов листерий. Все бактериофаги демонстрировали типичные белковые профили, ко-

торые были определены натрий-додецил-сульфат-полиакриламид гелевым электрофорезом и последующим лазерным денситометрическим анализом гелей. Затем оказалось возможным выделить восемь белковых подгрупп на основе уникальных белковых моделей (схем).

Данная классификация хорошо согласуется с предыдущими группировками на основе разновидности хозяина. Большинство фагов обнаружили два или три основных белковых диапазона от 21 до 24 kDa и от 30 до 36 kDa. Также для каждого фага наблюдается не менее 10 второстепенных белков. Результаты представленных исследований указывают на то, что основные белки являются структурными белками капсида и хвоста, а белковая зона с диапазоном от 30 до 35 kDa может ясно быть определена для белков капсида фага.

В исследовании J. Klumpp (2008) представлен геномный анализ и молекулярная характеристика вирулентного фага *Listeria* A511. Электронная микроскопия и энзимная ферментация показали, что молекула ДНК A511

Табл. 3.2. Результаты обработки данных электронно-микроскопического исследования семи листериозных бактериофагов (Капырина Н.А., 1973)

Бактериофаг	Показатель		Lim	M ₀
L14A.04	Длина хвоста, нм	250±7,2	200-280	250-260
	Ширина хвоста, нм	8,1±0,44	-	-
	Размер головки, нм	47±1,1	43-53	45-48
L2A	Длина хвоста, нм	240±6,4	210-270	210-250
	Ширина хвоста, нм	7,2±0,42	-	-
	Размер головки, нм	46±0,8	42-50	42-50
L1A	Длина хвоста, нм	240±4,8	220-270	220-250
	Ширина хвоста, нм	6,4±0,43	-	-
	Размер головки, нм	51±0,7	45-56	47-50
L23A	Длина хвоста, нм	240±4,4	220-260	230-250
	Ширина хвоста, нм	9,2±0,6	-	-
	Размер головки, нм	44±1,1	40-50	42-45
L3A	Длина хвоста, нм	240±7,8	220-300	220-250
	Ширина хвоста, нм	7,7±0,42	-	-
	Размер головки, нм	51±0,8	48-58	50-53
L11A	Длина хвоста, нм	320±0,6	240-250	320-330
	Ширина хвоста, нм	8,3±0,5	-	-
	Размер головки, нм	55±0,7	50-60	55-60
L4A	Длина хвоста, нм	190±4,2 250±3,4	160-260	250-260
	Ширина хвоста, нм	6,7±0,4	-	-
	Размер головки, нм	44±1,2	42-55	42-50

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ - средние арифметические значения диаметра головки, длины и ширины хвостового отростка

Lim - экстремальные значения

M₀ - молярные значения

содержит линейные терминальные повторения в общем 3,125 br, окружая девять малых мнимых ОРС. Данная структура генома объясняет, почему A511 не способен выполнять общую трансдукцию. A511 характеризуется определенной последовательностью гомологии к *Listeria* фагу P100 и другим морфологически родственным фагам, инфицирующих *Firmicutes*, таких как *Staphylococcus* фаг К и *Lactobacillus* фаг LP65. Эквивалентные, но более экстенсивные терминальные повторы также существуют у фагов P100 (-6 kb) и К (-20 kb). Электронная микроскопия с высоким разрешением показала у этих вирусов присутствие длиннохвостых волокон, организованных в шестикратной симметрии. Массовая пептидная генетическая экспертиза, основанная на спектрометрии, позволила выделить индивидуальные белки для структурных компонентов A511. Предложена гипотеза, что SPO1-подобные элементы миовирусов характеризуются: (i) инфекцией грам-положительных бактерий с низким содержанием G+C; (ii) широким кругом хозяев внутри бактериального рода и чрезвычайной вирулентностью; (iii) схожей морфологией, последовательностью и коллинеарностью организации геномного фага; (iv) большим двухцепочечным геномом ДНК, демонстрирующим неперемещенные терминальные повторы различного размера.

На основании полученных данных можно сказать, что морфологический признак для таксономии листериозных бактериофагов, по-видимому, не имеет решающего значения. Однако электронно-микроскопические исследования позволяют судить о морфологической однотипности частиц, что служит косвенным доказательством генетической однородности популяции и может иметь большое значение при проведении научных исследований, а также при изготовлении препаратов для практических целей.

Взаимодействие бактериофага с бактериальной клеткой

Исследуя в электронном микроскопе процесс взаимодействия листериозного бактериофага L 1A с клетками штамма 9-127, Капыриной Н.А. было отмечено, что фаговые частицы адсорбировались на клетке, в основном, при помощи хвостового отростка.

Рецепторы для бактериофагов могут иметь различное расположение на клетке. Согласно сообщениям S. Jasinska (1964) рецепторы для листериозных фагов также располагаются на жгутиках чувствительных штаммов. М. К. Щеглова (1969) в противоположность указанному автору, наблюдала адсорбцию корпускул фага 10 на клеточной стенке. Н. А. Капыриной (1973) у частиц фага 1A отмечена способность фиксироваться только на поверхности бактерии. Специфические фаговые рецепторы в зависимости от особенностей изучаемых листериозных бактериофагов могут располагаться как на жгутиках, так и на бактериальной оболочке, но инфекционный процесс, вероятно, вызывают лишь фаги, адсорбированные на клеточной стенке.

Электронные микрофотографии, полученные Капыриной Н. А., демонстрирующие этапы формирования частиц бактериального вируса в клетке свидетельствуют о том, что репродукция листериозных бактериофагов осуществляется непосредственно в зоне нуклеоида.

Поэтому именно структура ядра претерпевает морфологические изменения в первую очередь. Сначала отмечается сильное разрыхление нуклеоида, в котором более четко, по сравнению с организацией ядра в незараженной клетке вырисовывается нитевидная структура, с ориентацией фибрилл по длинной оси микробной клетки. В дальнейшем нуклеоид зараженной клетки заполняется рыхлыми клубками, состоящими из тех же нитей, но свернутых в определенном порядке. Конденсация макромолекулы ДНК, по мнению исследователей (Капырина Н. А., 1973; Kellenberger E., 1961) сопровождается дегидратацией, в результате чего образуются плотноупакованные тельца, которые однако еще лишены инфекционных свойств. Предположения E. Kellenberger о возможной конденсации нуклеиновой кислоты на ранних стадиях ее формирования и последующей дегидратацией конденсатов нашли подтверждение в исследованиях Капыриной Н. А.

Опытами A. Hershei (1954) было установлено, что синтез фаговой ДНК и белка в клетке идет отдельно, причем фаговые антигены обнаруживаются только во второй половине латентного периода, но раньше, чем появляются зрелые частицы. Появление плотноупакованных частиц многогранной формы в исследованных нами 5-ти часовых препаратах, по видимому, связано с началом образования белковой оболочки, так как гексагональная форма частиц указывает на появление жесткой структуры на поверхности головки (Беспалова И. А., 1967; Levinthal C., 1952), вызывая преждевременный лизис инфицированных фагом клеток, наблюдали в лизатах кольцевидные образования, состоящие на 85 % из белка и на 15 % из ДНК. Эти образования появлялись лишь при разрушении клеток незадолго до окончания латентного периода. В лизирующихся листериозных клетках Капыриной Н. А. также отмечены кольцевидные структуры, которые по мнению большинства исследователей являются пустыми оболочками фагов.

Заключительный этап созревания бактериальных вирусов – присоединение к образовавшимся головкам хвостового отростка (Тихоненко А. С., 1968) и лизис микробных клеток с освобождением потомства. Поскольку процесс созревания фагов происходит несинхронно в полуразрушенных клетках, наряду с полноценными (в морфологическом отношении) корпускулами, просматривались отдельные структурные компоненты фаговых частиц, не успевшие оформиться в зрелые вирионы.

Спектр литической активности

Спектр литической активности во многом зависит от штамма, на котором они размножались – фаг L 4А, полученный из культуры четвертого серотипа (II серогруппа), воспитанный на культуре, также принадлежащий к 4-ому серотипу, лизировал преимущественно штаммы, относящиеся к тому же серотипу. Эти результаты подтверждают справедливость высказываний С. Sword, М. Pickett (1961), которые считают, что для получения листериозных бактериофагов с ограниченным литическим действием, необходимо проводить адаптацию фагов к культурам того серотипа, из которого они выделены. Решение этого вопроса заслуживает большего внимания со стороны исследователей, поскольку бактериофаги со строго дифференцированным действием могут найти широкое применение для типирования листериозных культур и явиться заменой трудоемкому и недостаточно специфическому серологическому способу. К тому же метод фаготипирования может оказать помощь при изучении эпизоотической и эпидемиологической обстановки при выявлении первичного источника возбудителя инфекции, позволяет отличать местные штаммы от занесенных извне. По утверждению ряда авторов (Sword С., Pickett М., 1961; Шеглова М.К., 1968; Капырина Н. А., 1973) культуры, выделенные в одном очаге, проявляют одинаковую чувствительность к определенному набору бактериофагов.

Специфичность

Интерес к бактериофагам как к диагностическому препарату по-прежнему не ослабевает. Основные требования, предъявляемые к диагностическим бактериофагам, это – высокая активность и строгая специфичность. В отношении листериозных бактериофагов сложилось единодушное мнение о том, что они способны реагировать только с культурами гомологичного вида.

Капыриной Н.А. (1973) было проведено определение специфичности листериозных бактериофагов на 152-х штаммах гетерологических культур (табл. 3.3.).

В число исследуемых вошли микроорганизмы, встречающиеся как сопутствующая микрофлора при листериозе (кишечные палочки, сальмонеллы, пастереллы), имеющие морфологическое сходство с *L.monocytogenes* (рожистые палочки, дифтероиды) и антигенное родство (стафилококки). В эксперименте не указаны культуры энтеропатогенных кокков, у которых также установлено серологическое родство с листериями, однако по данным С. Sword, М. Pickett (1958), листериозный бактериофаг не взаимодействует с указанными микроорганизмами.

Проверка эффективности действия бактериофагов показала, что с помощью набора, включающего три монофага (L 2А, L 3А и L 4А), можно идентифицировать свыше 85 % листериозных культур.

Табл. 3.3. Проверка специфичности действия листериозных бактериофагов (Капырина Н.А., 1973)

Наименование культур	Количество исследуемых штаммов	Бактериофаги		
		L 2A	L 3A	L 4A
Staphylococcus	51	–	–	–
Escherichia	43	–	–	–
Corynebacterium	20	–	–	–
Salmonella	12	–	–	–
Erysipelothrix	16	–	–	–
Pausterella	10	–	–	–

Согласно результатам исследований Капыриной Н.А. для идентификации препараты необходимо использовать в титре не ниже, чем 5×10^8 (для фага L 3A) и 1×10^9 (для фагов L 2A, L 4A). Применение фаголизатов в неразведенном виде значительно повышает процент выявляемых культур (с 67 до 85,9 %). Такое увеличение произошло, по-видимому, за счет культур, лизирующихся без репродукции фаговых частиц. Подобное явление обычно наблюдается при высокой множественности заражения, когда бактерии не в состоянии ликвидировать значительные дефекты клеточной стенки, образующееся в результате действия фагового лизоцима адсорбировавшихся частиц.

При установлении принадлежности микроорганизма характер лизиса, как правило, не играет решающего значения. Большая роль в этом случае придается способности корпускул прикрепляться к клеткам только гомологичного вида. Определенную ценность имеет работа В. Watson, W. Eveland (1965), в которой с помощью флуоресцирующих антител, используемых для демонстрации прикрепления фагов к клетке, доказано отсутствие у листериозных бактериофагов способности адсорбироваться на штаммах *Staphylococcus aureus* имеющих антигенное родство с листериями. В экспериментах К. Н. Шлыгиной (1970) установлено, что перекрестные серологические реакции у листерий, стафилококков и энтерококков обуславливаются наличием видонеспецифического антигена Рантца, входящего у листерий в состав III-го, а также II и IV факторов. Исходя из этих данных, можно предположить, что указанный антиген не является структурным компонентом фаговых рецепторов, чем, возможно, объясняется высокая специфичность листериозных бактериофагов, по сравнению с серологическим тестом.

Фаговары

По данным Капыриной Н. А. 19 рас листериозных бактериофагов после пассирования на культурах-индикаторах приобретали способность лизировать штамм, из которых они получены, хотя в исходной популяции ни в одном случае не наблюдалось лизиса культуры-продуцента. Это позволило

автору отнести указанную группу фагов к V-мутантам (virulent mutant). Образование вирулентных мутантов может является следствием рекомбинаций, в результате гибридизации генома инфицирующего фага и профага, присутствующего в штамме-хозяине (Раутенштейн Я. И., Мисюрева Л. С., Хачатрян Л. С., 1964) или же в результате обмена генетическими маркерами между геномом профага и клетки-хозяина (Estela L. A., Sofos J. N., 1993).

Проверка спектра литической активности стабилизированных фагов позволила отобрать 7 рас, с помощью которых 67 фагочувствительных культур разделены на определенное число групп. М. К.Щеглова, используя 20 рас бактериофагов распределила 25 музейных культур *L.monocytogenes* на 6 основных и 2 дополнительных фаговара. Автором не выявлено четкой корреляции фаго- и сероваров.

Иные результаты получены С. Sword, M. Pickett (1958), которые с помощью 5 фагов распределили 127 из 149 листериозных штаммов на 8 фаговаров. Этими исследователями установлена выраженная корреляция фаго- и сероваров. В экспериментах Н. А. Капыриной также получена определенная закономерность чувствительности культур к фагам в зависимости от их серологической принадлежности (табл. 3.4).

Так культуры, отнесенные к I серогруппе, распределены на 8 «фаговаров», а культуры II серогруппы включены в два фаговара (IX и X). Причем, учитывая некоторые особенности, культуры этих двух «фаговаров» распределены соответственно на 2 подтипа. Как правило, штаммы II серогруппы лизировались фагом L 4A или 3A и лишь в редких случаях фагом L 2A, проявляя одновременно полную инертность к остальным 4-м исследованным бактериофагам. Культуры I серогруппы оказались высокочувствительны к фагу L 2A. Отсутствие данных по развернутой антигенной формуле у большинства исследованных штаммов не позволило провести более глубокий анализ чувствительности культур в соответствии с серотипами.

Этапы внутриклеточного развития бактериофагов

При изучении отдельных этапов взаимодействия семи рас листериозных бактериофагов, характеризующих их активность на индикаторных штаммах, выявлено, что они несколько различались между собой по **скорости адсорбции** – для фагов L 2A, L 3A, L 4A, L 11A, L 14A, **константы скорости адсорбции** составили $3,6 - 6,9 \times 10^9$, а для L 1A и L23A – $2 - 2,7 \times 10^9$; по **величине латентного периода**, которая равнялась 50 – 80 мин; **периоду лизиса**, находившемуся в пределах 50 – 70 мин; и **урожаю**, в среднем на одну бактериальную клетку приходилось от 25 до 10^6 корпускул. Четкой корреляции между этими признаками у данной группы фагов не выявлено. Только у фага L 23A отмечена самая низкая константа адсорбции, самый длительный латентный период и невысокий урожай, что свидетельствует

о более низкой биологической активности указанного фага по сравнению с остальными расами. Бактериофаги, изученные М. К. Щегловой (1969) не отличаются по указанным характеристикам: К-адсорбции составляла $1,5 - 9 \times 10^9$, а урожай – $23 - 10^9$ частиц, но последние имели более длительный латентный период равный 90 – 210 мин. Согласно указаниям автора пониженная температура ведет к удлинению латентного периода. Так как Н.А. Капырина проводила исследования при 26 – 28 °С, а не при 22 – 24 °С, то становится понятным, почему фаги имели более короткий латентный период и период лизиса. На скорость адсорбции и урожай, судя по полученным результатам, температура в пределах 22 – 28 °С не оказывает существенного влияния, но при 22 °С несколько затягивается процесс репродукции фагов. Морфологически стабильные негативные колонии при этой температуре появляются в более поздние сроки и они имеют меньшие размеры. На этом основании автор считает, что температура 26 – 28°С является наиболее благоприятной для этапа внутриклеточного развития

Табл. 3.4. Чувствительность листериозных культур с фагам *(Капырина Н.А., 1973)

Фаговары	Исследуемые штаммы листерий	Бактериофаги						
		L 2A	L 3A	L 4A	L 1A	L 14A	L 23A	L 11A
I	9-127, Т-1, 15, 78П, <u>56, 39, 139, 52, Аурф., 1472, 1683, 5Г, 7Г, 8Г, 3, 13, 9-МО, 4ГЦ, МД, 613</u>	+	+	–	+	+	+	+
II	324, 23П, 24618, 3413/86, Куст, 132/134, 47	+	+	–	+	+	–	+
III	34, 728, 4-40	+	+	–	–	+	+	+
IV	<u>1324, 1395, 1611, 14П, 80П, 1621, 3453, Р</u>	+	+	–	–	+	–	+
V	6, 7, 4Г, 750	+	+	–	–	+	+	–
VI	382, 1213, 3Г, X ₂ , 178П, 2598	+	–	–	–	–	–	–
VII	9-128 (2ст), Т-2 (2ст), 15/57 (2ст), 16/57 (2ст), 35, 468, 1383	+	–	–	+	+	–	–
VIII	A	+	–	–	+	+	+	(?)
IX	9-72 (4ст), 9-130 (4ст), 137 (4ст), 4с (4ст), 4в (4ст), 129 (4ст), 546 (2сг)	–	+	+	–	–	–	–
	K-1 (II сг), 1221 (II сг)	±	±	±	–	+	–	+
X	163 (II сг)	–	+	–	–	–	–	–
	820 (II сг, 5 ст)	+	+	–	–	–	–	–

* + - положительный результат (лизис культуры);

± - сомнительный результат (слабый или непостоянный лизис культуры);

– - отрицательный результат (отсутствие лизиса);

– - подчеркнуты штаммы, присланные из одной местности;

() – в скобках обозначена серологическая принадлежность штамма (сг – серогруппа, ст – серотип);

остальные культуры принадлежат к I серогруппе.

листериозных бактериофагов. Температура 37 °С, эффективная для большинства фагов других видов, вероятно, подавляет внутриклеточный цикл развития листериозных бактериофагов. Исследуемые листериозные фаги, на бактериальном газоне при 37 °С не образовывали негативные колонии совсем или формировали очень мелкие бляшки, количество которых на 1 – 2 порядка ниже, чем при 22 – 28 °С.

В представленных исследованиях J.-W. Kim, S. Kathariou (2009) выявлено, что фаги, взаимодействовали с *Listeria monocytogenes* epidemic clone II (ЕСII), выращенных при 37 °С, но не в тех случаях, когда бактерии выращивали при более низких температурах (30 °С и ниже). ЕСII явился причиной двух широкомасштабных вспышек в США в 1998 – 1999 и 2002, в которые были вовлечены контаминированные готовые к употреблению мясные продукты (хот-доги и деликатесы из индюшатины соответственно). Штаммы ЕСII, выращенные при более низких температурах, были резистентными к фагам независимо от температуры во время инфицирования и последующей инкубации. Напротив, восприимчивость к фагам других проверенных штаммов серотипа 4b (включая эпидемический клон I) и штаммов других серотипов рода *Listeria* не зависела от температуры культивирования бактерий. Температурно-зависимая фагосоприимчивость бактерий ЕСII единообразно наблюдалась во всех подвергаемых исследованию штаммах ЕСII из места вспышек или из фабрик независимо от присутствия или отсутствия кадмий-резистентных плазмид. Фаги адсорбировали одинаково на бактериях ЕСII, выращенных при 25 °С и 37 °С, что дает возможность предположить, что сопротивляемость штаммов ЕСII при 25 °С не была вызвана неспособностью фага к адсорбции. Даже хотя данные механизмы остаются ясными, температурно-зависимая фагосопротивляемость может представлять важную экологическую адаптацию *L.monocytogenes* ЕСII в переработанных хранящихся при низких температурах пищевых продуктах в среде фабрик, где преобладают сравнительно низкие температуры.

Антигенное родство

Ряд работ, в которых нашло отражение изучение вопроса антигенного родства, свидетельствует о том, что фаги различных видов могут в значительной степени отличаться по антигенной активности (Адамс М., 1961; Гольдфарб Д.М., 1961). Листерииозные бактериофаги обладают невысокой антигенной активностью и близки по этому свойству к чумным и псевдотуберкулезным фагам. Согласно данным М.К. Щегловой (1962) К-скорости нейтрализации листериозных антифаговых сывороток составили 42,4 – 165,4 мин⁻¹, в опытах Н.А. Капыриной эти величины находились в пределах 30 – 135 мин⁻¹. Сыворотки, полученные S. Jasinska (1964), нейтрализовали гомологичные фаги в разведениях 1:50 – 1:400.

Проверка антифаговых сывороток по данным Капыриной Н.А. в перекрестной РН с гетерологичными фагами показала, что по характеру антигенных комплексов исследуемые фаги могут быть расположены на две четко различающиеся группы. У фагов, включенных в группу А, отмечено выраженное антигенное родство. Они нейтрализовались гетерологическими сыворотками в 57 – 97 %. Фаг L 4А отнесен в группу В, поскольку он не снижал своей активности в присутствии сывороток, нейтрализующих фаги первой группы. Антифаговая сыворотка к фагу L 4А также не обладала выраженной активностью в отношении остальных 6 рас. Можно предположить, что фаг L 4А обладает специфическими белковыми структурами, которые, по всей вероятности, комплиментарны антигенным комплексам бактериальных клеток, относящихся ко II-й серологической группе. Белки фагов L 2А, L 11А, L 23А и L 1А более специфичны в отношении бактериальных антигенов I-ой серогруппы. Фаги L 3А, L 14А занимают как бы промежуточное положение между двумя специфическими группами. Указанные результаты (Капырина Н.А., 1973) являются еще одним подтверждением того, что у листериозных бактериофагов, возможно, существует определенная связь активности фагов с антигенной структурой бактериальных клеток.

Деление фагов на 2-е группы по антигенным свойствам находилось в соответствии с показателями их чувствительности к температуре 58 °С. Серологически родственные фаги группы А обладали повышенной чувствительностью к температуре. За 20 мин. они теряли активность 85 – 98 %. К-инактивации у данных фагов находились в пределах 0,1 – 0,2 мин⁻¹. Для фага L 4А величина К составляла 0,02 мин⁻¹. Статистическая обработка результатов позволила автору установить достоверность различий показателей термоинактивации фага L 4А по сравнению с остальными 6-ю расами, но таковой не установлено среди фагов группы А. Если учесть, что термоинактивация связана, в основном, с денатурацией белков, то полученные результаты являются еще одним подтверждением качественного отличия структуры белковых компонентов фагов этих двух групп. Бактериофаг L 4А, кроме того, имел самый короткий латентный период, на газоне индикаторного штамма образовывал более мелкие негативные колонии и отличался от остальных фагов по спектру активности, лизируя только культуры II серогруппы.

В отношении фагов L 2А, L 3А, L 11А, L 14А и L 23А отмечено, что они родственны, но не идентичны, поскольку среди них выявлены различия в морфологии негативных колоний, спектре литической активности, а также в показателях биологических свойств.

Основываясь на результатах проведенных рядом авторов исследований можно сделать вывод, что для листериозных бактериофагов в качестве

основных таксономических критериев могут быть использованы такие признаки, как антигенные свойства, чувствительность к повышенной температуре, а дополняющие их – спектр литической активности и морфология негативных колоний. Последний признак будет иметь большую ценность при выделении чистых линий бактериальных вирусов, а также в качестве ориентировочного критерия оценки активности фагов в отношении индикаторного штамма.

БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ФАГОВ ЛИСТЕРИЙ

Моно/смесь фагов

Серия наблюдений показала, что диагностические бактериофаги лучше использовать по отдельности. При проверке действия фагов в смеси наблюдалось отсутствие или резкое снижение их активности. Некоторые авторы подобный депрессионный эффект связывают с явлением интерференции между представителями серологически неродственных групп. В опытах Н.А. Капыриной отсутствие реакции наблюдалось обычно на культурах, лизирующих серологически родственными фагами (L 2А, L 3А), поэтому механизм подавляющего действия у них должен быть иным. Как известно бактериофаги L 2А и L 3А представляют собой мутанты умеренных фагов с пониженной лизогенизирующей способностью. По всей вероятности, для этих фагов характерным является локализация изменений в различных участках группы сцепления С. Не исключено, что у одного фага они затронули детерминанты, контролирующие процессы, связанные с ранними функциями, осуществляющие лизогенизацию, а у другого – с поздними. Смешанное заражение в таких случаях может привести к образованию рекомбинантов с исходным генотипом, обуславливающим редуکتивную реакцию.

Предлагаемый Капыриной Н.А. набор бактериофагов способен выявлять культуры, различающиеся по антигенным свойствам независимо от сроков и источника выделения. Находящиеся среди исследуемых листериозных культур легко диссоциирующие штаммы в большинстве своем также оказались высоко чувствительными к некоторым из испытываемых бактериофагов.

Хранение биопрепарата листериозных бактериофагов

Проверке некоторых свойств высушенных препаратов показала, что листериозные бактериофаги одинаково хорошо переносят лиофилизацию

при использовании в качестве стабилизирующего материала желатин-сахарозной среды и сухого обезжиренного молока. В указанных средах 86 % фагов снизили титр не более чем на 1 lg, 5,6 % не потеряли активности совсем и только 8,4 % снизили ее на 2 lg. У подавляющего большинства фагов снижение титров обычно имело место в процессе высушивания. Последующее хранение фагов на протяжении 12 мес. (срок наблюдения) при +4°C не оказало существенного влияния на величину титров большинства фагов, лишь у 6-ти из 71-ого фага отмечено дополнительное снижение активности за этот период. На примере фага L 8A, находившегося после высушивания в различных температурных условиях (+4°C, +22°C и +37°C), показано, что высушенные препараты могут также храниться и при комнатной температуре. У высушенных бактериофагов при хранении не выявлено различий в спектре литической активности. На основании полученных данных можно заключить, что метод лиофилизации вполне пригоден для сохранения матричного клона листериозных бактериофагов, но для стабилизации свойств фагов, предназначенных для практического использования.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Специфическое взаимодействие бактериофагов с бактериальной клеткой-хозяином дает возможность использовать их для идентификации бактерий. В отличие от искусственно созданных систем для определения и дифференциации различных структур бактериальных клеток, основанных на использовании антител или на амплификации нуклеиновых кислот, система бактерия-бактериофаг естественно возникла в ходе эволюции, когда бактериофаг распознает рецепторы и адсорбируется исключительно на клетках своего хозяина.

Взаимодействие используется в целом ряде различных методик специфического определения и дифференциации штаммов бактерий. Одной из первых методик практического применения стала **фагоидентификация** – метод, в котором фаги используются для выявления их способности лизировать гомологичные бактериальные культуры и образовывать хорошо видимые на матовом фоне глубинного роста бактерий бляшки.

По выполнению метод фагоидентификации не представляет особых трудностей. Для постановки пробы с бактериофагом используются общедоступные питательные среды (агар и бульон Мартена).

Четко выраженная положительная реакция освобождает практических специалистов от проведения трудоемкого бактериологического исследова-

ния, требующего до 8 – 14 суток, который к тому же не всегда дает положительный результат. Получение сомнительного или отрицательного результата при испытании культур с бактериофагом требует проведения полного бактериологического исследования штаммов.

Набор листериозных бактериофагов (авторы – Капырина Н.А., Бакулов И.А.), включающий три монофага (L 2А, L 3А, и L 4А) рекомендован в практику работы диагностических лабораторий в качестве вспомогательного теста, позволяющего за довольно короткий срок (не более 24 часов) установить принадлежность возбудителя к роду *Listeria*.

По данным Estela L.A. и Sofos J.N. (1993) из 225 изолятов *Listeria* 199 имели одинаковые бактериофаговые модели как традиционные, так и более простые для применения «реверсивные» процедуры фагоидентификации. Пять имели различные фаговые реакции, а остальные 21 изолята были нетипируемыми. Общий уровень типирования данного исследования составил 90,7 %, 97,6 % из типизируемых изолятов показали одинаковые фаговые модели посредством обеих процедур.

Для идентификации листерий M.J. Loessner (1991) была предложена модифицированная техника, названная реверсивной процедурой фагоидентификации. Готовые к использованию чашки для типирования были подготовлены посредством предварительного внесения суспензии фагов на пластины трипозного агара. Новая процедура предлагает ряд значительных преимуществ по сравнению с традиционным методом, будучи более надежной, эффективной и удобной для использования. Более 1000 штаммов *Listeria* было типировано при помощи указанного метода, посредством применения расширенного ряда 21 родоспецифчных бактериофагов. Общая способность идентификации штаммов составила 89,5 %.

Mee-Marquet N. van der, Loessner M., Audurier A. (1997) оценили семь экспериментальных фагов для включения в международный свод фагов для подтипирования *Listeria monocytogenes*. Результаты показали, что включение пяти фагов из экспериментальных внесло существенный вклад в типизируемость и уровень дифференциальности системы.

При использовании идентичных фагов результаты фагоидентификации хорошо воспроизводятся в лабораториях любого уровня. Простота применения и дешевизна метода способствуют тому, что по настоящее время он остается в числе самых широко используемых методов идентификации бактерий.

ФАГОТИПИРОВАНИЕ

Для облегчения эпидемиологической работы по обнаружению и слежению за листериозными инфекциями необходимо знать маркеры штаммов *Listeria*. Одной из возможностей является фаготипирование *Listeria* (Бакулов И. А., Васильев Д. А., Колбасов Д. В., 2008).

А. Audurier и соавторы (1997) описали систему для фаготипирования штаммов *L.monocytogenes* с использованием 15 фагов, выделенных из лизогенных штаммов. С помощью такого набора фагов 238 из 350 штаммов (68 %) можно было классифицировать на 22 типа. В то же время они опубликовали кодовую систему для оценки результатов фаготипирования. Этот «октальный код» не только рациональный, но и полезный метод, облегчающий сравнение изучаемых штаммов с помощью компьютера.

Те же авторы (1995) исследовали 823 штамма *Listeria*, полученные во Франции, с помощью 20 фагов. Смогли провести типирование 645 из всех штаммов (78,4 %). 131 штамм принадлежал к серотипу 1/2, 499 к серотипу 4, 5 к серотипу 5 и 10 к другим серотипам. Удалось лизотипировать 57,7 % штаммов серотипа 1/2, 88 % штаммов серотипа 4, все штаммы серотипа 5 и менее половины других серотипов (10 из 24 штаммов).

Для оценки пригодности этого метода В. Ralovich (1984) исследовал литическую модель 247 штаммов *Listeria*, выделенных из разных источников – людей, животных, воды – в Венгрии. Было типировано 39,6 % всех штаммов. Такой результат несколько низок, поэтому для использования этого метода требуется больше фагов. В последующих исследованиях использовались 27 фагов *Listeria* и определили 34 литические модели (табл. 3.5.).

Было типировано 36 (40,9 %) из 88 штаммов *Listeria* серотипа 1/2 а, а остальные представляли 14 типов фагов. 77,7 % из 18 штаммов были отнесены к серотипу 4. Они принадлежали к 10 типам фагов. 3 штамма *L.monocytogenes* серотипа 5 можно было разделить на 2 типа фагов, 2 из них с одной и той же литической моделью были выделены в Венгрии, третий с другим типом фага выделен в Болгарии. 36 штаммов принадлежали к серотипу ба и бв.

Литическую модель можно было определить у 20 штаммов, 16 штаммов остались нетипируемыми. 20 штаммов можно было распределить на 10 типов фагов. Кроме того, были исследованы еще 18 других штаммов *Listeria*. Не было определено к каким серотипам, сероварам они принадлежали. Можно было определить литическую модель 7-ми из всех штаммов.

Результаты свидетельствуют о том, что между антигенной структурой и фаговым типом данного штамма *Listeria* существует специфическая связь.

Табл. 3.5. Связь между серотипом и фаговым типом штаммов (Ralovich B., 1984)

Серотип, серовар или субсеровар	Тип фага	Количество штаммов
I / 2a I, II, III/	77 100 0000	1
	74 000 0000	2
	73 100 0000	1
	54 000 0000	1
	41 000 0000	2
	40 000 0000	8
	34 000 0000	1
	33 000 0000	1
	20 000 0000	2
	13 000 0000	6
	10 000 0000	3
	04 000 0000	1
	02 000 0000	3
	01 000 0000	4
	нетипируемый	5
4 ab /III/, V, VI, VII, IX	00 000 0400	1
	00 605 0040	1
	00 400 0004	1
	00 253 0000	2
	00 211 0000	1
4 /III/, IV/, VI, VII	00 201 4000	1
	00 201 0000	4
	00 200 0000	1
	00 001 0004	4
	00 001 0000	1
	нетипируемый	2
5 /III/, IV/, VI, VIII, X	00 000 3737	2
	00 000 3714	1
	00 060 0004	1
	00 000 3232	1
	00 000 2737	1
	00 000 2707	1
	00 000 0040	2
	00 000 0004	3
	нетипируемый	7
	00 000 2737	1
	00 000 2004	2
6b*	00 000 0420	2
	00 000 0200	1
	00 000 0010	3
	00 000 0004	2
	нетипируемый	9
V, VI, XIV, XV**	00 000 0040	2
	00 000 0004	2
	нетипируемый	10
V, VI, IX, XIV, XV**	00 000 0040	1
V, VI, IX, X**	00 000 0420	1
V, VI, X, XIV*	00 000 0004	1

* - штаммы с антигенами, предложенными Seeliger, Schoofs (1979), принадлежат к серотипу 6a и 6b

** - невалифицированные серовары (субсеровары)

Когда данные типирования фагов венгерских штаммов *Listeria* сравнивают с таковыми французских штаммов, оказывается, что соотношение типизируемых и нетипизируемых штаммов различно в двух странах (табл. 3.6.).

Эти результаты позволяют допустить, что между штаммами *Listeria* могут существовать небольшие различия в разных странах, чему можно приписать патологические и эпидемиологические различия.

S. Ortel (1972) тоже использовал систему типирования фагов и обнаружил, что эпидемиологическая ситуация и литическая модель штаммов *Listeria*, выделенных в течение 1957 – 1979 гг. в Германии, изменилось. Кроме того, ежегодно менялась частота обнаружения *Listeria* с одним и тем же типом фага.

McLauchlin J., Audurier A., Taylor A.G. (1986) исследовали штаммы *Listeria monocytogenes*, выделенные в период 1967 – 1984 от 475 человек, зараженных листериозом, отнесенные к одной из трех серогрупп (1/2, 3 или 4). Штаммы были фаготипированы при помощи 28 фагов для выявления трех аспектов эпидемиологии листериоза. У троих пациентов страдающих листериозом, от 3 месяцев до 2 лет, были обнаружены штаммы одной и той же серогруппы, неразличимые типированием. Имело место десять случаев возможной перекрестной инфекции между парами новорожденных в одной больнице; первый ребенок заболел в день рождения или на следующий день после него, а второй ребенок заболел через 8 – 12 дней после контакта с первым. В каждой паре *L.monocytogenes* принадлежали к одной серогруппе и были неразличимы типированием.

Три группы случаев, возможно, были вызваны типичным источником инфекции. Штаммы *L.monocytogenes* в 10 из 11 случаев листериоза в области Карлайл в июле – декабре 1981 принадлежали к одной серогруппе; девять штаммов являлись нетипизируемыми. Вторая группа случаев включала взрос-

Табл. 3.6. Соотношение типизируемых и нетипизируемых штаммов листерий в двух странах (Ralovich B., 1984).

Серотип	Страна	Типизируемые штаммы (коэф.фиц.)	Нетипизируемые штаммы	Всего
1/2	Венгрия	36 (10,40*)	52	88
	Франция	131 (10,57**)	96	237
4	Венгрия	14 (10,77*)	4	18
	Франция	499 (10,88**)	68	567
5	Венгрия	2	–	2
	Франция	5	–	5
Другие	Венгрия	27 (10,47)	30	57
	Франция	10 (10,41)	14	24

* - разница значительна,

** - разница незначительна; $\chi^2=7,186$ $p<0,01$

лых людей, находившихся в больнице, и третью пару – новорожденных детей, которые заболели вскоре после рождения. В каждой группе штаммы принадлежали к одной серогруппе и были неразличимы типированием. Авторы предполагают возможность общего источника инфекции, т.к. два последних случая зафиксированы в короткий временной период, когда было выделено необычайно высокое количество штаммов листерий, которые не различались фаготипированием.

М. J. Loessner, M. Busse (1990) была создана схема типирования бактериофагами для выделения изолятов *Listeria* из молочных и других пищевых продуктов. Для типирования было использовано 16 изолятов фагов выделенных из природных источников и из лизогенных штаммов. Согласно их литическим спектрам, изоляты были разделены на четыре группы. До сих пор наблюдалась 41 четкая модель (структура) лизиса, когда данный набор был использован в типировании 57 определенных эталонных штаммов, представляющих пять утвержденных видов и 16 серогрупп в дополнение к 454 изолятам *Listeria* преимущественно пищевого происхождения. В целом, типлируемость составляла 84,5 %; т.е., штамм был лизирован не менее чем одним фагом при 100 % типовом тестовом спаде. Штаммы, принадлежащие к серовару 3, были в основном сопротивляемы к лизису внесенных фагов. Результаты оказались высоко воспроизводимыми, что было подтверждено посредством ретипирования несколько недель спустя. Некоторые фаги, изолированные из природных источников, показали более широкий литический спектр чем фаги, изолированные из лизогенных штаммов. В соответствии с этим, фаги были обнаружены в различных кластерах в созданной компьютером карте систем связи. Видовая и специфичность по сероварам литической реакции не была выявлена. Ни один из фагов не был способен лизировать штаммы *Listeria grayi*, *Listeria murrayi* или *Jonesia denitrificans*. Система фаготипирования может предоставить важную информацию для способов обнаружения и устранения источников контаминации вида *Listeria* в оборудовании молочных заводов.

Система типирования J. McLauchlin, A. Audurier, A.G. Taylor (1986) для штаммов *Listeria monocytogenes* основывается на литических способностях 28 фагов и была проанализирована при помощи ряда штаммов изолированных в Соединенном Королевстве и проверены на «слепом эксперименте». Система оказалась высоко воспроизводимой и избирательной, удалось типировать 64 % из проверенных штаммов.

Комбинированный анализ, проведенный N. van der Mee-Marquet, A. Audurier (1995) 5179 фаговых реакций 20 штаммов *Listeria monocytogenes* на протяжении 14 лет и результаты фаготипирования 2659 и более штаммов *L.monocytogenes* позволил оценить специфичность литического спектра и

разнообразие литических реакций 35 фагов. Данное исследование включало 26 фагов, рекомендованных для международного метода типирования фагов, разработанного в 1985 году J. Rocaourt [et al]. Авторами внесены предложения для модификации системы с целью производства оптимального набора бактериофагов для рутинного использования.

Таким образом, метод фаготипирования позволяет проводить более глубокий эпидемиологический анализ вспышек, может оказать неоценимую помощь при установлении связи между отдельными вспышками и спорадическими случаями болезни, а также при выявлении источника возбудителя инфекции.

ДЕТЕКЦИЯ

Впервые теоретическое и экспериментальное обоснование методу индикации бактерий с помощью реакции нарастания тира фага (РНФ) дали В. Д. Тимаков и Д. М. Гольдфарб в 1955 году.

Полученные результаты по изучению специфичности бактериофагов L 2A и L 4A позволили перейти к разработке оптимальных условий постановки РНФ для обнаружения возбудителя листериоза в различных субстратах.

При разработке оптимальных условий проведения РНФ необходимо наиболее точно подобрать следующие параметры:

- подобрать питательную среду, температуру и условия инкубирования при постановке РНФ;
- определить количественный показатель, имеющий диагностическое значение;
- определить оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями.

В первую очередь для постановки РНФ Т.И. Кольпиковой (1981) были испытаны **различные питательные среды**. На основании этих экспериментов было показано, что среда, содержащая 0,5 % глюкозы обеспечивает лучшую репродукцию фаговых корпускул и позволяет учитывать результаты РНФ на 6 часов раньше, чем на средах без содержания глюкозы. Указанные выводы о зависимости эффективности в проведении РНФ от используемой питательной среды совпадают с данными Н.А. Капыриной. Она считает, что инкубирование листерий зараженных фагом, в обогащенной среде, к числу которых относится и бульон Мартена с глюкозой, способствует не только интенсификации внутриклеточного цикла развития вирусных частиц, но и повышает количественное содержание вновь образовавшихся потомков фага в клетке.

Использование при постановке РНФ таких, общедоступных для любой бактериологической лаборатории, питательных сред как: МПБ 1,5 и 0,7 %

МПА с 0,5 % глюкозой значительно упрощает и облегчает применение РНФ в сравнении с методами бактериологического исследования.

В последующих опытах Т.И. Кольпикова определяла **количественный показатель листериозного фага**, имеющий диагностическое значение. Из литературных источников (Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М., 1962) известно, что при обнаружении бактерий РНФ считают отрицательной, если увеличение количества фага в опытной пробе по сравнению с контрольной составляет до 3 раз. Увеличение количества фага от 3 до 5 раз учитывается как слабо положительная реакция; от 5 до 10 раз – положительная, свыше 10 – резко положительная.

Для определения количества фага, имеющего диагностическое значение при обнаружении возбудителя листериоза, было проведено более 200 исследований различных субстратов (МПБ, вода, почва) контрольных и инфицируемых культурой листерий обеих серогрупп в концентрации от 10^1 до 10^8 м.к. в мл.

В результате проведенных исследований установлено, что РНФ положительна в случае, если количество «стерильных пятен» на чашках Петри, засеянных из опытных проб, было в 5 раз больше по сравнению с контролями титра фагов.

Выбранный критерий гарантировал достоверность результатов, поскольку он позволял исключить технические погрешности при титровании, при которых возможно выявление невысокой степени увеличения количества фага. Достоверность РНФ определяли путём выделения возбудителя листериоза бактериологическим методом исследования и специфичностью РНФ с контрольными пробами.

Выбрав питательную среду для постановки РНФ и определив количество фага, имеющее диагностическое значение при обнаружении возбудителя листериоза в исследуемых субстратах, Кольпиковой Т.И. (1981) были начаты исследования по разработке режима РНФ. Для этой цели были поставлены эксперименты с использованием двух основных модификаций, заключающихся **в предварительном проращивании или увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом.**

При отработке вопросов предварительного подращивания исследуемого материала использовали 7 режимов, различающихся по времени данного процесса (1, 2, 3, 4, 16 часов) и условиям аэрации (шуттелирование). После предварительного подращивания к исследуемому субстрату добавляли определённое количество фага и смесь выдерживали при температуре 28 °С в течение 8 часов. В результате этих исследований было показано, что при подращивании изучаемого материала в течение 16 часов при температуре 37 °С РНФ оказалась менее чувствительной, так как позволяла обнаружи-

вать 10^5 м.к. в мл. Вероятно, при столь длительной экспозиции (16 часов) культивирования при температуре 37°C сильно развивается посторонняя микрофлора, которая оказывает антагонистическое действие на листерии.

При подращивании исследуемого материала в течение 2-х часов при шуттелировании или 3 – 4 часа без шуттелирования при температуре 37°C , листерии обнаруживались в исследуемом материале в количестве 10^3 м.к./мл. Таким образом, эти режимы подращивания были выбраны как оптимальные. Для выяснения оптимального времени контакта исследуемого материала с фагом было испытано 5 параметров. В результате этих исследований установлено, что при культивировании исследуемого субстрата с фагом в течение 6 часов при температуре 28°C заметное нарастание количества листериозного фага наблюдается при концентрации гомологичных бактерий не менее 10^5 в мл. Удлинение сроков инкубации (16 – 24 часа) дало возможность получить увеличение количества фага в пределах, имеющих диагностическое значение уже при концентрации листерий 10^2 до 10^3 м.к. в мл.

Исходя из выше изложенного можно предположить, что значение инкубации смесей в течение 16 – 24 часов при температуре 22°C или 28°C сводится к тому, что за это время бактерии, находящиеся в исследуемом субстрате в очень малых количествах, размножаются. В результате этого между добавленным индикаторным фагом и бактериями устанавливаются такие количественные соотношения, при которых вероятность встречи между ними повышается, и бактерии инфицируются фагом. Отсюда вытекает, что исход реакции зависит не только от свойств индикаторного фага, но и от биологических особенностей данного возбудителя, обнаруживаемого с помощью РНФ.

В. А. Тимаковым и Д. М. Гольдфарбом (1962) было показано, что чувствительность реакции является функцией времени и концентрации бактерий. Из этого следует, что, как и при выявлении других микроорганизмов, чувствительность РНФ при экспериментальном листериозе является функцией времени и концентрации бактерий. Удлинение срока контакта исследуемого субстрата с фагом способствует выявлению бактерий при незначительном содержании их в объекте исследования. Таким образом, из числа испытанных режимов наиболее быстрым, но менее чувствительным, является подращивание исследуемого материала в течение 3 часов при температуре 37°C с последующим контактом исследуемого материала с фагом при температуре 28°C в течение 8 часов. Учёт результатов проводят в этом случае через 24 часа. Бактерии удастся обнаружить в количестве 10^3 м.к./мл /г/.

Наиболее чувствительным, но более длительным, методом является выдерживание исследуемого материала с фагом (без предварительного подращивания) в течение 24 часов при комнатной температуре или температуре

28 °С. При данном режиме выявляются листерии в концентрации 10^2 м.к./мл/г, на проведение РНФ затрачивается не более 48 часов. Этот метод наиболее удобен в практических условиях лаборатории.

Проведённые исследования в процессе изучения возможности использования РНФ для обнаружения листерий в органах и объектах внешней среды показывают следующее:

Во-первых – РНФ как метод диагностики чувствительней бактериологического исследования при обнаружении возбудителя листериоза в различных субстратах. Это выражается в большей частоте положительных результатов РНФ по сравнению с бактериологическим методом исследования. Положительные результаты появляются при наличии такого количества листерий, которое бактериологическими исследованиями не выявляется.

Во-вторых – РНФ является ускоренным методом диагностики. Она позволяет за относительно короткий срок (24 – 48 часов) обнаружить возбудителя листериоза в присутствия посторонней микрофлоры.

В-третьих, при помощи РНФ можно определить серогрупповую принадлежность листерий, которыми вызвана вспышка заболевания, без выделения культуры в чистом виде.

Указанная методика постановки РНФ даёт положительные результаты с использованием листериозных монофагов L2A и L4A.

Раздельное применение монофагов вызывает ряд затруднений технического характера связанных, в частности, с объемом исследований и необходимостью расхода большого количества лабораторной посуды реактивов и питательных сред. В связи с этим, с целью сокращения объёма исследований и одновременного выявления листерий 1 и 2 серогрупп рекомендуем использовать технику постановки РНФ смешанными листериозными фагами. Исходя из того, что листериозные монофаги L 2A и L 4A строго специфичны, они не интерферировали. При использовании смеси фагов в РНФ для обнаружения возбудителя листериоза были проведены исследования МПБ, инфицированного отдельно культурами листерий 1 и 2 серогруппы, *E.coli*, *Streptococcus albus* и *Staphylococcus aureus*, а так же почвы песчаной и воды водопроводной, инфицированных культурой листерий 1-й серогруппы (штамм 9-127) в концентрации $8 \times 10^2 - 8 \times 10^7$ м.к./мл /г/ и культурой листерий и 2-й серогруппы (штамм – 9-72) в концентрации $10^2 - 10^8$ м.к. на мл/г. Параллельно для исследования этих проб использовали РНФ с монофагами.

Проведенные Кольпиковой Т.И исследования позволили установить, что листериозные бактерии могут быть выявлены при постановке РНФ как с монофагами, так и со смесью фагов. Кроме того, использование смеси фагов позволяло определять листерий как 1, так и 2 серогрупп. Тогда как с помощью монофагов выявляли листерии по серогруппам.

При использовании монофагов и их смеси в РНФ при исследовании с гетерологическими бактериальными культурами ни в одном случае не было увеличения количества фага, что указывает на высокую специфичность данных биологических агентов и методики их использования.

Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является разработка новых подходов для детекции бактерий с помощью бактериофагов.

Одним из таких является метод детекции клеток *Listeria* в смешанной бактериальной культуре с участием кодируемых бактериофагами гидролаз пептидогликана (эндолизин) с применением флуоресцентной микроскопии. Эндолизины бактериофагов A118 и A500 карбоксиконцевых доменов клеточной стенки (cell wall-binding domains, CBDs) *Listeria* были генетически объединены с зеленым флуоресцентным белком (green fluorescent protein, GFP). При их взаимодействии с бактериальными клетками *Listeria* уже через 30 секунд образуется устойчивый комплекс, который делает возможным идентификацию патогенов (Lenz L.L. [et al.], Henry R. [et al.], 2006).

Rees C.E. and Dodd C.E. (2006) разработали чувствительный метод для индикации клеток *Listeria* в смешанном образце. Для детекции использовали бактериофаги, вызывающие лизис бактерий, затем с помощью биолюминесценции измеряли АТФ лизированных бактерий. Предел определяемых клеток составил 10^3 клеток в 0,1 мл образца.

Бактериофаг A511 является вирулентным миовирусом, инфицирующим около 95 % всех используемых в исследовании штаммов *Listeria monocytogenes* (Ripp S., 2010). Использование люциферазного репортерного бактериофага, созданного на основе A511, позволило осуществлять детекцию *Listeria monocytogenes* за 24 часа, что значительно быстрее по сравнению с классическим чашечным методом (Schmelcher M., Loessner M., 2008).

В последнее время разработана новая технология получения высокофинных фрагментов антител, которая состоит в конструировании библиотек миниантител, экспонированных на нитевидных фагах.

Paoli G.C. с соавт. (2004) применяли библиотеку Griffin.1 для получения набора бактериофагов, взаимодействующих с целыми клетками *Listeria monocytogenes*. С помощью данного метода была доказана возможность детекции различных серотипов бактерий *Listeria monocytogenes*.

Антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, успешно используются для идентификации бактерий (Paoli G.C., Chen C.Y., Brewster J.D., 2004; Nanduri V. [et al.], 2007).

Система New England Biolabs 12-mer фагового дисплея была использована для получения пептидов, соответствующих бактериям вида *Listeria monocytogenes* (Gasnov U. [et al.], 2006).

Другие исследования показывают возможность применения фрагментов антител, произведенных с помощью библиотеки фагового дисплея, для иммуно-электрохимической детекции клеток *Listeria monocytogenes* (Benhar I. [et al.], 2001).

ФАГОВЫЙ БИОПРОЦЕССИНГ

Бактериофаги представляют собой хороший способ борьбы с пищевыми патогенами без влияния на качество продукта.

Guenther S., Loessner M.J. (2011) использовали широкий спектр листериозных штаммов, вирулентные фаги *Listeria* A511 для контроля за *L.monocytogenes* во время фазы производства и созревания обоих видов мягких сыров – белый сыр с плесенью (типа камамбер) и рассольный сыр с красной поверхностью (типа лимбургерского). Поверхность молодого незрелого сыра была инокулирована 10^1 – 10^3 CFU/cm² штаммами *L.monocytogenes* Scott A (серовар 4b) или CNL 103/2005 (серовар 1/2a). После этого был внесен фаг в определенное время единичными или повторяющимися обработками при 3×10^8 или 1×10^9 PFU/cm². При помощи Scott A (10^3 CFU/cm²) и единичной дозы A511 (3×10^8 PFU/cm²) на сыре типа камамбер к концу 21 дня периода созревания количество жизнеспособных колоний уменьшилось в 2,5 раза. Повторное применение фагов не ингибировало бактерии, в то время как единичная более высокая дозировка (1×10^9 PFU/cm²) оказалась более эффективной. На рассольном сыре, зревшем 22 дня, сумма клеток листерий уменьшилась в более чем 3 раза. Повторное применение A511 позже отсрочило повторный рост *Listeria*, но не повлияло на сумму бактерий после 22 дней. С более низкой изначальной контаминацией *Listeria* (10^1 – 10^2 CFU/cm²) количество жизнеспособных клеток выпало ниже границы определения, соответствуя более чем 6 уровням понижения в сравнении с контрольными. Результаты исследований ясно показывают потенциал использования бактериофагов в биоконтроле *L.monocytogenes* в мягком сыре.

Индустрия свежесрезанной продукции является самой быстрорастущей на рынке розничной продажи. Однако свежесрезанные фрукты и овощи вызывают опасения по поводу безопасности, так как пораженная структура растений может гораздо легче быть колонизирована патогенными бактериями по сравнению с неповрежденными (целостными) продуктами. Это вызвано более высокой доступностью питательных веществ на срезанной поверхности и более высокими возможностями для контаминации из-за возросшего количества продукции.

В. Leverentz [et al.] определили (2003), что внесенные культуры *Listeria monocytogenes* выживали и незначительно возрастали на свежепорезанных яблоках Red Delicious, которые хранились при температуре 10 °С, и значительно вырастали на свежепорезанных сладких дынях, которые хранились при 10 °С более 7 дней. В дополнение были проведены исследования по изучению эффективности литичных *L.monocytogenes* посредством двух методов применения фагов, распылением и внесением пипеткой на популяции *L.monocytogenes* на искусственно контаминированных свежепорезанных дынях и яблоках. Смесь фагов сократила популяции *L. monocytogenes* до 2,0 к 4,6 lg на дынях. На яблоках сокращение составило 0,4 lg. В комбинации с низином (бактериоцин), фаг сократил популяции *L.monocytogenes* вплоть до 5,7 lg на кусках дыни и до 2,3 lg на яблоках по сравнению с контрольными. Применение одного низина сократило популяции *L.monocytogenes* до 3,2 lg на дынях и до 2,0 на яблоках в сравнении с контрольной группой. Титр фага был стабилен на дынях, но быстро снижался на яблоках. Применение распыления фагов и фагов вместе с низином сократило бактериальное число не меньше, чем пипеточное внесение. Эффективность фагового лечения также зависела от изначальной концентрации *L.monocytogenes*.

Те же авторы (2004) вносили на куски сладкой дыни коктейль из фагов за 1, 0,5, и 0 часов до их контаминирования штаммом *L.monocytogenes* LCDC 81-861 и через 0,5, 1, 2, и 4 часа после контаминации. Внесение фагов оказалось более эффективным, когда осуществлялось за 1, 0,5, или 0 часов до контаминации *L.monocytogenes*, сокращая патогенные популяции вплоть до 6,8 log-элементов после 7 дней выдержки. Это указывает на то, что в коммерческих условиях, если контаминация имеет место во время разрезания, фаг должен быть внесен как можно скорее после того, как было осуществлено разрезание продукта. Однако все добавления фагов, имевшие место от одного часа до времени контаминации и 4 часов после, и все концентрации фагов от 10⁴ до 10⁸ PFU/ml сокращали бактериальные популяции на кусках дыни. Более высокие концентрации фагов оказались более эффективным в сокращении патогенных популяций. Концентрация фагов примерно 10⁸ PFU/ml оказалась необходимой для сокращения патогенных популяций до уровней, где они не поддаются обнаружению сразу после воздействия. Рост патогенов был сокращен концентрацией фагов 10⁶ – 10⁸ на протяжении 7-дневного периода при 10 °С. для того, чтобы усилить эффективность смеси фагов на фруктах с низким pH, таких как яблоки, фаги вносились в комбинации с MnCl₂. Эта комбинация, однако, не усилила эффективность фагов на ткани яблок. Результаты исследования указывают на то, что эффективность внесения фагов на куски сладкой дыни может быть оптимизирована за счет применения фаговой концентрации не менее 10⁸ PFU/ml, вносимой до 1 часа после переработки дыни.

Способность фагов особым образом взаимодействовать с бактерией-хозяином и вызывать ее лизис делает их идеальными антибактериальными агентами. Ряд вариантов применения бактериофагов может быть расширен посредством их фиксации на нейтральных (или инертных) поверхностях.

Н. Anany [et al.] (2011) разработали новый метод для направленной фиксации бактериофагов. Данный метод основывается на различиях заряда у фаговой головки (которая демонстрирует в целом отрицательный результирующий заряд) и хвостового волокна (которое обладает, в целом, положительным результирующим зарядом). Следовательно, более вероятно, что голова будет прикрепляться к положительно-заряженным поверхностям, а хвосты останутся свободными и смогут захватить и лизировать бактерию. В качестве основы для фиксации фага использовались целлюлозные мембраны, которые были изменены так, что заряд их поверхности являлся положительным. Было выявлено, что количество контагиозных фагов, зафиксированных на положительно-заряженных целлюлозных мембранах было значительно выше, чем на неизмененных мембранах. Оказалось, что коктейль из активных против *Listeria* или *Escherichia coli* фагов, зафиксированных на этих мембранах, эффективно контролировал рост *L.monocytogenes* и *E.coli* O157:H7 в готовом к употреблению и сыром мясе, соответственно, при разной температуре хранения и условиях упаковки. Авторы изучили стабильность хранения фагов в целях последующего расширения их промышленного применения. Исследование показало, что в качестве метода по просушиванию фагов может быть применена лиофилизация для сохранения эффективности фагов на новых биоактивных материалах. Отмечено, что использование различий заряда голов и хвостов фагов обеспечило простую технику направленной фиксации подходящую для широкого ряда фагов и позволяющую сохранять их эффективность.

Бактериофаг A511:luxAB является рекомбинированным производным от бактериофага, специфичного для рода *Listeria* и характеризующегося широким кругом хозяев, преобразующей бактериальную биOLUMИнесценцию в инфицированные клетки. В исследовании М. J. Loessner, М. Rudolf, S. Scherer (1997) была проанализирована его значимость для быстрой и легкой проверки контаминированных пищевых продуктов и природных примеров на наличие присутствия жизнеспособных клеток *Listeria* в сравнении со стандартным чашечным методом. За короткий период до обогащения, длившийся 20 часов, система была способна выявить очень низкий показатель изначальной контаминации в различных пищевых продуктах, искусственно контаминированных клетками *L.monocytogenes*. В сыре рикотта, шоколадном пудинге и капусте менее одной клетки на грамм продукта могло быть ясно идентифицировано посредством сравнения легкой эмиссии фаго-инфицированных

образцов с контрольной группой, не содержащей lux-фаг. В продуктах, имеющих большой и сложный набор микробной флоры, таких как мясной фарш и мягкий сыр, не менее 10 клеток на грамм требовалось, чтобы произвести положительный биолюминесцентный сигнал. Из 348 потенциально контаминированных естественных пищевых продуктов и природных источников 55 оказались *Listeria* положительными согласно lux-фаговому методу. Стандартный чашечный метод выявил 57 положительных образцов. Наблюдались некоторые различия относительно частных образцов, а именно, lux-фаговая процедура выявила больше положительных образцов среди молочных продуктов и природных образцов, в то время как чашечный метод показал больше контаминированных образцов мяса и птицы. В целом, оба метода продемонстрировали сходство, а именно оказались одинаково чувствительными. Однако минимум времени, требуемый для выявления *Listeria* посредством люциферазо-фаговому анализу составил 24 часа, что гораздо меньше, чем 4 дня, требующиеся для чашечного метода. Описывается количественная техника с тремя параллелями, основанными на использовании A511:luxAB для определения положительных и отрицательных трубок. Метод позволяет быстрее подсчитывать низкие уровни клеток *Listeria* в различных пищевых продуктах на фоне сопутствующей микрофлоры.

По данным A. Holck, J. Berg (2009) бактериальные культуры могут быть использованы в качестве дополнительного барьера вместе с фагами для сокращения роста *Listeria monocytogenes* на разрезанной вареной ветчине. Внесение фагов способствовало в результате быстрой 10 кратной редукции *L.monocytogenes*. После хранения в течение срока от 14 до 28 дней, наблюдалась 100-кратная редукция в образцах с фагами и защитной культурой по сравнению с образцами, которые содержали только фаги.

Были осуществлены исследования по оцениванию безопасности и эффективности Listex™ P100, для удаления контаминации *Listeria monocytogenes* с сырой рыбы. Listex™ не должен представлять токсикологических проблем, так как бактериофаг P100, используемый как активный элемент, не считается опасным ни для потребителей, ни для каких-либо организмов кроме *Listeria spp*, а также в связи с тем, что параметры производства не подразумевают ничего, что может повредить безопасности. Данные исследований показывают, что Listex™ P100 является листерицидным на инокулированных образцах зубатки и лосося, но не предоставляют определенных заключений по поводу эффективности удаления колоний *L.monocytogenes* на сырой рыбе или по поводу роли Listex™ P100 в уровне контаминации *L.monocytogenes* на переработанных продуктах. Оказалось невозможным оценить потенциальное снижение риска листериоза посредством внесения Listex™ P100 в сырую рыбу. Данные оказались недостаточными для того, чтобы сделать точное

закключение о стойкости или активности P100 в находящейся на хранении рыбе. Маловероятно, что предполагаемое использование Listex™ P100 приведет к сокращению восприимчивости к биоцидам и/ или сопротивляемости к ключевым терапевтическим противомикробным препаратам. Однако данное заключение нуждается в доказательстве. В наличии нет информации по выживаемости P100 в переработке сточной воды или в окружающей среде, или о потенциальной аккумуляции природных P100-резистентных вариантов *L.monocytogenes*. Пилотные исследования и исследования производственного масштаба должны рассмотреть параметры влияющие на эффективность деконтаминации, а также должны доказать, что применение на сырой рыбе влияет на снижение контаминации *L.monocytogenes* в конечном продукте. Во время хранения рыбы необходимо оценивать выносливость или активность P100, как и потенциальные изменения в численности *L.monocytogenes*. Рекомендуются тесты для изучения потенциального развития сопротивляемости или сокращения восприимчивости к биоцидам и ключевым противомикробным препаратам после применения Listex™ P100. Необходимо отследить и зафиксировать продолжительную эффективность Listex™ P100 против *L.monocytogenes* и потенциал для отбора и доминирования штаммов, естественно-резистивных к P100 .

В значительном количестве экспериментов S. Guenther [et. al.] (2009) были оценены вирулентные фаги A511 и P100, обладающие широким кругом хозяев для контроля штаммов *L.monocytogenes* Scott A (серовар 4b) и WSLC 1001 (серовар 1/2a) в различных пищевых продуктах готовых к употреблению, которые известны как частые переносчики патогенна. Образцы пищи были контаминированы бактериями (1×10^3 CFU/g), затем внесен бактериофаг (3×10^6 до 3×10^8 PFU/g). Образцы хранились при 6°C в течение 6 дней. В жидких продуктах питания, таких как шоколадное молоко и сыр моцарелла, количество бактерий стремительно падало ниже уровня определяемости. На твердых продуктах (хот-доги, резаная индюшати́на, копченый лосось, морепродукты, резаная капуста и салат) фаги могли сокращать число бактерий до 5 lg. Различия экспериментальных условий (продолженное хранение более 13 дней или хранение при 20 °C) дали схожие результаты. В целом, применение больших фаговых частиц (3×10^8 PFU/g) оказалось более эффективным чем более низкие дозы. Внесенные фаги сохраняли большую степень эффективности во время хранения в пище животного происхождения, в то время как растительный материал вызывал инактивацию более чем 1 lg . В заключении отметим, что приведенные данные демонстрируют, что вирулентные фаги широкого круга хозяев, такие как A511 и P100, могут быть очень эффективными для специфического биоконтроля *L.monocytogenes* в чувствительных к контаминации готовых к употреблению пищевых продуктах.

Данные ряда авторов (Greer G.G., 2005; Peek R., Reddy K.R., 2006; Volker M. [et al.], 2010) подтверждают потенциальную возможность использования бактериофагов для контроля за распространением *L.monocytogenes* в макроорганизме без вреда для комменсальной микрофлоры. Для того чтобы изучить эффективность воздействия бактериофагов на сокращение количества патогенов, мышей кормили через зонд смесью фагов *Listeria monocytogenes* (ListShield) перед пероральным инфицированием *L.monocytogenes*. Лечение при помощи фагов и при помощи антибиотиков было одинаково эффективным в сокращении уровня *L.monocytogenes* во внутренних органах инфицированных мышей. Однако отмечалась значительная потеря веса у мышей из контрольной группы и группы, подвергаемой лечению антибиотиками, которая не наблюдалась у группы, обработанной ListShield. Долговременное (90 дней) лечение ListShield не показало определенных изменений в микрофлоре их кишечника или отрицательного эффекта, наносимого их здоровью.

Исследование R.M. Carltto [et al.] (2005) представляет всесторонний подход к характеристике и оцениванию вирулентного фага P100, обладающего широким рядом хозяев и способного инактивировать большинство штаммов *Listeria monocytogenes*. В начале эксперимента была определена полная нуклеотидная последовательность генома P100, включающих 174 генных продукта и 18 РНК. Анализ посредством биоинформатики выявил, что ни один из предполагаемых фаговых белков не имеет гомологии с генами или протеинами *Listeria* или какими-либо другими бактериями, которые известны в качестве токсинов или предположительно являются токсинами, являются патогенными факторами, указывают на сопротивляемость к антибиотикам или известны как аллергены. Затем несколько раз крысам орально давали токсины, что не произвело каких-либо особых гистологических изменений, не вызвало заболеваемость или смертность. Таким образом, не было выявлено никакого возможного риска, связанного с применением P100 в качестве добавки к пище. В качестве доказательства и для определения параметров применения P100 для пищевых продуктов, чувствительных к контаминации *Listeria*, был произведен рассольный сыр. Сыры были контаминированы низким содержанием *L.monocytogenes* в начале периода созревания, а P100 был внесен на поверхность во время вымачивания. В зависимости от временных точек, частотности и дозы фагов, авторам удалось проследить значительное снижение (не менее 3,5 единиц) или полное уничтожение жизнеспособных клеток *Listeria* соответственно. Не было зафиксировано свидетельств фагового сопротивления изолятам *Listeria* полученным из образцов.

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что бактериофаги могут обеспечить эффективные и безопасные меры для контроля за контаминацией *Listeria* в пищевых продуктах и на оборудовании.

Бактерии *Listeria monocytogenes* являются серьезной угрозой для человеческого здоровья. Листерия представляет собой значительную проблему не только как классическая нозологическая единица заболевания животных, но и как пищевая инфекция. Листерии подвержены 104 вида животных и рыб, в том числе сельскохозяйственные животные, а так же человек. Вспышки листериоза среди сельскохозяйственных животных сопровождаются значительными экономическими потерями, связанными с падежом, лечением больных животных, ограничениями в реализации продуктов животноводства, полученных от больных животных, противоэпизоотическими и противоэпидемическими мероприятиями. Контаминация патогенными листериями продуктов питания (мясных, молочных, рыбных продуктов, а так же овощей и фруктов), обуславливает возникновение вспышек пищевой инфекции, сопровождающихся тяжелыми последствиями зачастую с фатальным исходом у людей с первой группы риска.

Стационарность и широкое распространение возбудителя листериоза обусловлены двумя основными факторами:

- сапронозной природой листерий, у которых естественным резервуаром в природе являются грызуны (в т.ч. синантропные) и почва,
- способностью активно существовать и размножаться не только при температуре тела животного и человека, но и при пониженных температурах (4-20°C) в режимах хранения продуктов питания, в условиях холодильников.

Основными средствами диагностики листериоза в России остаются микробиологические методы, требующие значительных трудовых и временных затрат (выделение культуры возбудителя на селективных средах, биохимическая идентификация и т.п.), достаточно дорогостоящие, малопродуктивные. Поэтому остро встает задача создания современных экспрессных высокочувствительных и специфичных средств и методов диагностики листериоза.

Многие публикации предоставляют список преимуществ и недостатков, связанных с использованием бактериофагов. Что касается «фактов за», например, фаги могут являться бактерицидными, могут увеличивать численность в процессе лечения, только минимально нарушая нормальную флору, являются одинаково эффективными против чувствительных к антибиотикам и нечувствительных к антибиотикам бактерий, часто легко обнаруживаемы, способны разрушать бактериальные биопленки и могут иметь низкую присущую им токсичность. «Факты против» использования фагов в качестве диагностических и (или) антибактериальных агентов являются относительно минимальными.

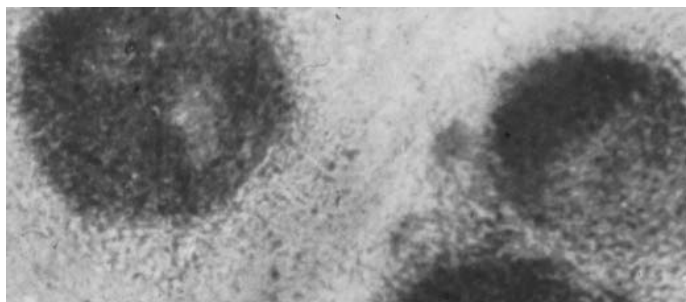


Рис. 3.1. Фаг L 11А с двумя хвостовыми отростками (x 150 000)

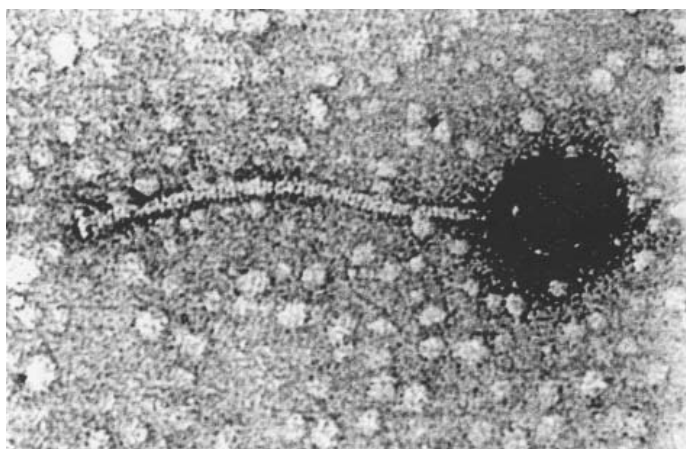


Рис. 3.2. Фаг L 1А с базальной пластинкой в форме пестика (x 144 000)

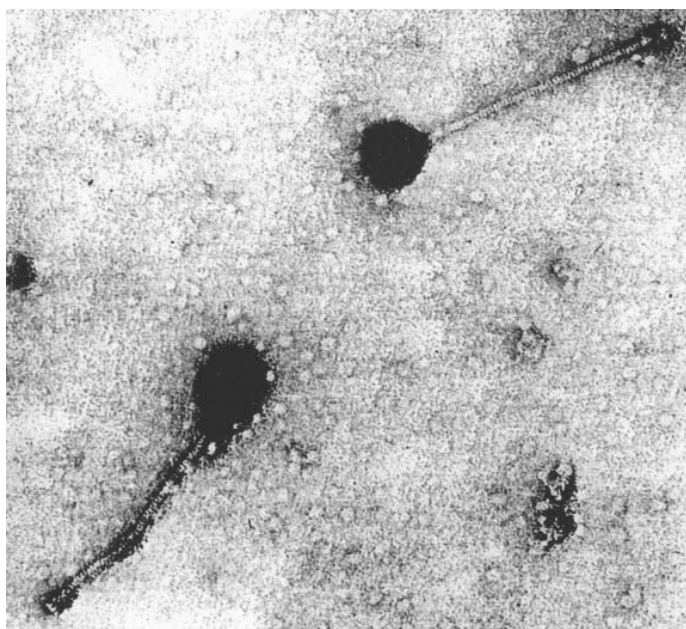


Рис. 3.3. Фаг L 23А, имеющий базальную пластинку в форме пестика, головки фаговых частиц более округлые (x 155 000)

Рис. 3.4. Фаг L 14A с базальной пластинкой «якоревидной» формы (x 215 000)

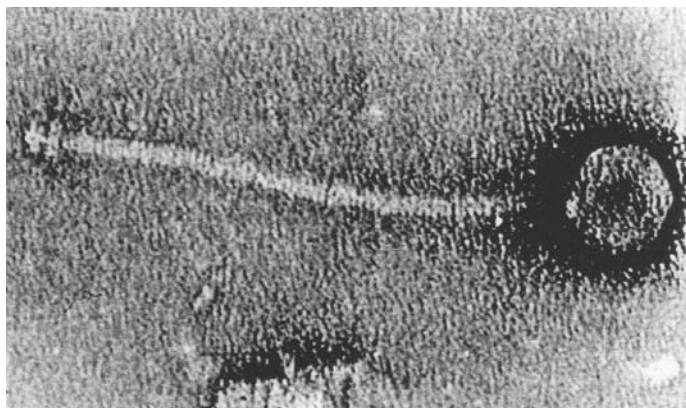


Рис. 3.5. Фаг L 2A с базальной пластинкой в виде выростов (x 190 000)



Рис. 3.6. Листериязная клетка через 50 минут после заражения фагом. Хорошо выражена нитевидная структура ядра, занимающего всю центральную часть цитоплазмы. Ядерные фибриллы ориентированы по длинной оси клетки

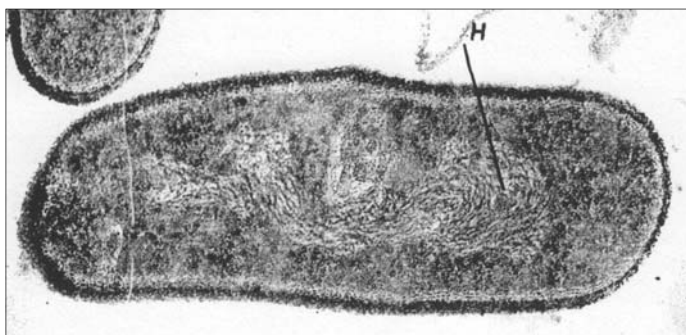
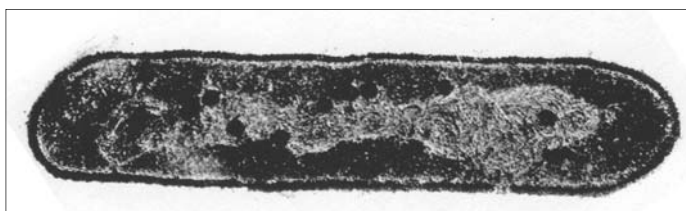


Рис. 3.7. Листериязная клетка через 5 часов после контакта с фагом. Появление плотноупакованных частиц. Некоторые частицы имеют гексагональную форму



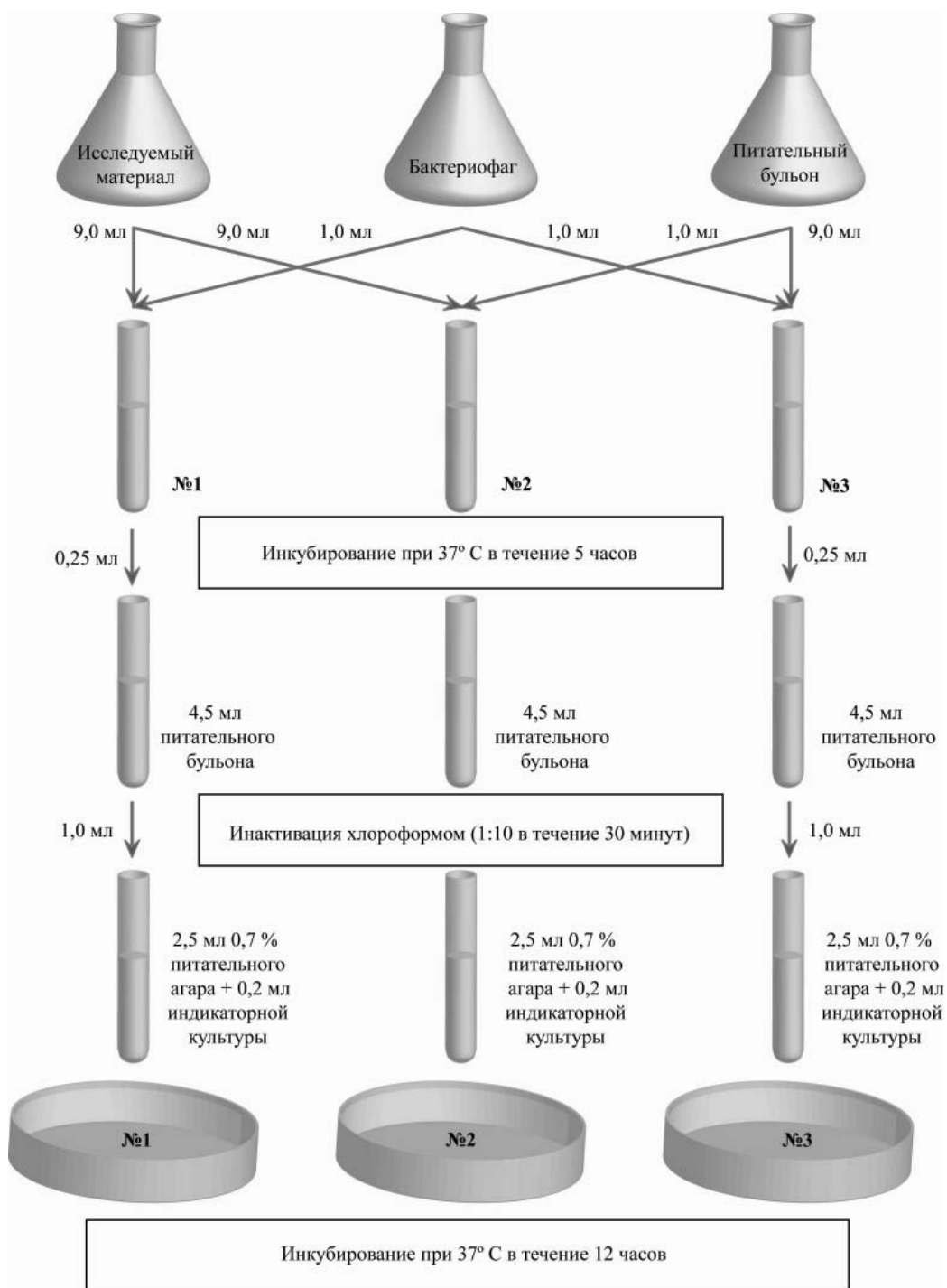


Рис. 3.8. Схема постановки реакции нарастания титра фага (Тимаков В.Д., 1962)

ЧАСТЬ IV

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ

ЛИСТЕРИОЗА

ЭКОЛОГИЯ ЛИСТЕРИЙ

Листерии – микроорганизмы, широко распространенные в природе. Многими исследователями доказано их присутствие в почве и растениях. (Н. Welshimer et. al., 1971, I. Armstrong, 1980). По данным Н. Seeliger (1975) листерии выделяют из проб почвы и растений в 9 – 44 % случаев. Интересно отметить, что самые высокие положительные результаты на наличие листерий были получены с поверхности образцов почвы тех полей, где травы не скашивались несколько лет. Авторы считают, что увядшая и разложившаяся трава способствует накоплению листерий. По данным В. И. Гершуна (1981) способность листерий размножаться в почве зависит от сезона года (температуры), фитомассы (гумуса), влажности и показаний pH. Размножение листерий в почве происходит в осенний период, когда их концентрация возрастает по сравнению с летом. Зимой происходит замедление репродукции бактерий. В весенний период вновь значительно увеличивается количество листерий на единицу веса почвы. Летом в почве отмечается резкое понижение концентрации листерий. Возбудитель листериоза размножается и длительно сохраняется в почвах с высоким естественным плодородием, с содержанием значительного количества фитомассы. В черноземах, лугово-болотной, лугово-каштановой, лесной (но не хвойного леса) почвах листерии выделяются круглый год. Пустынные почвы, пески, такыры не являются средой обитания листерий. Водный баланс почвы оказывает значительное влияние на количество листерий. В почве с влажностью 15 – 26 % листерии не размножаются и их концентрация со временем снижается. При 40 % влажности почвы количество листерий увеличивается в 7 – 11 раз, а при влажности 55 – 70 % их концентрация увеличивается в 100 – 400 раз по отношению к первоначальному показателю.

По данным исследований, проведенных Picard (1989) химический состав почвы не влияет на вирулентность листерий.

В. В. Сливко (1954) указывает, что листерии подобно бруцеллам на глубине 1 – 3 см при низких температурах весны, осени и снежной зимы могут оставаться в почве активными до 6 месяцев. По мнению Н. Seeliger экология листерий на некультивированных полях связана в первую очередь с величинами рН. В их опытах у 22 из 46 проб эти показатели были в пределах 4,8 – 7,6, т.е. соответствовали величинам, характерным для некоторых силосных масс.

В эпизоотологии листериоза давно отмечена связь между клиническими вспышками болезни у животных и использованием в их рационе силоса. В Ирландии листериоз известен как «силосная болезнь». Наблюдения Djlphanson (1945) не только подтвердили это предположение, но и дали возможное объяснение более широкой распространённости листериоза среди жвачных, питающихся силосом, по сравнению с другими животными, получающими иные корма.

В воде листерии сохраняют свою жизнеспособность в зависимости от величин рН, жёсткости воды и окисляемости. При оптимальных условиях эти бактерии сохраняют жизнеспособность в воде до 737 дней. Н. Seeliger (1988) считает, что листерии обладают уникальной возможностью размножаться при очень низкой температуре воды.

Присутствие листерий в фекалиях человека и животных доказано К. Bauen (1962). Поэтому неудивительно, что этот микроорганизм выделяют из сточных и поверхностных вод, и это может способствовать возникновению вспышек листериоза.

N. Stamatini et al. (1957) выделяли листериозную культуру из поймы реки. Причём как на возможный источник контаминации реки авторы указывают на мясоперерабатывающее предприятие, расположенное выше по её течению. Со сточными водами этого предприятия, листериозная палочка разносилась на значительные расстояния, что и послужило причиной заболевания и гибели до 50% форелей в водном бассейне данной реки. Н. Г. Олсуфьев и др. (1959) выделили листериозную палочку в водных протоках и от водяных крыс, обитающих в этих водоёмах. V. Rosca (1962) установил контаминацию листериями ряда естественных водоёмов, расположенных на слиянии рек. Листериозная палочка была обнаружена и у домашних животных (КРС, овцы, свиньи), водопой которых проводился из этих водоёмов.

По данным американской группы исследователей, изучавших распространение листерий в эстуарных водах Калифорнии, листериозная палочка обнаруживалась в 81 % случаев в пресной и слабокислой воде. Причём вид *L. monocytogenes* доминировал в пресной воде, к которой имели доступ сельскохозяйственные животные. К. Colburn (1990); D. Vatking et al., (1981) изучили распространение листериоза в сточных водах, или сточных вод и

речной воде. Листерии были выделены из всех изученных проб воды и ила, причём в ряде случаев в концентрациях, превышающих таковую для сальмонелл. Авторами была отмечена более длительная выживаемость листерий, чем сальмонелл в естественных условиях.

R. Dickstra (1982) исследовал на наличие листерий поверхность воды каналов и озёр в Северной провинции Нидерландов. Из 180 отобранных образцов, в 62 выявляли наличие листерий. Из 25 образцов вод каналов контаминированно листериями – 9, остальные 53 контаминированных образца приходятся на сточные воды. A. Lappi (1986) выделил листериозную палочку из вод реки. По. H. Geuenich (1985) при изучении очищенных сточных вод городской канализации, было выделено 214 штаммов листерий, из них 92,5 % принадлежали *L.monocytogenes*, 4,2 % – *L.innocua* и 3,3 % – *L.zeeligeri*.

H. Skovgard (1988) отмечает, что в отличие от стафилококков, сальмонелл, иерсиний, которые погибают в неаэрированной холодной навозной жиже, листерии, в этих условиях, хорошо сохраняются в течение длительного времени. Использование такой жижи на полях в качестве удобрений, по его мнению, приводит к распространению листерий в окружающей среде.

Листерии распространены в различных климатических районах планеты, даже за Северным полярным кругом (Т. Н. Дунаева и др., 1967). Адаптационные механизмы листерий позволяют им сохранять свою жизнеспособность и размножаться при различных условиях и средах обитания.

Изучение экологии листерий показывает, что этот микроорганизм достаточно пластичен в своей приспособляемости к условиям обитания. Под воздействием антибиотиков и других факторов листерии могут изменяться – появляются R-формы колоний, антибиотикоустойчивые мутанты и, наконец, L-формы листерий. Появление L-форм это защитная реакция микроорганизма на вредные для него воздействия факторов внешней среды и его своеобразная экологическая форма. Образуются они и в организме животных и людей.

«L-трансформация листерий в почве в летний период года под влиянием неблагоприятных условий, – пишет В. И. Гершун (1988), – убедительными данными ещё не доказана, однако не исключена».

Некультивируемые формы листерий

С позиции экологии, листерии способны существовать и размножаться как в объектах внешней среды (абиотические объекты), так и в организме животных и человека (биотические объекты).

Определённым резервуаром листерий являются кровососущие насекомые, мышевидные грызуны и клещи. В работах целой плеяды иссле-

дователей приведены убедительные данные о наличии листерий в их организме.

Изучение эколого-эпизоотологических и эпидемиологических характеристик листериоза людей и животных имеет огромное значение. Н. Seeliger в 1961 году указывал, что листериоз животных установлен в 24 странах. Новые данные по распространению листериоза в мире представлены в работе А. В. Книзе, А. И. Бузун, Р. К. Шарма (1999), которые отмечают что листериоз сельскохозяйственных, диких и синантропных животных в период с 80-х годов XX века по настоящее время регистрировался в 82 странах мира, включая Российскую Федерацию. Таким образом, листериоз можно отнести к числу инфекционных болезней с расширяющимся ареалом. Ежегодно нозоареал охватывал в среднем 40 стран: в Европе – в среднем 20 стран, в Азии – 6 стран. Аналогичная тенденция отмечена в ряде стран Австралии и Океании, Северной и Южной Америки, Африки. Болезнь регистрируется среди многих видов животных, которые по уровню эпизоотологической значимости ранжируются следующим образом:

- 1) мелкий рогатый скот,
- 2) крупный рогатый скот,
- 3) свиньи,
- 4) лошади,
- 5) птицы,
- 6) собаки, кошки, дикие животные.

По данным И. И. Гуславского (1980) листерии выделены от 103 представителей животного мира. Это свидетельствует о широком, почти повсеместном распространении листериоза на земном шаре.

Листериоз животных наблюдается в различных областях и природных зонах России. Первые сообщения о листериозе животных на территории бывшего СССР относятся к 1936 г. (Т. П. Слабоспицкий 1936). С 1936 по 1964 г. опубликовано большое количество сообщений об обнаружении листериоза у животных в различных географических и климатических зонах страны. Только за 1961–1964 гг. листериоз сельскохозяйственных животных был зарегистрирован и описан: – в Азербайджане, Грузии, на Украине; в средней полосе – в Белоруссии, в Псковской, Московской, Калужской, Саратовской и Воронежской областях; на севере страны – в Коми; на Урале; в Казахстане; в Сибири – в Омской и Томской областях, в Бурятии.

Отмечено совпадение пика заболеваемости и расширения нозоареала с увеличением неблагополучия Российской Федерации по листериозу овец (1988–1992 года). Эпизоотический процесс развивался одинаково в странах, где проводились и не проводились прививки против листериоза (Норвегия,

Табл. 4.1. Регистрация случаев заболевания листериозом сельскохозяйственных и домашних животных в различных странах земного шара по данным Всемирной организации здравоохранения с 1957 по 1963 гг. (Animall health year-book. Fao-Who-Ole)

Название страны	Виды животных						
	Птица	КРС	Собаки	Козы	Овцы	Свины	Лошади
Австралия	+	–	–	–	+	–	–
Австрия	+	–	–	–	–	–	–
Бельгия	+	+	+	+	+	+	–
Бирма	–	–	+	–	–	–	–
Болгария	–	–	–	–	+	–	–
Великобритания	+	+	–	–	+	–	–
Венгрия	+	–	–	–	+	+	–
ФРГ	+	+	+	+	+	+	–
Греция	+	+	+	+	+	+	–
Израиль	+	+	–	–	+	–	–
Исландия	–	–	–	–	+	–	+
Канада	+	+	+	+	+	+	–
Куба	+	–	–	–	–	–	–
Голландия	+	+	+	+	+	+	–
Новая Зеландия	–	+	–	–	++	–	–
Норвегия	–	+	–	+	+	+	–
Пакистан	+	+	–	–	–	–	–
Польша	–	–	–	–	+	+	–
Португалия	–	+	–	–	–	–	–
Румыния	–	–	–	–	+	+	–
Северная Ирландия	+	+	–	–	+	–	–
СССР	+	++	–	+	++	++	–
США	+	+	–	+	+	+	–
Турция	+	–	–	+	+	–	–
Финляндия	+	+	–	–	–	–	–
Франция	++	+	+	+	++	+	–
Цейлон	+	–	–	–	–	–	–
Чехословакия	+	+	+	+	+	+	–
Швеция	+	+	–	–	+	–	–
Япония	–	+	–	+	+	–	–

Примечание: + спорадические случаи, ++ умеренная частота по всей стране, – заболевание не регистрировалось.

Нидерланды и др.), что свидетельствует о недостаточной эффективности вакцинации живыми вакцинами.

Проблема листериоза продолжает привлекать практических врачей и научных работников. Ведутся работы по совершенствованию диагностики болезни, типизации возбудителя. Делаются попытки стандартизировать методы диагностики, утверждены ГОСТы и другие документы, регламентирующие работу медицинских и ветеринарных специалистов. Постоянный мониторинг позволяет следить за возникновением новых очагов болезни и ее распространением в странах мира, в том числе и в России.

Анализ эпизоотологических данных по листериозу за 2003 год представлен в табл. 4.2.

Табл. 4.2. Эпизоотологические данные по листериозу за 2003 год

Страна	Вид пораженных животных	Число неблагополучных пунктов	Заболело животных	Из них пало	Мероприятия, в т.ч. вакцинация
Аргентина	КРС	–	–	–	
Белоруссия	КРС	1	1	1	1598
Болгария	Козы	1	12	6	
Чили	КРС	Нет точных данных			
Эстония	Все виды овец	–	5	–	
Финляндия	КРС, козы, лошади, овцы	10	10	1	
		1	1	0	
		0	0	0	
		7	8	4	
Франция	КРС, овцы, козы	Нет информации			
Германия	Птицы, КРС, козы, овцы	1	–	–	
		126	–	–	
		6	–	–	
		53	–	–	
Греция	Овцы, козы	12	45	36	4623
Венгрия	КРС, овцы	–	–	–	
Исландия	Овцы	50	79	13	
Иран	КРС	2	4	0	
Ирландия	КРС, овцы	–	–	–	
Израиль	КРС, козы, овцы	4	4	–	
		0	0	0	
		2	2	–	
Ямайка	КРС, козы	–	–	–	
		1	1	0	
Мексика	КРС	1	1	1	
Новая Зеландия	КРС, овцы, козы	–	–	–	
Норвегия	Овцы / козы	–	–	–	
Казахстан	–	–	–	–	11828
Польша	Свиньи	1	1	0	
Португалия	КРС, овцы	–	18	–	
		–	4	–	
Румыния	КРС	2	2	0	
Россия	КРС, овцы	8	49	8	20300
		4	9	2	428100
Словения	КРС, овцы	8	8	–	
		1	1	–	
Испания	КРС, овцы и козы	1	1	–	
		3	3	–	
Словакия	Овцы	5	123	113	
Швеция	КРС, козы, овцы	6	–	–	
		13	–	–	
		8	–	–	
Украина	Овцы, свиньи	2	69	26	9970
		1	45	35	
Йемен	Козы, овцы	8	48	2	
		7	34	3	

Таким образом, в 2003 году неблагополучных по листериозу у животных было 29 стран, в том числе в 22 странах количество неблагополучных пунктов заболевания повторяется. Сообщается также о числе вакцинированных животных, однако не указано какой вакциной прививали; было ли совпадение серологической принадлежности вакцинного и полевого штаммов листерий. Не отражены показатели эффективности вакцинации.

В большинстве случаев отмечали заболевание крупного и мелкого (овца и коза) рогатого скота, очень редко свиней. И хотя ущерб от листериоза сравнительно невелик, однако необходимо учитывать зооантропонозный характер болезни. В неблагополучных по листериозу странах проводятся мероприятия по профилактике и борьбе с этой болезнью: мониторинг, регистрация случаев болезни, контроль на границе и меры внутри страны, включающие убой пораженных животных и другие меры по недопущению распространения болезни и охрану людей от заражения.

ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ЖИВОТНЫХ РАЗНЫХ ВИДОВ

В естественных условиях листериоз установлен у всех видов сельскохозяйственных животных, многих видов диких животных, грызунов, мелких лабораторных животных, домашней и дикой птицы. Из сельскохозяйственных животных листериоз наблюдается у овец, коз, крупного рогатого скота (в том числе у буйволов), свиней, лошадей, кроликов; из домашней птицы – у кур, гусей, уток, индеек, голубей.

Листериозом болеют животные всех возрастов, однако особая чувствительность наблюдается у молодняка, а также у беременных животных. Преимущественной чувствительности отдельных пород животных к листериозу не установлено. М. L. Gray (1958) наблюдал листериоз у телят в 2–9-дневном возрасте, Пауден (1947) в 3–4-месячном возрасте, А. А. Аннагиев (1960) в 5–7-месячном возрасте, а А. А. Мамедов (1957) в 6–12-месячном возрасте. Ягнята чаще всего болеют в 3–6-месячном возрасте, однако наблюдались случаи заболевания ягнят в подсосном периоде. Листериоз у поросят большинство авторов регистрировало в отъемный период, но описаны случаи заболевания новорожденных поросят (Г. Г. Беденашвили, 1957; L. Hessen, 1957). М. И. Абрамов (1955) в одном совхозе характеризовал листериоз свиней различных возрастных групп следующими цифрами: заболело и пало сосунов 94 %, отъемышей 76 %, подсвинков 36 %; свиноматки и хряки болели, но не погибли. А. А. Вендров (1954) сообщил,

что в начале эпизоотии болели свиньи 4–9-месячного возраста, затем более старших возрастов, однако свиньи старше 1 года болели редко. У жеребят и лошадей листериоз описан в возрасте от 3 месяцев до 5 лет (М. В. Схиладзе, 1953) Листериоз у цыплят З. В. Попова (1955, 1957) наблюдала в 5–6-дневном возрасте.

Чаще всего листериозом болеют овцы. В Германии, как пишет Н. Tham (1962), листериоз в 95,3 % случаев является болезнью овец. Созданным в ГДР листериозным центром при научно-исследовательском институте ветеринарии за 1960 г. выделено 497 штаммов листерий, из них 462 (93 %) от овец, 12 от крупного рогатого скота, остальные от морских свинок, кур, свиней и коз (S. Fechner, 1962). По данным G. Train (1962) за 1961 г., в ГДР из 508 штаммов листерий 470 выделено от овец, 21 – от крупного рогатого скота, 10 – от кур, 2 – от коз, 2 – от кошек, 1 – от свиньи, 1 – от собаки, 1 – от кролика. О. Asahi (1962) с 1951 по 1961 г. выявил в Японии 128 случаев листериоза, из которых 75 обнаружены у овец, 44 у коз, 4 у крупного рогатого скота, 1 у свиньи, 4 у человека. Это положение не относится в равной мере ко всем странам. В Голландии G. Schoor (1962), например, из 475 выделенных штаммов листерий 348 получены от крупного рогатого скота и только 26 от овец. Во Франции А. Lucas (1962) обнаружил преимущественное поражение листериозом птиц, реже он наблюдал это заболевание у млекопитающих. По данным П. М. Свинцова (1946) у нас в стране листериоз, чаще всего регистрировали у свиней. Однако эти данные периодически приходится пересматривать. Так, в 1961–1964 годах, больше всего сообщений в литературе касалось листериоза овец.

Для решения вопроса о преимущественном поражении листериозом того или иного вида сельскохозяйственных животных в этот период нами за 100 % были приняты данные, характеризующие количество неблагополучных пунктов, больных и павших животных с 1956 по 1964 г.

Оказалось, что наиболее пораженным видом сельскохозяйственных животных в СССР являлся мелкий рогатый скот, на долю которого пришлось за 9 лет 69 % неблагополучных пунктов, 72 % больных и 77 % павших животных. Пораженность свиней характеризовалась следующими цифрами: неблагополучных пунктов 25 %, больных животных 27 % и павших 22 %. Менее всего был поражен крупный рогатый скот (6,22 %; 0,96 % и 0,99 % соответственно). А. А. Пальгов и Л.П. Лемешкина (1963) также указывали, что в Казахстане по заболеваемости листериозом на первом месте стояли овцы – 69 %, затем свиньи – 17 %, крупный рогатый скот – 13,7 %, лошади – 0,3 %.

На основании всех представленных данных можно утверждать, что в животноводстве группой риска по листериозу являются овцы.

Спонтанный листериоз у лабораторных животных (морских свинок, кроликов) впервые наблюдали Мюррей, Уэбб и Суэнн. Листериоз морских свинок описан и в нашей стране (В. Я. Головачёва 1957, Н. И. Кожеватова 1957).

Листерии были выделены при исследовании многих видов диких животных, представителей различных отрядов: отряд грызунов – лесные, полевые, домовые мыши, пеструшки, полевки, серые крысы, водяные крысы, лемминги, песчанки, тушканчики, шиншиллы, белки, суслики, тарбаганы, зайцы; отряд хищных – хорьки, соболи, норки, скунсы, еноты, дикие кошки, лисицы, корсаки, песцы, енотовидные собаки, леопард; отряд парнокопытных – косули, лани, серны, джейраны, сайгаки, дикие свиньи; отряд насекомоядных – куторы, бурозубки, ежи; отряд рукокрылых – летучие мыши; отряд воробьиных – воробьи, канарейки, дрозды, скворцы, сороки; отряд куриных – серые и белые куропатки, фазаны, тетерева, глухари; отряд гусиных – дикие утки; отряд попугаев – попугаи; отряд сов – полярные совы; отряд хищных птиц – орлы.

Проведенный нами анализ материала по грызунам выявил пораженность листериозом различных видов (ондатра обыкновенная, крыса серая, стадная полевка, домовая мышь, бурозубка обыкновенная, узкочерепная полевка, полевая мышь, полевка рыжая, мышь-малютка, полевка водяная, сибирская красная полевка, степная пеструшка и др.) на территории Западной Сибири (Алтайский край), Казахстана, Москвы и Московской области, Тульской области. В Москве на объектах и открытых территориях возбудитель листериоза выделяли в 1992–1999 гг. в 0,14 % случаев. Пораженность отдельных видов характеризовалась следующими цифрами: домовые мыши 0,13 %, крысы 0,17 %, полевые мыши 0,05 %, полевки обыкновенные 0,25 %, рыжие полевки, лесные мыши, землеройки до 1 %. Чаще выделяли листерии на плодоовощных объединениях города – 32,5 %, на открытых станциях – 31,2 %; других объектах: коммунальных – 21,7 %, пищевых – 4,9 %, промышленных – 4,5 %. Культуры листерий выделены от гамазовых клещей на территории Тимирязевской сельскохозяйственной академии, от блох на территории аэропорта Шереметьево, из погадок хищных птиц в пойме реки Москвы (совхоз «Тепличный»), из гнезда обыкновенной полевки в пойме реки Городна.

Листерии были выделены из иксодовых и гамазовых клещей, блох, вшей, а также из личинок оводов.

V. Rosca (1962) обнаружил заражение листериозом рыб и лягушек. Этот же возбудитель установлен у домашних животных (крупный рогатый скот, овцы, свиньи), которых поили из этих водоемов. Н. Г. Олсуфьев, В. Г. Петров и К. Н. Шлыгина (1959) также выделяли листерии из воды ручьев и от во-

Табл. 4.3. Результаты бактериологического исследования на листериоз материала от млекопитающих и членистоногих

Административная территория	Проведено исследований	Выделен возбудитель
1992 год		
Российская Федерация	26	1
Тульская область	1	1
1993 год		
Российская Федерация	6237	8
г. Москва	1212	
Липецкая область	84	
1994 год		
Российская Федерация	13226	21
Челябинская область	76	13
Вологодская область	15	
г. Санкт-Петербург	231	22
Калужская область	7	
Тульская область	577	11
Липецкая область	1263	2
1995 год		
Российская Федерация	18108	5
Карелия	53	1
Вологодская область	29	2
г. Москва	510	2
1996 год		
Российская Федерация	10192	19
Мурманская область	204	1
г. Москва	204	1
Вологодская область	289	8
Челябинская область	72	3
Камчатская область	212	6
1997 год		
Российская Федерация	12768	16
Карелия	107	1
Владимирская область	99	2
г. Москва	203	4
Московская область	517	1
Волгоградская область	145	
Республика Саха (Якутия)	183	1
Амурская область	294	4
1998 год		
Российская Федерация	1765	341
Карелия	70	4
Калужская область	114	29
Московская область	1065	
1999 год		
Российская Федерация	23178	101
Брянская область	44	14
г. Москва	334	22
Волгоградская область	243	
Пензенская область	512	
Амурская область	317	

данных крыс, которые обитали в этих водоемах. Стаматин (1957) наблюдал заболевание и гибель форелей от листериоза. Наблюдались случаи заболевания листериозом кошек, собаки обезьян.

ИСТОЧНИКИ ИНФЕКЦИИ, ПУТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО АГЕНТА ВО ВНЕШНЮЮ СРЕДУ, СПОСОБЫ ЗАРАЖЕНИЯ, ПУТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ БОЛЕЗНИ

Одним из основных источников инфекции при листериозе являются больные животные, выделяющие возбудителя болезни во внешнюю среду с истечениями из носовой полости, из половых органов (при абортах), с абортированным плодом, с калом, мочой, молоком (при листериозных маститах), а также животные – листерионосители.

Возникновение листериоза связано с выпасом животных на территории неблагополучных пастбищ, с пастьбой по неблагополучным пастбищам, с вводом животных в помещения, где раньше наблюдалось заболевание скота листериозом. В ряде случаев обнаруживается связь заболевания среди людей и животных с наличием листериоза и листерионосительства среди грызунов. Последним отводится роль основного резервуара листериозной инфекции в живой природе (таблица 4.3.).

Уже в 40–х годах прошлого столетия, П. М. Свинцов (1946) указывал на возможность контактной передачи «заразного начала», а М. М. Халимбеков (1955) в эксперименте показал, что при совместном содержании больных листериозом животных со здоровыми, у последних может вспыхнуть заболевание. G. C. Porpensiek (1944) описал случай листериозного аборта у овцы. Спустя 37 дней после этого были отмечены случаи заболевания листериозом крупного рогатого скота, выпасавшегося на том же пастбище. R. Jensen, D. R. Mackey (1949) наблюдали листериоз крупного рогатого скота в загонах, где до этого содержались овцы, подозреваемые в заражении данной болезнью. W. D. Pouden, D. S. Bell, R. E. Mairs (1947) сообщили о случае заболевания листериозом телят 3–4-х месячного возраста, которых при перегоне задержали на некоторое время в загоне, где раньше содержались больные листериозом овцы.

Наблюдения за больными листериозом животных в естественных условиях и изучение способов экспериментального заражения позволяют в настоящее время определить основные пути заражения при листериозе. В экс-

перименте удастся заразить животных алиментарно, интрацеребрально, интраназально, подкожно, внутримышечно, путем инстиляции культуры на конъюнктиву глаза и респираторным путем.

В естественных условиях заражение, очевидно, происходит через носовую полость, конъюнктиву глаза, пищеварительный тракт, органы дыхания, а также через поврежденную кожу. Животные могут заражаться при питье из водоемов и луж, а также при поедании соломы и зернового корма, загрязненных выделениями больных листериозом животных, в особенности грызунов. В стойловый период животные могут заражаться от грызунов, обитающих в животноводческих помещениях.

Вторым по значимости источником инфекционного агента являются корма. Ряд зарубежных исследователей (С. Lehnert 1964, Н. Thamm 1962, D. Urbanek 1961) сообщали о частых случаях заболевания животных листериозом в связи со скармливанием силоса. После перемены корма (прекращение кормления силосом) заболевания не наблюдалось. Возможно, однообразное кормление силосом, особенно без добавок минеральных веществ, снижает резистентность организма животных к возбудителю листериоза.

М. Borkenhagen (1964) считает, что особое значение имеет не вид силоса, а его рН и качество. В качественном силосе с рН 3,8 – 4,2 листерии погибают. Плохой силос с рН 5,6 – 5,9 способствует дальнейшему размножению возбудителя. В связи с тем, что листерии хорошо размножаются при низких температурах, зимой может наблюдаться так называемое «обогащение холодом». Поэтому особенную опасность представляет покровный, а также сильно загрязненный, подмороженный силос.

Определенную роль в заражении животных листериозом играет инфицированность внешней среды. А. Skogsholm (1962) указывает, что ему удалось выделить культуру листерии из фекалий овец, силоса и подстилки, причем из подстилки на неблагополучной ферме выделяли листерии спустя 2 и 4 месяца после последнего случая заболевания. Л. А. Поманская (1962) доказала, что листерии способны не только сохраняться, но и размножаться в почве и воде.

На основании изучения эпизоотологии листериоза в ГДР Н. Thamm (1962), сделал заключение о том, что листерии являются почвенными бактериями. Животные заболевают листериозом исключительно в местностях с определенными видами почвы, такими, как лессовая, черноземная, суглинистая. В местностях с песчаными и известковыми почвами заболевания листериозом животных не встречаются или наблюдаются редко.

J. Fechner, G. Train (1962), исходя из того, что люди в ГДР болеют листериозом в течение всего года, а животные исключительно в I и II кварталах

года, сделали вывод об отсутствии связи между заболеваниями людей и животных. По мнению авторов, заражение происходит вследствие контакта с инфицированными предметами внешней среды.

Особенно опасными распространителями листериоза являются мышевидные грызуны. Многочисленными наблюдениями в различных районах страны на большом материале наглядно показано то серьезное значение, которое имеют грызуны в эпизоотологии и эпидемиологии листериоза. Ряд наблюдений посвящен выявлению листерий у грызунов в крупных городах (Москва, Киев, Харьков, Иркутск, Хабаровск) и портах (Владивосток).

Полученные факты указывают на пути борьбы с распространением этого заболевания и контаминацией возбудителем листериоза внешней среды, окружающей человека и животных.

Приведенные ниже данные убедительно подтверждают высказанное положение.

Н. С. Огнева в 1953 – 1961 гг. проводила исследование грызунов и насекомых, выловленных на территории Москвы. Всего было исследовано 157 750 различных животных. При этом удалось выделить 83 штамма листерии (20 от серых крыс, 21 от домашних мышей, 38 от обыкновенных полевых, 3 от рыжих полевых, 1 от полевой мыши). За этот же период при очесывании грызунов и обследовании их гнезд собрано 63 600 блох, 49 500 клещей и 10 500 вшей, при исследовании которых выделены культуры листерии – от гамазовых клещей (*Haemolaelaps glasgowi*), снятых с обыкновенной полевки, и от вшей, счесанных с рыжих полевых. При исследовании более 20 тыс. зверьков из ближайших районов Московской области листерии выделены от рыжих полевых, домашних мышей и землероек.

По наблюдениям автора, листериоз широко распространен по всей территории города, но чаще регистрируется на окраине, чем в центре. Наибольшее количество культур было выделено от обыкновенных полевых, обитавших в овощехранилищах, парках, садах и животноводческих помещениях. Наиболее зараженными оказались домашние мыши в овощехранилищах и животноводческих хозяйствах. Инфицированные серые крысы обнаруживались только в животноводческих хозяйствах, жилых домах и торгово-промышленных объектах города.

Г. Г. Юрков (1962) при изучении листериоза в Луганской области установил взаимосвязь между количеством энзоотических вспышек листериоза сельскохозяйственных животных и численностью мышевидных грызунов. Последняя, в свою очередь, зависела от погодных-климатических условий и урожайности зерновых культур. J. W. Osebold, G. Shultz, E. M. Jameson (1957) сообщили, что в местности, где был листериоз среди сельскохозяйственных

животных, наблюдался также листериоз у скунсов и енотов. Выделенные культуры листерий от крупного рогатого скота, овец и скунсов принадлежали к одному серотипу.

Эпизоотии листериоза среди грызунов описаны Н. Г. Олсуфьевым и О. С. Емельяновой (1954), Л. А. Поманской (1957), причем последняя подчеркивает необходимость исследования объектов внешней среды, как материала для обнаружения листерий. Ею выделены культуры листерий из замерзшей мочи грызунов, гнезд грызунов, мякины. П. Н. Глаголева и О. С. Емельянова (1955) сообщили, что в одном из районов средней полосы европейской части России ежегодно регистрировались эпизоотии листериоза среди полевок, которые особенно усиливались при увеличении численности грызунов. Возбудитель листериоза удавалось выделить от грызунов, добытых из ометов и скирд в период с ноября по май. В летнее время листериоз грызунов не регистрировали.

По данным Л. А. Тимофеевой и В. Я. Головачевой (1962), в период 1956 – 1961 гг. врачами противочумных организаций в Приморском, Хабаровском краях, Читинской и Кокчетавской областях, г. Иркутске, Тувинской и Бурятской АССР выделено 106 культур листерий от 16 видов грызунов (серой и черной крыс, крысовидного хомячка, домовой и полевой мыши, тарбагана, суслика даурского и длиннохвостого, полевок – Брандта, стадной, узкочерепной и красной). Листерии были выделены из эктопаразитов, снятых с грызунов, гнезд мышей и полевок, а также из почвы, сточной воды и воды ручья.

В. Н. Курятникова (1962) в Забайкальском чумном очаге выделила культуры листерий от даурских сусликов и тарбаганов. О. А. Михайлова и Т. И. Якунина (1962) сообщили, что при исследовании 3717 грызунов (серые, черные, александрийские крысы, домовые мыши), выловленных в г. Владивостоке, и 800 блох, собранных с этих грызунов, ими выделено 7 культур листерий: 6 от серых крыс и одну из блох *Ceratophyllus anisus*.

О. И. Клименко (1957) от полевых мышей, выловленных в окрестностях г. Хабаровска, также выделила культуры листерий. О. А. Антипьева, Н. М. Бусоедова, О. И. Клименко (1962) за 1957 – 1961 гг. исследовали 16 936 грызунов и выделили 31 культуру листерий. Авторы указывают, что в 1960 г. в Хабаровском сельском районе была зарегистрирована эпизоотия листериоза среди грызунов на участке протяженностью 40 км и площадью 700 км². С января по май в этих районах выделили 18 культур листерий. О. А. Антипьева, В. М. Липаев, М. А. Гарбузов и А. Д. Калмыкова (1962) подвергли исследованию 9844 грызуна (в основном полевая мышь – 59,4 %) и 751 гнездо этих грызунов. Из органов грызунов было выделено 4 культуры, из гнезд – 20 культур листерий.

По данным И. А. Степановой, В. М. Ступницкой и Е. Ф. Литвиненко (1959), в 1956 г. в Запорожье была установлена эпизоотия листериоза среди грызунов, культуры при этом были выделены от 15 домовых мышей. В 1957 г. авторы наблюдали эпизоотию листериоза у обыкновенных полевых в скирдах овса. При исследовании 86 199 клещей выделили 32 культуры листерий, в том числе 18 от клещей *Ixodes ricinus* и *Dermacentor pictus*.

Л. П. Штолина и В. Л. Адамович (1962) выделили культуры листерий от клещей *Ixodes ricinus* и *Dermacentor pictus*, от полевых, лесных, домовых мышей, полевых, водяных крыс и из болотной воды. Они обнаружили эпизоотию листериоза среди грызунов, причем интенсивность ее повышалась зимой и весной 1958–1959 гг., в особенности в пойме реки Припять, где в это время значительно увеличилась численность водяной крысы и обыкновенной полевки (22 % попадаемости на 100 ловушко-дней). Зимой 1959/60 г. при исследовании грызунов выделить листерий не удалось (попадаемость составила только 3 % на 100 ловушко-дней). Авторы сделали вывод о том, что листериозу свойствен межэпизоотический период. Инфицированность внешней среды возбудителем листериоза повышается за счет нарастания численности заражения мышевидных грызунов.

В. И. Юркина (1963) в Херсонской области выделила культуру листерий из блох *Ophthamopsylla volgenais* Wagn и *Ioffi Ctenophthalmus orientalis* Wagn, собранных из гнезд емуранчика (*Scirtopoda telum*).

А. П. Мороз и О. П. Хижинская (1959) в 1954–1956 гг. подвергли бактериологическому исследованию 35 тыс. грызунов, выловленных в различных районах г. Киева и его окрестностях, и выделили 38 культур листерий, в том числе 5 от домовых и 33 от серых крыс. Часть грызунов была отловлена в сараях для хранения овощей, на продуктовых базах, в кухнях и мясных магазинах, в жилых помещениях (дачи, общежития).

Свободноживущие грызуны оказались весьма чувствительными к экспериментальному заражению листериозом. Особенно опасным является длительное листерионосительство, обнаруженное у отдельных видов грызунов после экспериментального заражения листериозом.

Ф. А. Абушев и М. А. Мусаев (1964) установили высокую чувствительность песчанок Виноградова, персидской, малазиатской, краснохвостой песчанок, домовых мышей к возбудителю листериоза. Серых хомячков заразить листериозом не удалось. Установлено листерионосительство у песчанок Виноградова до 267 дней, у персидских до 29, у малоазиатских песчанок до 30, у краснохвостых песчанок до 21 дня.

В экспериментах Н. С. Огневой (1964) наиболее восприимчивыми к листериозу оказались рыжие и обыкновенные полевки и домовые мыши. Зараженные грызуны выделяли возбудителя листериоза с мочой и калом,

а листерионосительство у них продолжалось до 30 суток (срок наблюдения). Скармливанием подстилки, остатков корма от больных зверьков, а также трупов погибших от листериоза грызунов удалось вызвать заболевание у 25 из 49 взятых в опыт грызунов, 7 из них погибли, у остальных отмечено клиническое заболевание с выздоровлением или бессимптомное носительство.

С. Е. Сорокина (1953) в эксперименте установила чувствительность нутрий к листериозу. По данным И. Л. Мартиневского (1962), большая песчанка оказалась высокочувствительной к листериозу (DLM-100 микробных тел, а для белой мыши соответственно 10^6 – 10^8 млн. микробных тел). Генерализация инфекции у песчанок наступала на четвертые сутки (у белых мышей на седьмые сутки) и бактериемия была более ярко выражена, чем у белых мышей.

Приведенные данные убедительно говорят о серьезной роли грызунов в эпизоотологии и эпидемиологии листериоза.

На основании многочисленных наблюдений и результатов экспериментов следует сделать вывод о возможности циркуляции возбудителя листериоза между дикими (в частности, грызунами) и домашними животными. В указанной циркуляции листерий, по-видимому, играют определенную роль кровососущие насекомые и клещи. Проведенные нами опыты показали, что иксодовые клещи (личинки, нимфы, самки), подсаженные на экспериментально зараженных листериозом морских свинок и овец, способны инфицироваться. Подтверждено наличие трансфазной передачи листерий (от нимф к имаго). Подсадкой голодных имаго, получивших заразное начало от инфицированных нимф, удалось заразить листериозом лабораторных животных. Заразить овец таким же способом не удалось. Процент инфицированности клещей, снятых с больных листериозом животных, был незначительным. Одновременно нами установлено снижение вирулентности листерий, выделенных из клещей, паразитировавших на экспериментально зараженных овцах (здесь, возможно, речь идет не только о трансформации, но и о селекции части популяции, как наиболее приспособленной в существовании в клещах). Этот факт имеет важное эпизоотологическое значение, так как он свидетельствует о возможной трансформации листерий в природных условиях, снижении их вирулентности по мере пассажей через клещей и потере такими ослабленными штаммами роли этиологического фактора. Однако следует заметить, что пассаж через белых мышей в этих опытах позволил восстановить исходную вирулентность штаммов (это как раз свидетельство селекции).

М. К. Ганиев и Д. Г. Мамедова (1962) в своих опытах показали, что листерии сохраняются в организме иксодовых клещей до 18 месяцев – на всех

стадиях их превращения (от имаго до имаго). У бычка, которому подсадили свежезараженных имаго, авторы установили повышение температуры тела и выделили культуру листерий из мочи.

Н. С. Огнева (1964) в эксперименте на белых мышах установила способность блох (*Leptopsylla segnis*) переносить возбудителя листериоза. Аналогичные результаты получены А. К. Рассказовой и В. Н. Прокопьевым (1962) с блохами *Oropsylla silantiewi*, *Ceratophyllus tesquorum*, *Frantopsylla luculenta*, *Neopsylla pleskei* и *Neopsylla bidentati-formis*. Блохи *C.silantiewi* сохраняли возбудителя при температуре 12–15 °С до 7 суток, а блохи *C.tesquorum* до 16 суток. По сообщению Ф. А. Абушева, гамазовые клещи *Haemolaelaps*, *H.nidi* и *H.glasgowi* способны воспринимать листерии при кормлении на больных песчанках.

Как пишет И. А. Даньшев (1963), ему не удалось вызвать заболевание у кроликов при кормлении на них, зараженных листериозом клещей *Dermacentor marginatus*, за исключением одного случая, когда в опыт был взят слабый кролик. Однако при бактериологическом исследовании яиц, отложенных насосавшимися самками, обнаруживали листерии, а мыши, зараженные суспензией из этих яиц, пали от листериоза. Автор расценивал эти опыты как доказательство отсутствия передачи возбудителя листериоза клещами. С нашей точки зрения, автор установил факт восприятия листерий клещами при кормлении последних на зараженных животных. Инфекционный агент восприимчивым животным передавался, а клинически выраженное заболевание возникло лишь у одного слабого индивидуума, резистентность организма которого была снижена. Этот факт еще раз подчеркивает важность роли факторов, снижающих резистентность организма, в возникновении листериоза у животных. Автор также установил, что вирулентность листерий, выделенных от личинок, нимф и имаго, уступала вирулентности исходных штаммов.

Дальнейшие опыты показали, что шесть видов иксодовых клещей: *Rhipicephalus bursa* (имаго и личинки), *Haemophysalis neumanni* (имаго, нимфы, личинки), *Hyalomma asiaticum* (имаго), *H.plumbeum* (имаго), *Ixodes persukatus* (имаго), *I.rieinus* (имаго, личинки) – способны воспринимать листерии при кормлении на зараженных лабораторных животных.

Большое значение имеет установленный в ходе исследований феномен восприятия листерий аргасовыми клещами, хотя Ф. А. Абушев и М. А. Мусаев (1964) указывали, что клещи *Ornithodoros alactagalis* не способны передавать возбудителя листериоза.

Эти клещи, как обнаружено многими исследователями, являются хранителями и переносчиками возбудителей различных инфекционных болезней, причем отдельные патогены сохраняются в организме аргасовых клещей до

25 лет. Вероятна определенная роль этих клещей в поддержании листериоза в живой природе и обеспечении стационарности этого заболевания.

Учитывая все вышесказанное, можно сделать вывод, что кровососущие насекомые и клещи – возможный, но не основной фактор передачи заразного начала при листериозе. Подтверждением этому служит то, что сезон паразитирования клещей на овцах не совпадает с установленной нами сезонностью листериоза у мелкого рогатого скота. Следует отметить, что обнаружение листерий в клещах были единичными и составляют весьма незначительный процент от общего количества исследованных клещей. Прямого заражения инфицированным клещом сельскохозяйственного животного в эксперименте также не было получено, если не считать работу М. К. Ганиева и Д. Г. Мамедовой (1962), которым удалось заразить бычка листериозом, но для этого они использовали недокормленных на другом инфицированном животном клещей, а такой феномен наблюдается в природе очень редко.

По нашему мнению, инфицированный клещ (или несколько клещей) не способен передать сельскохозяйственному животному дозу, достаточную для того, чтобы вызвать заболевание. Опыты по искусственному заражению сельскохозяйственных животных листериозом показали их высокую устойчивость, в частности к введению листерий под кожу. Но одновременно мы не можем полностью исключить возможность размножения листерий в организме инфицированного таким образом животного и создание дремлющего очага. Ослабление, в последующем, резистентности организма животного в результате воздействия каких-либо неблагоприятных факторов может активизировать этот очаг и вызывать клинически выраженное заболевание. Так, овца, инфицированная клещом в летний период, может стать носителем и затем зимой или весной, попав в неблагоприятные условия содержания и кормления, заболеть листериозом.

Несколько иное положение, очевидно, с мелкими млекопитающими, грызунами. Их чувствительность к заражению листериозом очень велика, о чем уже говорилось раньше. И поэтому для них передача заразного начала при листериозе кровососущими насекомыми и клещами имеет большее значение, чем для сельскохозяйственных животных, не исключая при этом и других способов распространения болезни. Надо учитывать также, что у грызунов в отличие от сельскохозяйственных животных чаще заболевание протекает в септической форме, что облегчает передачу листерий кровососущими насекомыми и клещами.

Характерной особенностью листериоза, имеющей важное эпизоотологическое значение, является длительное, бессимптомное листерионосительство, имеющее место у сельскохозяйственных животных и гры-

зунов. Ю. А. Малахов (1960), например, обнаружил в неблагополучных свиноводческих хозяйствах до 21 % животных-листерионосителей и до 9 % животных-листериовыделителей. Поросята, зараженные листериозом, выделяли возбудителя болезни с мочой до 5 дней, с носовой слизью до 17 дней, с калом до 22 дней и оставались листерионосителями до 45 дней с момента заражения. В этих же хозяйствах до 2 % исследованных крыс оказались листерионосителями, а пробы кала крыс, собранные в животноводческих помещениях, содержали листерии в 0,41 % случаев. Экспериментально зараженные крысы переболевали бессимптомно и выделяли при этом листерии с носовой слизью, калом и мочой до 20 дней, оставаясь листерионосителями до 50 дней.

Интересный факт приводит J. Donker-Voet (1965). Она наблюдала листериозный мастит у коровы, причем листерии выделялись из всех четырех долей вымени в течение более чем трех лет.

Ф. А. Абушев и М. А. Мусаев (1964) наблюдали листерионосительство у песчанок до 267 дней, Н. С. Огнева (1964) у полевок и домовых мышей – до 30 суток.

Примером такого скрытого носительства может служить случай, наблюдавшийся (И. А. Бакулов, Н. Г. Трегубова (1959) на одной из биофабрик. Группу овец заразили вирусом-фикс в мозг для получения антирабической вакцины. Через 36 часов после заражения наблюдался падеж овец с явлениями поражения центральной нервной системы (из 40 зараженных овец пало 18). При вскрытии установлен менингоэнцефалит. Из головного мозга павших овец выделена вирулентная культура листерии.

При обычном течении процесса в результате заражения вирусом фикс овцы проявляли клинику бешенства на 6–7-е сутки, в данном же случае заболевание и гибель овец происходили на вторые сутки. Для заражения использовался вирус-фикс, который поддерживался непрерывным пассажем на овцах. Отдельные кусочки мозга от зараженной вирусом-фикс овцы сохранялись до заражения следующей партии в глицерине. Перед заражением проверяли вирусосодержащую мозговую ткань на микробиологическую чистоту. Остатки вызвавшего заболевание прививного материала также оказались не контаминированными. Овец перед заражением клинически осматривали и термометрировали. Известно, что у овец чаще всего наблюдается нервная форма листериоза, причем при бактериологическом исследовании листерии выделяются только из головного мозга. Исходя из этого, можно сделать вывод, что в данном случае причиной внезапного заболевания овец было наличие среди овец, взятых для заражения, большого количества листерионосителей, внутримозговое заражение которых вирусом фикс послужило толчком к обострению скрытой листериозной инфекции. Наличие ли-

стериионосителей подтвердилось исследованиями овец с помощью реакции агглютинации с листериозными антигенами. Из 800 исследованных овец выявлено 11 реагирующих в титре 1:400, 13 – в титре 1:200.

Факты обострения носительства листерий у животных в результате внешнего неблагоприятного воздействия неоднократно описывались в литературе. Примером могут служить опыты В. Г. Пинчука (1957) с радиоактивным стронцием на крысах. Среди крыс, взятых для опытов, оказалось большое количество листерионосителей. Крысам ввели внутрибрюшинно радиоактивный стронций. В результате ослабления резистентности организма в связи с внутренним облучением бета-частицами крысы погибли от листериоза, хотя та же доза стронция у неинфицированных крыс не вызывала серьезных изменений в состоянии организма.

Листерионосительство у клинически здоровых животных представляет угрозу заболевания листериозом при ослаблении резистентности организма в результате влияния неблагоприятных факторов внешней среды: резкие колебания погоды, недостаточное и неполноценное кормление, плохие условия содержания, беременность и др. Интересны наблюдения П. П. Сахарова и Е. И. Гудковой (1959), которые зарегистрировали одновременное заболевание листериозом животных после резкого похолодания. На основании этого они сделали вывод об определенном значении температурного фактора в возникновении заболевания, по-видимому, у листерионосителей.

Многочисленные случаи обнаружения листерий у диких животных, наблюдения над эпизоотиями листериоза среди свободноживущих грызунов, факты обнаружения возбудителя у разного рода кровососущих насекомых и клещей, эпизоотологические особенности болезни (наличие стационарности, повторяемости болезни в неблагополучных пунктах) – все это позволяет высказаться в пользу существования природных очагов листериоза.

Н. Г. Олсуфьев (1954) относил листериоз к числу нетрансмиссивных природноочаговых болезней. Однако, учитывая наблюдения в естественных условиях и опыты по передаче возбудителя листериоза кровососущими насекомыми и клещами, о которых уже сказано, листериоз следует отнести к числу факультативно-трансмиссивных болезней с природной очаговостью.

В. Адамовичем и И. Ойцось (1963) был зарегистрирован природный очаг листериоза в одном из заповедников Волынской области, где в февралемарте 1962 г. наблюдали массовую гибель косуль (погибло около 200 животных, или 20–25 % стада).

R. G. Scholtens, A. Brim (1964) исследовали головной мозг 20 лисиц, подозреваемых в заболевании бешенством. У пяти животных были выделены культуры листерий. Зараженные лисицы были пойманы в различных

округах штата Джорджия (США), отстоящих друг от друга на большом расстоянии.

Таким образом, пути распространения листериоза в природе могут быть представлены в виде схемы, из которой видно, что основным резервуаром возбудителя листериоза в природе следует признать грызунов. Они являются причиной заражения листериозом сельскохозяйственных животных, чаще всего через инфицированную внешнюю среду. Сельскохозяйственные животные являются, в свою очередь, основной причиной заболевания людей, которые заражаются главным образом при использовании в пищу животноводческих продуктов. Как установлено в последнее время, человек также не является «тупиком» для листериоза, ибо он может распространять болезнь путем внутриутробного заражения плода, половым путем, а также при родах и родовспоможении. Заражение сельскохозяйственных животных от человека, больного листериозом, никем не описано и представляется маловероятным.

ХАРАКТЕР ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ В ХОЗЯЙСТВЕ, СЕЗОННОСТЬ, ПОВТОРЯЕМОСТЬ, ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ, СМЕРТНОСТЬ, ЛЕТАЛЬНОСТЬ

Для правильной постановки диагноза на листериоз необходимо знать основные наиболее характерные черты течения этой болезни в хозяйстве. Это позволит в комплексе с другими данными уверенно распознавать заболевание животных листериозом.

Сезонность. Многим инфекционным болезням людей и животных свойственна сезонность – преимущественное проявление в определенные сезоны года. Эпизоотология богата примерами ярко выраженной сезонности отдельных инфекционных заболеваний животных (рожа свиней, эмфизематозный карбункул крупного рогатого скота, инфекционный энцефаломиелит лошадей). Изучение сезонности болезни имеет большое значение для диагностики, так как позволяет с учетом других факторов более точно распознавать соответствующие заболевания. С другой стороны, знание сезонности определенного заболевания позволяет прогнозировать его возможное появление и соответствующим образом строить систему мероприятий по профилактике и борьбе с этой болезнью.

О сезонности листериоза сельскохозяйственных животных единого мнения нет. Большинство исследователей наблюдали листериоз животных в нашей стране в зимнее-весенний период или в осенний и зимнее-весенний периоды

года. М. М. Халимбеков (1955) и А. А. Мамедов (1957), наблюдавшие листериоз животных в Азербайджане, указывают на летнее-осеннюю сезонность этого заболевания. А. М. Ханкишиев (1959) с этим мнением не согласен и считает, что листериоз в Азербайджане можно наблюдать в течение всего года.

А. Л. Корнилова (1953) и П. С. Соломкин (1959) считают, что листериоз животных может быть зарегистрирован в любое время года; появление болезни они связывают с влиянием неблагоприятных факторов внешней среды, снижающих резистентность организма животных.

П. С. Пономарев (1957) наблюдал заболевание поросят листериозом в начале лета. В. И. Попов (1960) пишет, что листериоз свиней проявлялся в любое время года, но чаще регистрировали случаи болезни весной и летом.

По данным А. А. Пальгова и Л. П. Лемешкиной (1963), период массового заболевания животных листериозом совпадает со стойловым периодом содержания. Максимум заболевания достигает в феврале-марте, затем отмечается спад, а с ноября-декабря подъем заболеваемости. Летом наблюдались только спорадические случаи.

Зарубежные авторы также указывают на зимнее-весеннюю сезонность болезни. G. Trautwein, H. Behrens (1962) регистрировали листериоз овец в Германии с февраля по июнь, в сентябре-октябре вновь отмечалось увеличение числа случаев. G. Train (1964) также указывал, что листериоз в ГДР является сезонной болезнью – около 62 % случаев заболевания наблюдалось в феврале-апреле.

Сезонность инфекционных болезней в южном полушарии, как правило, обратная сезонности болезней в северном полушарии. D. A. Gill (1931) наблюдал листериоз овец в Новой Зеландии с февраля до июня.

Мы попытались выяснить, какова сезонность листериоза сельскохозяйственных животных на территории СССР. При обработке данные исходили из предположения о том, что сезонность листериоза животных будет различной для разных республик Советского Союза, имея в виду возможное влияние природно-климатических факторов на сезонное проявление болезни. Мы также предположили, что возможны сезонные отличия в проявлении этого заболевания у различных видов сельскохозяйственных животных.

В связи с этим группировка материала проводилась по отдельным союзным республикам, за исключением РФ, которая для удобства обобщения данных была разбита на 10 зон, включающих в себя области, близкие по своим природно-климатическим условиям.

Существует несколько методов изучения сезонности. Рекомендуется определять отношение суммы заболеваний за год к сумме заболеваний за период сезонных подъемов. Пользуются также индексом сезонности – от-

ношением максимального числа заболеваний в один из месяцев года к числу заболеваний в месяц с наименьшим годовым показателем заболеваемости. Однако наиболее целесообразным является определение сезонных подъёмов заболеваемости на основании рассмотрения кривой заболеваемости за весь год в целом с учетом ее роста от минимума до максимума.

Учитывая это, нами были проанализированы данные за период с 1956 по 1964 г. с суммированием количества, заболевших животных по месяцам года в разрезе республик (областей, краев) с учетом определенного вида сельскохозяйственных животных. Обобщенные материалы представлены в виде графиков и диаграмм. Последние, построены на основе полярных координат. Ординатами при этом являлись отрезки радиусов (или их продолжения), отложенные от центра, на которых соответственно указанному масштабу откладывали количество случаев заболевания за каждый месяц. Порядок расположения месяцев соответствует направлению движения часовой стрелки.

В результате проведенного исследования было установлено, что наибольшее количество случаев листериоза крупного рогатого скота в Азербайджане за 1956–1964 г. было зарегистрировано в I квартале (март) и в IV квартале (октябрь), в Грузии – в I квартале (январь). В Казахстане отмечено значительное количество случаев листериоза крупного рогатого скота зимой (январь), затем идет снижение (апрель), вновь увеличение количества случаев летом (июль) с дальнейшим резким снижением в августе–сентябре и последующим увеличением в декабре.

По РСФСР сезон проявления листериоза крупного рогатого скота был различным в разных зонах. В Северо-Западной и Центральной зонах наибольшее количество случаев заболевания приходится на второй квартал (апрель – май), в Волго-Вятской, Центральной-Черноземной и Поволжской зонах – на первый квартал (март). На Северном Кавказе наибольшее количество случаев заболевания падает на декабрь, что в какой-то мере соответствует сезонности листериоза крупного рогатого скота в Азербайджане и Грузии, о чем уже говорилось выше. В Уральской и Западно-Сибирской зонах наибольшее количество случаев заболевания отмечалось в ноябре, в Восточно-Сибирской зоне отмечались два пика заболевания – в апреле и августе, в Дальневосточной зоне – в апреле.

На рисунке показаны кривые сезонности листериоза мелкого рогатого скота в Казахской и Украинской союзных республиках. В обеих республиках наибольшее количество случаев заболевания мелкого рогатого скота листериозом отмечалось весной (март–апрель); летом число больных резко уменьшалось и к осени вновь отмечалось нарастание случаев заболевания листериозом.

Особенно характерно выглядит сезонность листериоза мелкого рогатого скота по различным зонам РСФСР. Случаи листериоза мелкого рогатого скота сосредоточены в первой половине года, в основном с января по май, независимо от зоны. Почти для всех зон характерно резкое снижение числа больных в июне. По времени это совпадает с переходом на пастбищное содержание овец. В летнее время регистрировались лишь единичные случаи заболевания; выраженного нарастания количества случаев заболевания к осени также не отмечалось. Таким образом, в отличие от листериоза крупного рогатого скота и листериоза свиней (о чем будет сказано дальше) сезонность листериоза у овец выражена довольно четко.

Данные сезонных колебаний количества больных листериозом свиней показывают, что в Белоруссии наибольшее количество больных регистрируется в январе, июне и ноябре; в Грузии – в январе – феврале, июне и декабре; в Казахстане – в январе, марте, июне, августе с нарастанием в ноябре; на Украине – в январе, марте, июне с нарастанием количества случаев заболевания в октябре.

При рассмотрении листериоза свиней в РСФСР обнаружена сходная картина сезонных колебаний с таковой в Белоруссии, Грузии, Казахстане и на Украине. В Северо-Западной зоне наибольшее количество случаев заболевания свиней листериозом регистрировалось в декабре и июне, в Центральной зоне – с мая по октябрь, в Волго-Вятской зоне – в мае и июле. Особенно характерно выглядит проявление листериоза свиней в Центрально-Черноземной и Поволжской зонах – на диаграммах хорошо зафиксировано наличие случаев листериоза в различные периоды года. На Северном Кавказе наибольшее количество случаев заболевания отмечается в марте и августе; на Урале – в марте, июне и ноябре; в Западной Сибири – в марте, мае, октябре и ноябре; в Восточной Сибири – в апреле, июне, сентябре; в Дальневосточной зоне – в ноябре.

Таким образом, установлено, что листериоз свиней может проявляться в различное время года.

Из полученных нами данных, с нашей точки зрения, анализу подлежат только результаты изучения сезонности листериоза мелкого рогатого скота и свиней. От интерпретации данных по сезонности листериоза крупного рогатого скота мы вынуждены были воздержаться, так как заболеваемость листериозом крупного рогатого скота невелика, и нам приходилось оперировать небольшими цифрами.

Данные по сезонности листериоза мелкого рогатого скота и свиней получены на большом материале, анализ которого позволяет делать обобщения и соответствующие выводы по характеру и причинам наблю-

дававшихся сезонных колебаний. Результаты исследований показывают, что наибольшее количество случаев листериоза мелкого рогатого скота наблюдается в первых двух кварталах года (январь-май), в то время как листериоз свиней наблюдается в течение всего года, и преимущественного проявления в какой-либо определенный сезон года нам установить не удалось.

Полученные нами данные имеют большое значение для определения времени проведения профилактических прививок и организации мероприятий по недопущению возникновения этой болезни.

Чем можно объяснить такого рода сезонность листериоза мелкого рогатого скота и отсутствие сезонности листериоза у свиней. Существует несколько теорий о сущности и причинах сезонных колебаний заболеваемости инфекционными болезнями людей и животных. И. И. Рогозин и Б. Л. Шура-Бура (1965) пишут, что сезонные изменения интенсивности эпидемий зависят от различных причин: сезонного изменения активности природных факторов внешней среды, сезонного изменения резистентности человеческого организма, особенностей труда и быта коллектива. М. С. Ганнушкин (1961) указывал, что сезонный ритм эпизоотии является отражением сезонных изменений природных условий, влияющих на проявление некоторых эпизоотологических особенностей и сезонных вариаций физиологических функций организма.

Л. В. Громашевский (1965) писал, что доминирующей (если не единственной) причиной сезонных повышений вспышек инфеций является активизация в определенные сезоны года тех или иных факторов, осуществляющих передачу заразного начала. Касаясь роли влияния природного фактора на ход эпидемического процесса, он указывал, что прямое влияние метеорологического и климатического факторов на иммунитет может сводиться лишь к явлениям повышения и понижения неспецифической резистентности. Эти факты нельзя полностью игнорировать, но не им принадлежит в процессе руководящая роль. Ослабление резистентности организма под действием метеорологических или других природных условий может, по мнению Л. В. Громашевского, играть роль эпидемиологического фактора лишь в отношении очень легко передающейся инфекции (инфекции дыхательных путей) или такой инфекции, возбудитель которой может находиться в организме в латентном состоянии (пневмококки и другие условно-патогенные микробы).

Обобщая полученные данные, мы пришли к выводу о том, что сезонность листериоза мелкого рогатого скота и свиней не случайно различается в своем проявлении. В основу объяснения следует положить принцип, высказанный Л. В. Громашевским (1965), об активизации факторов

передачи инфекции как причине сезонных колебаний эпидемического процесса.

Заражение листериозом сельскохозяйственных животных происходит в основном в результате поедания корма, инфицированного выделениями больных листериозом грызунов (а также листерионосителей и выделителей), обитающих в животноводческих помещениях, а также в скирдах сена и соломы, хранилищах фуража. Такие факты установлены Г. Г. Юрковым (1962), который выявил взаимосвязь количества энзоотических вспышек листериоза жвачных, с численностью мышевидных грызунов, которая, в свою очередь, зависела от погодно-климатических условий и урожайности зерновых культур. Как известно, в осенний период наблюдается миграция грызунов к животноводческим помещениям, скирдам и ометам, хранилищам фуража, поэтому возможность обсеменения листериями кормов значительно повышается. По данным И. А. Даньшева (1963), активность и миграция грызунов в Саратовской области совпадали по времени со вспышками листериоза овец. Следует заметить, что и у грызунов эпизоотии листериоза зарегистрированы в основном в зимнее-весенний период года.

Поэтому наибольшее количество случаев заболевания овец листериозом падает именно на зимний стойловый период содержания (январь-май) и резко сокращается в июне, когда в основном во всех зонах страны начинается массовая пастьба овец. Эта мысль, высказанная Г. Г. Юровым (1962) в отношении листериоза у жвачных в Луганской области, нашла подтверждение в проведенном нами исследовании на большом материале. Что же касается свиней, то они, постоянно (в большинстве случаев) находясь в условиях стойлового содержания, имеют возможность контактировать с грызунами и инфицированными ими кормами круглый год. В этом, очевидно, одна из причин отсутствия выраженной сезонности листериоза свиней.

Однако это одна из причин. Другая причина сезонности листериоза у мелкого рогатого скота и отсутствия сезонных колебаний у свиней, по нашему мнению, состоит в сезонных изменениях условий содержания, кормления, которые имеют место у овец и мало отражаются на свиньях. Известно, что в зимнее время овцы содержатся в помещениях, как правило, скученно. Они подвержены действию резких колебаний температуры, сырости, холода и т. п. Кроме того, в связи с переходом на стойловый период содержания резко меняется характер кормления, уменьшается количество витаминных кормов в рационе овец; в ряде случаев имеет место неполноценное и недостаточное кормление; накопленный за летний период запас питательных веществ в организме к январю – февралю истощается. Все эти факторы снижают неспецифическую резистентность животных и могут способствовать

переходу скрытого носительства возбудителя листериоза в клинические формы болезни.

Концентрация животных в тесных помещениях увеличивает возможность перезаражения, если в данном стаде имеются листерионосители и листериовыделители. На пастбище эти возможности ограничиваются разобщенностью животных и воздействием внешних факторов (солнечные лучи, высушивание) непосредственно на возбудителя.

Свиньи, как правило, не подвержены такому резкому изменению условий содержания. В большинстве случаев они постоянно находятся в помещениях, кормление их в течение года сравнительно однообразно.

И еще на один фактор хотелось бы обратить внимание. Нельзя упускать из виду влияние беременности на возникновение листериоза. Интересна в связи с этим работа Г. В. Бродского и А. П. Егоровой (1964), которые показали, что у кроликов имело место клиническое проявление листериоза во время наступившей беременности через 7 месяцев после заражения крольчих сублетальными дозами, а также при повторной беременности в отдаленные сроки. Это связано с существованием в организме дремлющих очагов инфекции, которые обостряются во время наступающей беременности. Возможно, это имеет место и у овец. Следует заметить, что окот овец бывает, как правило, зимой (январь–февраль) или весной (апрель–май), т. е. в период, совпадающий с установленной нами сезонностью.

Ну, а как же быть с клещами, у которых выявлено наличие возбудителей листериоза? Для свиней этот фактор передачи инфекции вообще вряд ли имеет значение. Овцы больше соприкасаются с клещами во время пастбы. Однако сезон паразитирования клещей на овцах не совпадает с установленной нами сезонностью листериоза у мелкого рогатого скота. Очевидно, клещевой фактор не играет существенной роли в распространении листериоза среди овец.

Большинство исследователей, изучавших листериоз, отводят значительную роль неблагоприятным факторам внешней среды, снижающим резистентность организма и способствующим переходу скрытого носительства в клинически выраженные формы болезни. К числу такого рода неблагоприятных факторов при листериозе относят недостаточное и неполноценное кормление (авитаминозы), отсутствие прогулок в зимнее-стойловый период, плохой уход, скученность, антисанитарные условия, метеорологические факторы. Многие авторы отмечали, что заболевание прекращалось после выгона животных на пастбище.

G. Pallaske (1943) писал, что гиповитаминозные состояния готовят почву для заболевания центральной нервной системы, которая очень чувствительна к возбудителю листериоза. П. П. Сахаров и Е. И. Гудкова (1959)

считают, что листериозная инфекция принимает широкие масштабы лишь в периоды снижения реактивности организма человека или животного, причем ведущее значение имеют факторы питания и неблагоприятные метеорологические условия.

В. Я. Виноградов (1961) изучал влияние различных факторов на возникновение листериоза в эксперименте и в условиях неблагополучных хозяйств Целинного края и Омской области. В лабораторных и производственных опытах ему не удалось обнаружить заметного влияния на проявление листериоза таких факторов, как витамины А, D, группы В (кроме В12), белок, кальций, фосфор, щелочной резерв крови, микроэлементы (медь, кобальт, марганец, цинк, фтор, бром). Такие косвенные данные, как изменение веса щитовидных желез у овец в неблагополучных по листериозу хозяйствах, зимнее-весенняя сезонность листериоза, совпадающая с уменьшением содержания в кормах йода по мере хранения их, связь листериоза с определенной местностью, по мнению автора, указывали на зависимость листериоза от недостаточности микроэлемента йода. Применение йода в опытах профилактики листериоза йодной подкормкой дало положительный результат.

Данные В. Я. Виноградова показывают возможную роль одного из факторов, снижающих резистентность организма животных и способствующих возникновению листериоза в конкретных условиях тех местностей, где его наблюдал автор.

D. Urbaneck, R. Lippmann (1961) не установили связи между качеством помещений и вспышками листериоза. Заболевания наблюдались как в хороших, так и в плохих в санитарно-гигиеническом отношении помещениях. R. Aa (1962) наблюдал листериоз у животных, как при плохом, так и при хорошем кормлении, однако большинство случаев заболевания все же было связано с плохим кормлением.

Многие исследователи считают, что листериоз сельскохозяйственных животных чаще всего протекает спорадически или в виде отдельных вспышек. П. М. Свинцов (1946) отмечал, что листериозу может быть свойственно и эпизоотическое течение. Эпизоотию листериоза среди овец наблюдал J. W. Osebold (1957). В описанном случае болезнью за 6 недель было охвачено 11 хозяйств, от листериозного энцефалита пало 225 овец из общего поголовья 14 тыс. овец. Эпизоотии листериоза были зарегистрированы также у свободно живущих грызунов. Данные по листериозу в Московской области с 1947 по 1958 г. позволяют сказать, что заболеваемость носила спорадический характер или в виде отдельных вспышек.

Болезнь в хозяйстве обычно протекает с перерывами, между отдельными случаями заболевания наблюдаются значительные промежутки времени.

В одном из хозяйств Ярославской области заболевание овец листериозом протекало своеобразными скачками между отдельными случаями заболевания и падежа животных. Эти перерывы длились до 1–2 недель.

Листериоз в хозяйстве может тянуться неделями, месяцами и даже годами. Характерна тенденция болезни к стационарности (случаи повторения болезни в отдельных пунктах), и энзоотичности причины которой следует искать в длительной сохраняемости листерий во внешней среде, в наличии животных листерионосителей, а также в существовании природных очагов листериоза, в которых болезнь может поддерживаться в дикой фауне и с помощью различных факторов передаваться сельскохозяйственным животным.

Так, установлено, что в Московской области с 1947 по 1958 г. заболевание было повторно диагностировано в 23 пунктах, что составляет 19 % к общему числу неблагополучных пунктов по области. В некоторых из них листериоз диагностировали в течение трех и более лет подряд. О повторяемости листериоза в отдельных неблагополучных пунктах (стационарности) сообщают также D. F. Eveleth (1953), G. Pallaske (1943), В. И. Попов (1960), М. М. Халимбеков (1955) и др.

Заболеемость. Листериоз охватывает не все поголовье, а только часть его – от 1 до 20 % у сельскохозяйственных млекопитающих, до 60 % – у птиц. Надо отметить, что исследователи регистрировали, как правило, клинически выраженные формы. Данные о значительном количестве животных в неблагополучных стадах, переболеваящих бессимптомно, позволяют говорить о широком охвате поголовья. Серологические исследования (РА, РСК), проведенные в неблагополучных хозяйствах, показали, что количество положительно реагирующих животных превышает количество животных, у которых выявлены клинические формы болезни.

Как указывал П. М. Свинцов (1946), у овец листериоз может охватывать до 20–30 %, среди крупного рогатого скота до 10 %, среди кур до 50 % поголовья и более. По данным Иванова (1957), у овец, впервые пущенных в случку, листериозные абортс наблюдались у 45 %, среди старых овец на этих же фермах абортсировало не более 4%.

J. Fechner, G. Train (1962) указывают, что заболеемость листериозом овец в ГДР составляет 0,2 на 1000 голов. По данным А. Lucas (1961), при исследовании 25 тыс. животных заболеемость листериозом цыплят составила 0,34 %, фазанов 0,33 %, куропаток 0,81 %, зайцев 0,51 %.

Мы проанализировали заболеемость листериозом сельскохозяйственных животных в СССР за период с 1956 по 1964 г.

Оказалось, что средняя заболеемость листериозом сельскохозяйственных животных (табл. 4.4.) за 9 лет составила $0,9 \pm 0,25$ больных на 10 тыс.

голов. За 1956–1961 гг. заболеваемость была ниже средней, а в 1962–1964 гг. болело больше, чем в среднем за последние 9 лет.

Меньше всего болеет крупный рогатый скот (средняя заболеваемость за 9 лет $0,03 \pm 0,007$ на 10 тыс. голов). Средняя заболеваемость овец и свиней за этот же период оказалась одинаковой ($1,2 \pm 0,46$ и $1,2 \pm 0,2$ соответственно).

По сравнению с 1956 г. заболеваемость в среднем возросла более чем в 4 раза. Однако это касается не всех видов животных. Заболеваемость листериозом крупного рогатого скота почти не изменилась, свиней – увеличилась в 1,5 раза, овец, – более чем в 10 раз.

Заболеваемость листериозом крупного рогатого скота за этот же период по отдельным союзным республикам, а также областям, краям и автономным республикам РСФСР колебалась от 0,01 до 1,6, мелкого рогатого скота – от 0,02 до 21,8, заболеваемость свиней – от 0,02 до 47,4 головы на 10 тыс. голов.

Смертность. Смертность (отношение количества павших ко всему восприимчивому поголовью) при листериозе животных является одним из показателей, характеризующих тяжесть эпизоотического процесса. По данным D. Urbanek, R. Lippmann (1955), смертность овец от листериоза в ГДР колебалась в среднем от 0,73 до 1,9 %. N. Verdes, C. Ungureanu (1964) наблюдали смертность овец от листериоза в Румынии в пределах 0,36–10,5 %.

Табл. 4.4. Заболеваемость листериозом сельскохозяйственных животных в СССР с 1956 по 1964 гг. (количество больных животных на 10 тыс. голов).

Вид животных	По годам									Средний показатель
	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	
КРС	0,02	0,03	0,01	0,004	0,009	0,02	0,04	0,05	0,06	$0,03 \pm 0,007$
МРС	0,1	0,2	0,3	0,2	0,5	0,7	3,0	2,4	3,2	$1,2 \pm 0,46$
Свиньи	0,8	1,0	1,9	0,7	0,5	1,0	1,5	2,2	0,9	$1,2 \pm 0,2$
По всем видам	0,2	0,3	0,5	0,3	0,4	0,6	1,8	1,6	1,9	$0,9 \pm 0,25$

Табл. 4.5. Смертность сельскохозяйственных животных от листериоза в СССР с 1956 по 1964 гг. (количество больных животных на 10 тыс. голов).

Вид животных	По годам									Средний показатель
	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	
КРС	0,004	0,01	0,003	0,002	0,007	0,009	0,02	0,02	0,03	$0,01 \pm 0,003$
МРС	0,06	0,1	0,2		0,2	0,4	1,4	1,3	1,3	$0,56 \pm 0,21$
Свиньи	0,4	0,4	0,5	0,1	0,2	0,4	0,6	0,7	0,4	$0,4 \pm 0,06$
По всем видам	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,9	0,8	0,7	$0,4 \pm 0,12$

Табл. 4.6. Смертность сельскохозяйственных животных от листериоза в СССР с 1956 по 1964 гг. (в %).

Вид животных	По годам									Средний показатель
	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	
КРС	15,79	37,61	30,95	54,29	79,16	38,09	68,66	50,35	47,75	$46,96 \pm 6,25$
МРС	69,80	65,10	61,59	59,69	53,65	48,83	47,19	56,12	41,52	$55,94 \pm 3,2$
Свиньи	52,88	39,71	25,48	39,87	49,88	35,63	37,45	32,16	39,86	$39,21 \pm 2,98$
По всем видам	55,65	47,23	38,07	49,65	52,65	43,70	45,42	49,87	41,44	$47,07 \pm 1,98$

Полученные нами данные (табл. 4.5.) показывают, что наиболее высокая смертность у мелкого рогатого скота ($0,56 \pm 0,21$), самая низкая – у крупного рогатого скота ($0,01 \pm 0,003$). Свиньи занимают в этом случае промежуточное положение ($0,4 \pm 0,06$). В среднем по СССР за 1956–1964 гг. смертность сельскохозяйственных животных составила $0,4 \pm 0,12$ на 10 тыс. голов.

Летальность. Ущерб, наносимый листериозом, значителен, и это связано, в частности, с высокой летальностью (отношение числа павших к числу заболевших), обусловленной в основном поражением центральной нервной системы у больных листериозом животных. Так, летальность при нервных формах достигает 98–100 % (А.Л. Корнилова, 1953, И. И. Оробинский 1955, R. Sohler, 1944), при септических формах – 60 %, при листериозных абортах животные, как правило, не погибают.

Полученные нами данные (табл. 4.6.) показывают, что наибольшая летальность при листериозе отмечена у мелкого рогатого скота ($55,94 \pm 3,2$ %), наименьшая – у свиней ($39,21 \pm 2,98$ %). Крупный рогатый скот в данном случае занимает среднее положение между мелким рогатым скотом и свиньями (летальность крупного рогатого скота $46,96 \pm 6,25$ %). По этим видам животных в среднем по СССР летальность составила $47,07 \pm 1,98$ %. Наиболее высокая летальность от листериоза у овец объясняется, с нашей точки зрения, преобладанием у этого вида животных клинических форм болезни с поражением центральной нервной системы, которые не поддаются лечению и, как правило, заканчиваются летальным исходом. Близкое положение занимает и крупный рогатый скот. У свиней же чаще регистрируются септицемические формы болезни, эффективность лечения которых значительно выше, нежели нервных форм.

Следует указать еще на некоторые эпизоотологические особенности листериоза животных. Заболевание листериозом одного вида животных в хозяйстве не всегда сопровождается распространением этой болезни на животных других видов. По нашим наблюдениям, в одном из районов Ярославской области не отмечалось распространения листериоза от больных овец на другие виды животных, в то время как козы и телята паслись в одном стаде с неблагополучными по листериозу овцами. Также не было отмечено случаев листериоза среди плотоядных – собак и кошек – хотя мясо прирезанных, а иногда и павших от листериоза овец местное население скармливало этим животным.

А. А. Вендров (1960) сообщил, что больные листериозом свиньи имели контакт с крупным рогатым скотом и лошадьми, однако среди этих животных листериоз не наблюдался. Однако описаны и другие случаи. Так А. И. Гавриченков (1955) наблюдал заболевание листериозом поросят. В хозяйстве одновременно отмечались заболевания телят с клинической карти-

Табл. 4.7. Результаты бактериологического исследования мышей, павших от экспериментального листериоза.

Сроки гибели, сутки	Кол-во мышей	Выделение культуры									
		Печень		Селезенка		Почки		Кровь		Мозг	
		Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
1,5-5	62	44	70,9	43	69,3	33	53,2	31	50	39	62,9
6-19	42	24	57,1	19	45,2	26	61,9	20	47,6	34	80,9

ной поражения центральной нервной системы, падеж собак, кошек, крыс и мышей.

Листериоз может протекать самостоятельно или в качестве вторичной (или смешанной) инфекции. П. М. Свинцов (1946) указывал, что листериозу у свиней могут сопутствовать чума, паратиф и пастереллез; у овец – стрептококковая инфекция; у кур – пуллороз, нейролимфоматоз, заразный ринит. П. С. Соломкин (1959) наблюдал смешанное течение листериоза и болезни Ауэски. I. Szabo, G. Szemerédi (1962) описали одновременное течение чумы и листериоза у свиней.

У крупного рогатого скота листериоз нередко протекает в виде смешанной инфекции со злокачественной катаральной горячкой. Некоторые исследователи (П. П. Сахаров, Е. И. Гудкова, 1959) даже считали, что злокачественная катаральная горячка – это одна из форм проявления листериоза. Н. Linsert описывались случаи выделения листерий при злокачественной катаральной горячке в качестве вторичной инфекции. В одном населенном пункте Московской области злокачественная катаральная горячка регистрировалась с 1943 г. До 1954 г. случаи заболевания были единичными, а затем приобрели более широкий размах. В сентябре – октябре 1958 г. в стаде из 412 голов крупного рогатого скота заболело 13, из них пало 2, вынуждено убито 10 и выздоровело одно животное. Возникло подозрение на смешанную инфекцию. Было проведено 6 экспертиз, в трех случаях из мозга коров выделили культуры листерий.

На возможную связь между этими двумя заболеваниями указывают наши наблюдения в трех неблагополучных по листериозу пунктах Ярославской области. Все три пункта были также стационарно неблагополучными по злокачественной катаральной горячке. Было установлено, что заболевание овец листериозом в селе Р. возникло в помещениях, где до этого размещался крупный рогатый скот, среди которого наблюдались случаи злокачественной катаральной горячки.

Смешанное течение листериоза с пастереллезом и бронхосептикозом у кроликов наблюдали П. П. Сахаров и Е. И. Гудкова (1959). Среди мышевидных грызунов Н. Г. Олсуфьев и О. С. Емельянова (1954) наблюдали смешанную эпизоотию туляремии, листериоза и стрептококковой инфекции, а Л. А. Поманская (1957) – смешанную эпизоотию туляремии, эризипелоида

и листериоза. Г. Г. Юрков (1962) в Луганской области наблюдал смешанные инфекции у крупного рогатого скота – листериоз и бруцеллез.

Отмечается также смешанное течение листериоза с некоторыми инвазионными и незаразными болезнями. Были зарегистрированы случаи смешанного течения листериоза с бронхопневмонией и авитаминозом у поросят, с кокцидиозом и аскаридиозом у кур, с эстрозом, ценурозом, эхинококкозом и дикроцеллиозом у овец, с гепатитом у собак и с бешенством у лисиц.

D. F. Eveleth (1953) наблюдал смешанное течение и наличие абортот у крупного рогатого скота и овец на почве листериоза и вибриоза. В Англии отмечено смешанное течение листериоза и губкообразной энцефалопатии у крупного рогатого скота.

На основании изучения эпизоотологии листериоза можно отметить характерные эпизоотологические особенности этой болезни, которые необходимо учитывать при постановке диагноза:

- 1) листериоз имеет широкое распространение и зарегистрирован во многих странах мира;
- 2) восприимчивы все виды сельскохозяйственных животных (чаще поражаются овцы) и многие виды диких животных;
- 3) характерна стационарность (повторяемость) листериоза в неблагополучных пунктах;
- 4) источником инфекции при листериозе являются больные животные и листерионосители, факторы внешней среды (корма и т.д.);
- 5) основной резервуар листериоза в живой природе – свободноживущие грызуны;
- 6) сезонный характер болезни у овец;
- 7) проявление болезни в виде спорадических случаев, реже эпизоотических вспышек;
- 8) возможность смешанного течения листериоза с другими болезнями;
- 9) болеют животные всех возрастов, но более чувствительны молодые и беременные животные.

Пищевые продукты как фактор передачи листериоза человеку

Алиментарный путь заражения животных и людей считался основным с самых первых шагов изучения этой болезни, поэтому ничего удивительного нет в том, что много лет спустя листериоз признан пищевой инфекцией, а алиментарный путь заражения стал считаться основным, в особенности у человека.

Начиная с середины 80 годов XX столетия листериозу людей стали уделять больше внимание. Это обусловлено лавинообразным появлением

вспышек листериоза, связанных, как позднее выяснилось, с употреблением пищевых продуктов, контаминированных листериями. Ухудшает ситуацию и то, что болезнь протекает очень тяжело, как у новорожденных, так и у пожилых людей. Самое большое число случаев приходится на первую возрастную группу, состоящую из новорожденных и детей до 1 месяца. Сравнительная частота этих случаев в разных странах в среднем составляла 35,6 % (от 21,1% до 71,1 %). Наименьшее число наблюдалось в Японии, самый высокий процент в Словакии (71,1 %) и в США в период с 1933 по 1966 гг. (39,3 %).

Высокие показатели заболеваемости листериозом были отмечены в Германии, Франции, Англии, Дании и Канаде (например, в Канаде – 46,3 %, в ГДР – 50,0 %).

Интересно, что в США в 1968–69 гг. этот процент заболевания составлял до 27,3 %. В Дании (27,1 %), в Великобритании 1967–81 гг. (24,5 %) и Нидерландах в 1958–76 гг. (25,4 %).

В возрастных группах от 10 до 40 лет коэффициент был самым низким, а после 40 лет он вновь увеличивался за исключением ГДР, где 42,2 % случаев имели место среди больных в возрасте 18–35 лет (Ralovich, 1984).

Листериоз является болезнью с высоким процентом гибели – до 62 % (С. Cherubin et al. 1981). Несмотря на то, что болезнь поражает в основном людей с пониженной резистентностью старых или в младенческом возрасте, люди другой категории не избегают риска заражения. Этому способствует использование в медицинской практике стероидов и других иммуноподавляющих препаратов. Увеличивающееся потребление алкоголя, наркотиков также играет роль в распространении листериоза (Т. King, 1988).

Первые крупные вспышки пищевого листериоза, которые и высветили данную проблему, были зарегистрированы на Северо-Американском континенте: в 1981 году в Новой Шотландии (Канада), в 1983 году – в штате Массачусет (США) и в 1985 году – в Южной Калифорнии (США). Причем в Южной Калифорнии они приняли характер эпидемии, т.к. заболел 181 человек и летальность составила 33 % (К. Brum, 1987, С. James, 1985). Эпидемиологический анализ указанных случаев позволяет выявить определенную закономерность, определить возможные пути заражения и оценить механизм взаимодействия заражающей дозы и ее восприятия хозяином. Все эти вспышки были обнаружены в необычных обстоятельствах. В Новой Шотландии вспышка произошла в родильном доме. Эпидемию не распознали до тех пор, пока степень заражения не достигла примерно 1,3 % от всех родов, имеющих в госпитале. Ретроспективный анализ лабораторных данных показал, что годом раньше в том же районе также была вспышка листериоза, но она оказалась незамеченной вследствие трудно-

сти обнаружения на общем фоне заболевания. В Массачусете вспышка была расшифрована, т.к. департамент здравоохранения предпринял наблюдение за всеми изолятами листерий в штате после заболевания в госпитале города Бостона в 1979 году.

В Южной Калифорнии вспышка была обнаружена потому, что единственный госпиталь в округе Лос-Анжелес имел возможность регистрировать основную часть акушерских заболеваний среди испанского населения этого района. После идентификации вспышки эпидемиологи пытались установить источник распространения листерий. Был составлен опросник, касающийся вопросов питания людей, заболевших и подозрительных по заболеванию. Врачи пришли к выводу, что диапазон продуктов, которые могут быть контаминированы листериями так широк, что исследование всех продуктов без информации о возможном источнике заражения неэффективно. После обработки полученных данных прослеживалась статистически существенная связь между продуктами и заболеванием. Итоги бактериологического исследования подтвердили наличие указанных связей, выделив листериозную культуру из пищи людей. В Южной Калифорнии таким источником оказался мягкий сыр типа «мексиканский». В Новой Шотландии вспышка была связана с употреблением шинкованной капусты (W. Schlech et al., 1983). В связи с этим было выдвинуто предположение, что капуста была контаминирована посредством инфицированного овечьего навоза используемого в качестве удобрения. Большое удивление вызвали результаты анализа вспышки листериоза в Бостоне. Там впервые была установлена причастность к ней пастеризованного молока. В первом опроснике о продуктах питания пастеризованное молоко не было включено, полагали, что это надежный продукт. Однако никакие другие продукты не были идентифицированы на первом опросе. Второй опросник показал, что пастеризованное молоко было единственным продуктом, покупаемым в тех магазинах, которые могли быть связаны с болезнью. Лица, употреблявшие больше молока, обладали большей возможностью заражения. Лица, употреблявшие обезжиренное молоко, были в меньшей степени подвержены опасности заражения. Исследования процесса пастеризации не обнаружили дефектов в пастеризирующем аппарате. Проба на фосфатазу не выявила аномалий. Поэтому и возник вопрос о возможности выживания листерий при использовании этих режимов в пастеризации молока.

Эти вспышки указывают на два разных аспекта болезни. Заболевание в Новой Шотландии и в ЛосАнжелесе коснулось в основном беременных женщин и их потомства (83 % случаев в Н. Шотландии). В Бостоне, наоборот, только 14 % случаев были перенатальными, остальные отмечались у

взрослых людей с пониженной резистентностью. Интересен и следующий факт. При вспышке в Лос Анжелесе «мексиканский» сыр был очень сильно загрязнен листериями. Напротив, Бостонская вспышка явилась результатом выживания единичных листерий, прошедших пастеризацию. Тем самым подтвердилась гипотеза, что люди с пониженной резистентностью особенно восприимчивы к низким дозам листериозной культуры. По данным Schonberg, (1988) в США частота случаев листериоза составляет от 4 до 7 человек на 1 млн. жителей.

Вспышка листериоза в Северной Америке не является исключением. Можно привести беглый обзор случаев листериоза людей, описанных в литературе за последнее десятилетие.

F. Quaglio et al. (1979) сообщает о ряде вспышек листериоза людей в Италии. Он указывает, что наиболее частыми клиническими формами листериоза являются менингит, менингоэнцефалит (до 75–89 % больных), септицемия. Особое внимание он обращает на способность листерий проникать через плацентарный барьер и вызывать у новорождённых субклиническую или инвазивную инфекцию. Листерийные поражения новорождённых составляют до 75 % всех случаев листериоза. Латентность при этих формах заболевания достигает 50–80 %. Автор один из первых предложил обратить особое внимание на роль продуктов питания, как фактора распространения листериоза.

В Испании E. Balsech (1981) сообщает о выделении и идентификации 17 штаммов листерий от больных людей. C. Sancher et al. (1981) описывают 10 случаев листериоза в Барселонской больнице. До 1986 года число случаев листериоза людей в среднем за 20 лет в этом регионе было достаточно постоянным и равнялось приблизительно один в шесть месяцев. С лета 1986 по декабрь 1987 года произошло заметное увеличение числа заболеваний до 29 случаев. Причём регистрации подлежит менингеальная форма листериоза людей (N. Skovgaard et al., 1987).

В Скандинавских странах E. Bauvet et al. (1982) описывают сорок случаев менингита, вызванного листериями. Они отмечают, что у 58 % исход болезни – выздоровление, причём 8 % без осложнений.

S. Larson et al. (1979) описали 7 случаев листериоза у новорождённых в центральной части Швеции, 2 из них закончились летальным исходом.

В Нидерландах по данным E. Kampelmacher (1980) на протяжении 20 лет от людей выделено 793 штамма *Listeria monocytogenes*, в т.ч. 193 от новорождённых и детей до 2-х месяцев. У взрослых людей листерии выделяли как среди больных листериозом (242), так и среди клинически здоровых (358) людей. Предрасположенность к листериозу отмечается у людей после лечения иммунодепрессантами и трансплантации органов (J. Herrero et al. 1989).

В Швеции до 1983 года в течение многих лет описывалось примерно по 9 случаев листериоза ежегодно. За 1983–1984 гг. стало известно о 25 случаях листериоза (Maliverni et al. 1985). В октябре 1985 г. заболело 10 человек, из них трое скончались. Источником листериоза людей послужил сыр.

Во Франции по данным А. Morel (1989) в университетском госпитале города Руана за 20 лет было зарегистрировано 249 больных листериозом. Автор указывает, что в среднем 5 женщин из 1000 в период беременности подвергаются риску заражения листериозом.

Vitti (1980) описал 20 случаев листериоза новорождённых, из них у 7 наступил летальный исход.

B. Yersin (1981) описал 10 случаев инфекции, обусловленной листериями. Gladel (1987) сообщил о результатах исследования национальной медицинской лаборатории. Ею был сделан запрос в 422 лаборатории страны о случаях листериоза за 1984 год. Ответили 285 (67 %) лабораторий, из которых 172 имели положительные результаты по листериозу (всего 630 случаев). Из указанного количества – 352 (56 %) касается беременных женщин и новорождённых. По подсчётам автора на 1 млн. жителей Франции приходится в среднем 11,3 случая листериоза.

По данным национального справочного центра Франции в 1985 году у людей выделено 215 штаммов листерий. По сообщению V. Gonlet (1989) во Франции отмечается тенденция роста данного заболевания.

В Германии в 1986 году было зарегистрировано 79 случаев листериоза. Причём по данным J. Kulz (1990) в ряде случаев источником внутриутробного заражения плода листериями послужили беременные женщины, заразившиеся в свою очередь листериозом в результате употребления продуктов питания контаминированных бактериями.

F. Allerbergen (1989) сообщает, что за 1986 год в Министерство здравоохранения Австрии поступили сообщения о 39 случаях листериоза у людей.

В Шотландии, где с 1 января 1988 года введён надзор за листериозом среди людей, в течение года выявлено 35 случаев бактериологически подтвержденного листериоза человека (D. Campbell, 1989).

Описывается несколько вспышек листериоза в Великобритании (D. Bovi, 1983; A. Dajdjonii, 1983), Японии (S. Inagichara, 1982), Бразилии (E. Ramires, 1979; L. Cintra, 1983).

По сообщению А. Froun (1989) количество регистрируемых в мире заболеваний листериозом составляет около 20 000 случаев в год. Однако не вызывает сомнения, что это только верхушка айсберга, так как только в нескольких развитых странах листериоз людей является регистрируемой болезнью.

За последние несколько лет среди клиницистов (медиков и ветврачей) России наблюдается все возрастающий интерес к листериозу, так как болезнь встречается все чаще и чаще.

За период с 1992 по 1995 гг. в России листериозом заболело 204 человека, в т.ч. женщин с 15 лет – 75; детей до 14 лет – 112; в сельской местности – 20. За этот период погибло 9 человек. Заметного снижения заболеваемости людей листериозом за последние годы не происходит, пожалуй, даже наблюдается увеличение числа случаев болезни – 1992 – 45; 1994 – 60; 1995 – 51.

На территории Тульской области первые культуры листерий были выделены работниками противотуляремийной станции и ветеринарной лаборатории в 50-х годах XX века. В течение последних лет культуры листерий выделялись постоянно, как из объектов внешней среды, от больных животных, так и у людей.

В настоящее время листериоз в Тульской области распространен повсеместно. Из 24 районов природные очаги листериоза были обнаружены в 22.

Городской централизованной диагностической бактериологической лабораторией (ГЦДЛБ) г. Тулы за 1997 год было исследовано на листериоз 1880 проб различного клинического материала от больных и умерших. При исследовании этих проб было выделено 73 культуры *L.monocytogenes* от 45 человек. За 1998 г. было исследовано на листериоз 1698 проб различного клинического материала от больных и умерших. При исследовании этих проб было выделено 32 культуры от 25 человек. (Т. В. Честнова, А. С. Игнаткова, 1999).

За период 1994–98 гг. на территории Москвы и Московской области зарегистрировано 75 случаев листериоза у людей: взрослых – 13,3 %, подростков – 73,6 % и новорожденных – 13,3 %. Данные анализа эпизоотолого-эпидемического обследования очагов показывают, что основными источниками листериоза в г. Москве являются владельческие и безнадзорные домашние животные (собаки и кошки), а также грызуны.

Заболеваемость листериозом в Москве носила, в основном, спорадический характер, за исключением вспышки, зарегистрированной в 1998 году в летнем оздоровительном детском лагере. Одновременно заболело 11 человек. Доказательством вспышки послужило лабораторное подтверждение диагноза листериоза у двух детей и в смывах, взятых на пищеблоке.

Контаминированы листериями могут быть продукты:

а) из некачественного пищевого сырья содержащего листерии и используемого в процессе приготовления пищи (те продукты, которые употребляются в необработанном виде – охлажденные свежие салаты, овощи, фрукты);

б) которые прошли обработку, консервирующую их на незначительное время и хранящиеся при низких плюсовых температурах (к этой группе относятся некоторые сорта сыра, и молочные продукты);

в) в технологии хранения, которых, использовались достаточно традиционные методы консервирования, гарантирующие до недавнего времени их санитарное качество (к этой категории можно отнести пастеризованное молоко, колбасы и копчености, замороженное мясо);

г) полуфабрикаты и готовые к употреблению продукты консервированные современной технологией и хранящиеся длительное время при низких температурах в ожидании использования (к этой группе относятся продукты быстрого приготовления всех типов).

Однако необходимо подчеркнуть, что все продукты питания, при создании которых используются сырые пищевые материалы могут являться источником листерий.

Роль пищевых продуктов в возникновении листериоза людей

Вышеприведенный беглый обзор эпидемиологических данных свидетельствует о возросшей проблеме листериоза среди людей. Конечной причиной распространения этой болезни являются продукты питания.

В связи с этим остановимся подробнее на тех продуктах, которые играли ключевую роль в возникновении вспышек листериоза.

а) Молоко. В настоящее время твердо установлено, что листерии могут быть обнаружены в молоке коров с разной степенью мастита или без него. Аналогичные результаты получали и другие исследователи (O. Potel, 1953, 1954; K. Dedie, 1955; J. Vries, 1966; D. Fenlon, 1969).

Эпидемиологическая роль молока в передаче болезни подозревалась во время эпидемии листериоза в Германии в середине 50-х годов. Патогенный агент выделили и из молока овец и коз (K. Dedie, 1955, 1958; O. Poter, 1955; I. Comi, 1987). Традиционным методом исследовали 140 проб молока коз и в 9 из них обнаружили *L.monocytogenes*.

J. Farber (1983) сообщает, что при исследовании больших танков для сырого молока в штате Онтарио (США) в 12,4% из 445 исследуемых образцов, были выделены штаммы, идентифицированные как *L.monocytogenes*.

D. Lucais (1985) сообщил, что в Центральной Испании за 16 месяцев было отобрано 95 образцов. В 45,3 % выделена *L.monocytogenes*.

P. Hayes et al. (1986) указывают, что во время вспышки листериоза ими была исследована 121 проба сырого и 14 проб фильтрованного молока. В 12 % и 14 % соответственно обнаружена листериозная палочка. J. Garagrabel (1986) сообщил, что из 28 проб пастеризованного молока он выделил куль-

туры *L.grayi* (69,3 %), *L.monocytogenes* (21,4 %), *L.innocua* (10,7 %), *L.welshimeri* (3,6 %).

G. Siragusa (1988) установил, что из коммерческого йогурта (рН – 4,1) листериозная палочка выделяется в течение 9 дней хранения.

б) Сыры. Как вспышка в Ю. Калифорнии (1985), так и в Швеции (1987) связана с потреблением сыра. Это и побудило исследователей более детально заняться вопросами санитарной оценки сыров. По сообщениям С. Breer (1987) швейцарские ученые исследовали 799 проб мягкого, полумягкого и твердого образцов сыра в основном из Швейцарии и Франции. Они установили, что 96 (12 %) из 799 исследуемых проб содержат листерии. 50 изолятов были типированы как *L.monocytogenes*, другие 46 принадлежали к *L.innocua*. Все 88 проб твердого сыра были свободны от листерий, а среди 205 проб полумягкого сыра – 4 (2 %) содержали *L.innocua*.

Степень выделения листерий из 604 проб мягких сыров составила 19,2 % образцов. Авторы отмечают, что нет никакой разницы между образцами, приготовленными из пастеризованного и не пастеризованного молока.

Анализ всех сыров контаминированных листериями показал, что эту бактерию можно обнаружить только на поверхности продукта. Все пробы, взятые из середины сыров были свободны от листерий. Количество бактерий доходило до 4×10^4 колонеобразующих единиц (КОЕ) на 1 грамм. Проведенные авторами дополнительные исследования показали следующие результаты: ни одна из 24 проб молока, сыворотки, сгустки не содержала листерий. В течение первых пяти дней созревания при 12°C с поверхности 33 сыров не выделяли листерий. Но через две недели вслед за повышением рН у 6 (из 36 образцов) обнаружили искомую культуру. Еще через неделю 41 проба (46) – 80,1 % оказалась контаминирована листериями. В конце срока созревания (4 недели) листериозная культура была выделена из 58 проб (28 образцов из 48).

В ФРГ доктор J. Serla (1987) проводил исследования 706 проб сыра различных типов. По приведенным данным только 8,2 % были контаминированы листериозной палочкой. Из них 2,5 % – *L.monocytogenes*, 5 % – *L.innocua*, 0,7 % – *L.seeligeri*. Авторы пришли к выводу, что только мягкие и полумягкие сорта сыра обладают хорошими условиями для присутствия и развития листерий. Разновидность сыров с клейкой поверхностью дала самые высокие результаты присутствия.

Группа A. Veber (1988) в период с октября 1987 года отобрала 245 проб у немецких и 264 пробы у иностранных сортов сыра, продававшихся в Северной Баварии. В 60 образцах (11,8 %) из 506 исследованных образцов обнаружены листерии. В 29 случаях это *L.monocytogenes* и в 31 случае это *L.innocua*. По данным исследователей из Великобритании – P. Pini et al.

(1988) 10 % из 22 проб британского и импортного мягкого сыра содержали *L.monocytogenes*. Чаще всего были контаминированы сыры из Италии (16%) и Франции (14 %), реже из Кипра (10%) и Великобритании (4 %). Из твердых, полутвердых и плавленых сортов сыра листерий выделить не удалось.

в) Мясо и мясопродукты. О наличии листерий в мясе, признанным годным для употребления в пищу людей, сообщили A. Forray (1969), B.Raeovieh et al. (1970), Hohneg (1975). О выделении листерий из тушек замороженных цыплят и из мяса птицы указывали Kwantes (1971), K. Elischerova (1979) и др. Результаты изучения этого вопроса свидетельствуют о возросшей степени риска заражения людей посредством данных продуктов питания. По данным Guilleon сообщенным в 1980 году, в Мозеле (Восточная Франция) 8 % измельченного мяса и 6,5 % сырокопченых колбас содержали листериозную палочку. Через 7 лет K. Nikolas et al. (1987), проводя во Франции аналогичные исследования, получили цифры, превышающие вышеуказанные в 10 раз. R. Shcoen (1987) и J. Breur, O. Prandl (1988) подтвердили эти данные, обнаружив листерии в 70 % рубленого мяса и в 67 % копченой колбасы. Культуру *L.monocytogenes* выделили из 36 % проб мяса и 23 % колбасы. Аналогичные работы были проведены в Германии U. Shcmidt (1988), которые зимой и весной 1988 года изъяли из торговли 30 проб свиного фарша и 30 проб свежей копченой колбасы с целью исследования на наличие листерий. Данная культура была обнаружена во всех 30 пробах фарша и в 29 пробах копченой колбасы. В фарше чаще всего выделяли *L.monocytogenes* (80 %), далее идет *L.innocua* (47 %) и *L.weishmeri*. (30 %). В колбасе *L.monocytogenes* составляла 59 % всех проб, *L.innocua* – 83 %.

Исследования, приведенные в 1988 г. в лаборатории Датского ветеринарного и сельскохозяйственного университетов выявили, что из 67 образцов говяжьего фарша, отобранного ими в магазинах, и 17 образцов тушек домашней птицы 67 % и 94 % образцов соответственно были контаминированы листериями, в том числе микроорганизмы вида *L.monocytogenes* выделены соответственно из 28 % и 47 % образцов. Подобная работа была проведена M. Pini et al. (1988) в Великобритании. Из 100 проб тушек цыплят в 60 выделена листериозная палочка вида *L.monocytogenes* и в 28 пробах другие виды листерий. Помимо сырокопченых колбас, о которых уже упоминалось, есть сообщение К. Николаса и др.(1986) о наличии листерий в сосисках, о выделении листериозной бактерии из колбасы сорта «салями» (J. Johnson, 1988). Практически ни один вид мясопродуктов не может быть гарантирован от обсеменения листериями.

г) Растительная пища. На растительную пищу, как на причину возможного заражения листериозом людей почти не обращали внимание. И только

вспышка в Канаде в результате использования в пищу капусты, контаминированной листериями, когда заболело свыше 40 человек, также ее тяжелые последствия – 27 % смертность новорожденных, гибель 2-х взрослых людей, привлекли внимание врачей к этому виду пищи человека. Подобные случаи возможны и при употреблении в пищу всех видов сырых овощей и салатов, выращенных на полях, удобряемых навозом от больных листериозом животных и фекалиями от людей носителей *L.monocytogenes*. Учитывая тот факт, что собранные овощи хранятся в холодильниках при температуре +4 до +10 °С (достаточной для интенсивного размножения листерий), риск заражения людей возрастает.

Н. Seeliger (1988) считает, что овощи и фрукты, собранные с почв, где использовались органические удобрения, являются дополнительным фактором заражения, в первую очередь для пожилых и больных людей, а также детей и беременных женщин.

В России проблемой пищевого листериоза мы начали заниматься, с 90-х годов прошлого века. Нами были разработаны методы исследования пищевых продуктов на наличие листерий, которые приведены в монографии «Листериоз как пищевая инфекция» (И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, 1991), изданы «Методические рекомендации по бактериологическому контролю пищевых продуктов на наличие листерий» (И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, 1992), опубликован в «Вестнике РАСХН» обзор по указанной проблеме основанный на материалах зарубежной печати «Пищевой листериоз как проявление известной болезни» (И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, 1995), представлена серия докладов на первой в стране конференции по пищевым зоонозам (Москва 1995 г). В дальнейшем были проведены совещания, симпозиум и разработаны нормативные документы: Методические указания – Порядок контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах (МУК 4.2), Государственный Стандарт Российской Федерации «Продукты пищевые: методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*», который принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 12.07.2002. № 277–ст. Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, в том числе на продукты детского, лечебного и специализированного питания: мясо, включая мясо птицы, субпродукты и мясные продукты; рыбу, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них; молоко и молочные продукты; маргарин, майонез, свежие и свежемороженые овощи, картофель, салаты из овощей и устанавливает метод выявления и определения в них бактерий вида *Listeria monocytogenes* по биологическим свойствам.

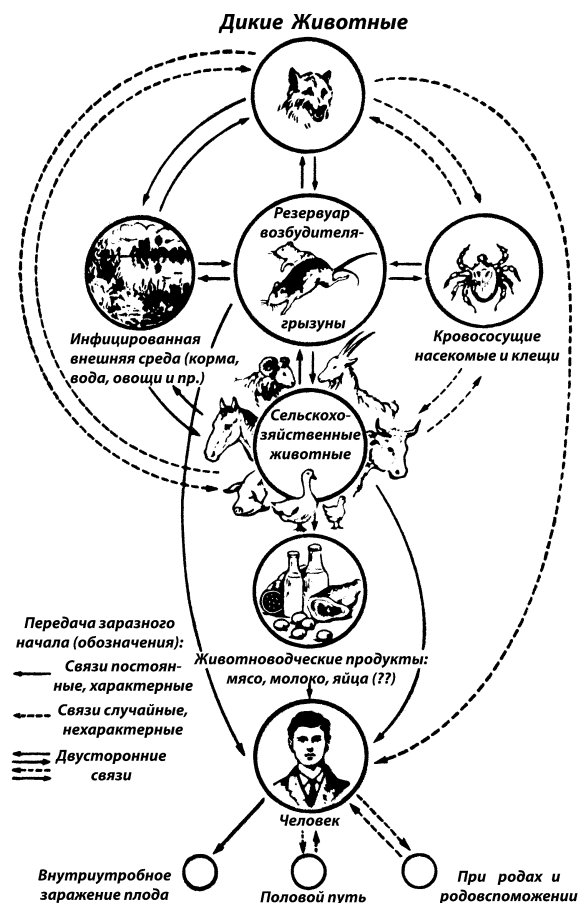


Рис. 4.1. Схема путей распространения листериоза.

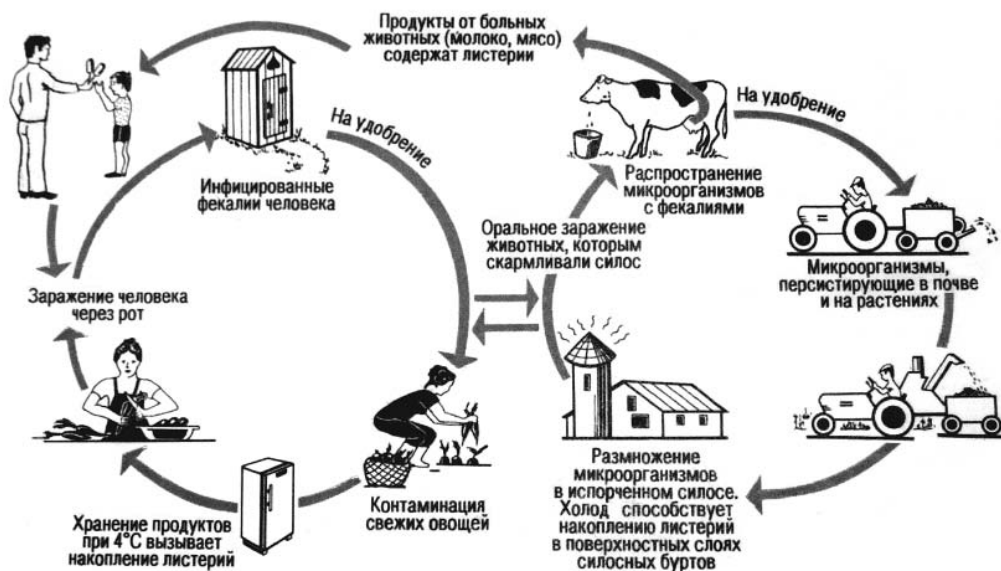


Рис. 4. 2. Схематическое изображение путей распространения листериоза по Э. Г. Кампельмахеру с дополнениями И. А. Бакулова.

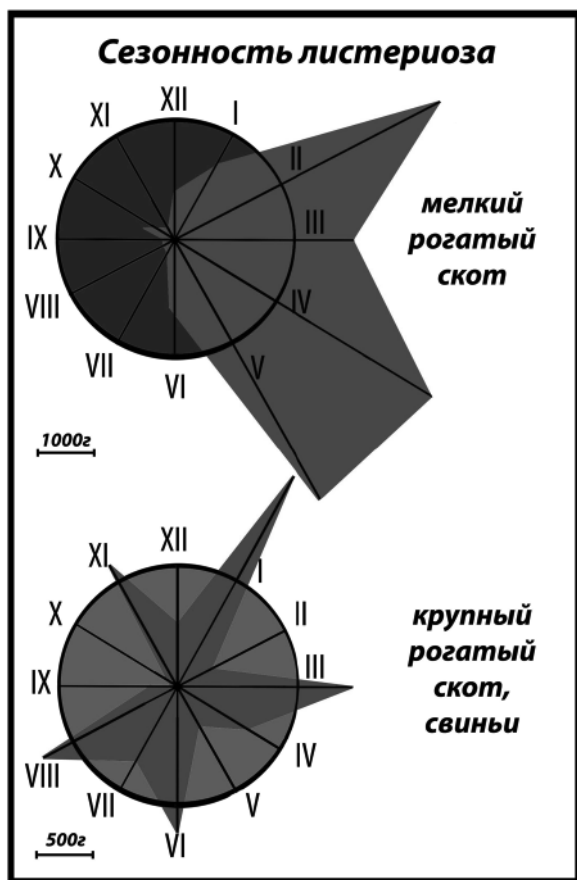


Рис. 4.3. Сезонность листериоза

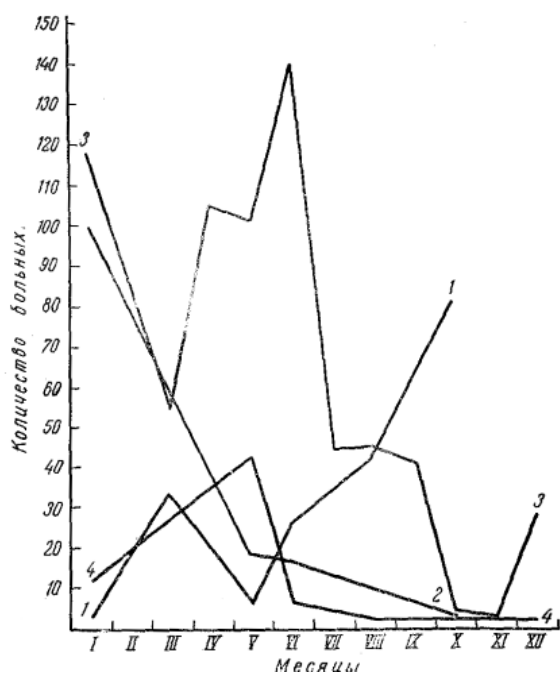


Рис. 4.4. Сезонность листериоза КРС в Азербайджанской, Грузинской, Казахской, Украинской союзных республиках за 1956 - 1964 гг.

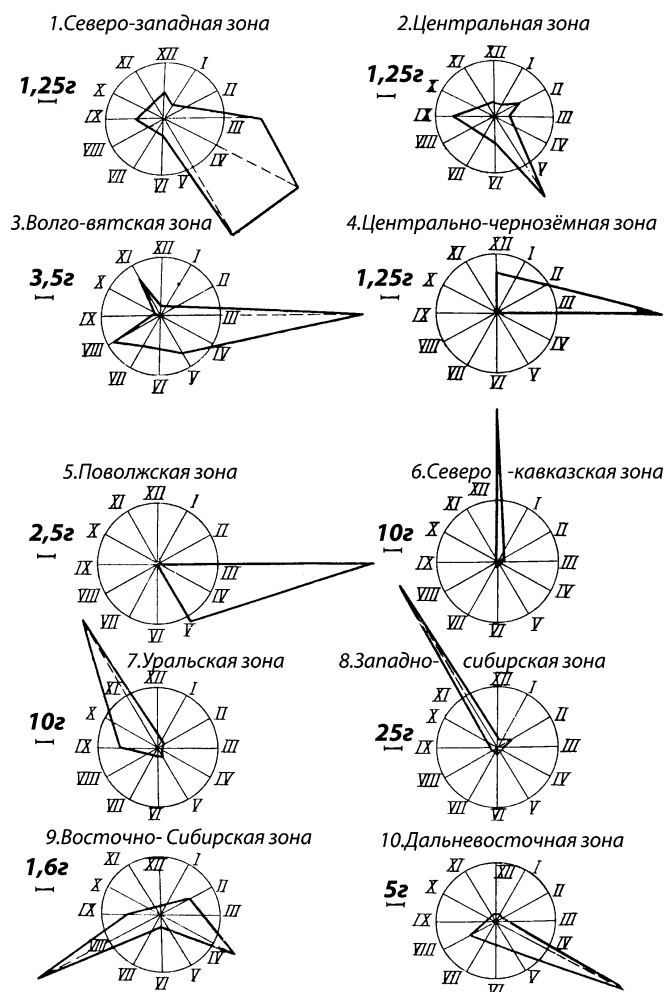


Рис. 4.5. Сезонность листериоза КРС в РСФСР за 1956 - 1964 гг.

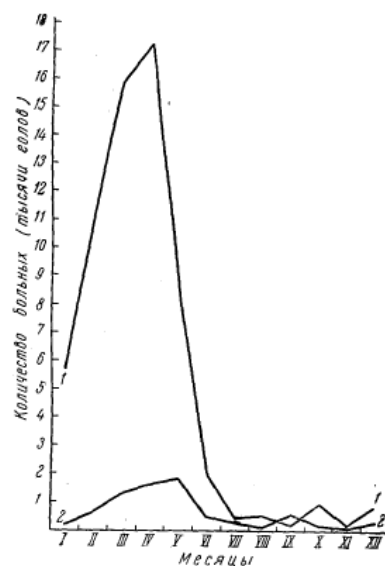


Рис. 4.6. Сезонность листериоза МРС в Казахской и Украинской союзных республиках за 1956 - 1964 гг.

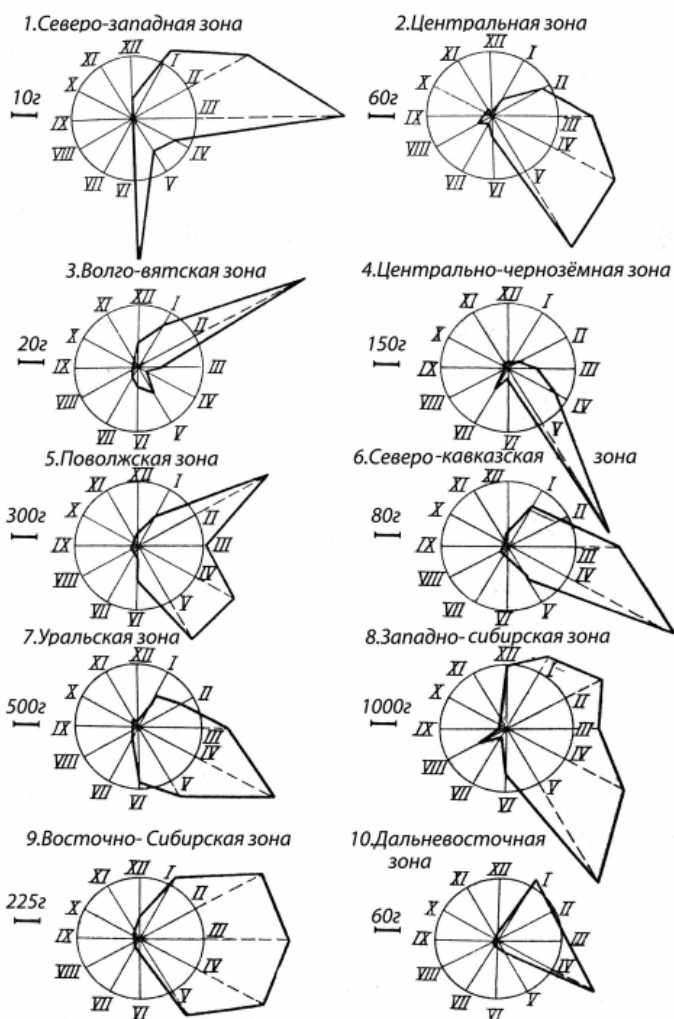


Рис. 4.7. Сезонность листериоза МРС в РСФСР за 1956 - 1964 гг.

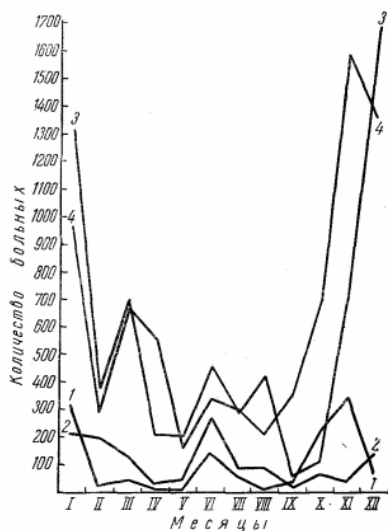


Рис. 4.8. Сезонность листериоза свиней в Белорусской, Грузинской, Казахской, и Украинской союзных республиках за 1956 - 1964 гг.

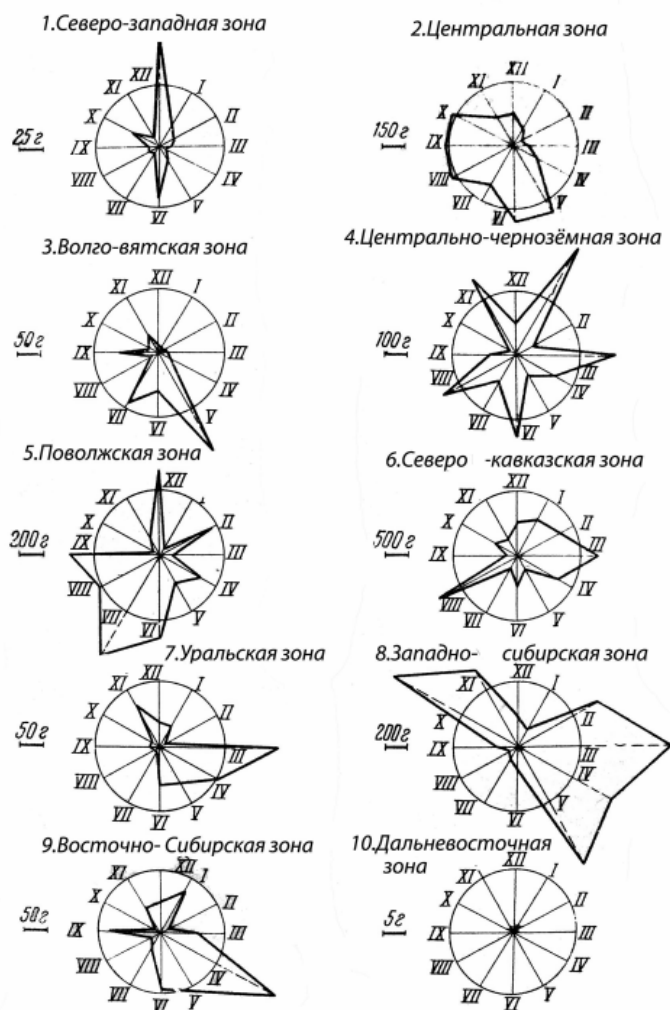


Рис. 4.9. Сезонность листериоза свиней в РСФСР за 1956 - 1964 гг.

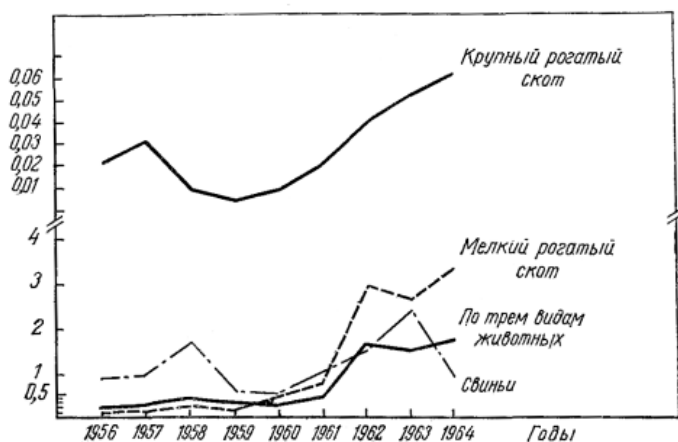


Рис. (схема) Изменение характера природных листериозных очагов в зависимости от сезона года.

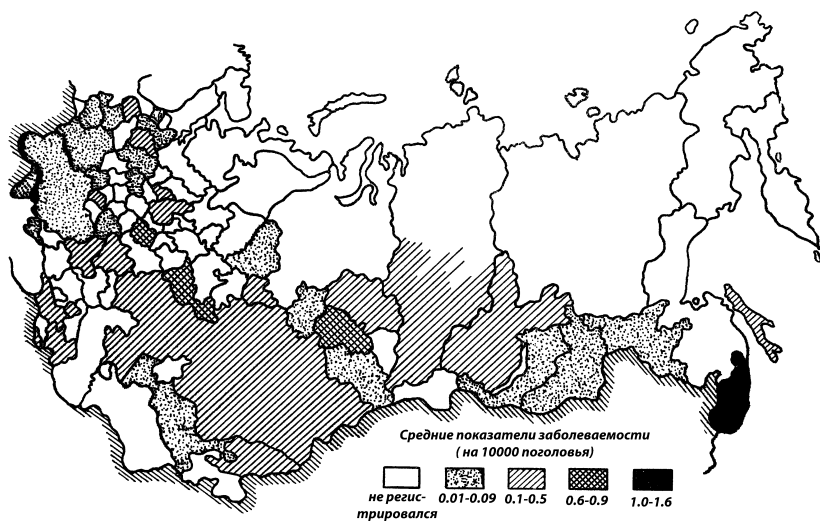


Рис. 4.10. Заболеваемость листериозом сельскохозяйственных животных в СССР за 1956 – 1964 гг.

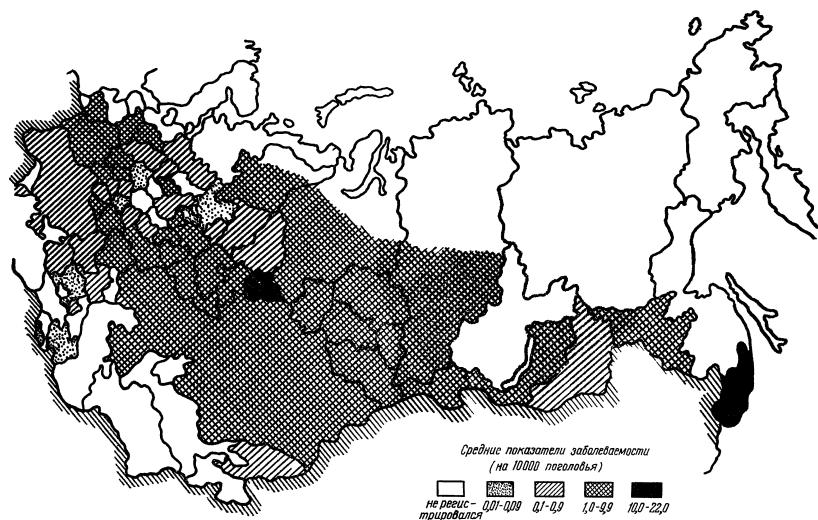


Рис. 4.11. Заболеваемость листериозом КРС за 1956 – 1964 гг.

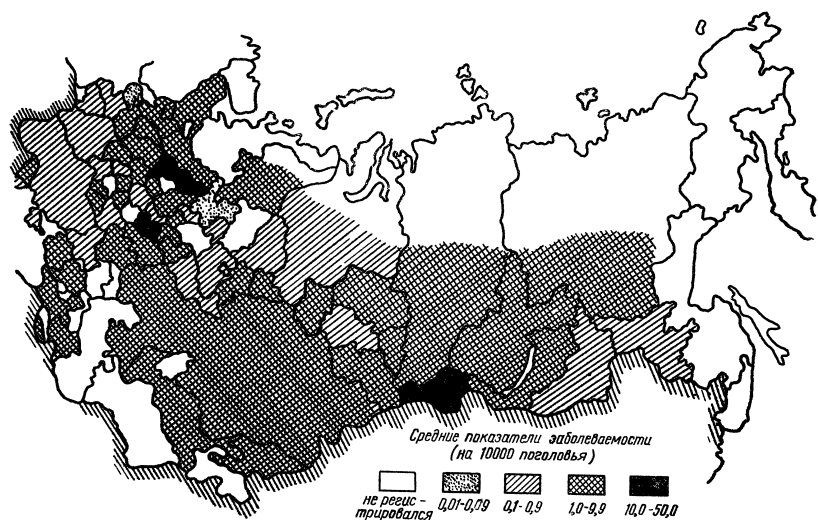


Рис. 4.12. Заболеваемость листериозом МРС за 1956 – 1964 гг.

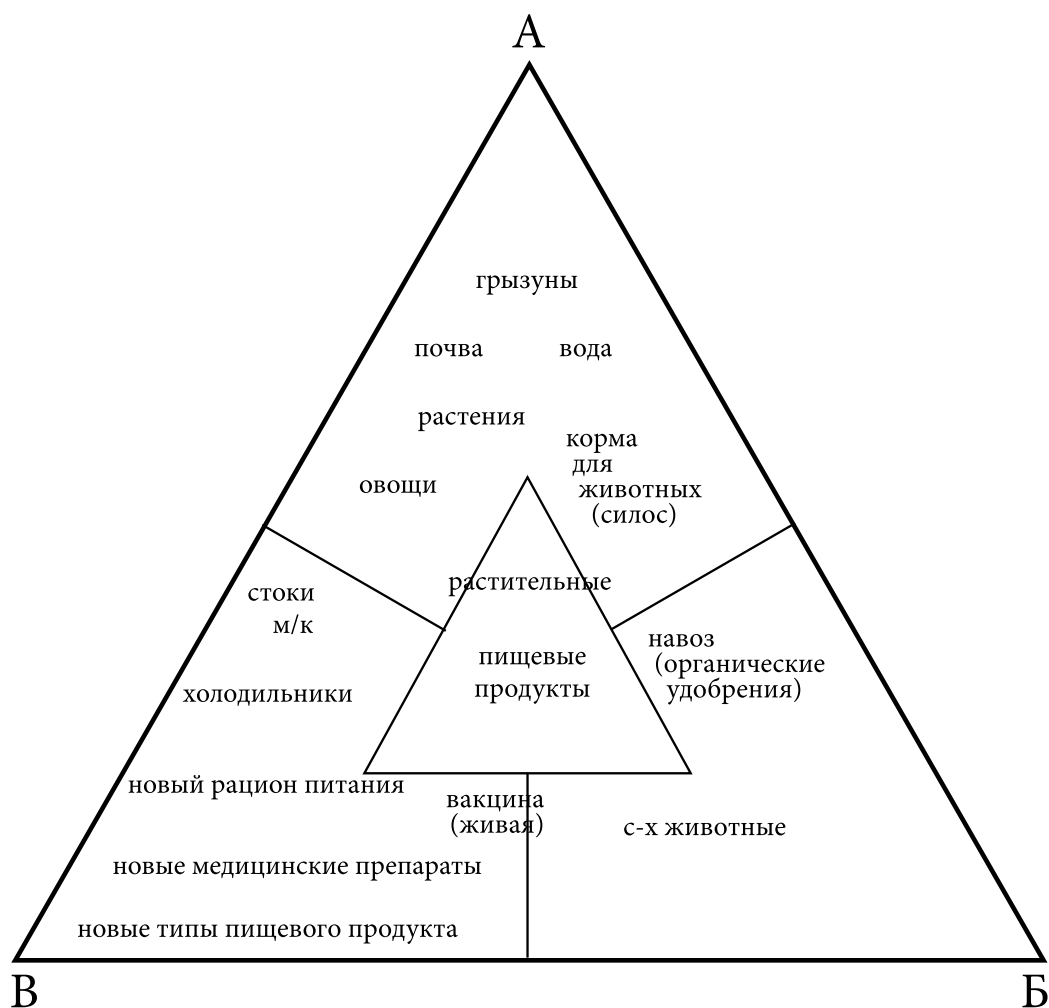


Рис. 4.13. Схема. Факторы способствующие распространению пищевого листериоза.

ЧАСТЬ V

ИММУНИТЕТ ПРИ ЛИСТЕРИОЗЕ

ФОРМИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ИММУНИТЕТА ПРИ ЛИСТЕРИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Первый шаг к понятию иммунитета при листериозе был сделан J. В. Мас Канесс (1962, 1971), когда он продемонстрировал, что листерии способны выживать и размножаться в макрофагах полученных из брюшной полости мышей. Им продемонстрировано, что при заражении монослоя мышинных макрофагов суспензией листерий, образовывались ясно очерченные бляшки. Причём способность к бляшкообразованию коррелировала с вирулентностью штамма. Менее вирулентные штаммы образовывали мало бляшек, штаммы более вирулентные образовывали большее количество бляшек. Автор считал, что ткани нормальных мышей, в частности их макрофаги, не способны препятствовать размножению листерий. Ткани мышей выздоравливающих от листериоза, способны инактивировать введённые листерии. Автор установил, что эта способность клеток не связана с гуморальными факторами и с введением инактивированных листерий последние не стимулировали образование популяций макрофагов устойчивых к листериям. Полученные автором данные позволяют судить об активном значении клеточного иммунитета при листериозе, отсутствия влияния гуморальных факторов на иммунный процесс, а так же заставляют сомневаться в целесообразности применения инактивированных вакцин.

Механизм иммунного ответа можно разделить на несколько этапов.

Первоначальный – после появления инфекционного агента основная роль в иммунном ответе отводится фагоцитам и накапливающимся в очаге поражения макрофагам. В начале фиксированные макрофаги или моноциты поглощают бактерии в ходе неспецифического фагоцитоза; в результате около 90 % инокулюма разрушается. В фагоцитоз и киллинг могут быть вовлечены компоненты комплемента.

Непонятно, почему одни макрофаги могут убивать листерий, тогда как другие макрофаги – не могут. Выделено три факта, которые влияют на способность макрофагов убивать бактерии *Listeria monocytogenes*. Первый – листерицидные макрофаги должны иметь оптимальные концентрации вну-

триклеточных ионов. Второй – рецептор макрофагов, используемый для фагоцитоза листерий, вероятно, влияет на внутриклеточное состояние этой бактерии. Рецептор комплемента типа 3 (CR3) способствует фагоцитозу бактерий листериоцидными макрофагами. В результате фагоцитированные бактерии не разрушаются и размножаются внутри клетки-хозяина. Третий – макрофаги, которые имеют понижающий их функции поверхностный монокин интерлейкин-10 (ИЛ-10), не могут убивать листерий.

Начиная с 1960 г. известно, что *Listeria monocytogenes* может выживать внутри резидентных макрофагов печени и селезенки. В 1980-х годах установлено, что *Listeria monocytogenes* может инфицировать нефагоцитарные клетки (например, эпителиальные, гепатоцеллюлярные, фибробласты), в результате бактерия во внутриклеточном окружении защищена от большинства хозяйских механизмов защиты.

Внутриклеточное выживание листерий регулируется синтезом специфического листериолизина О (ЛЛО). Он обеспечивает бактериям возможность выхода из фагосом в результате лизиса фагосомальной мембраны. Выход *Listeria monocytogenes* из внутриклеточных вакуолей сопровождается внутриклеточным ростом и полимеризацией актина. Свободный микроб развивается в цитоплазме клетки, которая обеспечивает наиболее оптимальные условия роста. Такие экстрацеллюлярные белки как интерналин, ЛЛО, белок полимеризации актина (ActA), фосфолипаза, металлопротеаза и, возможно, р60 важны для проникновения в клетки, сохранения в цитоплазме, при переходе от клетки в клетку. Другие белки важны для роста, физиологии и поддержания структуры бактерии.

Исследования показали, что лишь экстрацеллюлярные белки индуцируют гуморальный ответ, тогда как клеточноассоциированные антигены его не вызывают. Поскольку *Listeria monocytogenes* является внутриклеточным патогенным и не персистируют в крови в результате чего не удается стимулировать гуморальный иммунитет.

Следующий этап характеризуется антигенспецифической пролиферацией Т-клеток. Через 3-4 дня после инфицирования в моноцит-макрофагальной фагоцитарной системе происходит, как правило, уменьшение числа бактерий. Это является свидетельством начала Т-клеточнозависимой иммунной стадии защиты, заканчивающейся приобретением длительной устойчивости. Развитие приобретенной антилистериозной активности наблюдается через 5 дней инфекции, когда уже можно продемонстрировать адаптивный перенос устойчивости, используя иммунокомпетентные клетки. На этой стадии количество активированных макрофагов в инфицированных тканях быстро увеличивается. Для эффективного взаимодействия Т-клетка-макрофаг, макрофаги должны подключить антиген и он должен

быть экспрессирован вместе с антигенами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Антиген-презентующие макрофаги взаимодействуют с Т-хелперами, которые имеют на своей поверхности рецептор к ГКГС. Это взаимодействие усиливается ИЛ-1, монокином экскретируемым ГКГС-представляющим макрофагом. В результате взаимодействия популяция активированных Т-клеток начинает продуцировать лимфокин ИЛ-2. В присутствии листериозного антигена и ИЛ-2 стимулируются и приступают к делению две субпопуляции Т-клеток: цитотоксические Т-лимфоциты; Т-клетки – продуценты медиаторов, обеспечивающих формирование устойчивости к инфекции. Эти два Т-клеточных клона продуцируют повышенные количества гамма-интерферона (γ -ИФ). Дополнительно, нормальные киллеры (НК-клетки), стимулированные γ -ИФ, приобретают способность лизировать инфицированные фибробласты и гепатоциты.

Исследования по адаптивному переносу показали, что устойчивость обеспечивают иммунные CD4 (+) Т-клетки. Клональный анализ спленоцитов полученные от инфицированных *Listeria monocytogenes* BALB/с мышей показал наличие ЦТЛ, специфичных к четырем различным ГКГС-рестрицированным пептидам. Рестимуляция *in vitro* спленоцитов от иммунных к *Listeria monocytogenes* мышей каждым из этих четырех пептидов (p60 217-225, металлопротеин 84-92, ЛЛО 91-99, p60 449-457) приводила к мощному Т-клеточному ответу. Иммунодоминантными оказались ЛЛО 91-99 и p60 217-225.

Ключевым фактором в иммунном ответе на *Listeria monocytogenes* является ЛЛО. У BALB/с-мышей, иммунизированных ЛЛО-секретирующими штаммами *Listeria monocytogenes*, вырабатывается специфическая резистентность, тогда как у мышей, иммунизированных ЛЛО-негативными штаммами или неживыми препаратами *Listeria monocytogenes*, протективный иммунный ответ не вырабатывается. Полагают, что ЛЛО является доминантным антигеном из-за его быстрой деградируемости и очень эффективного процессинга в ГКГС I ассоциированный эпитоп.

Известно, что дифференциация CD4(+) Т-клеток в Th1- или Th2-хелперах зависит от цитокинов, индуцируемых антигенами бактерий. Ответ, который приводит к секреции γ -ИФ, лимфотоксина и ИЛ-2, классифицируется как Т-хелперный 1 (Th1), а - ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-13, как Т-хелперный 2 (Th2).

Изменение концентраций циркулирующих γ -ИФ и β -ИФ у иммунокомпетентных животных, инфицированных *Listeria monocytogenes*, можно обнаружить на вторые или третьи сутки. Пик иммунного ответа развивается к 6 дню инфекции, который совпадает с максимумом синтеза γ -ИФ Т-клетками. Введение анти- γ -ИФ моноклональных антител с целью нейтрализации эндоген-

ного γ -ИФ за 2 дня до иммунизации мышей живыми бактериями полностью блокировало как генерацию протективных Т-клеток, так и адаптивный перенос. Считают, что неспособность убитых листерий индуцировать протективный иммунитет обусловлена их неспособностью индуцировать продукцию γ -ИФ. Если инфекцию, индуцирующую иммунитет, остановить антибиотиками, то ослаблялись индукция протективного иммунитета и продукция γ -ИФ. γ -ИФ повышает экспрессию антигена ГКГС II. Было установлено, что γ -ИФ увеличивает презентацию эпитопов ЛЛО молекулами ГКГС класса I и II, а ИЛ-10 сильно ингибирует презентацию ЛЛО обоими лигандами.

ФНО- α появляется в течение первых 5 дней и были определены как медиаторы клиренса листерий. Имеются сведения, что ФНО- α усиливает механизмы антибактериальной резистентности. Его специфический антибактериальный эффект неизвестен, но его участие в рекрутировании лейкоцитов на первых этапах инфекции в печень и селезенку может быть крайне важным. Введение мышам анти-ФНО- α иммуноглобулина приводит к существенному увеличению числа бактерий в течение 2-3 суток инфекции, однако введение анти-ФНО- α иммуноглобулина на 5 сутки инфекции не оказывает эффекта на число листерий в печени и селезенке. Эти данные свидетельствуют, что ФНО- α -зависимые механизмы ограничивают внутриклеточную инфекцию на ранних этапах инфекции. ФНО- α в свою очередь может также генерировать продукцию интерферонов, которые имеют важную роль в контроле раннего бактериального роста, но не эффективны на поздних стадиях инфекции.

Роль колонестимулирующего фактора гранулоцитов (Г-КСФ), гранулоцит моноцитарного колонестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), ИЛ-3, ИЛ-6 не определена. Блокирование этих цитокинов предотвращает элиминацию бактерий.

Ингибиторные цитокины (ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО- β) появляются на поздней стадии инфекции.

Иммунизация солюбилизованными белками *Listeria monocytogenes* приводит, как правило, не к формированию защиты, а к повышению чувствительности к заражению данным возбудителем. В этой связи представляется интересным напомнить работу Virgin, Unanue, (1984). Когда мышей проиммунизировали овальбумином, а затем через 4 недели им ввели вновь овальбумин одновременно с сублетальной дозой (8×10^3) *Listeria monocytogenes*, то количество бактерий в селезенке мышей, получивших два антигена, было в 2500 раз выше, чем таковое в селезенке контрольных животных, не иммунизированных альбумином. Это дало основание сделать вывод об иммунодепрессирующем влиянии комплексов ОА+АТ на протективный иммунитет мышей к *Listeria monocytogenes*.

Известно, что иммунные комплексы стимулируют продукцию ИЛ-10, который, в свою очередь, ингибирует продукцию γ -ИФ и ФНО- α , если перед введением иммунных комплексов, мышей предобработать антителами, нейтрализующими ИЛ-10, то мыши приобретают устойчивость к сублетальным дозам *Listeria monocytogenes*.

Сегодня, благодаря достижениям фундаментальных исследований в области инфекционной иммунологии, в частности, листериоза, становится возможным управление развитием иммунных механизмов защиты.

Несмотря на то, что вакцинация живыми аттенуированными штаммами *L.monocytogenes* сейчас в мировой практике широко не практикуется, данная мера способна эффективно снижать инцидентность листериоза среди овец. В Норвегии иммунизация овец имеющейся живой аттенуированной бивалентной вакциной (1/2a и 4b) промышленного производства снижала инцидентность листериоза и абортосов по сравнению с невакцинированными контрольными хозяйствами. В производственных опытах половина овец в 70 отарах (всего 3130 головы) получила два аттенуированных штамма *L.monocytogenes* серотипов 1/2a и 4b, тогда как остальные овцы использовались в качестве невакцинированного контроля. После этого обе группы животных содержались вместе в одних и тех же загонах. Результаты данного исследования показывали, что инцидентность листериоза у вакцинированных и невакцинированных овец составляла соответственно 1 и 3 %. В 1984 году вышло разрешение, позволяющее в ограниченных размерах использовать данную вакцину в ходе 2-летних полевых исследований. После вакцинации приблизительно 8 % всех находящихся на территории Норвегии овец (приблизительно 145000 голов) инцидентность листериоза снизилась приблизительно с 4 % до 1,5 %. Инцидентность абортосов в вакцинированных отарах составляла 0,7 %, в невакцинированных – 1,1 %. В другом исследовании на овцах, ягнятах и овцематках исследовали экспериментальную вакцину, состоящую из сероваров 1/2a и 4b *L.monocytogenes*, аттенуированных посредством метаболических дрейфовых мутаций. Полученные результаты полевых тестов указывали на то, что вакцинированные овцематки давали большее количество ягнят, свободных от возбудителя листериоза (93,4 против 69,7 %) и имеющих больший вес при окоте (2,2 кг против 1,8 кг), чем ягнята, полученные от контрольных невакцинированных овцематок. Кроме того, *L.monocytogenes* не выделялись в образцах молока вакцинированных овцематок, в отличие от контрольных, у которых 32 % образцов молока содержали листерии. Несмотря на то, что вызываемые вакцинацией осложнения являются незначительными, сдерживающие факторы экономического характера показывают, что вакцинацию овец следует ограничивать отарами, где наблюдаются рецидивы листериоза.

Протективный иммунитет удалось индуцировать в результате введения мышам ЛЛО с убитыми теплом бактериями в присутствии неполного адъюванта Фрейнда. Эксперименты по адаптивному переносу подтвердили, что защита антигенспецифична. ЛЛО плюс убитые бактерии индуцировали экспрессию γ -ИФ и ИЛ-12, а CD4(+) Т-клетки были принципиально необходимы для протективного иммунитета. Показано, что множественное введение теплоинактивированных *Listeria monocytogenes* и ИЛ-12 формирует иммунологическую память, которая сопоставима с долговременным (больше 3 месяцев) протективным иммунитетом. Эти исследования показали, что ИЛ-12 может быть эффективным адъювантным компонентом вакцин для широкого круга патогенов животных и человека.

Ещё в 1950 году Stanley (1950) наблюдал, что липиды *L.monocytogenes* могли действовать как «адъювант» при продуцировании антител. Позже Jakoniuk и Borowski (1972) исследовали влияние убитых теплом *Listeria* на ответную реакцию мышей, иммунизированных овечьими эритроцитами. Как первичная, так и вторичная иммунная реакция были ускоренными, соответственно, пролиферация антителосинтезирующих клеток была усиленной и длительной. Вес селезёнки был тоже увеличен. Lane и Unanue (1973) сообщали, что во время листериозной инфекции у мышей отмечалось заметное возрастание иммунного ответа к растворимым белковым антигенам. Бактериальные фильтраты тоже производили подобный адъювантный эффект. В 1974 г. Petit и Unanue (1974) обнаружили, что культуры *L.monocytogenes* содержат вещество, митогенное для лимфоцитов В. Это вещество вызывало заметную гиперплазию в зонах «В-клеток» селезёнки. Пролиферация лимфоцитов *in vitro* тоже была увеличена. Будучи введёнными внутрибрюшинно, эти жидкости активировали макрофаги, а у мышей развивалось временное состояние неспецифической резистентности к листериозной инфекции. Fylton et al. (1975) описали, как водорастворимый экстракт из разрушенных ультразвуком *Listeria* вызывал запоздалую гиперчувствительность кожи морских свинок, заражённых внутрисердечно. В то же время экстракт был митогенным для перитонеальных лимфоцитов. Инкорпорация тимидина H^3 тоже усилилась.

Cohen et al., (1975) и Campbell et al., (1975) наблюдали очень похожие реакции на фракцию *L.monocytogenes*, содержащую много клеточных стенок. Это вещество является митогеном В-клетку мышей, вызывающим бласттрансформацию и инкорпорацию тимидина в клетки мышинной селезёнки. Кроме того, оно усиливает иммунную реакцию мышей на эритроцитные антигены как *in vitro*, так и *in vivo*. Вещество стимулирует три разных популяции В-клеток мышей, не затрагивая Т-клетки. (Campbell et al., 1976). Этот адъювантный эффект влияет на ранние этапы образования иммунной реакции. Препарат действует непосредственно на лимфоциты, присутствующие в неприкрепив-

шейся популяции клеток при относительном отсутствии прилипших клеток (Schuffler и Campbell, 1976). Кроме того, фракция из клеточных стенок *Listeria* вызывает хемотаксис и связывает комплемент (Bakes et al., 1977). Kearns и Minrichs (1978) тоже приготовили водорастворимый термочувствительный экстракт, который оказывал митогенный эффект на В-клетки. Митогенное свойство не было связано с вирулентностью для мышей. Экстракт содержал также термоустойчивые антигены, которые стимулировали культуры клеток селезёнки, полученные от специфически иммунных мышей.

Ivaný (1978) тоже наблюдал митогенный эффект фракции клеточных стенок листерий по отношению к В-клеткам мышей и материалам, полученным от человека.

С другой стороны, Kim et al. (1976) писали, что обработка мышей стерильным водным экстрактом *L.monocytogenes* вызывала понижение веса тимуса, и увеличение веса селезёнки. Общее число клеток в тимусе и костном мозге уменьшалось, тогда, как число клеток селезёнки увеличивалось. Производство антител и ответная реакция бляшкообразующих клеток на овечьи эритроциты подавлялись, когда экстракт применяли до антигена. Повидимому, эта обработка ослабляла потенциальные антитело-образующие клетки. Kongshavn et al. (1977) тоже наблюдали подавление *in vitro* реакций клеток селезёнки на антигена при заражении листериями. Кинетические исследования показали, что иммуноподавляющий эффект начинал развиваться на второй день после инокуляции бактерий и достигал пика на 6-ой день. Низкие дозы *Listeria* не обладают иммуноподавляющим действием и создают некоторый усиливающий эффект. Baker и Campbell (1978) тоже сообщали, что неочищенная и очищенная фракция клеточных стенок *Listeria* понижает резистентность мышей к *L.monocytogenes*.

L.monocytogenes вызывали скопление тромбоцитов крыс *in vitro* и стимулировали нелитический выход серотонина. Скопление тромбоцитов и выход серотонина требовали наличия интактных *Listeria* (Czupryneki, Balish 1981).

Наши исследования (Д. А. Васильев, 1983) по изучению протективных свойств изолированных клеточных структур листерий показали их значительную величину у фракции цитоплазмы. Иммуногенность рибосом, клеточной стенки и цитоплазматической мембраны в сочетании с полным адъювантом Фрейнда и другими иммуностимуляторами не повысили показатели протективного иммунитета (И. А. Бакулов, Д. А. Васильев и др., 1988, 1991, 1994, 2006).

Таким образом, расширение понимания развития иммунитета при листериозе существенно приблизило к возможности специфической профилактики этой болезни.

ЧАСТЬ VI

ПАТОГЕНЕЗ ЛИСТЕРИОЗА

ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ПАТОГЕННОСТЬ ЛИСТЕРИЙ

Патогенные свойства микроорганизмов рода *Listeria* изучаются с 1924 года. В первую очередь здесь следует упомянуть Julianelle, который предложил заражать мышей, кроликов, морских свинок и ставить реакцию Антона для определения вирулентности штаммов *Listeria monocytogenes* (Julianelle 1941). Kampelmacher и Noorle Jansen (1972) описали связь между гемолитическим свойством и патогенностью *Listeria* по отношению к куриным эмбрионам. Исследованиями установлено, что вирулентный штамм выделяется из организма в течение более длительного периода времени, чем слабо вирулентный. Это может быть связано со способностью вирулентных бактерий размножаться и персистировать в тканях хозяина лучше, чем менее вирулентных штаммов *Listeria*.

Audurier et al. (1980) тоже наблюдали, что патогенные *Listeria* могут заражать и размножаться у мышей после разного вида спленомегалий, вызванных инфекций. Только *L.innocua* персистировали без инвазии и увеличения печени.

Patocka et al. (1979) описали нейротропную активность непатогенных *Listeria*.

Skalka et al. (1982) предложили использовать экзовещество R.equì для определения in vitro вирулентность разных штаммов *Listeria*.

Schultz и Wilder (1971) обнаружили существование связи между вирулентностью штаммов *Listeria* и их сравнительной способностью выживать в сыворотке. Активный листерицидный фактор напоминает Ц-лизин, но может быть отдельной частью множественной системы подобных бактерицидов. Вирулентность штаммов *Listeria monocytogenes* повышается, когда в организме хозяина содержится большое количество железа. Кроме того, если в культуральной среде больше железа, бактерии *Listeria* размножаются в ней лучше (Sword 1965, 1966; Jackson, Sword

1967). Однако, Cowart, Poster (1981) наблюдали обратную связь между образованием гемолизина и железом. Гемолиз усиливался, когда снижалась концентрация железа.

Czurprunski и Balish (1981) тоже смогли выделить листерицидин, который был похож на Ц-лизин, в сыворотке как безмикробных, так и обычных крыс. Тромбоциты крыс оказались источником листерицидина.

Факторы патогенности

Бактерии *L.monocytogenes*, попавшие в организм с пищей, адсорбируются в кишечной слизи. Вначале думали, что подвижность благодаря жгутикам может быть важным фактором патогенности. Фактически, бактерии *L.monocytogenes* имеют жгутики, но бактерии подвижны только при температуре значительно ниже, чем существующая в теле теплокровного (20-25 °C). При 37 °C, образование жгутиков сильно уменьшается, и вероятно, поэтому подвижность не является фактором патогенности. Другой тип подвижности более важен для патогенности; способность бактерий использовать актин хозяйской клетки для собственного движения внутри и между хозяйскими клетками. Этот тип подвижности уже описан в случае с *Shigella spp.* В цитоплазме хозяйской клетки *L.monocytogenes* размножается быстро. Установлено, что бактерия размножается внутри хозяйской клетки каждые 50 минут, что является высоким уровнем для внутриклеточного патогена. Очевидно, для этой бактерии, цитоплазма хозяйской клетки является очень благоприятной средой. *L.monocytogenes* движется через цитоплазму со скоростью 1,5 мкм/сек, занимая соседние клетки путем полимеризации актина, формируя длинные хвосты. Хвосты состоят из коротких актиновых фибрилл и тянутся только от одного конца бактерии. Укорачивание актинового волокна может быть результатом конкуренции между бактерией и факторами хозяйской клетки, деполимеризующими актин. Актиновый хвост является фактически петлей, заполняющей пустоты, которые формируются на поверхности бактерии и остаются позади, продвигая бактерию вперед. Со временем, петли актиновых филаментов деполимеризуются, потому что нормальная хозяйская клетка включает механизм оборота актина. Таким образом, хвост постепенно исчезает по мере продвижения клетки вперед. Актиновый ядерный фактор, секретируемый бактерией, является, очевидно, белком, но он до сих пор не выделен и неохарактеризован. Инсерция транспозона в гене, кодирующем белок 90-kDa, уничтожает сформированные актиновые хвосты в макрофагах. Ген обозначен actA, но до сих пор неизвестно является ли этот протеин ядерным актином. Недавно найдено доказательство, подтверждающее, что ActA, фактически вовлекается в

формирование актинового хвоста, и, что ActA, похожий на IcsA из *Shigella spp.*, локализован на одном хвосте бактерии, из чего следует, что энуклеированный актин формируется предпочтительнее на одном конце палочковых бактерий.

Когда бактерии сталкиваются с цитоплазматической мембраной хозяйской клетки, которая отделяет клетку от соседних, они продолжают двигаться вперед, образуя выступы, которые продлеваются до соседней клетки. Так как мутантные бактерии, испытывающие недостаток в PC-PLC, фенотипически образуют маленькие бляшки, эта фосфолипаза может играть определённую роль в том процессе, при помощи которого бактерия проникает мембрану соседних клеток.

Был проведен эксперимент – остаются ли актиновые хвосты *L.monocytogenes* стационарными или двигаются с бактериями. Фотореактивные компоненты объединялись в растущие актиновые хвосты, а затем раздел хвоста пульсировал под тонким лучом лазерного света (таким образом, маркируются дискретные сегменты хвоста). Из результатов наблюдения, – осталась ли полоса индикатора постоянной или переместилась относительно бактерии, ученые заключили, что актиновый хвост остается стационарным, когда бактерия продолжает двигаться, подтверждая, что рост хвоста при помощи полимеризации актина в конце бактерии приводит в движение бактерии через цитоплазму.

Адсорбция и инвазия

L.monocytogenes прикрепляются и вторгаются в клетки млекопитающих. Фактически ничего неизвестно об адгезирующих стадиях, хотя думают, что α-D-галактозные остатки на поверхности бактерий связываются с α-D-галактозными рецепторами на клетках кишечника. Если так, то это противоречит ситуации, видимой в большинстве случаев бактериальной адгезии, когда белок на бактерии связывается карбогидратной половиной клетки хозяина. Как и в случае с *Shigella spp.*, бактерии захватываются при помощи фагоцитоза. Мембранный белок молекулярной массой 80-kDa, называющийся интерналин, может быть вовлечен в инвазию. Транспозонная вставка в *inlA*, кодирует ген интерналина, элиминируя способность захватывать культивированные клетки. *inlA* является частью оперона, который также содержит ген *inlB*, с неизвестными функциями. Таким образом, вставка в *inlA* может иметь полярный эффект с *inlB*, (т.е., *inlB* может быть важным для инвазии). Это не является объяснением для инвазивного фенотипа, так как аналог, несущий только *inlA*, комплементарен мутации в *inlA* при полном отсутствии инвазии. Части *inlA* аминокислотной последо-

вательности сходны с М-протеином *Streptococcus pyogenes*, белковая поверхность клетки предотвращает активацию комплемента и является более того антифагоцитной. Таким образом, на первый взгляд, *inlA* (который стимулирует фагоцитоз) выполняет противоположные функции для его гомолога в *S.pyogenes*. Однако, если два протеина взаимодействуют по схожим путям с хозяйскими белками, то они имеют одинаковые части доменов, но различные функции. Факт, что рецептор для *inlA* на макрофагах является комплементарным рецептору и, что М-протеин связывает сыворотку фактора Н и С3b указывает, что между ними существует связь. У *L.monocytogenes*, данный одиночный белок является важным для процесса, который требует трех белков (*IpaB-D*) в *Shigella spp.* Таким образом, *L.monocytogenes* лучшая модель для изучения инвазивной функции, чем *Shigella spp.*, так как его инвазивный процесс проще.

Бактерии *L.monocytogenes*, подобно *Shigella spp.* вторгаются только в недифференцированные ткани клеток. У человека и животных, *L.monocytogenes* четко инвазивный организм, который покидает кишечник и мигрирует в слизи, распространяясь по тканям. Не ясно используют ли *L.monocytogenes* М клетки как точку входа (как это происходит в случае *Shigella spp.*) или может входить через крипты клеток кишечника, который является только недифференцированными слизистыми клетками. Ничего неизвестно о том, как *L.monocytogenes* входят в тело интактных животных.

Роль в патогенезе субклеточного и внеклеточного листериозного субстрата

Anton (1934) первым отметил, что *Listeria* вызывают гемолиз на кровяном агаре. Позже, Burn (1936) и Barber (1939) обнаружили растворимый гемолизин в культуральной питательной среде. Lin и Bates (1961) смогли вызвать некроз кожи кролика и убить мышей введением фильтрата культуры *Listeria*. С 1962 г. ведутся исследования взаимосвязи между образованием гемолизина и патогенными свойствами *Listeria*. После Njoku-Obi и Jenkins (1962) многие исследователи: Jirazd, Sbazza et al., (1963); Jirazd et al., (1963); Njoku-Obi et al., (1963); Jenkins et al., (1964); Rogul, Alexander (1964); Kingben, Sword (1967, 1970); Sword, Kingdon (1971); Khan (1971, 1973); Cooper et al., (1973); Lemeland et al., (1974) с успехом выделяли гемолизин. Вещество оказалось кислородо- и тепло-лабильным белком. Cooper et al., (1973) показали, что гемолизин *L.monocytogenes* серотипа 5, *L.ivanovii* содержит также холинфосфолипид. Сначала полагали, что между образованием гемолизина и вирулентностью нет определённой связи. Njoku-obi, Jenkins 1962, 1963); Jirazd et al., (1963); Fuzi, Pillis (1962) наблюдали липазную активность *Listeria*

на агаре LV. Cirazd, Sbarra (1963) и Jenkins et al., (1964) отметили некоторую связь между гемолитической и липазной активностью. После соответствующего экстрагирования и очистки стало ясно, что липолитические и гемолитические молекулы независимы друг от друга, это установили Jenkins et al., (1966); Jenkins и Watson (1968).

Важно отметить, что только вирулентные штаммы действительно постоянно обнаруживают липолитическую активность. Souck et al., (1969) выделили из *Listeria* фосфолипазу, которая очень токсична, летальна и вызывает некроз кожи. Jenkins и Watson (1971) выделили гемолитические и липолитические белки. Ralovich et al., (1972) описывали разные типы реакций для вирулентных и невирулентных штаммов на агаре LV и заметили, что жирные кислоты нельзя обнаружить в среде с помощью реакции с сульфатом меди. Khan et al., (1975) показали, что штамм WCTC 5214 содержит лицитиназу (вероятно фосфолипазу C) и липазу. Позже Leighton et al., (1975) подтвердили, что *L.monocytogenes* (Boldy) продуцируют фосфолипазу C. В то же время Watson, Lavizzo (1973) с успехом усиливали патогенность невирулентного штамма в клеточной культуре путём добавления липолитического антигена к системе. Кроме того, было отмечено, что невирулентные штаммы *Listeria* тоже способны вызывать гемолиз. Этот результат не подтверждает точку зрения о том, что лишь лизис β -типа на кровяном агаре, вызываемый гемолизином, имеет патогенное значение (Ralovich et al. 1977). Многие результаты доказывают, что гемолизин токсичен для экспериментальных животных. Особенно поражаются печень и сердце, но токсин влияет также на гладкие мышцы и функцию матки. По-видимому, нарушается нормальный баланс энергии, функция митохондрий, процесс фосфорилирования и метаболизм углеводов и пуринов (Wilder, Sword 1965, 1967; Sword, Wilder 1967; Siddique et al. 1970, 1976; Mc Callum, Sword 1972, Stokes et al. 1976). В своих исследованиях Siddique et al. (1970) выделили фракцию гемолизина, которая может расщеплять НАД. Однако, группе Cooper et al. (1973) не удалось наблюдать токсического эффекта.

Внутривенно введенный гемолизин является пирогенным для кролика (Siddique и сотр. 1969) и оказывает разное влияние на компоненты крови, поражая тромбоциты (Siddique, Williams 1969; Siddique et al. 1970), влияя на их число как у кроликов (Siddique et al. 1969), так и у мышей (Cooper et al. 1973), и приводя к моноцитозу (Cooper et al. 1973). Очень важно, что лизин поражает не только эритроциты, но и фагоциты; кроме того, он повреждает мембрану лизосом и фагосом (Kingdon, Sword 1970). В результате освобождаются разные ферменты (Kingdon, Sword 1967, 1968; Sword, Kingdon 1971), и электронная микроскопия свидетельствует о разрушении мембраны (Armstrong, Sword, 1966).

Но не только гемолизин может играть роль в патогенезе листериозной инфекции. Вполне возможно и другие продуценты или структурные компоненты клетки связаны с этим процессом.

Stanley (1949) выделил водорастворимый полисахарид, который, по его мнению, является очень токсичным и вызывает лимфопению и гранулоцитоз. Patocka, Schindler (1956) повторно исследовали первичную токсичность разных экстрактов. В ходе работы они обнаружили, что водорастворимый полисахарид выделенный Стэнли нетоксичен; однако он усиливает вирулентность штаммов *Listeria* при одновременном введении. Позже они исследовали лизат глицина *Listeria* (Patoka et al. 1959). Материал, полученный фракционированием, состоит в основном из белка и вызывает лихорадку и гранулоцитоз.

Zipplies (1957) выделил белок и углевод, и установил, что оба экстракта обладали антигенными и пирогенными свойствами у кроликов, увеличивали число лейкоцитов, но снижали число лимфоцитов. Silverman et al. (1961) экстрагировали дезинтегрированные ультразвуком *Listeria* солевым раствором и получали вещество, которое усиливало вирулентность, было токсично, вызывало изменения в количестве кровяных клеток и уровне пропердина, лизоцима и комплемента в сыворотке. Оно было более устойчиво к теплу, чем экстракт, выделенный Patocka и Schindler. Исследования Woodrow и Valentine (1965) подтвердили результаты Silverman et al. (1961).

Potel и Degen (1961) получили разные фракции из *Listeria* с помощью уксусной кислоты, фенола и NaOH. Фракция «Е», которая оказалась специфическим аллергеном, состояла из белка и фосфолипида. Это нетоксичное вещество не вызывало ни моноцитоза, ни лихорадку.

Tubylewicz (1963) исследовали фракции липидов, сахаров и белков *Listeria* и предположили, что «фактор, ответственный за патогенность этих штаммов, находится в белковых фракциях».

Согласно исследованиям Njoku-obi (1964) и Robinson, Njoku-obi (1964), токсичный полисахарид, экстрагированный из *Listeria* вестфальским методом, защищает мышей от листериозной инфекции.

Cooper et al., (1973) исследовали 14 фракций *Listeria*, лишь три из них не имели липидов. Кроме того, экстракты содержали различные количества белков и углеводов. Ни одна из 14 проб не была токсичной. 7 фракций вызывали аборт, а 6 из них были преципитирующими антигенами. Одна высоколабильная фракция вызывала окситоциноподобную реакцию в матке мыши.

Patocka и Mara (1973) использовали метод Рибби и получили токсичный пирогенный экстракт, который обладал антигенными свойствами и вызывал аллергические реакции. Экстракт, содержащий белок, углеводы и свободно и «крепко» связанные белки, можно было нейтрализовать спец-

ифической иммунной сывороткой. Нуклеиновые кислоты присутствовали, по-видимому, лишь как контаминанты. Эта исследовательская группа не обнаружила никаких фундаментальных различий между биологической активностью и химическим составом материалов, экстрагированных из 2-х штаммов разных серотипов, их вирулентностью и образованием гемолизина. Оба экстракта повышали вирулентность *Listeria* и не могли лизировать эритроциты или влиять на активность НАД. Кроме того, эти авторы наблюдали освобождение ингибирующего фактора миграции (MIF) из лимфоцитов животных, сенсибилизированных экстрактом (John et al., 1974).

В том же году Srivastava и Siddique (1974) выделили эндотоксиноподобное вещество из экстракта *Listeria*, полученного с помощью диэтилового эфира; оно содержало углеводы, белок, нуклеиновую кислоту, фосфор и липиды. Гексоза, гептоза, гексозамин, метилпентоза (рамноза), 2-кето-3-дезоксиктанат (КДО) и дидезоксигексоза составляли углеводные компоненты экстракта. Белок содержал 16 аминокислот. Токсичный компонент был пирогенным для кроликов, вызывал отёк и был летальным для куриных эмбрионов. Позже Conklin и Siddique (1976) выделили токсичный компонент из *L.monocytogenes* с помощью фенола; экстракт содержал углевод, белок, липид, фосфор и 2-кето-3-дезоксиктанат-подобный компонент. Антигенность водной фазы была похожа на таковую целых бактериальных клеток. Экстракт был токсичным для куриных эмбрионов.

Wexler и Oppenheim (1979) выделили из фенол-водного экстракта *L.monocytogenes* токсичный LPS – подобный компонент, ответственный за «синдром холодного агглютина» у людей и животных. Материал содержал 15 % всей жирных кислот (из которых 50 % составляла Ц-гидрооксимиристиновая кислота) 40-45 % глюкозы, галактозы и рамнозы, 11,5% аминасахара, 12 % уроновой кислоты, 2,5 % 2-кето-3-дезоксиктановой кислоты, 2 % гептозы, 0,87 % фосфора и 1,6 % аминокислоты, составляя, таким образом, 85-90 % веса компонента. Очищенный материал, расположенный очевидно на поверхности клеток *Listeria*, образовывал осадок (скопление) в водных растворах, был токсичным и пирогенным для кроликов и активным в пробах лизата *Limulus* и карбоаминовых пробах. Кроме того, при его введении повышался титр антилистериозных антител. Singh и сотр. (1981) приготовили материал с очень похожими свойствами.

Murray et al., (1926) писали, что заражение листериями вызывало мононуклеарную реакцию у кроликов. Stanley (1949) выделил МРА, Girard показал, что МРА является фосфолипидом. Jaeger и Myer (1954) применили экстрагирование хлороформом и выделили липидоподобный термолабильный поверхностный антиген, который вызывал моноцитоз у кроликов также, как МРА. Keeler и Gray (1960) предположили, что МРА заключён в кле-

точную стенку или мембрану. Munker и Roots (1963) обнаружили обратную связь между продуцированием МРА и вирулентностью. Работа Beaulieu (1963) отразила влияние температуры и времени инкубации на выход МРА.

Mc. Ilwain et al., (1964) исследовали неочищенный белковый экстракт и получили 3 белковые фракции из разрушенных *Listeria*. Неочищенный белок и фракция Р вызывали аномалии в электрокардиограмме и увеличивали частоту дыхания у подопытных животных; кроме того, они были пирогенны, влияли на углеводный обмен и вызывали значительный моноцитоз. В 1966 г. Carroll et al., (1966) представили данные по липидным экстрактам *Listeria*, полученным из целых клеток или клеточных мембран. Активность МРА была связана с моноглицеридами. Кроме того, Holder и Sword (1967, 1969) сообщали, что глицеридная фракция была активной; им также удалось обнаружить углевод и белок в хлороформовом экстракте. Активный элемент влиял не только на углеводный обмен, но и на обмен мочевины.

Sen и Dhanda (1968) выделили неочищенные липополисахариды из разных серотипов *Listeria* с помощью щелочного гидролиза. Полисахариды были не токсичны для мышей, но пирогенны для кроликов и вызывали полиморфонуклеарный и моноцитный лейкоцитоз. Согласно Carroll и сотр. (1968), ни одна из липидных фракций не стимулировала образование моноцитов, но фосфолипидная фракция снижала число лимфоцитов у мышей. Они также исследовали те факторы, которые влияли на образование МРА и реакцию моноцитов; этот экстракт оказывал влияние как на число лейкоцитов, так и на число лимфоцитов (Tadayon et al., 1969). Позже они обнаружили, что моноцитостимулирующая и лимфоцитоподавляющая активность фосфолипидного экстракта не была связана с липидной частью. Активное вещество состояло из белка, аминокислот, углевода и нуклеиновой кислоты и могло экстрагироваться водой или солевым раствором (Tadayon et al., 1970).

Cooper et al., (1973) исследовали штаммы *L.monocytogenes* серотип 5 (*L.ivanovii*). Они экстрагировали МРА, гемолизин и ещё 14 разных фракций; МРА содержал лишь нейтральные липиды.

Galswor et al., (1977) сообщали, что МРА связан с клеточной оболочкой, особенно с плазматической мембраной. Они смогли разделить МРА и иммуноподавляющий агент водного экстракта как две независимые «молекулы». МРА не был белком, но содержал углевод и фосфор. Водорастворимый МРА стимулировал пролиферацию промоноцитов мышей. Ауторадиография клеток костного мозга у мышей, обработанных тимидином, меченым по тритию, показал повышенный индекс мечения промоноцитов, а моноциты крови тоже оказались в высшей степени мечеными (Shum и Galsworthy 1979). После очистки МРА они получили частично очищенный препарат (С-4), теряющий

in vitro митогенную и адьювантную активность, а также активность, стимулирующую гранулоцитоз и лимфопению (Otokunefor et al., 1979).

В настоящее время общепризнанным является следующий механизм поражения соматической клетки. Фагоциты переносят *L.monocytogenes* в хозяйские клетки, используя запаковывание ее в везикулярную мембрану. Бактерии покидают везикулу и размножаются в клеточной цитоплазме.

Что влияет на вирулентность штаммов *Listeria*

Вирулентность – относительный признак, который является характерным для одного бактериального штамма и может определяться тестом на подходящем хозяине. Степень вирулентности определённого бактериального штамма определяется не только его собственными свойствами, на которые очень влияют условия культивирования, но и биологическими свойствами хозяина, условиями проведения теста и способом заражения.

Хорошо известно, что действительное биологическое состояние (на молекулярном уровне) клеток бактерий и организма хозяина определяет результат заражения (Kaufman et al., 1979). Это состояние генетически определено, но на него могут влиять специфические (иммунологические) и неспецифические (физические, химические, биохимические и биологические) факторы.

Munker и Roots (1963) исследовали взаимодействия между режимом культивированием, с одной стороны, и образованием гемолизина, развитием моноцитоза и вирулентностью *L.monocytogenes*, с другой. Культивирование при 37 °C приводило к увеличению показателей вирулентности и к более низкому образованию моноцитов, чем культивирование при комнатной температуре. Вирулентность увеличивалась, а реакция моноцитов снижалась, когда культуры выращивали в присутствии 10 % CO₂. В таких условиях гемолиз тоже был более интенсивным, чем в обычных условиях культивирования. Fridman и Kautter (1962) отметили, что вирулентность штаммов *L.monocytogenes* в отношении способности вызывать респираторную инфекцию у мышей или морских свинок можно было усилить, понижая концентрацию глюкозы или добавляя 0,1 % L-цистеин в среду. Этого нельзя было добиться, когда мышей заражали внутрибрюшинно. На вирулентность влиял и возраст культуры. Эффект от применения фруктозы был таким же, как и от глюкозы; а мальтоза снижала урожай клеток и увеличивала вирулентность.

Kautter et al., (1963) выявили, что показатели вирулентности штаммов *Listeria* могут зависеть от способа заражения. Silverman et al., (1963) исследовали рост *L.monocytogenes* в органах мышей после заражения респира-

торным, внутривенным и внутрибрюшинным способами. После заражения каждым из этих способов можно было получить *Listeria* из селезёнки, печени и мозга, но не из лёгких. Silverman et al., (1963) пассировали 3 штамма *L.monocytogenes* на мышах, морских свинках и обезьянах путём введения возбудителя в головной мозг, брюшину и спинной мозг, соответственно. Результаты не показали усиления вирулентности. Изучение генетической основы резистентности или чувствительности к инфекции очень важно. Работа с разными линиями мышей показала отчётливые различия в резистентности или чувствительности к *Listeria*. Путём использования обратного скрещивания и разных родственных и рекомбинантных линий мышей связь соответствующих генов с локусами H-I, H-2, H-3, H-4, H-7 или H-8, с аллотипом иммуноглобулина, с геном T_Hу-I, с геном Hс, определяющим С5 или генами цвета шерсти (В, С) была исключена. Не было различий в ответной реакции самцов и самок. Во всех исследованиях было очевидно сильное тормозящее влияние генома мышей линии C57BL (Cheers, Mc Kanzie 1978; Skamene et al., 1979). Мыши C57BL /I0 были в 100 раз более устойчивы к внутривенному введению *L.monocytogenes*, чем мыши BALB/с благодаря действию одного гена Lr (Cheers и сотр. 1980). Различия в гистопатологии листериоза у двух штаммов приведены в статье Mendel и Cheers (1980).

Результаты изучения экспериментального листериоза у фенотипически нормальных / пу / + / мышей NMR1 с нормальным тимусом и у мышей с конгенитальным нарушением тимуса / пу / пу / были различны. Бесщёрные мыши обнаружили аномально высокую природную резистентность против заражения *Listeria* при наличии естественно существующих активированных макрофагов. В целом же отмечена неспособность голых мышей к эффективному сопротивлению листериозной инфекции. Этот признак, очевидно, был результатом отсутствия Т-лимфоцитов (Emmerling et al., 1975; Heymer et al., 1976; Nickol, Bonventre 1977). Lawrence и Schell (1978) сообщали, что мыши с С5 – недостаточностью были более восприимчивы к *Listeria*, чем нормальные мыши.

Исследовали также изменения резистентности мышей к *Listeria* в зависимости от возраста. У 1-месячных мышей наблюдали самую низкую резистентность, затем она усиливалась в течение первых нескольких месяцев, достигая максимума к 8-му месяцу. После этого с возрастом происходило прогрессирующее снижение резистентности. Эти изменения связаны с пониженной способностью взрослых мышей продуцировать защитные Т-клетки (Cardner, Remington 1977; Patel 1981).

Как упоминалось выше, связь между хозяином и бактерией очень сложная, на неё влияет и гормональное состояние. Ishibashi et al., (1981) наблюдали изменённую резистентность к *Listeria* у мышей с диабетическими

нарушениями. Лечение инсулином не влияло на изменения. Половые гормоны могут стимулировать фагоцитарную активность, антибактериальное действие сыворотки, могут снижать образование и действие токсинов и могут влиять на размножение грамположительных бактерий. Harrison et al., (1975) сообщали, что эстрадиол-17 увеличивает латентный период штамма *L.monocytogenes* и влияет на активность гемолизина. Позже Brookes et al., (1981) сообщили, что прогестерон тоже осуществляет бактериостатическую активность по отношению к *Listeria*. Следовательно, оба гормона могли контролировать патогенное свойство *L.monocytogenes*. Hamada et al., (1981) наблюдали повышенную резистентность во время беременности у мышей СЗН/Нс с 10 дня беременности по 5 день после родов, но не ранее 10 дня беременности.

Кортикостероиды оказывают определённый ингибиторный эффект на естественные защитные механизмы, увеличивая восприимчивость мышей к листериозной инфекции (Miller, Hedberg, 1965).

McKenzie (1956), Sinkovics et al. (1980), Van Asbeck et al. (1982) наблюдали больных с гемохроматозом и листериозом. Избыток железа у хозяина может повышать восприимчивость к *Listeria* не только благодаря усилению вирулентности *Listeria*, но и благодаря снижению фагоцитарной способности моноцитов.

Способы определения вирулентности листерий

В работе с возбудителем листериоза большое значение имеет изучение степени его патогенности – вирулентности. Это необходимо для проведения работ по аттенуации штаммов с целью получения живых вакцин из ослабленных штаммов. Кроме того, при бактериологическом исследовании патологического материала необходимо определять вирулентность выделенных штаммов. Чрезвычайно важно установить вирулентность штаммов, выделяемых у листерионосителей, которые имеют весьма большое эпизоотологическое значение. Определение вирулентности штаммов листерий проводится путем нанесения культуры на конъюнктиву морской свинки (конъюнктивальная проба) или путем заражения лабораторных животных различными способами.

Конъюнктивальная проба заключается в нанесении испытуемой культуры на конъюнктиву глаза морской свинки или кролика. Для конъюнктивальной пробы мы брали суточную бульонную культуру соответствующего штамма, наносили 1-2 капли на конъюнктиву одного глаза морской свинки или кролика. Затем накладывали на этот глаз ватный тампон и делали легкий массаж. Нанесение культуры листерий на конъюнктиву через 1-4 дня

вызывало местный воспалительный процесс в виде в начале серозного, а затем гнойного кератоконъюнктивита. Спустя 10-17 суток после аппликации культуры воспалительные явления глаза обычно стихали, но помутнение роговицы иногда сохранялось дольше. Через месяц после нанесения культуры глаз животного полностью восстанавливал свой первоначальный вид.

Отмечено, что интенсивность реакции, сроки ее появления и длительность зависели от вирулентности штаммов: более вирулентные вызывали кератоконъюнктивит на 1-2-й день, и процесс длился 11-17 суток, менее вирулентные – на 3-4-й день с длительностью процесса 10-13 суток, сильновирулентные у отдельных свинок вызывали септицемию, и животные погибали на 5-44-й день после нанесения культуры. Штаммы с пониженной вирулентностью, в том числе R-формы, не вызывали реакции глаза.

Опыты по заражению лабораторных животных различными способами описаны ранее. Недостаток этих методов в том, что они дают ответ на вопрос – да или нет, но с их помощью почти невозможно оценить степень патогенности – вирулентность. Лишь в отдельных работах делались попытки установить опытным путем минимальную смертельную дозу для лабораторных животных. Однако определение минимальной смертельной дозы, недостаточно точно характеризует истинную вирулентность штамма. Правильнее вычислять среднюю летальную дозу (дозу, при которой гибнет 50% взятых в опыт животных).

Мы применили методику определения вирулентности листерий с помощью титрации различных штаммов на куриных эмбрионах. Целью нашей работы было изыскать метод, который позволил бы стандартизировать определение вирулентности штаммов, объективно (до известной степени) судить о качественной стороне, об изменении вирулентности штаммов в процессе культивирования или воздействия на них различными факторами, позволяющими изменить это качество штамма.

С этой целью были использованы куриные эмбрионы 10-дневного возраста, для сравнения были взяты 7-8-дневные мыши-сосуны и 12-15-граммовые белые мыши. Заражали смывами суточной агаровой культуры. Из исходной суспензии после установления концентрации в 1 млрд. микробных тел делали десятикратные разведения в 1 мл. Эмбрионы заражали в аллантоисную полость дозой 0,2 мл (по 4 на каждое разведение), мышей-сосунов заражали подкожно по 0,2 мл, взрослых мышей – по 0,4 мл внутривентально. Титр определяли по методу Рида и Менча; полученные результаты обработаны статистически методом прямолинейной регрессии.

В результате проведенных исследований было установлено, что lg LD₅₀ штамма 766 для куриных эмбрионов был равен $9,09 \pm 0,48$ ($P < 0,001$), для штамма 1472 - $8,67 \pm 0,26$ ($P < 0,001$), для мышей-сосунов соответственно 8,28

$\pm 0,27$ ($P < 0,001$) и $8,5 \pm 0,25$ ($P < 0,001$). Для взрослых мышей lg LD₅₀ штамма 766 оказался равным $3,02 \pm 0,44$ ($P < 0,001$). При заражении взрослых мышей штаммом 1472 получен незакономерный результат, который невозможно было обработать математически.

Таким образом, развивающиеся куриные эмбрионы оказались более чувствительной, стабильной и более удобной моделью для титрования листерий, чем мыши-сосуны и взрослые мыши. Эмбрионы погибали на 2-5-е сутки, мыши-сосуны – спустя 6 дней, некоторые – спустя 14-20 дней, взрослые мыши – на 10-30-й день, а некоторые вообще не погибали. Выявить какую-либо закономерность в гибели мышей нам не удалось, что совпадает с наблюдениями других авторов.

Нам кажется, что, используя эту методику, можно точнее устанавливать и оценивать вирулентность штаммов листерий, выделяемых при исследовании патологического материала, а также в ходе работы по аттенуации штаммов. Как уже указывалось ранее, вирулентность листерий связана с их ферментативной активностью. На основании проведенных опытов Стрикер, Фишера, Кремер и Ференчик считают, что количественное определение каталазы, некоторых дегидрогеназ и глутаминооксалазной трансаминазы является простым и вполне удовлетворительным методом оценки вирулентности возбудителя листериоза.

Таким образом, у всех животных в патологоанатомической и патологистологической картине при листериозе являются общими и наиболее часто повторяющимися следующие признаки, о которых нужно помнить при постановке диагноза на это заболевание.

1. При нервной форме болезни не удастся выявить характерных макроскопических изменений. Обнаруживают лишь отечность мозгового вещества, инъекцию сосудов мозга и мозговых оболочек, кровоизлияния в мозговой ткани и отдельных внутренних очагах. Гистологическое исследование при нервных формах устанавливает менингит или менингоэнцефалит с инфильтрацией клетками (чаще моноцитарного типа) и с наличием периваскулярных муфт.

2. При септицемической форме болезни обнаруживают гиперемия или отек легких, катар слизистых оболочек пищеварительного тракта, кровоизлияния в сердечной мышце, в паренхиматозных органах, увеличение селезенки, дегенеративные изменения и некротические очажки в печени, селезенке, реже в почках и миокарде; увеличение лимфатических узлов. Гистологическое исследование печени, селезенки показывает, что некротические очажки представляют собой скопление клеток (лимфоидногистиоцитарного типа), в центре которого обнаруживали некроз с явлениями кариорексиса.

При поражении половых органов у самок обнаруживают эндометрит или метрит. Гистологическое исследование показывает наличие десквамации эпителия, обнаруживаются поверхностные эрозии по вершинам складок слизистой оболочки, кровоизлияния, скопления лейкоцитов и гистиоцитов, в подслизистом и мышечном слоях – скопления полибластов и лимфоидных клеток.

Патогенность лабораторных животных

Патогенность листерий для лабораторных животных – это видовой признак данного микроорганизма. Этим свойством обладают почти все выделенные из патологического материала штаммы листерий, а также лабораторные культуры в S-форме. Листерии патогенны для многих диких и домашних животных.

Степень чувствительности различных лабораторных животных к листериозу различна. Успех заражения зависит от вирулентности штаммов.

Большую роль играют доза, используемая для заражения, а также пути и способы заражения. Наиболее надежными способами являются внутрицеребральный, внутривенный и внутрибрюшинный. Высокоэффективен аэрозольный способ заражения. Успешный результат дает заражение путем инстилляций материала на конъюнктиву глаза, а также на слизистые оболочки носовой и ротовой полостей, в особенности с предварительной скарификацией последних. От подкожной инъекции гибнут только белые мыши, степные пеструшки, морские свинки. Кролики, как правило, устойчивы к подкожному и внутримышечному заражению, но быстро погибают при внутривенном заражении. Мыши, зараженные в мозг и внутрибрюшинно, погибают в 100 % случаев, зараженные внутривенно и подкожно – в 75 %.

Попытка повысить вирулентность листерий путем серийного пассирования через организм мышей, морских свинок и обезьян при различных способах заражения (интрацеребрально, интраперитонеально и в спинномозговой канал) не имела успеха.

Добавление к культуре листерий экстракта убитых этиловым эфиром листерий, аутолизатов центрифугированных листерий или же убитых ацетоном листерий усиливает и ускоряет летальное действие этой культуры на зараженных мышей. Этот экстракт представляет собой комплекс протеинов, полисахаридов, нуклеопротеинов и липидов. Дальнейшие исследования показали, что активной частью этого комплекса является L-протеин. Активность полисахаридов была незначительной, а нуклеопротеины оказались неактивными. Установлено, что приготовленный термостабильный экстракт из клеток листерий, снижает устойчивость мышей, морских сви-

нок, кроликов и обезьян резусов к заражению листериями, а также снижает резистентность мышей к инфекциям, вызываемым другими грамположительными и грамотрицательными видами бактерий (*Brucella suis*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*). Ю. Н. Одинцов установил, что длительное воздействие переменного магнитного поля (напряжение 200 эрстед, частота 50 герц) в течение 15 дней, по 6,5 часов ежедневно резко снижает естественную резистентность белых мышей к листериозу.

Для биологической диагностики листериоза обычно используют белых мышей, морских свинок, кроликов, степных пеструшек.

Белые мыши. Белые мыши – доступная и сравнительно удобная модель для работы с листериозом. Они достаточно чувствительны к заражению листериями, если правильно выбрать способ заражения, дозу возбудителя и возраст мышей. Их, как правило, заражают подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, реже интрацеребрально, интраназально, интравенозно. Подкожный и внутримышечный способы мало отличаются друг от друга по своим результатам. Гибель мышей зависит от дозы возбудителя и веса мышей при одной и той же вирулентности штамма. Лучше всего пользоваться мышами весом не более 18 г.

В наших опытах установлено, что минимальная смертельная доза (DLM) штамма 766 *L. monocytogenes* для белых мышей весом 18 г при подкожном способе заражения составила 1 млн. микробных тел. Мыши, получившие 1 млрд. микробных тел, пали через 3 суток с момента заражения, 100 млн. микробных тел – через 4 суток, 10 млн. микробных тел – через 5-6 суток, 1 млн. микробных тел – через 8-9 суток.

Зараженные листериями мыши становятся вялыми, малоподвижными, отказываются от корма. У них наблюдается оцепенение, диффузный пот, судороги. Непосредственно перед смертью обнаруживаются параличи конечностей. Гибель животных наступает в срок от 1 до 30 суток (обычно до 15 суток). Часть мышей при этом выживает, что связано, очевидно, с индивидуальной устойчивостью животных. В связи с этим мышь нельзя считать «стандартной» моделью для работы с листериозом. Поэтому исследователи постоянно искали способы усовершенствования использования мышей для биологической диагностики листериоза.

Н. С. Огнева установила, что введение кортизона (5 мг за 4 часа до заражения, внутримышечно) значительно повышает чувствительность мышей к возбудителю листериоза. Ф. С. Шуляк показал, что чувствительность мышей к листериозу резко повышается при введении культуры в жевательный мускул. Он же успешно применил в качестве модели для изучения листериоза белых мышей-сосунов.

Мыши оказались весьма чувствительными к внутримозговому заражению культурами листерий, что в отдельных случаях очень ценно в работе с листериозом. Некоторые авторы предлагают ускоренный метод диагностики листериоза путем внутримозгового заражения мышей эмульсией мозга животных, подозрительных по заболеванию листериозом. Мы проводили заражение мышей в мозг, используя укороченные иглы и применяя объем вводимой жидкости не более 0,1 мл. Высоковирулентные штаммы убивали мышей через 15-20 часов с момента заражения, менее вирулентные – через 2-5 суток. Штаммы в R-форме не всегда вызывали гибель мышей, однако пассаж через мозг мышей приводил к восстановлению у штаммов способности вызывать гибель мышей при последующем подкожном заражении.

При интраназальном заражении доза возбудителя в 1 млрд. микробных тел убивает мышь через 3,5 суток, в 100 млн. микробных тел через 6,5 суток, в 1 млн. микробных тел через 7,5 суток.

Степные пеструшки. Удобной и весьма чувствительной моделью для работы с листериозом являются степные пеструшки (*Lagurus Lagurus Pall*), относящиеся к семейству мышиных (*Muridae*), подсемейству полевок (*Microtinae*). Впервые при листериозе в качестве экспериментальной модели пеструшки были использованы Т. Н. Дунаевой, которая установила высокую чувствительность этих животных к возбудителю листериоза. Нами также была использована пеструшка, как экспериментальное животное при листериозе. Степная пеструшка – небольшой зверек величиной с белую мышь. Вес пеструшки в 6-месячном возрасте 18-20 г. Зверьки удобны для работы, хорошо размножаются в лабораторных условиях, неприхотливы. Экспериментальный листериоз у пеструшек характеризуется снижением аппетита, угнетением. Шерсть у животных взъерошивается, и пеструшка становится похожей на маленького ежа. Отмечается наличие двухстороннего гнойного конъюнктивита, а в позднем периоде болезни обнаруживаются параличи конечностей.

Оказалось, что чувствительность пеструшек (DLM=10 микробных тел) намного превышает чувствительность белых мышей (DLM=1 млн. микробных тел). Кроме того, гибель пеструшек наступала при заражении аналогичными дозами в более короткие сроки. Так, от дозы 100 млн. микробных тел пеструшки погибали через 2-2,5 суток, 10 млн. микробных тел через 2,5-3 суток, 1 млн. микробных тел – через 3 суток, 1 тыс. микробных тел – через 4 суток, 10 микробных тел – через 4-4,5 суток.

Белые крысы. Опыты по заражению листериями крыс были поставлены Ю. А. Малаховым. Алиментарным путем были заражены взрослые крысы (доза 10 млрд. микробных тел) и крысята (доза 5 млрд. микробных тел.). Все животные переболели бессимптомно. Крысята, зараженные дозой 25-

30 млрд. микробных тел, погибли от листериоза. Крысы, зараженные аэрозольным методом при 2-часовой ингаляции взвеси листерий, погибли на 4-6-й день от листериозной септицемии, при однократовой ингаляции крысы переболели бессимптомно. При подкожном заражении крысы также переболели бессимптомно.

Таким образом, белые крысы являются недостаточно чувствительной и неудобной моделью при работе с листериозом.

Кролики. Кроликов легко заразить при введении листерий в мозг, внутривенно, интраназально, интраперитонеально. В отношении подкожного и внутримышечного способов заражения данные противоречивы.

В наших опытах испытаны различные способы заражения кроликов: внутривенный, подкожный, интраназальный. Оказалось, что кролики устойчивы к подкожному (переносят дозу 2 млрд. микробных тел) и интраназальному заражению. Наиболее эффективным было внутривенное заражение – минимальная смертельная доза для штамма 766 *L.monocytogenes* при внутривенном заражении составляла (для кроликов весом 1,5-2 кг) 500 млн. микробных тел, кролики погибали на пятые сутки. При введении внутривенно 2 млрд. микробных тел кролики погибали на третьи сутки. Листериоз у кроликов протекает остро и подостро. Подострое течение характеризуется наличием менингоэнцефалита (кривоголовость, нарушение равновесия, перекачивающиеся движения у кроликов) или метрита. Существуют три клинические формы листериоза кроликов: острая, подострая и хроническая. При остром течении кролики погибают через 1-2 дня после появления у них видимых признаков болезни; при подостром имели место характерные признаки поражения центральной нервной системы; при хроническом течении – насморк. Листериозом болеют преимущественно беременные крольчихи. Болезнь проявляется неполными абортами или падежом самок за 1-2 дня до окрола или после него. Молодняк заболевает редко, а взрослые самцы и небеременные самки вовсе не болеют или переболевают скрыто, без видимых признаков заболевания. Аборт, обычно наблюдаемый во второй половине беременности, как правило, неполный (1-2 плода остаются в матке). Абортировавшие самки тяжело переболевают (угнетение, отказ от корма, исхудание, истечение из половых органов, параличи задних конечностей) и гибнут через 2 – 4 дня (реже через 3 – 4 недели). Иногда плоды рассасываются в матке полностью, у таких самок признаков болезни не отмечают. Имеет место также рождение мертвых или живых, но нежизнеспособных крольчат, последние погибают в первые дни после рождения.

В наших опытах при экспериментальном заражении первые клинические признаки листериоза у кроликов появлялись на 2-3-й день и характеризо-

вались угнетением, снижением аппетита, серозными конъюнктивитами и ринитами. Но на 3-4-й день наблюдали резкое угнетение, искривление шеи, парезы и параличи ушей и конечностей, приступы судорог с запрокидыванием головы на спину. Иногда отмечали параличи сфинктеров мочевого пузыря и непроизвольное истечение мочи. Температура тела повышена, пульс учащен, дыхание затруднено.

Морские свинки. Листерииоз морских свинок впервые описан Е. Murray, R. Webb, M. Swann (1926). Мы также наблюдали спонтанный листериоз морских свинок в одном из питомников (питомник Рапполово Ленинградской области). В литературе имеются указания на устойчивость морских свинок к листериозу, в частности при подкожном и внутримышечном способах заражения. На основании проведенных опытов мы не склонны разделять это мнение и считаем морских свинок чувствительными к листериозу животными.

Минимальная смертельная доза штамма 1472 при подкожном заражении оказалась 100 млн. микробных тел, свинка при этом погибала через 8 суток. Доза в 1 млрд. микробных тел при подкожном заражении убивала свинок через 3 суток. Суточная бульонная культура этого же штамма в дозе 1-1,5 мл при подкожном заражении вызывала гибель свинок на 3-15-е сутки. Вначале были зарегистрированы аборт у самок, затем начался падеж абортировавших самок, позднее присоединился падеж молодняка. Таким образом, волна абортов предшествовала гибели морских свинок от листериоза. Всего абортировало 52 % самок, пало 35,9 % самок (68,4 % к числу абортировавших) и 32,8 % молодняка. Наиболее устойчивыми оказались самцы (пало 6,9 % самцов). Общий отход поголовья (смертность) составил 32,3 %. Летальность у самок составила 68,4 %, у молодняка 98 %. Перед абортом у самок никаких признаков, за исключением небольшого угнетения, заметить не удавалось. После аборта самка становилась вялой, заметно худела, сидела нахохлившись, шерсть у нее была взъерошена, мускулатура расслаблена, наблюдалось наличие серозного или слизисто-гнойного конъюнктивита, опухание век. В последней стадии болезни у части морских свинок наблюдали параличи задних конечностей. В ряде случаев был выражен паралич сфинктеров мочевого пузыря, в результате чего наблюдалось непроизвольное истечение мочи. Заболевание у взрослых свинок длилось 3-2 дней, у молодняка наблюдалось более острое течение и гибель наступала в первые сутки с момента появления клинической картины болезни.

ПАТОГЕНЕЗ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ

При изучении патогенеза листериоза необходимо дать ответы на целый ряд вопросов: какими путями возбудитель болезни проникает в организм; как он распространяется по организму и в каких органах происходит его накопление, характер возникающих изменений, почему проявляется тропизм (избирательное действие) листерий по отношению к определенным органам (центральная нервная система, половые органы); в чем заключается патогенетическое действие возбудителя на организм животного; роль внешних и внутренних факторов, обуславливающих развитие болезни; от чего зависит возникновение различных клинических форм болезни.

На современном уровне знаний, к сожалению, не на все вопросы можно дать исчерпывающие ответы.

Листерии в организм проникают различными путями. Как уже указывалось выше, экспериментально удается заразить животных введением культуры листерий внутрицеребрально, внутримышечно, интраназально, внутривенно, подкожно, нанесением культуры на конъюнктиву глаза, аэрозольным методом и путем скармливания. Наиболее вероятными путями заражения листериозом в естественных условиях является заражение через слизистую оболочку носовой и ротовой полостей, конъюнктиву, пищеварительный тракт, дыхательные пути и поврежденную кожу.

Как показали многочисленные эксперименты, от способа заражения зависят пути распространения листерий по организму, а также формы течения болезни. Листерии могут обусловить возникновение носительства, развитие местных процессов (при поражении отдельных органов и систем), а также сепсиса. Возникновение той или иной формы болезни зависит, с одной стороны, от вирулентности микроба, инфицирующей дозы, путей заражения, с другой стороны, от возраста, физиологического состояния (беременности), условий жизни, наличия сопутствующих заболеваний.

Многочисленные авторы пытались воспроизвести листериоз у животных различными способами. Приведем краткий обзор опытов по заражению овец:

- при интраназальном способе возникало смертельное заболевание овец (D. Gill 1931, 1933) или лишь легкое недомогание и овцы оставались живыми (E. Yungherr 1937; H. Biester 1939; И. А. Попов 1958);
- при конъюнктивальном – конъюнктивит и незначительная общая реакция организма (M. Gitter et al., 1965) или энцефалит;
- при внутримышечном – стертая нетипичная картина заболевания у овец на 38-42-й день с момента заражения (П. П. Сахаров, Е. И. Гудкова, 1959);

- при подкожном – видимого заболевания не возникало (D. Gill 1931, 1933);

- при внутривенном – в некоторых случаях гибель овец (R. Graham 1940) или же лишь скоропроходящая лихорадка (D. Gill 1931, 1933; И. А. Бакулов 1960). По данным W. Jakob (1963), этот способ заражения сопровождался септициемией;

- при внутримозговом – во всех случаях гибель животных в течение 1-2 суток (П. П. Сахаров, Е. И. Гудкова. 1959, Н. Biester 1939, D. Gill 1931, 1933, R. Graham 1940, W. Jakob 1963);

- при заражении в сонную артерию – гибель овец (D. Gill 1931, 1933; E. Yungherr 1937).

W. Jakob (1963) пишет, что внутриартериальное заражение овец приводило во всех случаях к поражению центральной нервной системы и висцеральных органов;

- при комбинированном способе заражения – внутривенно и интраназально (с предварительной скарификацией слизистой оболочки носовой полости) – в наших опытах (И. А. Бакулов 1960) гибель овец в течение 5-8 суток;

- при пероральном способе заражения, по данным некоторых авторов (D. Gill 1931, 1933) не возникало клинически выраженного заболевания. В опытах других авторов (O. Asahi 1957) удалось вызвать заболевание животных листериозом при пероральном способе заражения, но с предварительной скарификацией слизистой оболочки ротовой полости.

Большое количество опытов проведено по экспериментальному заражению листериозом свиней (И. Лысенко и др. 1959; М. И. Яшенкина 1959), крупного рогатого скота (Г. Г. Беденашвили 1965). Так же как и при экспериментальном листериозе овец, результаты заражения были разнообразны – от легкого, скоропроходящего недомогания до летального исхода.

Такое положение, очевидно, имеет место и при заражении животных листериозом в естественных условиях, ибо здесь мы также сталкиваемся с множественностью клинического проявления этой болезни, с различными ее формами – от бессимптомного носительства до тяжелых поражений центральной нервной системы, заканчивающихся гибелью животных.

Листерии, попавшие в организм животного, обезвреживаются и выводятся из него или получают возможность к размножению и распространению по организму. По вопросу о путях распространения листерий в организме существует несколько точек зрения. Например, O. Asahi (1957) пишет, что листериозный менингоэнцефалит у овец возникает в результате проникновения листерий в головной мозг по нервным путям. Он считает, что при естественном заражении листерии проникают в организм через микроскопиче-

ские повреждения губ, попадают в нервные окончания и далее по нервным волокнам достигают головного мозга. По мнению автора, листерии попадают в головной мозг по тройничному нерву (по периневральным пространствам), поэтому энцефалит может быть воспроизведен введением листерии в область разветвления этого нерва. С целью подтверждения данного положения он провел ряд остроумных опытов: скормил животным (белым мышам и козам) бактериальную суспензию в смеси с сушеной рыбой или с шелухой бобов, что приводило к возникновению микротравм слизистых оболочек. Таким образом, удавалось воспроизвести листериозный энцефалит у мышей и коз, причем по ходу тройничного нерва были обнаружены гистологические изменения (изменение клеток глии, периваскулярная инфильтрация).

Выводы О. Asahi (1957) нашли подтверждение в работах других исследователей (J. Borman et. al., J. Potel 1963, H. Urbanek 1961-1963). H. Urbanek (1961) при исследовании овец, павших или вынужденно убитых в связи с церебральной формой листериоза, с помощью гистологических исследований обнаружил наличие изменений тройничного нерва: воспалительные клеточные инфильтраты, состоящие из лимфоидных клеток, лимфоцитов и гистиоцитов. Вблизи участков сильной инфильтрации наблюдались регрессивные процессы очагового характера с разрушением нервных волокон и гибелью инфильтрирующих клеток. Такие клеточные инфильтраты встречались в эндо-, пери- и эпиневральной ткани и были диффузными или очаговыми. В воспаленных участках были найдены бактерии, сходные по морфологии с листериями. Автор считает, что эти наблюдения говорят в пользу развития восходящей инфекции, которая и является причиной энцефалита при церебральной форме листериоза. Воротами инфекции в данном случае могут быть слизистые оболочки ротовой и носовой полостей. Эти наблюдения Урбанек подтвердил экспериментально. Десяти овцам он ввел интра- или периневрально в различных участках периферических разветвлений тройничного нерва взвесь вирулентной культуры листерий. Заражение вызывало у всех овец восходящий периневрит, причем у шести овец развился энцефалит, по своему характеру не отличавшийся от такового при спонтанном заболевании. Таким образом, налицо была восходящая нейрогенная инфекция головного мозга.

Многие исследователи обращают внимание на тропизм листерий к центральной нервной системе. П. П. Сахаров и Е. И. Гудкова (1959) пишут, что листерии в ряде случаев имеют явно выраженное сродство к нервной ткани, вызывая менингиты, энцефалиты, тетрапарезы и т. п.

У мышей, которых авторы кормили молоком или водой, инфицированными культурой листерий, через 2-3 недели развивались симптомы поражения нервной системы: тремор, судороги, кривоголовость, ригидность мышц

хвоста и потеря зрения. При вскрытии регистрировали энцефалит, культуру листерий выделяли из головного мозга и редко из печени и селезенки. Эти опыты доказывают наличие алиментарного пути заражения и тропизма листерий к центральной нервной системе. Другой опыт, поставленный теми же авторами, подтверждает нейротропность листерий. Кроликов заражали внутримышечно культурой листерий и помещали в холодильник, а через некоторое время в термостат. Через 2 недели у них развивались симптомы нервного заболевания с парезами и параличами, которое завершалось смертью от энцефалита. Таким образом, авторам удалось, не нарушая механически гематоэнцефалический барьер, вызвать листериозный энцефалит у кроликов.

Еще легче вызвать листериозный энцефалит путем нарушения функционального состояния гематоэнцефалического барьера. А. А. Аннагиев (1964) методом «буксирования» (по А. Д. Сперанскому) в различные сроки после заражения кроликов листериозом вызывал у последних поражение центральной нервной системы.

Thamm J. (1962) указывает, что в ГДР листериоз среди животных является в 95,3 % случаев болезнью овец, причем в 96,7 % случаев у овец поражается головной мозг.

Это же положение подтверждается данными бактериологических исследований трупов животных, павших в результате естественного переболевания или искусственного заражения листериозом, так как наибольший процент выделения культур листерий обычно бывает при исследовании головного мозга.

В чем причина такого нейротропизма листерии, пока еще не установлено.

Изучая патогенез листериоза, многие авторы пытались провести исследования по изучению изменений, возникающих в результате внедрения листерий в организм, и дать истолкование роли этих изменений в развитии болезненных явлений.

А. А. Аннагиевым (1964) было установлено, что при экспериментальном заражении листериозом кроликов и овец увеличивается количество глобулинов в сыворотке крови и нарушается альбуминоглобулиновое соотношение, в моче увеличивается количество остаточного азота и мочевины, содержание сахара в крови снижается, увеличивается содержание мочевины в спинномозговой жидкости. Автор считает, что увеличение остаточного азота в крови вызвано, очевидно, поражением печени. Период увеличения количества мочевины в спинномозговой жидкости совпадает с появлением признаков поражения центральной нервной системы. По мнению автора, накопление мочевины в спинномозговой жидкости связано с проницаемостью гематоэнцефалического барьера.

Более ранние наблюдения D. Gill (1931, 1933), свидетельствуют, что у больных листериозом овец отмечается увеличение содержания углеводов в крови.

Однако, кроме нейрогенного пути распространения листерий в организме, нельзя исключить возможность распространения лимфогенным и гематогенным путями.

На основании своих экспериментов А. А. Аннагиев (1964) считает, что вначале листерии локализуются в лимфатических узлах, где отмечаются сосудистые нарушения (гиперемия, отек), активация клеток мезенхимы. Затем (спустя примерно 24 часа) можно выделить листерий из крови и паренхиматозных органов (печени, селезенки, почек), причем в них отмечаются сосудистые нарушения, дистрофические изменения. Начиная с третьего дня после заражения, нарушается гематоэнцефалический барьер и листерии проникают в центральную нервную систему. М. М. Халимбеков (1955) считает, что основным местом размножения листерий является кровь. Менингоэнцефалит он рассматривает как одну из форм проявления листериоза, следующую за септическим процессом.

Urbanek D. (1961, 1962, 1963, 1964) так же пишет, что ряд данных заставляет считаться и с гематогенным путем распространения возбудителя, а также с латентным пребыванием его в различных органах, в том числе в мышцах. По наблюдениям Potel K. (1965), наряду с нейрогенным путем возможно гематогенное распространение листерий по организму. При экспериментальном заражении овец автор показал, что при листериозной септицемии процесс с оболочек мозга, сосудистых сплетений желудочков и из ликвора вторично распространяется на паренхиму головного мозга. Matthias D. (1961) указывает, что большее значение при листериозе животных имеет гематогенный путь распространения, чем нейролимфогенный. Автор отвергает нейролимфогенный путь проникновения листерий в головной мозг по n. olfactorius, так как в обонятельном мозге изменений не обнаружено, и по n. trigeminus в связи с тем, что в ядрах последнего изменений нет или они появляются здесь вторично.

Наши наблюдения по экспериментальному листериозу у белых мышей показали, что мыши, зараженные подкожно вирулентными культурами листерий в различных дозах, погибали в сроки от 1,5 до 19 суток с момента заражения, причем часть из них погибла в сроки от 1,5 до 5 суток, другая часть в сроки от 6 до 19 суток. У мышей первой группы наблюдали признаки септицемического течения болезни. Листерий при этом выделяли из всех органов, однако наибольшее количество культур было выделено из печени (70,9 %) и селезенки (69,3 %). У мышей второй группы наблюдали признаки поражения центральной нервной системы, а культуры листерий

были получены в основном из головного мозга (80,9 %) и почек (61,9 %). С нашей точки зрения, процесс развивался вначале по типу септицемии, часть мышечной при этом погибала, возбудитель обсеменял почти все внутренние органы. В дальнейшем возбудитель листериоза фиксировался в отдельных органах, в частности в головном мозге (очевидно, в силу имеющегося тропизма к нервной ткани) и в почках (выделительных органах). Таким образом, в развитии листериозного процесса у мышечной можно уловить две фазы – септицемическую и локальную (поражение отдельных органов).

У взрослых животных в силу их высокой общей сопротивляемости листериозный сепсис возникает редко, чаще у них поражается центральная нервная система, а в период беременности – репродуктивная система. У молодняка вследствие низкой общей устойчивости развивается сепсис, а затем генерализованный гранулематоз. В некоторых случаях (чаще у взрослых животных) заболевание протекает бессимптомно, при этом животные длительное время остаются носителями листерий.

После внедрения листерии, как уже указывалось, получают возможность размножения и распространения по организму и заселяют определенные органы. Однако это распространение и заселение вовсе необязательно приводит к развитию клинически обнаруживаемого заболевания. Может пройти длительный период, пока обнаружатся признаки болезни, иногда инфекция может протекать бессимптомно. Эти суждения подтверждаются значительным преобладанием положительно серологически реагирующих животных в неблагополучных хозяйствах над числом клинически больных. Все зависит от факторов, нарушающих равновесие, установившееся между макро- и микроорганизмом, усиливающих патогенное действие листерий. К этой категории относятся ряд внешних и внутренних причин (неблагоприятные условия содержания, неудовлетворительное кормление, авитаминозы, недостаток микроэлементов в кормах, резкие колебания внешней температуры, простуда, беременность и др.).

Большое значение имеет выяснение влияния различных защитных факторов организма на возбудителя листериоза. А. А. Триполитова (1960) указывает, что лизоцим обладает незначительным бактериостатическим действием в отношении листерий. Желудочный сок с повышенной и нормальной кислотностью действует на них губительно, при снижении кислотности листерии сохраняют в нем жизнеспособность и интенсивно размножаются. Таким образом, если листериям удастся преодолеть желудок как наиболее трудный барьер, то в кишечнике они могут найти благоприятные условия для своего размножения, а также для проникновения через слизистую оболочку с последующим обсеменением внутренних органов.

О факторах, которые способны усиливать действие листерий, сообщил Olson C. (1956, 1957), который регулярно получал заражение при одновременном введении листерий и вирусоподобного агента, выделенного из крови овцы, продолжительное время находившейся в помещении, где возникла естественная вспышка листериоза. Он же получил усиление действия листерий от одновременного применения эмульсии из тканей животных, пораженных болезнью слизистых оболочек крупного рогатого скота.

Gray M. (1962) сообщил, что листериоз у людей развивается нередко вскоре после лечения их кортизоном и большинство из этих случаев заканчивается смертельным исходом. Это наблюдение перекликается с опытами Н. С. Огневой (1964), А. А. Триполитовой (1960) по применению кортизона при бактериологической диагностике листериоза с использованием мышей в качестве модели. Чувствительность мышей в данном случае значительно возростала.

Сущность обоих наблюдений состоит в одном: под влиянием определенного фактора (в данном случае кортизона) резко снижается резистентность организма, и организм становится беззащитным перед листериозной инфекцией.

П. П. Сахаров и Е. И. Гудкова (1959) выяснили, что не смертельная доза листерий и вирус гриппа, вводимые в организм морских свинок раздельно, не вызывают заболеваний, а при введении вируса гриппа с последующей инокуляцией не смертельной дозы листерий наблюдали заболевание и гибель морских свинок от нервной формы листериоза.

Листериоз у беременных животных изучал Gray M. (1955, 1956, 1957). При заражении через рот беременных кроликов, овец и коз наблюдалось смертельное инфицирование новорожденных, в то время как самки никаких симптомов болезни не проявляли. Небеременных самок, а также самцов таким методом заразить не удалось. При заражении в начале беременности животные абортiroвали, в конце беременности – отмечалось рождение мертвых плодов или нежизнеспособных животных, погибавших через несколько дней после рождения.

Г. В. Бродский и А. П. Егорова (1964) энтерально заражали крольчих в разные сроки до оплодотворения и при беременности сублетальными дозами. Установлено, что листерии проникают во внутренние органы уже через 20 часов после заражения. Степень клинического проявления и морфологических изменений тем интенсивнее, чем ближе к концу беременности заражено животное.

Выяснено, что опасность внутриутробного заражения существует и при введении культуры задолго до беременности. В одном случае интервал между заражением и оплодотворением достигал семи месяцев.

Внутриутробное поражение иногда сопровождалось подъемом титра специфических антител, причем подъем титра обнаруживали и при повторной беременности в отдаленные сроки. Это связано с возможностью существования в организме самки дремлющих очагов инфекции, которые могут стать источниками заражения плода при вновь наступившей беременности.

Таким образом, авторы своими опытами показали зависимость возникновения болезни от физиологического состояния животного – беременности. У небеременных животных заражение такими дозами вызывало лишь кратковременную лихорадку, у беременных – болезнь с выраженной клинической картиной и нередко с летальным исходом.

Jakob W. (1963) провел ряд опытов по выяснению влияния различных факторов на возникновение листериоза овец. Многократные инъекции коливакцины, дополнительное заражение вирусом болезни Борна, кормление силосом овец, заражение листериями через рот, носовую полость или конъюнктиву, не вызвало клинического проявления болезни. При даче овцам в течение четырех недель корма, бедного белками, удалось воспроизвести листериоз путем заражения через конъюнктиву; при сочетании такого кормления с блокадой ретикулоэндотелиальной системы (внутривенными введениями трипафлавина) также было воспроизведено заболевание при заражении листериозом через рот и носовую полость.

По нашему мнению, при заражении животных необязательны большие концентрации листерий и высоковирулентные штаммы. Не исключена возможность поступления в организм животного небольших количеств возбудителя листериоза.

В дальнейшем при благоприятных условиях возбудитель может накопиться в количествах, способных вызвать болезнь, или же он будет обезврежен и выведен из организма.

То же касается и вирулентности культуры. Попадание в организм слабо-вирулентного штамма может привести к тому, что этот штамм за счёт риверсии, обретет более высокую вирулентность, особенно если учесть, что листерия – микроб довольно пластичный в отношении своей вирулентности. По этому поводу Flamm H. (1958) пишет, что недостаточно вирулентные листерии не вызывают заболевания и остаются в организме более или менее длительное время. При понижении сопротивляемости организма эти «безвредные сапрофиты» вызывают заболевание.

Не исключена возможность подобного превращения и с диссоциированными штаммами. В организме восприимчивого животного может произойти естественная селекция: R-формы микробов отомрут, а S-формы (которые всегда имеются в сильно диссоциированных штаммах с преобладанием

R-форм) получают возможность для своего развития, а, следовательно, возникнут предпосылки для проявления их болезнетворного действия.

При заражении животных листериозом мы регистрировали определенные сдвиги в соотношении белковых фракций сыворотки крови. Так, у зараженных морских свинок наблюдалось уменьшение коэффициента альбумины/глобулины, что говорит об уменьшении содержания альбуминов и увеличении содержания глобулиновых фракций, в частности гамма-глобулинов.

У зараженных овец мы также отмечали уменьшение количества альбуминов в сыворотке крови (45 % до заражения и 38,9 % через месяц после заражения), увеличение количества гамма-глобулинов (с 20,9 до 25,6 %), а также уменьшение коэффициента альбумины/глобулины (с 0,82 до 0,63). Нам кажется, что эти сдвиги не являются специфическими для листериоза, так как подобные изменения зарегистрированы и при других инфекционных заболеваниях. Есть наблюдения по изменению витаминного баланса в организме животных, зараженных листериозом. Так, С. А. Гафарова и А. С. Гасанов (1964) в опытах на морских свинках показали, что при экспериментальном листериозе нарушается баланс витамина С. В частности, в связи с поражением центральной нервной системы уменьшается количество витамина С в мозгу, а также в надпочечниках, которые считаются депо аскорбиновой кислоты. По сравнению с контрольными группами в исследованных органах морских свинок, зараженных листериозом, количество витамина С было уменьшено на 63 %.

Таким образом, для возникновения и развития листериозного процесса характерным является множественность путей заражения, распространение листерий в организме нейрогенным, лимфогенным и гематогенным путями, контаминация всего организма или его отдельных органов, размножение возбудителя, накопление токсических продуктов, разнообразие клинических форм и несомненная роль неблагоприятных факторов, способствующих проявлению болезни.

Мы считаем необходимым дополнить представленные по патогенезу сведения, имеющимися мнениями и наблюдениями ряда авторов о внутриклеточном паразитизме листерий и о роли внутриклеточных факторов (С. Ф. Чевелев и др., 1989)

Как уже указывалось, по данным G. Mackaness (1964) приобретенная устойчивость к листериозу есть результат соответствующих изменений макрофагов. В его опытах макрофаги неиммунизированных мышей оказались неспособными препятствовать прогрессирующему размножению листерий, тогда как макрофаги выздоравливающих от листериоза мышей инактивировали их. Автор считает, что патогенность листерий связана с их способностью паразитировать в клетках.

Аналогичные результаты получили в 1964 г. В. А. Armstrong, С. Р. Sword, которые изучали поведение листерий внутри макрофагов иммунизированных и неиммунизированных морских свинок. В дальнейших исследованиях К. Miki, G. Mackaness (1964) установили, что макрофаги от иммунизированных мышей не только обладают заметной противолистерийной активностью, но и способны передавать свойство пассивной защиты нормальным реципиентам. По данным R. Faure (1967), только макрофаги животных, иммунизированных живыми листериями, способны подавлять внутриклеточное размножение листерий.

А. К. Takeea, R. Mori, N. Imaizumi (1968) наблюдали подавление размножения листерий *in vitro* в монослое макрофагов новорожденных мышей, у которых предварительно удаляли вилочковую железу, что свидетельствует о влиянии гормонов на активность клеточных систем. С. Ф. Чевелев и др. (1983) на основании литературных данных и результатов собственных исследований пришли к заключению, что основная причина расстройства иммунного ответа при некоторых инфекционных болезнях животных, в том числе и при листериозе, – неспособность ферментных систем макрофагов обусловить завершённый фагоцитоз персистирующих агентов и развитие дефицита фагоцитирующих клеток из-за их разрушения репродуцирующимся возбудителем.

В отношении гуморальных факторов защиты организма мнения исследователей в основном совпадают: они при листериозе малоэффективны.

Специалистам-бактериологам ветеринарных и медицинских диагностических лабораторий известна методика постановки биопробы на листериоз, заключающаяся в предварительном (за 3-4 часа до заражения культурой листерий) введении белой мыши 5 мг кортизона или гидрокортизона (Н. С. Огнева, 1959; А. А. Триполитова, 1960; Х. Зеелигер, 1965). Такая методика позволяет, как правило, добиваться заболевания листериозом всех подопытных мышей. Объяснение авторов данному факту: кортизон и гидрокортизон – гормональные препараты коры надпочечников подавляют гликолиз в лимфоцитах, вызывают лейкопению и тем самым ослабляют фагоцитоз листерий. В результате снижается общая резистентность организма к листериозу (подавление иммунной системы). Длительное применение кортикостероидов ведет к выраженной атрофии вилочковой железы, уменьшению селезенки и лимфатических узлов. При нарушении в организме баланса гормонов коры надпочечников в сторону преобладания противовоспалительных процессов, резистентность к листериям может понижаться.

Листерийная инфекция, как в естественных, так и экспериментальных условиях обуславливает резкое истощение, что особенно характерно для лабораторных животных.

Подводя итоги вышесказанному, можно сказать, что заражение животных возбудителем листериоза происходит в основном алиментарным способом; описаны также аэрогенный, через слизистые оболочки ротовой полости, восходящий по нервным стволам, конъюнктивальный и некоторые другие пути проникновения листерий в организм.

ПАТОЛОГОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

При листериозе патологоанатомические изменения зависят от формы болезни и длительности ее течения. Некоторые изменения, обнаруживаемые при вскрытии, являются общими для многих видов животных. Однако патологоанатомическая картина при листериозе не является строго специфичной. В связи с этим вскрытие и патологоанатомическое исследование играют в постановке диагноза вспомогательную роль, дополняя сведения, полученные с помощью других методов диагностики.

Основной наиболее характерный элемент патолого-гистологических изменений при листериозе животных – узелковые некротические поражения различных органов. Вначале в результате влияния возбудителя болезни и токсических продуктов наступает альтерация и некроз отдельных групп паренхиматозных клеток. Гибель клеток сопровождается пикнозом ядер и кариолизисом, образованием вакуолей. Одновременно при участии мезенхимальных и гематогенных клеток образуются характерные гранулемы. В центре гранулемы появляются вторичные некрозы с большим числом обломков ядер. В дальнейшем происходят очищение очага с удалением некротических масс, процессы репарации и может быть даже полное восстановление.

Патологоанатомические изменения у лабораторных животных

Патологоанатомические изменения у экспериментально зараженных лабораторных животных в основном сходны. Степень выраженности изменений зависит от вида животного, способа заражения, применяемой дозы, длительности течения и формы болезни. Нами установлено, что интенсивность патологоанатомических изменений у белых мышей нарастала по мере удлинения срока переболевания. У мышей, павших в ранние сроки (от 1 до 3 суток), выраженных патологоанатомических изменений не отмечалось. Это связано с тем, что при остром течении болезни и быстрой гибели жи-

вотных изменения, очевидно, не успевают проявляться. У мышей, павших на 6-15-е сутки, наблюдали характерные изменения во внутренних органах. В более поздние сроки видимые изменения, как правило, отсутствовали. Наиболее четкие изменения обнаруживаются у мышей, павших с ярко выраженной клинической картиной (оглумоподобное состояние, конъюнктивит, оцепенение, обильный пот, припадки судорог, параличи конечностей). Мыши, павшие спустя 15 дней с момента заражения с признаками поражения центральной нервной системы, не имели видимых изменений внутренних органов.

Клинической картине и патологоанатомическим изменениям соответствовали результаты бактериологического исследования павших мышей. У мышей, павших в ранние сроки, наибольшее количество культур было выделено из печени (70,9 %) и селезенки (69,3 %); у мышей, павших в поздние сроки, из головного мозга (80,9 %) и почек (61,9 %).

Наиболее характерные патологоанатомические изменения у лабораторных животных отмечены в печени и селезенке.

Печень, как правило, увеличена, неравномерно окрашена (чередование участков светло-красной или желтоватой окраски и участков, окрашенных в темно-красный цвет), ломкой консистенции. Селезенка также увеличена в размере (в 2-3 раза), окрашена в темно-красный цвет.

Патогномоничным для листериоза у лабораторных животных является наличие во внутренних органах мелких серобелых узелков диаметром 0,5-2 мм. Наибольшее количество узелков отмечается в печени, селезенке, реже в почках, сердечной мышце.

Формируются эти узелки, в несколько этапов. В гистогенезе очаговых изменений печени у экспериментально зараженных лабораторных животных Г. В. Борисова различает следующие стадии:

- а) очаговые некрозы печеночных клеток с инвазией их листериями;
- б) появление клеточных элементов вокруг очагов некроза с последующим формированием гранулем, состоящих из лейкоцитов и лимфоидных клеток;
- в) некротические изменения в центральных участках гранулемы с присоединением экссудативных процессов;
- г) организация некротических очагов с последующим рубцеванием.

У большинства павших мышей регистрировали инъекцию сосудов головного мозга, иногда отечность и дряблость мозгового вещества. У беременных самок наблюдали поражения матки, серозная поверхность которой была окрашена в темно-красный цвет с наличием кровоизлияний, при разрезе обнаруживали жидкое буро-красного цвета содержимое с наличием сероватых хлопьев. У некоторых мышей наблюдали катаральное воспаление

тонкого отдела кишечника. В грудной и брюшной полостях обнаруживали красноватый экссудат.

При вскрытии морских свинок, павших от экспериментального листериоза, обнаруживали увеличение печени, множественные некротические узелки в паренхиме печени. Селезенка, как правило, слегка увеличена и окрашена в темно-красный цвет. Сосуды головного мозга инъецированы. Гистологическими исследованиями при остром экспериментальном листериозе морских свинок установлено в регионарных лимфатических узлах и селезенке наличие отчетливой пролиферации клеточных элементов плазматического ряда. Начало пролиферации отмечено на третьи сутки, максимальное проявление соответствует 5-7 суткам с момента заражения.

У кроликов, павших от экспериментального листериоза, обнаруживали пятнистые кровоизлияния под слизистой оболочкой трахеи, отек легких, иногда катаральную бронхопневмонию. Печень увеличена и пронизана мелкими серо-белыми некротическими узелками. Селезенка нередко увеличена и окрашена в темно-красный цвет, дряблая, с наличием серо-белых узелков некроза. Такого же характера узелки обнаруживали в почках. Мочевой пузырь растянут мочой. Лимфоузлы на разрезе покрасневшие. Наблюдала резко выраженную инъецию сосудов головного мозга, набухание мозгового вещества. При листериозе кроликов отмечал поражения преимущественно в матке, печени и селезенке. Изменения в матке характеризовались метритами, творожистым распадом и рассасыванием плодов.

В лабораторной практике большое значение имеет правильно проведенное бактериологическое исследование лабораторных животных, зараженных листериозом. Обязательным условием такого исследования является вскрытие и посевы из головного мозга, так как оттуда чаще всего удастся выделить культуру листерий, на втором месте стоит печень, затем селезенка, почки и кровь.

Патологоанатомические изменения у сельскохозяйственных животных

Крупный рогатый скот. При вскрытии взрослых животных, павших от листериоза, регистрируют воспалительные явления в мозговых оболочках, инъецию сосудов головного мозга и размягчение отдельных участков мозгового вещества. При абортах на почве листериоза отмечают гнойно-некротические изменения в матке, у абортированных плодов – отечность и кровоизлияния во внутренних органах.

При гистологическом исследовании в мозговых оболочках и ткани мозга обнаруживают картину воспалительного процесса, фокусы, состоящие из

полинуклеарных и мононуклеарных клеток, а также периваскулярную инфильтрацию мононуклеарными клетками. Чаще всего при этом поражается продолговатый мозг, мозжечок, аммоновы рога; в спинном мозге поражается преимущественно его передняя часть.

При патоморфологическом исследовании коров и молодняк 6-12-месячного возраста, павших от листериоза, обнаруживают гиперемию слизистых оболочек глотки, гортани и трахеи. Легкие неравномерно окрашены, отмечалось чередование серых и красных участков. Под эпикардом отмечают кровоизлияния. Печень кровенаполнена, в паренхиме органа очаги кровоизлияния и мелкие некротические очажки серо-желтоватого цвета. Слизистые оболочки сычуга и кишечника геморрагически воспалены. В почках иногда обнаруживают серо-желтые пятна. Отмечается инъекцию сосудов головного мозга. В мозжечке и передней части большого мозга находят кровоизлияния, в полостях мозга – скопления серо-красной жидкости.

У молодняка крупного рогатого скота листериозные поражения характеризовались наличием кровоизлияний и дегенеративных изменений во внутренних органах. У новорожденных телят (3 и 10-дневного возраста), павших от листериоза, в печени находят множественные серо-белые узелки, расположенные под капсулой и в паренхиме органа, округлой или слегка овальной формы. При гистологическом исследовании эти узелки представляли собой скопления клеток лимфоидного типа, в центре этого скопления обнаруживали некроз с явлениями кариорексиса.

Овцы и козы. При вскрытии овец, павших от листериоза, отмечают наличие отека легких, катаральный ринит, кровоизлияния в сердечной мышце, под капсулой селезенки и почек; селезенка слегка увеличена; печень окрашена в желтый или желто-коричневый цвет, в толще ее обнаруживаются некротические узелки. Наблюдается катаральное состояние слизистой оболочки сычуга и тонкого отдела кишечника. При осмотре головного мозга отмечают отечность оболочек, кровоизлияния; сосуды головного мозга инъецированы, ткань отечна.

При гистологическом исследовании в головном мозге обнаруживают резко выраженный менингоэнцефалит.

У взрослых овец и ягнят, павших от листериоза, наблюдается истощение, анемия, ринит, гиперемия и отек легких, кровоизлияния под эпикардом, зернистую дистрофию сердечной мышцы и почек, увеличение селезенки, воспалительные изменения на слизистых оболочках сычуга и тонкого отдела кишечника, помутнение роговицы глаз. В головном мозге скопление жидкости в субдуральном пространстве, гиперемия сосудов мягкой мозговой оболочки. При гистологическом исследовании можно наблюдать се-

розный воспалительный отек мягкой мозговой оболочки, инфильтрацию ее лимфоцитами и гистиоцитами. У отдельных животных в головном мозге обнаруживают мутно-желтые очаги размягчения до 8 мм в диаметре, в белом и сером веществе мозга – периваскулярные клеточные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, гистиоцитов и нейтрофилов. В крупных очагах находили размягчение, иногда некроз мозгового вещества с накоплением гистиоцитов и глиозных клеток. В очагах инфильтрации и некротических фокусах обнаруживали листерии.

Считается, что воспалительные изменения в центральной нервной системе делятся на три основных типа:

- 1) рассеянные лейкоцитарные инфильтраты в мозговом стволе;
- 2) лимфо-лейкоцитарные инфильтраты вокруг сосудов в области очаговых изменений;
- 3) очаговые или диффузные моноцитарные инфильтраты в мягкой мозговой оболочке.

Более мелкие очаги, расположенные в паренхиме, состояли, по наблюдению авторов, из скоплений нескольких лейкоцитов и микроглиозных клеток. Чаще такие очаги обнаруживали около мелких сосудов или по соседству с ними.

Крупные очаги состояли почти исключительно из лейкоцитов. В застарелых очагах лейкоциты были в состоянии распада. Листерии обнаруживали в небольшом количестве. Изменения при энцефалите носили в основном гнойный характер. Вокруг сосудов, отходящих от мозговой оболочки, преобладали лимфоцитарные инфильтраты. Наблюдали также картину очагового лептоменингита, преимущественно с лимфоцитарными инфильтратами.

При значительном поражении центральной нервной системы при спонтанном листериозе овец, различают паренхиматозные и вазоменингеальные изменения. Вазоменингеальные явления выражаются в лептоменингите. Наблюдаются преимущественные поражения серого и белого вещества головного мозга в области варолиева моста и продолговатого мозга, меньше – в области четверохолмия, зрительных бугров, малого мозга и шейного отдела спинного мозга.

При заражении овец 6-12-месячного возраста в подслизистую оболочку губ, с последующим убоем их в разные сроки после заражения было установлено, что изменения в органах развиваются уже через 24 часа после заражения. Они характеризуются сосудистыми нарушениями, активацией мезенхимальных клеток, главным образом в лимфоузлах, селезенке и печени. Через 48 часов сосудистые нарушения приняли более выраженный характер, в прекапиллярах и капиллярах отмечали явления пролиферации и десквамации клеток эндотелия. В лимфоузлах и селезенке развиваются гипер-

пластические процессы со стороны лимфофолликулов, мякотных шнуров и пульпы. С 5-6-го дня отмечались поражения центральной нервной системы. В головном мозге обнаруживали гиперемия, отек периваскулярных и перичеселлюлярных пространств, кровоизлияния вокруг сосудов, пролиферацию мезенхимных клеток с образованием клеточных муфт вокруг мелких вен и прекапилляров, активизацию глии, явление нейронофагии и дистрофии ганглиозных клеток. Поражение головного мозга особенно сильно выражено через 15-16 дней после заражения, причем на первый план выступают пролиферативные и дистрофические процессы. Энцефалит при этом принимает подострый характер.

У абортированных, при экспериментальном листериозе, плодов установлена отечность подкожной клетчатки, кровоизлияния в подкожном слое, скопление красноватой жидкости в грудной и брюшной полостях, некротические очажки в печени, селезенке, легких, почках, на эпикарде. При гистологическом исследовании в печени плода обнаружены диффузная гиперемия и лимфолейкоцитарная инфильтрация, участки некрозов. Аналогичные некротические участки установлены в селезенке, почках, надпочечниках, легких, сердце. В головном и спинном мозге – слабая гиперемия.

У козлят отмечен катар кишечника, некротические узелки в печени, гиперемия мозговых оболочек и лимфатических узлов, отек легких.

Свины. При остром течении листериоза с поражением центральной нервной системы у поросят не удастся выявить макроскопически заметных изменений, за исключением резкой инъекции сосудов головного мозга и мозговых оболочек.

Гистологическое исследование показывает наличие менингоэнцефалита со значительной инфильтрацией клетками моноцитарного типа. Имеет место периваскулярная инфильтрация сосудов. Обнаруживают также многочисленные участки некроза мозгового вещества с инфильтрацией моноцитами. При септической форме болезни наблюдается геморрагический трахеобронхит, гиперемия и отек легких, иногда катаральная бронхопневмония, катар слизистой оболочки тонкого отдела кишечника, точечные кровоизлияния под эндокардом и капсулой почек, некротические очажки в печени и реже в селезенке. При абортах у свиноматок обнаруживают воспалительные изменения в матке.

У поросят 2-21/2-месячного возраста и у сосунов, павших от листериоза, возможен катаральный и геморрагический гастроэнтерит, жировое перерождение печени, гиперемия брыжейки, цианоз кожи ушей и живота. А. А. Вендров (1954) обнаруживал при листериозе у 4-9-месячных подсвинок некротические узлы в печени, которая имела зернистый вид, эластичную консистенцию и коричневую окраску.

П. С. Соломкин (1959) указывал, что при осмотре трупов поросят – отъемышей, павших от нервной формы листериоза, часто во внутренних органах видимых патологоанатомических изменений не обнаруживали. Автор отмечал лишь катар слизистой оболочки желудка и кишок, гиперемия головного мозга и мозговых оболочек. При хроническом течении листериоза регистрировали исхудание, иногда отек легких, печень была окрашена в желтый цвет и имела дряблую консистенцию.

А. И. Гавриченко (1955) обнаруживал у больных поросят оспоподобную сыпь и струповидную экзему.

П. П. Пирог (1959) при исследовании свиней 8-10-месячного возраста, павших от спонтанного листериоза, обнаруживал в печени, лимфоузлах и селезенке некротические узелки размером от головки булавки до трехкопеечной монеты. Эти некрозы развивались из лимфоидно-гистиоцитарных клеточных скоплений, подвергающихся распаду по типу кариорексиса. При гистологическом исследовании головного мозга автор установил гнойный менингит и энцефалит. Вокруг сосудов обнаруживали скопления из лейкоцитов и лимфоидно-плазматических клеток в виде муфт. Сосуды были инъецированы, находили также эритродиапезисы. В белом веществе обнаруживали явления пролиферации глии; в ганглиозных клетках – острое набухание, хроматолиз, вакуолизацию протоплазмы, набухание ядер и явления ложной нейронофагии. Менее поражены были клетки мозжечка. У абортировавших свиней выявили в матке гиперемия, десквамацию эпителия и поверхностные эрозии на вершинах складок слизистой оболочки, кровоизлияния и скопления лейкоцитов и гистиоцитов. В подслизистом и мышечном слоях обнаруживали скопления полибластов и лимфоидных клеток.

По наблюдениям К. Н. Языковой (1961), у свиней, больных листериозом, поражения встречаются преимущественно в стволовой части головного мозга, аммоновых рогах и затылочных долях.

Н. А. Бородулина и Т. А. Быстрова (1961) обнаруживали в головном мозге свиней, больных листериозом, непостоянно выраженные микрофокусы, состоящие преимущественно из неитрофильных лейкоцитов и лимфоидных клеток. Чаше их обнаруживали в варолиевом мосту, затылочных долях, продолговатом мозге. Наблюдали также явления моноцитарного менингита мелкофокусного характера в области мозжечка, затылочной доли и продолговатого мозга.

Обстоятельно исследовал картину патологических изменений листериоза свиней С. Е. Огрызков (1959). По его наблюдениям, у спонтанно больных свиней патологоанатомическая картина была однотипной и проявлялась поражением желудочно-кишечного тракта, лимфоузлов, головного и спинного мозга, паренхиматозных органов и желез внутренней секреции.

В желудочно-кишечном тракте автор наблюдал явления острого катарального гастроэнтерита и колита, сопровождавшиеся экссудативным или геморрагическим лимфаденитом. В паренхиматозных органах обнаруживали острые сосудисто-дегенеративные изменения. Печень была полнокровной, увеличенной. Селезенка чаще уменьшена, анемична, дряблая, реже гиперемирована с кровоизлияниями вдоль острого края органа. Сердце растянуто, в перикарде обнаруживали желтоватого цвета выпот. Коронарные сосуды инъецированы. Миокард серо-красного цвета, дряблый. Почки иногда полнокровны, мозговой слой гиперемирован. Легкие часто гиперемированы, отечны. Слизистые оболочки ротовой, носовой полостей и конъюнктивы бледные с цианотичным оттенком. В трахее и бронхах пенящаяся жидкость.

В центральной нервной системе автор обнаруживал экссудативно-альтеративный энцефало-миелит или менингоэнцефалит, сосудистые расстройства, отек мозгового вещества и дегенеративные изменения клеток, мелкие периваскулярные эритродиapedезы, иногда значительные кровоизлияния. Поражения ганглиозных нервных клеток характеризовались явлениями острого отека, тигролиза, ложной и редко истинной нейронофагии. В железах внутренней секреции регистрировали сосудистые расстройства и дегенеративноатрофические изменения паренхимы.

При подостром и хроническом течении спонтанного листериоза у свиней наблюдалась более сглаженная картина сосудистых расстройств и дегенеративных процессов, преобладали клеточно-инфильтративные и пролиферативные реакции. В головном мозге регистрировали негнойный клеточно-пролиферативный менингоэнцефалит с развитием гранулем. При экспериментальном листериозе у свиней автор наблюдал сходные со спонтанным течением изменения, но более резко выраженные, очевидно, за счет очень высоких доз возбудителя, применяемых для заражения.

Лошади. При вскрытии лошадей, павших от листериоза, обнаруживают кровоизлияния во внутренних органах, в толще печени – мелкие некротические очажки. Ткань головного мозга отечна, размягчена. При гистологическом исследовании устанавливают наличие менингоэнцефалита.

М. В. Схиладзе (1953) при вскрытии лошадей, павших от листериоза, находил изменения печени, которая имела глинистый вид и дряблую консистенцию; почки были увеличены, отечны; селезенка увеличена; сердечная мышца дряблая. У жеребенка, павшего от листериоза на третий день после рождения, обнаружили кровоизлияния под эпикардом, застойные явления в печени с некротическими очажками в паренхиме; такого же характера очажки регистрировали в корковом слое почек. Под серозной оболочкой селезенки отмечали кровоизлияния. Суставная жидкость была мутной.

Плотоядные. При вскрытии лисиц, павших от листериоза, характерно истощение, кровоизлияния под слизистой оболочкой желудка, катар кишечника, некротические очажки в сердечной мышце и печени, отечность мозга, сильная инъекция сосудов головного мозга и его оболочек.

Н. Г. Трегубова (1961) при вскрытии серебристо-черных лисиц, павших от листериоза, наблюдала также гнойно-некротическую пневмонию, острый катаральный гастроэнтерит, увеличение селезенки. Патологоанатомические изменения при листериозе песцов описаны Н. А. Литвиновым, В. М. Гришиным и А. В. Ирошниковым (1964). Они регистрировали изменение цвета сердечной мышцы (серый цвет), кровоизлияния под эпикардом. В перикарде находили соломенно-желтую жидкость со сгустками фибрина. Зобная железа была увеличена, темного цвета, с кровоизлияниями. Легкие застойно гиперемированы, обнаруживали также катаральную бронхопневмонию. Селезенка увеличена, с наличием инфарктов, под капсулой кровоизлияния. Печень глинистого цвета, кровенаполнена. Желудок и кишечник катарально воспалены. Почки анемичны, на слизистой оболочке мочевого пузыря кровоизлияния. В головном мозге наблюдали гиперемию, отек, размягчение мозгового вещества, под твердой мозговой оболочкой – точечные кровоизлияния.

Как сообщает П. С. Соломкин (1959), у плотоядных (собак, кошек) в печени и сердечной мышце обнаруживали некротические узелки, величиной с просяное зерно, отечность головного мозга, сильное наполнение кровью сосудов мозга и его оболочек. У собак, павших от листериоза, отмечали гнойную пневмонию, геморрагический гастроэнтерит, кровоизлияния в почках и на слизистой оболочке мочевого пузыря.

Птицы. При вскрытии птиц, павших от листериоза, обнаруживают увеличение печени и селезенки, катар слизистой оболочки железистого желудка и тонкого отдела кишечника, у кур – некротические очажки в сердечной мышце.

З. В. Попова (1957) при вскрытии цыплят, павших от листериоза, находила увеличение желчного пузыря, печень была окрашена в желтый цвет; у гусей и утят – катар кишечника. У кур Н. Г. Трегубова (1960) регистрировала истощение, кровоизлияния под слизистой оболочкой мускульного желудка, катар кишечника, утолщение нервных сплетений крыльев и конечностей. У кур листериоз чаще всего протекает в подострой септической форме с преимущественным поражением сердечной мышцы. При вскрытии кур, зараженных внутривенно, обнаруживают серо-белые узелки величиной с чечевицу в миокарде. Околосердечная сумка наполнена студенистой янтарно-желтой массой. В печени находят многочисленные субмилиарные желтоватые очаги, реже такие очаги обнаруживают в набухшей селезенке. При гистологическом исследовании возможно наличие диффузного мио-

кардита, характеризующегося преимущественным участием псевдоэозинофилов и гибелью мышечных волокон, образованием скоплений макрофагов и фибробластов. В дальнейшем образуются очаги из плотно лежащих друг возле друга клеток. В печени наблюдают вначале коагуляционный некроз печеночных клеток, затем разрастание оставшихся клеток ретикулоэндотелиальной системы и образование гранулемо-подобных очагов, по периферии которых располагаются печеночные клетки.

Патологоанатомические изменения при листериозе гусей, по данным А. Л. Корниловой (1953, 1956), характеризовались незначительным увеличением печени и селезенки, жировым перерождением паренхимы печени. Постоянно обнаруживали на вскрытии катар железистого желудка и тонкого отдела кишечника с большим количеством слизи. На слизистой оболочке прямой кишки находили точечные кровоизлияния. Регистрировали также отечность мозгового вещества и кровенаполнение сосудов мозговых оболочек. В отличие от кур поражение сердечной мышцы не устанавливали. При вскрытии павших от листериоза уток находят энтерит, кровоизлияния в селезенке и беловатые точечные очажки в печени. У серой куропатки возможно исхудание и поражение печени, у голубя – пленку в гортани и глотке, а также воспаление трахеи со скоплением в ней беловатой слизи.

Грызуны. При вскрытии грызунов, павших от листериоза, обнаруживают геморрагическую инфильтрацию легких, некротические очажки в печени, селезенке, почках и сердечной мышце, геморрагические энтериты и гастроэнтериты, отечность мозгового вещества, инъекцию сосудов головного мозга и мозговых оболочек, у самок при листериозной инфекции обнаруживают мумификацию плодов.

ОБОСНОВАНИЕ ГИПОТЕЗЫ И. БАКУЛОВА, С. ЧЕВЕЛЕВА И ДР. О ПАТОГЕНЕЗЕ ЛИСТЕРИОЗА

Важным для понимания патогенеза листериоза является размножение микроорганизма в месте первоначального внедрения, захват его фагоцитирующими клетками (моноциты, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты) и механический перенос во все органы и ткани, в том числе центральную нервную и эндокринную системы. Незавершенный фагоцитоз, наблюдаемый при листериозе, способствует переживанию возбудителя в фагоцитах, последующему их внутриклеточному размножению, заканчивающемуся разрушением фагоцита и выходом в межклеточное пространство большого количества листерий и продуктов их метаболизма.

Микроорганизм захватывается новыми фагоцитами и вызывает их разрушение. Высвободившиеся из фагоцита продукты метаболизма листерий обуславливают воспалительные изменения паренхимы соответствующих органов, блокируя их функцию. Вследствие этого возникают изменения регулирующего влияния на жизнедеятельность организма нервной и эндокринной систем. Известно, что лимфоидно-макрофагальная система широко представлена во всех органах и тканях, а приток циркулирующих лимфоцитов, со временем превращающихся в тканевые макрофаги (фиксированные), осуществляется в организме непрерывно.

Установлено, что листериоз часто проявляется поражением центральной нервной системы, при этом патоморфологические и гистологические изменения обнаруживаются практически во всех ее отделах (большие полушария мозга, средний мозг, малый мозг, варолиев мост, четверохолмие, зрительные бугры, мозжечок, продолговатый мозг, начальный участок спинного мозга). Естественно предположить, что в патологический процесс вовлекается также гипоталамус (занимает область промежуточного мозга), хотя прямых доказательств нет, так как патология эндокринной системы и регулирующих ее нервных центров при листериозе недостаточно изучена.

Известно, что гипоталамус – последнее звено рефлекторной цепи, непосредственно действующее на гипофиз. В нем вырабатываются гипоталамические нейрогормоны пептидной природы, которые поступают в портальные сосуды аденогипофиза и стимулируют либо угнетают выделение тропных гормонов гипофиза. Благодаря этому осуществляется интеграция нервных и гуморальных функций организма. В патогенезе заболеваний, проявляющихся нарушениями эндокринной регуляции, определяющее значение часто принадлежит первичному расстройству гипоталамической деятельности.

Гипоталамические нейрогормоны участвуют в регуляции всех жизненно важных биологических функций (рост и развитие организма, деятельность желез внутренней секреции). Кроме того, обеспечивают взаимодействие центральной нервной и эндокринной систем. Гипоталамический синдром (диэнцефалический синдром) – симптомокомплекс, возникающий при поражении гипоталамической области мозга и характеризующийся вегетативными, эндокринными, обменными и трофическими расстройствами.

В развитии патологических изменений имеет значение повышенная проницаемость сосудов гипоталамической области, что способствует проникновению в мозг токсинов, вирусов, бактерий. К редким формам поражения гипоталамуса относятся гранулематозные воспаления (болезнь Бека), лимфогранулематоз (неизвестной этиологии), лейкопения. Уместно вспомнить, что основная форма гистологического проявления поражений при

листериозе, вызванная бактериальной формой возбудителя, – гранулематозное воспаление.

Гипофиз принято считать центром эндокринной системы, который вырабатывает кринотропные гормоны, специфически стимулирующие рост, дифференцировку и функциональную активность некоторых «периферических» органов внутренней секреции. Основные гормоны, выделяемые гипофизом: тиреотропный, адренокортикотропный, гонадотропный, соматотропный и др.

Воспалительные изменения в гипофизе (специфические и неспецифические) часто приводят к обширным разрушениям железистой паренхимы, являющимся причиной развития выраженных симптомов гипофизарной недостаточности – болезни Симондса (прогрессирующее истощение вплоть до атрофии костей, гиперфункция щитовидной железы и надпочечников) и др.

Симптомы поражения гипофиза, обуславливающие гиперфункцию надпочечников и щитовидной железы, прогрессирующего истощения, наблюдаются при листериозе. Как отмечено выше, деятельность гипофиза связана с гипоталамусом в единую функциональную систему. Продуцируя ряд кринотропных гормонов, гипофиз представляет собой важнейший узел, где происходит переключение нервных импульсов, посылаемых головным мозгом к эндокринной системе, в гуморальные звенья эффекторных цепей (трансгипофизарный механизм регулирующих влияний центральной нервной системы).

Функциональная деятельность коры надпочечников, в частности ее пучковой зоны, зависит от гипофиза и имеет прямое отношение к способности организма противостоять различным неблагоприятным воздействиям, то есть к его сопротивляемости или резистентности. Увеличение выделения адренокортикотропного гормона (АКТГ) гипофизом обуславливает усиленную продукцию гормонов коры надпочечников. При различных воздействиях (химическая и бактериальная интоксикация, вирусная и бактериальная инфекция, чрезмерное охлаждение или перегревание, голодание, гипоксия и др.) происходит форсированное выделение адренокортикальных гормонов, особенно глюкокортикоидов. Параллельно быстро развивается инволюция зубной железы, происходит уменьшение веса и размеров лимфатических узлов, селезенки, а также лимфоцитопения и эозинофилопения (гликопротеиды вызывают лимфопению, редукцию селезенки и лимфатических узлов, угнетают фагоцитоз). Данная реакция получила название общего адаптационного синдрома Селье. В условиях гипофизэктомии адаптационный синдром не развивается. Как патологические состояния описаны кровоизлияния в надпочечниках при инфекционнотоксических воздействиях (менингококковый сепсис, дифтерия, скарлатина, дизентерия,

коклюш и др.), тяжелые дистрофические изменения клеток вплоть до некроза при дифтерии. При общих инфекционных процессах в надпочечниках наблюдают иногда диффузные или очаговые лейкоцитарные скопления, иногда абсцессы метастатического происхождения. Отмечены гистологические изменения надпочечников при листериозе свиней, проявляющиеся сосудистыми расстройствами и дегенеративноатрофическими изменениями паренхимы (С. Е. Огрызков, 1959). Острая недостаточность обоих надпочечников ведет к быстрой смерти. Морфологически это проявляется обширными кровоизлияниями различного происхождения.

Щитовидная железа синтезирует и выделяет в кровь и лимфу гормоны, регулирующие процессы роста, развития, дифференцировки тканей и обмен веществ. Специфическим стимулятором щитовидной железы считается тиреотропный гормон гипофиза, который, в свою очередь, активируется териолиберинотом гипоталамуса. Поэтому повреждение гипоталамуса приводит к такому же ослаблению деятельности щитовидной железы, как и гипофизэктомия.

В метаболизме тиреоидных гормонов ведущее место принадлежит печени, где продукты распада дейодирующихся йодтиронинов связываются в глюкуроновые и серные конъюгаты вместе с желчью поступают в кишечник. Затем освобождающийся йод всасывается обратно в кровь, переносится к щитовидной железе и реутилизируется. Известно, что при листериозе закономерно поражается печень: множественные мелкоточечные очаги некроза, позднее рубцовые изменения. (А. А. Аннагиев, 1965; И. А. Бакулов, 1967).

Зобной железе (вилочковая железа) принадлежит центральное место в формировании и поддержании полноценного функционального состояния системы иммуногенеза организма. Доказан антогонизм между тимическим гормоном и тироксином, гликокортикоидами и гормонами тимуса; синергизм – в действии гормона вилочковой железы и гормонов роста гипофиза.

Предполагается также, что в качестве одного из основных условий, создающего фон для проявления листериями их патогенных свойств, выступают первичные нарушения гормонального равновесия организма из-за гипо- и дисфункции отдельных желез внутренней секреции. Подобное состояние, очевидно, нередко возникает среди части животных в отдельных стадах. Вероятно, эти индивидуумы и составляют 1-10% восприимчивого к листериозу поголовья. Гормональные нарушения могут возникнуть в ходе беременности, а молодняк сельскохозяйственных животных, новорожденные дети, которые часто заболевают листериозом, имеют несовершенную эндокринную регуляцию.

Предлагаемая гипотеза патогенеза листериоза согласуется с установленными при этой болезни эпизоотологическими, клиническими и патолого-

анатомическими данными и в состоянии объяснить, а также указать новые подходы к изучению еще не решенных вопросов.

Так как в естественных условиях в неблагополучных пунктах листериозом болеет ограниченное число животных, и болезнь не является осторожаразной (контагиозной), можно предположить, что заболевшие листериозом животные до инфицирования имеют первичные дефекты (ворота инфекции) в желудочно-кишечном тракте, органах дыхания, незрелость либо повреждение нервной и эндокринной регуляции гомеостаза.

Находит объяснение влияние стрессовых воздействий как благоприятного условия для клинического проявления листериоза (однообразное неполноценное кормление, беременность, неблагоприятное воздействие факторов внешней среды, иммуноподавляющее действие и др.). Во-первых, благодаря защитно-приспособительным механизмам большинство индивидуумов находит резервы для поддержания гомеостаза. Во-вторых, при воздействии стрессовых факторов, прежде всего, нарушается функция эндокринной регуляции жизнедеятельности организма. В-третьих, легкость воспроизведения листериоза в эксперименте на фоне введения гормонов коры надпочечников, нарушающих установившееся в организме гормональное равновесие, а также частота случаев заболевания листериозом плодов в утробе матери, новорожденных детей и молодняка сельскохозяйственных животных (несовершенство деятельности эндокринной системы) указывают на ведущее значение гормональной деятельности в устойчивости к листериозу.

Вопрос о том, за счет каких факторов листерии осуществляют патогенное действие на клетки организма, требует уточнений. Известно, что воротами инфекции при листериозе чаще всего становится слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта. Установлены также некоторые другие пути проникновения листерий в организм – аэрогенно, по нервным путям, через конъюнктиву и др. Остались неподтвержденными попытки некоторых исследователей объяснить картину остропротекающего листериоза действием экзотоксинов.

Из анализа известной литературы по данному вопросу можно сделать вывод: сильных экзотоксинов листерии не продуцируют. Глубокие патологоанатомические и гистологические изменения при листериозе, описанные в литературе однотипны для животных разных видов, а также человека (лимфогранулематоз, некродистрофические изменения различных органов и тканей, в том числе центральной нервной системы и эндокринных органов) являются следствием комплексного воздействия – внутриклеточного паразитирования, выделения продуктов метаболизма, таких как гемолизин, лецитиназа, липаза, каталаза, токсического и иммунодепрессивного дей-

ствия субстанций самой микробной клетки, приводящих к нарушению нейрогуморальной регуляции деятельности системы иммуногенеза.

Предлагаемая гипотеза о патогенезе листериоза согласуется с установленным многими исследователями фактом о клеточном характере противолистерийного иммунитета обусловленного лимфоидно-макрофагальной системой, приводящим к функциональной неполноценности иммунной системы. В результате листерии получают возможность беспрепятственного размножения в клетках и тканях макроорганизма (генерализация инфекции).

В условиях *in vitro* листерии высокочувствительны к действию многих антибиотиков и химиотерапевтических препаратов, неблагоприятное воздействие оказывают на них также некоторые неспецифические гуморальные факторы (лизозим, опсонины, желудочный сок). В начальные периоды проявления болезни действие некоторых антибиотиков оказывается эффективным также *in vivo*. Поэтому в обычных условиях (поступление малых доз возбудителя, функциональная полноценность органов внутренней секреции и макрофагальной системы) преодолеть этот барьер листериям довольно трудно, так как у них отсутствуют какие-либо чрезвычайные факторы патогенности (капсула, сильнодействующие экзотоксины и т.п.). Совершенно иная ситуация складывается при действии на организм неблагоприятных факторов, при котором в первую очередь нарушается деятельность эндокринной регуляции.

Высокий процент смертности при листериозе, особенно при проявлении нервной формы, указывает на то, что органические изменения жизненно важных органов (паренхиматозные органы, нервные центры, железы внутренней секреции) зашли так далеко, что полностью блокировано их функциональное и регулирующее воздействие на гомеостаз, а именно на иммуногенез.

Становится понятной разноречивость толкований об эффективности вакцинопрофилактики листериоза сельскохозяйственных животных. Исходя из предлагаемой гипотезы, в случае применения живых вакцин с остаточной вирулентностью вакцинного штамма следует иметь в виду общее состояние животных в стаде (отаре). На фоне ослабленного поголовья такая вакцина может вызвать серьезные осложнения (вплоть до проявления болезни от вакцинного штамма). Выход из создавшегося положения - проводить вакцинацию животных против листериоза в период полноценной физиологической активности животных (ранняя осень) и использовать в качестве вакцинных штаммы листерий, не обладающих остаточной вирулентностью. Было бы идеальным иметь в арсенале средств специфической профилактики листериоза эффективную инактивированную вакцину (ком-

понентная, химическая и др.), хотя исследования в этом плане оказались пока неэффективными.

Находит объяснение и преимущественное возникновение листериоза в зимне-весенний период. Из-за скученности животных в зимний и зимне-весенний периоды на ограниченных площадях, ухудшения санитарно-зоогигиенического состояния помещений, несбалансированности рационов кормления витаминами, микроэлементами и другими необходимыми компонентами в организме животных происходит нарушение деятельности эндокринной системы, и создаются условия для проникновения листерий. Кроме того, происходит активация путей передачи возбудителя (грызуны, инфицированные грызунами корма и др.).

Отмеченное многими исследователями резкое истощение больных листериозом животных, особенно лабораторных при экспериментальном их заражении культурами возбудителя, по-видимому, указывает на поражение таких важных для жизнедеятельности организма регулирующих центров, как гипофиз, гипоталамус, щитовидная и зубная железа, надпочечники.

Таким образом, сопоставление клинико-эпизоотологических данных и патогистологических изменений, характерных для листериоза, с одной стороны, и симптомокомплекса поражений деятельности высшей нервной и эндокринной систем, проявляющегося стереотипно как при специфических, так и неспецифических поражениях, с другой стороны, позволяет сделать вывод: определяющее значение в патогенезе листериоза имеют нарушения нейрогуморальной регуляции жизнедеятельности организма, в частности процессов обновления, дифференцировки и созревания иммунокомпетентных клеток. В результате возникает состояние иммунодефицита.

Формулировка гипотезы патогенеза листериоза

Патогенез листериоза обусловлен паразитированием возбудителя в системе мононуклеарных фагоцитов, широко представленной во всех органах и системах макроорганизма (головной мозг, печень, селезенка, почки, лимфатические узлы, костный мозг, кишечник, эндокринные органы), сопровождающимся развитием в них воспалительных дегенеративно-некротических изменений, в результате чего нарушается нервная и эндокринная регуляция жизнедеятельности инфицированного организма. Как следствие нейрогуморального расстройства блокируются процессы обновления, дифференцировки и созревания клеток лимфоидно-макрофагальной системы и возникает состояние приобретенной иммунологической недостаточности, заканчивающееся генерализованной формой листериоза с летальным исходом.

КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА ЛИСТЕРИОЗА У ЖИВОТНЫХ

Инкубационный период при спонтанном листериозе у животных исчисляется 7-30 днями. Длительность его зависит от ряда причин: путей заражения, устойчивости организма животного, инфицирующей дозы, вирулентности микроба и места его внедрения. В ряде случаев не удается установить действительную длительность инкубационного периода, так как при листериозе имеет место носительство возбудителя, не сопровождающееся видимой клинической реакцией организма, и очень трудно уловить момент перехода носительства в клинически выраженную форму болезни.

При экспериментальном заражении в зависимости от способа введения культуры инкубационный период длится от нескольких часов (при интрацеребральном введении) до нескольких суток (при других способах введения). При заражении овец внутривенно процесс развивается по типу септицемии, и первые клинические признаки болезни обнаруживаются уже через сутки. В том случае, когда овец заражали путем введения культуры на слизистые оболочки ротовой или носовой полостей (т. е. в условиях, близких к естественным), возникновение листериозного энцефалита отмечали через 1-3 недели. А. Л. Корнилова (1953) считает, что инкубационный период у животных при листериозе длится от нескольких дней до 2-3 недель, М. М. Халимбеков (1955) – от 10 дней до 2,5 месяцев. С. А. Аманжулов (1953) наблюдал у козлят инкубационный период продолжительностью 15-20 дней.

Распространенность *L.monocytogenes*, несомненно, является отражением имеющейся совокупности восприимчивых животных. В Северной Америке большинство случаев листериоза зарегистрировано у КРС (82 %), реже – у овец (17 %), еще реже – у свиней. В период с 1993 по 1997 год случаи листериоза (общее количество – 253), представленные в Ветеринарную диагностическую лабораторию Университета штата Айова, показывали сходную распространенность: у КРС – 87 %, у овец 9 %, у коз 2 %, у лам и лошадей – по 0,4 %. На территории штата Айова 90 % случаев листериоза диагностировались как энцефалит. В заметном контрасте находится статистика случаев листериоза на территории Великобритании в период с 1975 по 1984 гг., когда на овец приходилось 63 % случаев, КРС – 32 %, на свиней, коз, птицу и другие виды – менее чем по 1 % от общего количества заявленных случаев. Клиническое проявление листериоза зависит от вида животных и их возраста. Отдельные клинические формы листериоза преобладают у определенных видов животных, например у овец чаще всего, встречается нервная форма

болезни, у птиц – септицемическая. Некоторые признаки болезни сходны у различных видов животных, что позволяет рассматривать ряд клинических форм листериоза, общих для всех видов животных.

Листериоз лошадей

В отличие от КРС и овец, сообщений о случаях листериоза лошадей имеется мало. Листериозная инфекция у лошадей может вызывать энцефалит, септицемию и выкидыш. Исследование фекальных образцов 400 лошадей на территории Германии показало, что доля носителей среди них составляет 4,8 % по *L.monocytogenes*, 6 % по *L.innocua* и 1,5 % по *L.seeligeri*, *L.welshimeri* обнаружены у менее чем 1 %. Результаты немногочисленных исследований с описанием *L.monocytogenes* сероположительных лошадей следует интерпретировать с осторожностью в свете существования возможной перекрестной реакции между антителами к другим видам бактерий и листериям.

Объяснением sporadических случаев листериоза у лошадей может служить предшествующий контакт с КРС и скармливание силоса. Имеется сообщение о присутствии *L.monocytogenes* у четырех валлийских и двух шотландских пони, которые содержались вместе с КРС (при этом у одной из них был диагностирован листериоз) и которым давали низкокачественный силос. Из образцов, отобранных при аутопсии лошадиной печени, селезенки, сердца, почек и легких выделили *L.monocytogenes*. В Тасмании имели место выкидыши у двух кобыл, содержавшихся на пастбище в хозяйстве, ранее являвшемся овцеводческим и впоследствии переориентированном на ведение молочного хозяйства. *L.monocytogenes* серогруппы 1 культивировались из образцов легкого и желудка одного из плодов. После терапевтического лечения антибиотиками кобыла использовалась для разведения и дала нормального здорового жеребенка, что указывает на то, что инекция *L.monocytogenes* не приводит к перманентному бесплодию. Имеется сообщение о случае выкидыша у кобылы, которому предшествовала умеренно выраженная респираторная инфекция, вызванная *L.monocytogenes* серотипа 4. До болезни кобылу в зимний период содержали вместе с КРС и кормили силосом. Неонатальная септицемия была зарегистрирована у жеребенка 3-дневного возраста, причем кобылу, от которой он был получен, содержали в закрытом стойле и кормили низкокачественным контаминированным сеном.

Как и у других видов, происхождение листериозной инфекции у лошадей может быть неизвестным. Так, *L.monocytogenes* выделяли из ствола головного мозга валлийского пони-мерина 16-летнего возраста с призна-

ками атаксии, слабости. Какой-либо иммунологической недостаточности обнаружено не было, контакт с жвачными отсутствовал, доступа к силосу не было. Обследовали ранневозрастную кобылу породы аппалуза в возрасте 21 день в связи с диареей, продолжавшейся в течение 2 недель. Вследствие ухудшения состояния животного были назначены гентамицина сульфат и прокаинпенициллин G. Септицемию диагностировали, исходя из присутствия *L.monocytogenes*, культивируемых из крови. Никаких источников инфекции не было обнаружено, что позволяет сделать вывод о том, что *L.monocytogenes* были переданы жеребенку с контаминированным молоком кобылы.

Также как и у людей, листериоз появляется чаще у животных с ослабленным иммунитетом, имеющих нарушения как гуморальной, так и опосредуемой клетками иммунной систем. Листериоз описан у кобылы арабской породы с комбинированным иммунодефицитом. У кобылы 1-месячного возраста была атаксия, вялость, она не могла сосать молоко и большую часть времени проводила с опущенной головой. Примечательно, что при передвижении животное привлекало копыта. При аутопсии во внутренних органах и ЦНС было отмечено наличие широко распространенных поражений.

Клиническая картина листериоза у лошадей

Листериоз протекает у лошадей, как правило, в виде энцефалита. В начале заболевания отмечается незначительное повышение температуры тела (до 39,5 °C). Затем появляется беспокойство, нарушается координация движений, развивается парез конечностей. Жеребята теряют способность самостоятельно стоять или передвигаются с большим трудом. Иногда наблюдается неудержимое стремление вперед. Общее состояние животного угнетенное. Наблюдается гнойный конъюнктивит, желтушность склеры. Аппетит понижен. Выздоровление отмечается редко. В последней стадии болезни развиваются параличи и наступает смерть.

М. В. Схиладзе (1953) наблюдал у жеребят, больных листериозом, гиперемию видимых слизистых оболочек, истечение из носовой полости, повышение температуры тела до 41,5 °C, учащенное дыхание, усиленное сердцебиение, отечность суставов конечностей, дрожь, судороги, расстройство координации движений. Болезнь длилась 1-3 дня и заканчивалась смертельным исходом. Svenkerud R. (1948) сообщил, что листериоз явился причиной септической пиемии у жеребенка. В другом случае у лошади-двухлетки с признаками поражения центральной нервной системы выделили возбудителя листериоза из внутренних органов.

По данным Pulst H. (1964), кобылица, находившаяся в плохом состоянии, родила слабого жеребенка. Общее состояние кобылы вскоре улучшилось, температура пришла к норме. Жеребенок казался вялым, плохо сосал и на

третьи сутки после рождения пал от сепсиса. Из внутренних органов павшего жеребенка выделили культуру листерий. При обследовании матери бактериологическое исследование оказалось отрицательным, а титр РА составлял 1:200. Через месяц после этого жеребец и кобыла реагировали по РА в титре 1:100. Краге (цит. по Pulst H., 1964) установил листериоз у двух жеребят. У жеребенка пони, который заболел на третий день после рождения и вскоре пал, в печени были обнаружены некротические узелки. Из печени, селезенки и из крови выделили культуру листерий. У другого жеребенка была установлена смешанная инфекция – наличие листерий и пиогенной микрофлоры.

Листериоз КРС

Симптомы листериоза КРС включают в себя энцефалит, выкидыши и септицемию с милиарными абсцессами. В 1928 году Мэтьюз подробно изучил вспышку энцефалита неизвестного происхождения у КРС, который, если судить ретроспективно, вероятно, был листериозом. Листерийный энцефалит с тех пор был подробно описан. Однако даже в ходе острых вспышек жертвами инфекции становится обычно не более 8-10 % стада. В Швейцарии после губкообразной энцефалопатии КРС листериоз КРС является наиболее часто диагностируемым неврологическим заболеванием и, таким образом, вероятно, является наиболее частой причиной бактериальных инфекций центральной нервной системы у взрослых животных КРС. На территории штата Миссури в период с 1986 по 1994 гг. случаи листериозного энцефалита диагностировались у КРС (67 %), коз (30 %) и овец (13 %).

Наиболее частой формой естественной листериозной инфекции у КРС является передача с кормом, при этом чаще всего фактором передачи является силос. Как и у овец, листерии после проглатывания распространяются с кровью, проникая во внутренние органы, головной мозг и беременную матку. Кроме того, поскольку *L.monocytogenes* присутствуют в почве, фекальном материале и растительности, он может проникать через царапины на ноздрях или конъюнктиве во время пастбы или через соски лактирующих коров. Известен случай когда прямая инъекция в конъюнктиву, приводящая к кератоконъюнктивиту, происходила в результате попадания контаминированных частиц силоса.

Продвигаясь по периферическим нервам, в особенности подъязычного и тройничного краниальных нервов, иннервирующих ротовую полость, *L.monocytogenes* проникает в ЦНС и локализуется в варолиевом мосту и продолговатом мозге. Повреждение краниальных нервов обуславливает клиническое проявление. Например, поражение пятого краниального и

нижнечелюстного нервов приводит к невозможности есть, и пить или удерживать корм во рту. Избыточное слюноотделение в результате затруднения при глотании и высунутый язык, атаксия или движение по кругу, паралич лицевых мышц, включая одностороннее опускание губы, глаза и века, и косоглазие отражают повреждение соответствующих краниальных нервов. На развитой стадии болезни, когда зрение и локомоция ухудшаются и животное становится все более раздражительным, болезнь можно спутать с бешенством или свинцовым отравлением. Наконец, животное впадает в кому и обычно гибнет спустя 1-2 суток. Гистопатологические поражения ствола головного мозга состоят из очагов некроза, инфильтрованного нейтрофилами, макрофагами и бактериями. Наблюдается наличие периваскулярного скопления моноклеярных клеток. В отличие от овец и коз, большая часть голов коров переживает листерийный энцефалит не менее чем через 4-14 суток после появления симптомов, имеется ряд сообщений о спонтанном выздоровлении.

Листерия у КРС часто связан с выкидышем, что обычно происходит в течение последней трети срока беременности.

Вместе с тем, как показывает пример с Дорой, коровой 11-летнего возраста с атипичным маститом, у хронических носителей, выделяющих патоген в молоко, могут рождаться здоровые телята. Как и у овец, *L.monocytogenes* переносятся в плаценту, затем в плод. Вслед за внутриматочной инфекцией может последовать септицемический менингит у новорожденного животного и гибель вскоре после рождения.

На Среднем Западе США листерии является третьей по частоте встречаемости бактериальной инфекции среди случаев выкидышей в последней трети беременности. Бактерии *L.monocytogenes* являлись ответственными за 1,35 % заявленных случаев выкидышей и мертворождений у КРС, представленных Ветеринарной научно-исследовательской и диагностической лабораторией штата Южная Дакота в период с 1980 по 1989 г. Десятью годами ранее из 2544 случаев выкидышей у КРС, исследованных на территории Северных Равнин США, 2,2 % были отнесены за счет листериоза. Аналогичным образом, в Германии в период с 1984 по 1989 год серотип 1/2 *L.monocytogenes* выделялся у 1,2 % и 1,8 % (122 из 9931) голов КРС с выкидышем в районах Эрфурта и Коттбаса, соответственно.

L.ivanovii наиболее часто ассоциируют с овцами и иногда выделяется у КРС. В Калифорнии в течение 3-летнего периода среди 243 плодов, представленных для оценки, листерийный аборт КРС диагностировался у пяти животных, из них – *L.ivanovii* выделяли у четырех животных, в то время как *L.monocytogenes* выделяли только в одном-единственном случае выкидыша у КРС. Патологические данные в этих пяти случаях листериоза были сходными.

L.monocytogenes могут проникать в стадо с контаминированными кормами, при введении в стадо нового поголовья или через грызунов. Аборты и мертворождение у КРС происходят вскоре после скармливания контаминированного силоса. Усовершенствование технологии производства силоса и изготовления сена привело к снижению количества случаев листерийного выкидыша у КРС на территории Нидерландов с 8,7 % до 1,2 %. Исходя из результатов анализа фекальных образцов, изменения в производстве силоса также были связаны со снижением процентной доли животных-носителей с 15 до 0,8 %. Вспышка листериоза, на территории Нигерии, включала 35 случаев энцефалита у КРС и 4 случая выкидыша в одном и том же стаде. Несмотря на то, что источник инфекции неизвестен, авторы предположили, что *L.monocytogenes* были занесены в стадо в результате введения новых животных. Согласно прогнозам, количество здоровых носителей меньше на фермах, где явные случаи болезни не наблюдаются, чем в хозяйствах где находятся животные с клиническим проявлением листериоза. Например, *L.monocytogenes* выделялись из образцов 2,0% коров в хозяйствах, где *L.monocytogenes* отсутствовали, и у 6,7 % здоровых животных в хозяйствах, где ранее имел место листериоз. Это может являться указанием на наличие контакта с каким-либо распространенным источником инфекции. Широко известными носителями *L.monocytogenes* являются грызуны, потенциальным источником контаминации служит фекальная контаминация кормов.

Генерализованные листерийные инфекции способны вызывать мастит. Начиная с 1938 года, Шмидт и Найфельдт допускали вероятность того, что небольшая вспышка листериоза человека на территории Дании была вызвана потреблением молока от маститных коров. Тем не менее, роль листерий в маститных инфекциях не была четко определена до 1944 года, когда Wramby выделил *L.monocytogenes* из молока и вымени маститных коров на территории Швеции. В 1956 году de Vries и Strickwerda описали другой случай мастита КРС, при котором резистентный к пенициллину штамм *L.monocytogenes* культивировался из материалов, полученных из задней части молочной железы коровы 6-летнего возраста. После начальной фазы, проходившей в острой форме, клиническое состояние вымени вскоре приобрело нормальный вид, при этом выделение *L.monocytogenes* в молоко продолжалось 3 месяца. Продолжительная экскреция *L.monocytogenes* в молоко, нормальный внешний вид молока, потребление парного молока в хозяйствах могут являться важными факторами передачи и дальнейшего распространения листерий. Рекомендуется выбраковка коров, больных листериозом с клиническими признаками мастита не поддающегося лечению. При забое возможна перекрестная контаминация туш листериями из пораженного вымени при обработке мяса.

Штамм Scott A (серотип 4b) *L.monocytogenes*, – клинический изолят, выделенный в ходе вспышки на территории Новой Англии, вызывал мастит у молочных коров в экспериментальных условиях. После повторного внутривымянного – через сосок (интрамаммальный) введения 34 коровам голштинской породы клеток *L.monocytogenes* в дозе 10^3 – 10^7 , у 75 % животных развилась хроническая инфекция с выделением листерий в молоке в количестве приблизительно 10^3 – 10^5 КОЕ/мл молока. Этот процесс длился с перерывами до 8 месяцев. Интрамаммальный путь инокуляции использовали с целью воспроизводства переноса инфекции из контаминированной подстилки непосредственно в канал соска. Интересно, что одна из этих зараженных в экспериментальных условиях коров дала нормального здорового теленка. Bourry et al., (1998), также вызывали мастит посредством интрамаммальной инокуляции однократной дозой в 300 клеток *L.monocytogenes* серотипов 4b и 1/2. *L.monocytogenes* выделялись из надвыменного лимфоузла, но не выделялись из селезенки и печени. Персистенцию инокулированного штамма подтверждали исследованиями ДНК.

По аналогии с овцами и козами у здоровых молочных коров без признаков мастита также происходило выделение *L.monocytogenes* с молоком. Шульц (2003) собрал образцы молока 1004 коров и выделил *L.monocytogenes* в молоке 10 животных (0,1 %), 7 из которых выглядели совершенно здоровыми. Выделение листерий с молоком этими животными было не постоянным и продолжалось до 12 месяцев. Обследование молочных стад на территории Югославии также продемонстрировало, что клинически здоровые коровы могут являться бессимптомными носителями *L.monocytogenes* и секретировать их в молоко в течение нескольких месяцев на протяжении нескольких периодов лактации. В одном из таких исследований *L.monocytogenes* были обнаружены в молоке 3,2 % 845 клинически нормальных коров в семи хозяйствах, где ранее диагностировался листериоз. Кроме того, E. N. Kampelmacher (1986) сообщал о том, что у молочных коров *L.monocytogenes* выделяли в концентрациях порядка 10^4 КОЕ/мл молока.

Вспышки человеческого листериоза в 1983, 1985 и 1987 годах, послужили причиной исследование парного молока, взятого из ранее неблагополучных по листериозу молочных хозяйств. Эти исследования подтвердили бессимптомное носительство *L.monocytogenes* коровами. Непрямая контаминация сборного молока происходит в результате несоблюдения гигиены при дойке в случае присутствия *L.monocytogenes* в кормах, фекалиях, на поверхности вымени или в подстилке, или в период выздоровления животного после незадолго до этого перенесенной инфекции. Имеются сообщения о наличии *L.monocytogenes* в парном коровьем молоке с охватом от 0,1 до 45 % стада. Длительность переживания листерий варьировала, в

зависимости от того, где брали пробы – у отдельных коров, в молочных цистернах, имеющихся в хозяйстве, или в молоковозах, обслуживающих большое количество хозяйств. Полученные данные указывают, что частота выявления *L.monocytogenes* на отдельных фермах, вероятно, ниже, чем в центрах переработки или встречаемость в молоковозах. Проводившийся на территории Дании на протяжении 23 лет надзор, охватывающий 36200 стад, показывал, что частота выявления *L.monocytogenes* от зараженных коров варьировала от 0,01 до 0,1 %, а доля стад с одной зараженной коровой – от 0,2 до 4,2 %. Вместе с тем, *L.monocytogenes* было контаминировано 8,5 % образцов сборного молока (n=445). Регистрировались региональные различия по показателям выделения *L.monocytogenes* в молоке. Например, Dominguez Rodriguez et al., (2004) обнаружили *L.monocytogenes* в 45,3 % из 95 образцов парного молока, взятых в одной и той же цистерне емкостью 80000 литров.

В северо-восточных штатах США проводили исследования проб молока и выделили *L.monocytogenes* из 12 % образцов парного молока. Бактерии *L.monocytogenes* были обнаружены в 4,4 % образцов парного молока (n=137), полученных из района Утрехта, Нидерланды и 3,8 % образцов парного молока с территории Шотландии. Это соответствует данным о выделении *L.monocytogenes* в 4,1 % образцов парного молока в Тенесси. Интересно, что в ходе этих исследований, проводимых на территории США, сообщалось, что парное молоко потреблялось 35 % лиц, участвующих в молочном производстве. При исследовании парного молока в трех различных регионах США *L.monocytogenes* обнаружили в 4,2 % всех образцов. Вместе с тем, выделение *L.monocytogenes* из образцов, взятых на территории штата Массачусетс, имело сезонный характер, при этом инцидентность была наиболее высокой в более холодные месяцы и наиболее низкой – в течение месяцев с наиболее жаркой погодой. Интересно, что сезонную закономерность демонстрировали образцы, взятые на территории штатов Огайо, Кентукки и Индиана. Там *L.monocytogenes* выделяли из 4,9 % образцов парного молока, полученного из 70 хозяйств, при этом инцидентность была более высокой в зимний период, когда коровы находились на стойловом содержании, чем летом. Исследования на *L.monocytogenes* парного молока на территории штата Небраска указывали на сезонную распространенность, в феврале *L.monocytogenes* содержали 6 % образцов парного молока, в июле положительными были 2 % образцов. Возможно, сезонное изменение связано со скормливанием силоса в зимний период. В Шотландии имела место сезонная распространенность листерий, которые присутствовали в 25 из 160 исследованных хозяйств (16 %). Контаминация имела спорадический характер, бактериальные титры обычно были на уровне менее 1 бактерии *L.monocytogenes* КОЕ/мл. Несмо-

тря на то, что в январе положительными по *L.monocytogenes* было большее количество образцов парного молока, чем в другие периоды взятия образцов в течение всего года, авторы сообщают, что никакой связи с технологией ведения фермерского хозяйства не наблюдалось. На территории Онтарио (Канада), встречаемость *L.monocytogenes* в парном молоке была выше в восточном регионе провинции. Несмотря на умеренный уровень выделения *L.monocytogenes* в парном молоке на территории провинции Онтарио (1,3 %, 6 образцов из 455), встречаемость в осенне-зимний период была выше, чем в другое время. В другом сообщении указано, что *L.monocytogenes* были обнаружены в 5,14 % образцов парного молока при ежемесячном скрининговом исследовании, проводимом на территории провинции Онтарио.

Нормальные здоровые животные могут временами выделять листерии с фекалиями, при этом доля распространенности варьирует от нескольких процентов до 52 %, при существовании определенной сезонности. Фекальное выделение может отражать уровни содержания *L.monocytogenes* в кормах. В одном из исследований выделение *L.monocytogenes* (52 %) было связано со скармливанием влажного корма, контаминированными являлись 67 % образцов. Бактерии *L.monocytogenes* выделяли в фекалиях 8,7 % из почти 4000 произвольно отобранных молочных коров на территории Финляндии, в течение 2-летнего периода. Кроме того, *L.monocytogenes* чаще выделяли в фекалиях КРС на фермах, где *L.monocytogenes* присутствовали в кормах, чем в хозяйствах, где корма (силос или луговые травы) были отрицательными на *L.monocytogenes*. Переход КРС с пастбищного кормления к рациону на основе силоса повышал показатель выделения *L.monocytogenes* с фекалиями. Распространенность имела сезонный характер, при этом *L.monocytogenes* чаще выделяли в фекалиях в период стойлового содержания (9,2 %), чем при выгуле животных на пастбище (3,1 %). Как и следовало ожидать, сезонная встречаемость *L.monocytogenes* в молоке отражала частоту встречаемости данного патогена в фекалиях, но не в травяном силосе или луговых травах, таким образом, вероятно, была фекальная контаминация во время дойки.

Для осуществления мониторинга по распространенности инфекции вызываемой *L.monocytogenes* у молочных коров использовали исследование сывороток. Показатель зараженности КРС можно оценивать путем измерения уровней антител к цельных клеткам, а также антител, специфически направленных против LLO. Титры агглютинации кровяной и молочной сывороток исследовали у молочных коров, зараженных в экспериментальных условиях (n=34). На 8-ой неделе после заражения 80 % коров демонстрировали сывороточные титры свыше 1:20-1:480. Титры молочной сыворотки, отражающие локальный мукозальный иммунитет против *L.monocytogenes* в молочной железе, редко превышали 1:256, ввиду более низкой concentra-

ции иммуноглобулина в молоке по сравнению с кровью. Поскольку 33 % молочных коров продолжали выделять *L.monocytogenes* несмотря на высокие сывороточные титры, уровни антител не позволяют давать точный прогноз в отношении присутствия *L.monocytogenes* в молоке. Как и у людей, овец и коз, антитела к LLO использовали с целью оценки иммунного ответа КРС, зараженного в экспериментальных условиях. Положительный ответ на LLO давал четкое подтверждение имевшей место ранее или текущей инфекции *L.monocytogenes* у молочных коров.

Иммуносупрессия, связанная со стрессом, с изменением рациона, погодой, транспортировкой, беременностью, отелом и лактацией, может снижать резистентность КРС к листериозу. Дексаметазон имитирует связанное со стрессом выделение глюкокортикоидов. У животных КРС дексаметазон повышает общее количество белых кровяных нейтрофилов и снижает численность популяций эозинофилов и лимфоцитов. Введение дексаметазона коровам, зараженным *L.monocytogenes* в экспериментальных условиях, повышало выделение патогена в молоке в 100 раз. Повышение уровня *L.monocytogenes* в молоке может отражать нарушение работы опосредуемых клетками иммунных механизмов и фагоцитарных функций клеток, лежащих в основе противолистерийного иммунитета. Уровень фекальной экскреции с *L.monocytogenes* существенно повышала также транспортировка живых животных на большие расстояния. Вместе с тем, контаминация полученных в результате убоя туш животных КРС и овец была минимальной.

Основной проблемой листериоза КРС является наличие потенциальной опасности для людей. В Дании исследование случаев заболевания указывало на то, что листериоз человека часто связан с потреблением непастеризованного молока (фактор риска составляет 8,6), между тем как в качестве более значимых рассматривались другие факторы, такие как иммуносупрессия и лежащие в ее основе заболевания. Далее, с применением серо- и риботипирования был осуществлен сравнительный анализ 33 изолятов, полученных от коров с маститом, и 27 клинических изолятов от человека, выделенных на территории Дании в течение 1993 года. Серотипирование показало, что все изоляты выделенные от КРС и 63 % изолятов человека относятся к серогруппе 1, тогда как 37 % человеческих изолятов относили к серогруппе 4. ДНК-фингерпринтинг с применением риботипирования указывал на то, что коровы, зараженные штаммами *L.monocytogenes*, сходными с человеческими клиническими штаммами, составляли невысокую, но устойчивую процентную долю среди датских молочных коров. О наличии риботипов *L.monocytogenes*, встречающихся как на оборудовании молокоперерабатывающих предприятий, так и на фермах (молочный скот КРС, парное молоко, силос), иллюстрируется теми фактами, что ферма может служить резервуа-

ром для штаммов *L.monocytogenes*, способных контаминировать оборудование на молокоперерабатывающем производстве. Полученные данные также подтверждают повсеместность распространения данного патогена.

Несмотря на то, что пищевой листериоз у людей чаще связан с потреблением контаминированных молочных продуктов, чем говядины, *L.monocytogenes* выделяли в 3 % смешанных фекальных образцов, представляющих 224 головы мясного скота, содержавшегося на кормовых площадках. В ходе ограниченных исследований коров голштинской породы (n=4), зараженных в экспериментальных условиях, *L.monocytogenes* выделяли из мышц, органов и лимфоидных тканей спустя 2 суток после заражения; однако спустя 6 и 52 суток после заражения возбудитель не выделяли. Таким образом, можно предположить, что отбракованный молочный скот вероятно, не является значимым источником контаминации мяса листериями. Тем не менее, в ходе этих исследований, *L.monocytogenes* были обнаружены в 91 % (21 из 23) образцов говяжьего фарша, полученного из туш этих животных, это свидетельствуя о том, что переработка значительно повышает уровень контаминации. Данное предположение находит свое дальнейшее подтверждение при отслеживании штаммов *L.monocytogenes* с помощью мультитро-кусного энзимэлектрофореза. Штаммы *L. monocytogenes* электрофорезного типа (ЕТ) 1 были задействованы в основных пищевых эпидемиях у людей и обнаружены одновременно у КРС. Штаммы *L.monocytogenes* ЕТ 1 доминируют у КРС в начале убоя, но не обнаруживаются в тушах в конце обработки или в окружающей среде на скотобойне. Напротив, такие находящиеся в окружающей среде штаммы, как ЕТ 19, контаминируют туши в ходе обработки. Штаммы ЕТ 19 были обнаружены в тушах свиней в конце обработки на двух скотобойнях, но не обнаруживались ни у живых животных, ни в начале забоя. В целом, эти данные свидетельствуют о том, что контаминация мяса штаммами *L.monocytogenes* происходит во время переработки туши, штаммами присутствующими на мясоперерабатывающем предприятии, а не штаммами, изначально присутствовавшими у животных.

Клиническая картина листериоза у крупного рогатого скота

Наиболее часто листериоз у взрослого животного протекает с поражением центральной нервной системы. Заболевание начинается угнетением, вялостью, снижением аппетита. Отмечается быстрая утомляемость. Через 3-7 дней появляются признаки поражения центральной нервной системы: у животного отмечаются парезы нижней челюсти, ушей и губ; глаза выпучены. Наблюдается наличие не координированных движений, закидывание головы на спину, слюнотечение, шаткая походка. У отдельных больных могут быть приступы буйства, тяжелые нервные расстройства, напоминающие бешенство, однако агрессии в отношении людей не наблюдается. Во вре-

мя приступа отмечаются судорожные сокращения шейных и затылочных мышц (ригидность). В ряде случаев нарушается зрение. У некоторых животных отмечают конъюнктивит, стоматиты, сыпь на коже.

Температура тела при описанной клинической картине остается в пределах нормы или может быть повышенной. В конце заболевания температура тела, как правило, падает ниже нормы. Больные животные погибают в состоянии прострации в течение 3-4 дней с момента появления признаков поражения центральной нервной системы.

Ward D. (1950) пишет, что у больной листериозом коровы отмечались круговые движения. Ее трудно было сдвинуть с места. У другой коровы отмечена повышенная возбудимость, она натыкалась на различные препятствия. Collet P. (1960) наблюдал латентный листериозный аденит у быка. Cole C. (1946) описал резко выраженное поражение центральной нервной системы у коровы. Животное оказалось слепо на оба глаза, веки оттянуты назад. Слепота была обусловлена резким сужением зрачков. Отмечалось слюнотечение, челюсть была повернута в сторону. Животное двигалось по кругу, хромя при этом. Из головного мозга павшей коровы была выделена культура листерий. Описаны также случаи листериоза у крупного рогатого скота с признаками атонии преджелудков и пневмонии, причем у одного животного атония впоследствии сменилась геморрагическим энтеритом.

Сходная клиническая картина наблюдается при одновременном поражении крупного рогатого скота листериозом и губкообразной энцефалопатией.

Другая часто встречающаяся форма клинической картины листериоза у крупного рогатого скота – поражение половой системы – проявляется абортными, задержаниями последов и различными воспалительными процессами в матке. Аборты обычно наступают на 2-7-м месяце стельности, причем больные животные, как правило, выздоравливают. Если происходит полное изгнание плода, у коровы развивается скоропроходящий локализованный метрит. Когда плод задерживается, дело может кончиться листериозной септицемией с летальным исходом.

Очень часто наблюдаются листериозные аборты в стаде крупного рогатого скота и листерии выделяют из содержимого желудка абортированного плода. При исследовании сыворотки крови абортировавших коров по реакции агглютинации отмечаются положительные реакции в высоких титрах. Fisy N. (1949) описал листериоз у коровы, возникший через неделю после аборта. Отмечались признаки родильного пареза: искривление шеи, корова лежала на боку с положенной на грудную клетку головой.

У крупного рогатого скота на почве листериоза может возникнуть мастит с длительным выделением листерий во внешнюю среду с молоком. Vries J. (1956) наблюдал листериозный мастит у 6-летней коровы. Поражена была

лишь одна четверть вымени, возбудитель выделялся с молоком в течение трех месяцев. Donker-Voet J. (1965) наблюдала листериозный мастит у одной коровы. Листерии выделяли при этом из всех четырех долей вымени в течение более трех лет. Количество бактерий колебалось от 2 тыс. до 20 тыс. на 1 мл молока, причем молоко внешне не изменилось.

В сыворотке крови коровы иногда отмечали высокие титры агглютининов, в остальное время титры были низкими. Кормление молоком от этой коровы беременных крольчих привело к рождению мертвых детенышей, из матки одной крольчихи выделили листерии.

От указанной коровы дважды в течение трех лет получали приплод. Телята не заболели листериозом, несмотря на большое количество листерий в молозиве и молоке матери. Из испражнений телят выделяли возбудителя листериоза.

У телят листериоз протекает в виде септицемии, в отдельных случаях сопровождается поражением центральной нервной системы. Pauden W. (1947) у телят 3-4-месячного возраста наблюдал угнетенное состояние, круговые движения, судороги, конъюнктивиты. У телят 5-7-месячного возраста А. А. Аннагиев (1960) отмечал следующие признаки: высокую температуру тела, конъюнктивиты, увеличение предлопаточных лимфоузлов.

А. А. Мамедов (1957) у телят 6-12-месячного возраста регистрировал угнетение, отказ от корма, учащенное дыхание и сердцебиение; температура тела оставалась в пределах нормы или повышалась до 41 °С. В ряде случаев отмечали кератиты, конъюнктивиты, расстройство деятельности желудочно-кишечного тракта. Гибель телят наступала через 1-2 суток после появления признаков болезни.

Листериоз буйволов наблюдал в Пакистане Khan M. (1964). Он отмечает, что взрослые буйволы были очень восприимчивыми к болезни, телята заболевали реже. Коровы более устойчивы, чем особи мужского пола. Болезнь протекала в форме энцефалита, септицемии, метрита и мастита. У животных, больных листериозным энцефалитом, наблюдали гиперестезию, возбуждение. Животные опирались головой о стены и кормушки, двигались по кругу, поворачивая голову в одну сторону.

Листериоз овец

Листериоз овец обычно вызывается серотипами *L.monocytogenes* 1/2, 3и 4, а также бактериями вида *L.ivanovii*. Несмотря на то, что «листериоподобные» инфекции ранее наблюдались у овец, первое выделение *L.monocytogenes* у домашних сельскохозяйственных животных приписывают Джиллу (1929). Он наблюдал болезнь овец в Новой Зеландии, которую он назвал «вертяч-

кой» (circling disease, листерийный энцефалит, энцефаломиелит, менингоэнцефалит). Данное название в настоящее время используется при ценурозе овец.

Клиническими проявлениями листериоза у овец являются:

- а) энцефалит;
- в) плацентит, при этом выкидыши происходят в последнем триместре суягности;
- с) гастроинтестинальная септицемия с гепатитом.

Наиболее широко распространенной диагностемой у овец формой листериоза является энцефалит. Уже в возрасте 5 недель у ягнят может развиваться септицемия, при этом у животных более старшего возраста (4-8 месяцев), находящихся на откорме, развивается энцефалит. Вероятно, одним и тем же контаминированным кормом заражаются все овцы, что указывает на высокую естественную резистентность, однако, при этом только у 5-10 % зараженных животных проявляются клинические признаки.

Бактерии *L.monocytogenes* обычно проникают в организм животного в результате заглатывания. После проникновения в кишечный эпителий через М-клетки пейеровых бляшек или эпителиальные клетки, возможно развитие бактериальной или септицемической фазы или латентной инфекции, в зависимости от иммунного статуса хозяина. Впоследствии *L.monocytogenes* поражает внутренние органы, беременную матку или продолговатый мозг. У беременных животных данные микроорганизмы могут локализоваться в плацентах и проникать в амниотическую жидкость. В плод патоген, попадает на поздней стадии беременности. В одной отаре могут иметь место выкидыши, септицемия и энцефалит.

Проникновение непосредственно через ссадины или повреждения слизистой оболочки щек, губ, ноздрей или конъюнктивы могут приводить к энцефалиту. Поскольку проникновение в дентальные окончания тройничного нерва у овец способно вызывать восходящий неврит и энцефалит, листерийный энцефалит чаще всего встречается зимой и ранней весной у овец, теряющих зубы, либо у которых они режутся. *L.monocytogenes* проникают сквозь эпителий щеки, достигает окончаний тройничного и подъязычного краниальных нервов и проникает в мозговой ствол, где происходят репликация и распространение в продолговатый мозг (medulla) и варолиев мост. В тяжелых случаях через один месяц после заражения происходит нарушение дыхания плода и наступает смерть. Повреждение глаза контаминированным силосом приводит к офтальмии, при этом какие-либо другие клинические проявления отсутствуют.

Наиболее широко распространенной инфекцией центральной нервной системы взрослых овец является менингоэнцефалит, вызываемый

L.monocytogenes. По окончании инкубационного периода, длящегося не более 3 недель, появляются клинические симптомы энцефалита овец. Таковые включают в себя повышенную температуру и отказ принимать корм и воду, затем появляются неврологические расстройства, в том числе скрежетание зубами, паралич жевательных мышц и неуклюжая походка. На этом этапе животное ходит кругами вправо или влево, в зависимости от направления, в котором наклонена его голова. Данная характерная особенность объясняет название «вертячка» (circling disease). Часто наблюдается избыточное слюноотделение, возникающее ввиду того, что животное не в силах сглатывать. Позднее развивается мышечная несогласованность движений, затем появляется неспособность животного к передвижению (атаксия). Гибель обычно наступает через 2-3 суток после появления клинических симптомов, при этом болезнь редко длится свыше 10 дней. Находящиеся в мозговом стволе листерийные антигены различны по своим характеристикам, однако всегда разбросаны. В гистопатологических образцах мозгового ствола характерны вызываемые *L.monocytogenes* периваскулярные микроабсцессы и микрогранулемы. Т-лимфоциты (CD8+ и CD4+) и В-лимфоциты способствуют воспалительным процессам.

После заглатывания и распространения с кровью в беременную матку *L.monocytogenes* появляются в амниотической жидкости и плоде в течение 48 часов. Листерийные инфекции у суягных овец часто приводят к преждевременному окоту и инфекционным абортam. Данная болезнь редко происходит одновременно с энцефалитом. Первоначально у суягных овцематок появляется гнойный метрит, при этом у большинства животных наступает выздоровление. Внутриматочный перенос *L.monocytogenes* через плаценту приводит к септическому заражению плода, которое, в свою очередь, вызывает аборт или преждевременный окот, при этом большинство летальных случаев происходит в виде мертворождений. Клинические симптомы после выталкивания плода пропадают, после чего овцематки выздоравливают. Заболеваемость у овцематок находится в пределах 1-20 %, смертность среди ягнят обычно высокая. Инъекция *L.monocytogenes* суягным овцематкам вызывала выкидыши у 10 % животных. У ягнят полученных от овцематок, зараженных экспериментальным путем, наблюдается существенная задержка роста костных тканей.

Септицемия наиболее часто встречается у новорожденных ягнят, появляется спустя 2-3 суток после орального заражения, однако может иметь место пупочная инфекция. Септицемия характеризуется повышением температуры тела, потерей аппетита и диареей. Несмотря на то, что в результате обширного поражения печени и очаговой пневмонии в конце концов возможна гибель, уровень смертности в результате септицемии здесь значительно более низок по сравнению с энцефалитной формой листериоза.

Листерия является болезнью, подлежащей регистрации, что позволяет проводить сравнительный анализ пораженности листериозом животных в различных странах. Кроме того, в большинстве случаев инфекции у сельскохозяйственного скота имеет место субклиническая форма, которая в результате этого остается недиагностируемой. В Венгрии листерии выделяли у 14 % овец, однако дифференциации *L.monocytogenes* и *L.ivanovii* не проводилось. Несмотря на то, что в Нидерландах выделение листерий у овец и КРС снизилось, что, связывают с изменениями технологии производства силоса, в Великобритании эти изменения, напротив, вызывали рост листериоза у овец. Так, в 1975 году листериоз регистрировался у небольшого количества голов КРС (n=37) и овец (n=44). К 1984 году количество случаев листериоза у овец возросло (n=269), при этом количество случаев листериоза у КРС изменилось мало. Параллельно с ростом инцидентности в Великобритании также имело место изменение формы проявления болезни, при этом энцефалит и аборт имели место в одной и той же отаре.

Наиболее часто листериоз развивается поздней осенью, зимой и ранней весной. Появлению болезни способствуют такие стрессовые факторы, как резкая смена кормового рациона, сопутствующее заболевание, прорезывание зубов, физическое повреждение или вирусное поражение эпителия пищеварительного тракта. Определяющими факторами могут служить также погодные изменения, например сильные дожди, особенно после засухи, могущие испортить корма, или периоды экстремально холодной погоды, вынуждающие содержать животных в помещениях, что приводит к скученности. В ходе исследований, проведенных за отарами в начальный период окота в Юго-Западной Англии (1989-1991 гг.), проводилось исследование образцов от 4413 ягнят на листериоз от рождения до забоя. В двух отарах из трех развивались клинические признаки болезни, относимые за счет серотипа 1/2 *L.monocytogenes*. За шесть недель до окота овцематки, находившиеся в двух зараженных помещениях, содержались на соломенной подстилке; овцематки на ферме, где клинического листериоза не наблюдалось, содержались на настилах из древесины хвойных пород. В единственной отаре, где случаи заболевания отсутствовали, профилактические мероприятия после окота включали в себя ежедневную замену подстилки и силоса и регулярную мойку кормушек для силоса, которые были расположены на бетонном полу. В пораженных стадах силос заменяли через день и кормушки располагали на земляном полу, и, таким образом, легко контаминировались. Перед отбивкой ягнята ели больше силоса, поскольку овцематки давали меньше молока. Несмотря на то, что данным факторам риска были подвержены все ягнята, согласно оценкам, в период с 4 по 42 сутки после отбивки клиническая инфекция развивалась у 1,3 %, а гибель происходила у 0,56 % ягнят (21 из 4413).

На возникновение листериоза среди овец может оказывать влияние качество силоса, измеряемое таким показателем, как усваиваемость (показатель D). В ходе вспышки овечьего листериоза на территории Великобритании показатель D силоса был ниже оптимального, составляющего 65-70 %. В Шотландии у овец, вынужденно поедавших низкокачественный силос, имел место листериоз, вызванный серотипом 1/2 *L.monocytogenes*. Анализ силоса показал, что показатель pH превышает 4. Несмотря на проведенное лечение антибиотиками, 19 овцематок погибло, более чем у 60 развились вагинальные выделения и у 94 животных окот дал мёртворожденных ягнят.

Исследовалась роль скармливания силоса в эпизоотии энцефалитного листериоза. В ходе одного из исследований, проведенных в Великобритании, была обнаружена устойчивая связь между скармливанием силоса и развитием у овец листериозного энцефалита. В другом сообщении экскрецию *L.monocytogenes* овцами связывали с рационом, при этом животные, которые полностью содержались на сене или рационах промышленного производства, не экскретировали *L.monocytogenes* в поддающихся обнаружению количествах, однако животные, поедавшие силос, обычно экскретировали данный микроорганизм. Скармливание низкокачественного силоса (pH 7,8), в значительной степени контаминированного *L.monocytogenes* (106 КОЕ/г.) явилось причиной вспышки листериоза в Испании. Во время этой вспышки была поражена отара, состоящая из 450 животных (доля пораженных 11,8 %), при этом показатель смертности составил 94,3 %.

Во вспышке листериоза в одной и той же отаре могут участвовать многочисленные штаммы *L.monocytogenes* как одного, так и различных серотипов. При выделении в ходе одной вспышки изолятов одного и того же серовара возможна их дальнейшая дифференциация с помощью ДНК-фингерпринтинга, фаготипирования или пиролитической масс-спектрометрии. В ходе вышеупомянутой вспышки в Испании серовар и фаговар штаммов *L.monocytogenes*, выделенных из двух образцов силоса и образцов головного мозга 3 из 53 пораженных овец, дифференциации не поддавались. Кроме того, для подтверждения идентичности штаммов *L.monocytogenes*, выделенных в пробах силоса, смывов с сельскохозяйственного оборудования и из головного мозга овец, использовали ДНК-фингерпринтинг путем анализа произвольно отобранной амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) и риботипирование. Напротив, обследование вспышек листериоза овец на территории Шотландии указывало на вероятность выделения в силосе, ответственном за возникновение вспышки, большого количества штаммов серовара 1/2 *L.monocytogenes*. По данным мультилокусного энзимэлектрофореза (МЭЭ), штаммы *L.monocytogenes*, выделенные, у каждого пораженного болезнью во время вспышки животного были идентичны. Тем не менее, ни один из

штаммов, выделенных в силосе, не соответствовал таковым, выделенным в образцах головного мозга. Возможно, данное явление отражает необъективность, допущенную при взятии образцов из брикетов и приведшую к пропуску небольших вирулентных популяций *L.monocytogenes* в растительном материале, которые после проникновения в организм овцы размножаются, становясь доминирующим штаммом и вызывая заболевание.

Количество сообщений о встречаемости *L.monocytogenes* в овечьем молоке незначительно. В Испании *L.monocytogenes* присутствовали в 2,2 % образцов молока 1052 овцематок из 283 хозяйств. Вместе с тем, *L.monocytogenes* были выделены в 18 % образцов из молочных контейнеров на территории Испании. Результаты проверки образцов молока овцематок в хозяйствах указывали на то, что контаминация *L.monocytogenes* в хозяйствах, где также содержатся коровы, значительно выше по сравнению с хозяйствами, где содержатся только овцы. Эти данные говорят о том, что контаминация среды в хозяйствах происходит либо в результате экскреции *L.monocytogenes* с коровьим навозом, либо в результате общего контакта с контаминированным силосом в хозяйствах с совместным содержанием овец и КРС. Интересно, что сезонных изменений в показателях контаминации молока не наблюдалось.

Описаны эпизоотология и экономика клинического листериоза на примере отары овец в Южном Иллинойсе. В этом исследовании, где ключевым фактором являлось скармливание контаминированного силоса, невакцинированные овцы породы рамбулье в большей мере подвергались угрозе заражения (отношение риска 4,6), чем другие овцы, причем годовалые овцы имели больший риск, чем животные более старшего возраста (отношение риска 4,1). Интересно, что использование бактериина не снижало риск заражения *L.monocytogenes* у овец породы рамбулье (отношение риска 0,8), однако снижение риска у овец других пород (отношение риска 0,1) имело место. Это указывает на то, что врожденная чувствительность овец породы рамбулье к *L.monocytogenes* не поддается изменению с помощью вакцинации.

Для оценки встречаемости листериоза у овец используют показатели серологических исследований. Вместе с тем, антитела к другим грамположительным микроорганизмам вступают в перекрестную реакцию с листерийными антигенами, создавая, таким образом, ложноположительные результаты. В 1990 году Берч и др. разработали более специфичный тест на *L.monocytogenes* на основе обнаружения антител к листериолизину О (LLO), антигенному белку величиной к 58 kD. LLO является фактором вирулентности, уникальным для *L.monocytogenes*, который необходим данному микроорганизму для ускользания от вакуолей и внутриклеточного роста. Он не

обнаружен у других видов листерий, включая *L.ivanovii*. У ягнят, зараженных *L.monocytogenes* в экспериментальных условиях, были обнаружены антитела к LLO, специфичные к *L.monocytogenes* и не вступающие в перекрестную реакцию с другими видами листерий. Очищенный LLO определяли как специфичный антиген для обнаружения как гуморального, так и опосредуемого клетками иммунных ответов у овец, зараженных *L.monocytogenes*, *L.innocua* и *L.ivanovii*. Антитела LLO наблюдались только у овец, зараженных *L.monocytogenes*. Кроме того, в реакции бластогенеза и кожной пробе, двух индикаторах опосредуемого клетками иммунитета, ответную реакцию к LLO давали только овцы, зараженные *L.monocytogenes*.

Бактерии вида *Listeria ivanovii* (ранее *L.monocytogenes*, серотип 5) впервые были описаны в связи с выкидышами у овец и дают до 8 % всех случаев листериоза у животных. Бактерии вида *Listeria ivanovii* являются официально признанным фактором выкидышей и мертворождений у овец, а также плохого развития ягнят. Козы к *L.ivanovii* нечувствительны. Так, например, имеется сообщение о случае присутствия и *L.ivanovii* и *L.monocytogenes* в двух мигрирующих отарах овец и коз в штате Химачал Прадеш, Индия. В то время как *L.monocytogenes* были выделены как у овец, так и у коз, *L.ivanovii* выделяли только у овец. Заражение овец *L.ivanovii* в экспериментальных условиях указывает на то, что в отличие от заражения *L.monocytogenes*, выкидыши при этом происходят без энцефалита. Факторы, предрасполагающие к обусловливаемым *L.ivanovii* выкидышам у сельскохозяйственного скота, аналогичны таковым, описанным для *L.monocytogenes*: снижение резистентности овцематок к инфекции вследствие пищевого стресса, периоды холодной и сырой погоды, скармливание низкокачественного силоса и заражение животными-носителями.

Вспышки листериоза, вызываемые *L.ivanovii*, согласно сообщениям, поражают до 45 % суягных овцематок. Одна вспышка, имевшая место в Новом Южном Уэльсе, повлекла за собой выкидыши или гибель животных вскоре после рождения и охватила в целом 110 животных. Предположительно причиной первоначальной контаминации *L.ivanovii* является интенсивный выпас овец (120 овец на гектар в течение 18 суток) на пастбищах, ранее покосенных на сено, из которого были сделаны брикеты и которое испортилось в результате сильных дождей. У абортированных ягнят наблюдались многочисленные гепатические очаги. Бактерии вида *L.ivanovii* выделяли в тканях печени, легких и содержимом желудка. Имеется сообщение о выкидышах у КРС, вызываемых *L.ivanovii* и связанных с выпасом животных на пастбищах, где ранее выпасали овец.

Даже, несмотря на то, что *L.monocytogenes* считаются более патогенными из листерий, как *L.ivanovii*, так и *L.monocytogenes* проникают в клетки

млекопитающих в культуре ткани, используют актиновые волокна для внутриклеточного распространения, вызывают миометриальные сокращения у маточной модели в условиях *ин витро* (*in vitro uterine strip model*) и вызывает конъюнктивит после окулярной инокуляции кроликам.

Клиническая картина листериоза овец

Чаще всего при листериозе у овец выражено стремление убежать в сторону, голова чаще свешена набок или вниз. Наблюдались круговые движения, многие овцы продолжали движение до тех пор, пока не упирались головой в какое-либо препятствие. На основании этих признаков листериоз называют «вертячкой», однако надо иметь в виду, что у овец «вертячкой» называют ценуроз, поэтому дифференциация этих болезней необходима, хотя наблюдались случаи смешанного течения листериоза и ценуроза. У больных овец возможны параличи нижней челюсти, пучеглазие, припадки. Во время припадков отмечается резкое учащение пульса (до 100-150 ударов в минуту) и дыхания (до 170 в минуту). Наблюдались спазмы лицевой мускулатуры, скрежетание зубами, отмечается также опухание губ и ушей.

Мы наблюдали листериоз овец в естественных условиях и при экспериментальном заражении. В одном из неблагополучных хозяйств Ярославской области у больных овец вначале наблюдали несвойственное этим животным поведение, отставание от стада, пониженный аппетит. Больные животные останавливались, жалобно блеяли и затем бежали за уходящим стадом. В этот период температура тела была обычно повышена до 40 °С и более. Через некоторое время обнаруживали признаки поражения центральной нервной системы. Овцы теряли способность ориентироваться в пространстве, казались ослепшими, натыкались на окружающие предметы, качались из стороны в сторону, спотыкались, падали и поднимались с трудом. Характерным признаком листериоза овец были круговые или маневренные движения. У некоторых овец отмечалось неудержимое стремление вперед. При падении овца беспомощно перебирала ногами, не имея возможности подняться. Некоторые овцы старались двигаться вдоль стены, как бы опираясь о нее. Наблюдались чрезмерная пугливость, вздрагивание и даже возникновение судорог при прикосновении или окрике больного животного. Часто обнаруживали искривление шеи, горизонтальное покачивание головой, дрожание глазного яблока (нистагм) и ушей. Иногда отмечали односторонний паралич уха, отвисание ушей.

У больных овец регистрировали сильные судороги, плавательные движения всеми четырьмя конечностями. Приступы судорог повторялись несколько раз в течение суток. Во время припадков голова сильно запрокидывалась назад и была как бы прижата к спине. Насильственное разгибание шеи в этот момент не удавалось, наблюдалась сильно выраженная ригид-

ность мышц шеи. Между приступами овца принимала лежачее положение, но располагалась строго на одном боку. При попытке повернуть ее на другой бок, она упорно занимала первоначальное положение. Это, очевидно, признак нарушения деятельности мозжечка или центров равновесия.

Септицемическая форма листериоза описана у овец молодого возраста и ягнят. Основные признаки септицемической формы листериоза: недомогание, повышенная температура тела, расстройства деятельности желудочно-кишечного тракта (поносы), потеря аппетита. Часть животных при этом выздоравливает, но они длительное время остаются носителями инфекционного начала. Продолжительность болезни от 2 до 10 суток.

У ягнят чаще наблюдали септицемическую форму болезни, однако регистрировали и нервные формы листериоза. В. И. Леганцева (1953) у ягнят, больных листериозом, наблюдала отказ от корма, угнетенное состояние, затрудненное дыхание, температура тела оставалась в пределах нормы. Ягнята совершали круговые движения, упирались лбом в стенку и простаивали так часами, не меняя своего положения. Г. С. Благовещенская (1960) отмечала в Нижегородской области у ягнят при листериозе преобладание нервных форм болезни. В. Я. Виноградов (1961) у 3-5-месячных ягнят наблюдал листериоз с поражением слизистой оболочки ротовой полости в области губ. Forsek Z. et al., (1962) описали у ягнят при листериозе потерю равновесия, нарушение координации движений. Ягнята теряли способность находить вымя у матери, в ряде случаев отмечалось стремление кусать вымя. Болезнь у ягнят длилась 3-4 дня, реже затягивалась до 7-10 дней.

Многие исследователи на почве листериоза наблюдали массовые аборт у овец. Перед абортом у суягных овец отмечается истечение из влагалища. Из внутренних органов плода и из последа удается выделить культуру листерий. Абортировавшие овцы, как правило, не погибают. И. Иванов (1957) пишет, что за 1-2 дня до аборта овцы казались взъерошенными, температура тела несколько повышена, наблюдалось снижение аппетита и потягивание. Нервные признаки болезни у абортировавших овец обычно не были выражены. У части овец отмечали задержание последа и воспаление родовых путей.

Желев, Джуров и Томов (1964) заразили листериозом 10 суягных овец. Все овцы абортировали в разное время после заражения (4-30 дней), независимо от способа заражения и штамма листерий. У овец повышалась температура тела, отмечалась слабость, понижение аппетита, затрудненное дыхание, слизистые выделения из половых органов. Вскоре после аборта нормальное состояние животных восстанавливалось. У пяти из десяти зараженных были зарегистрированы задержания последа, гнойные истечения из матки.

На почве листериоза у овец обнаруживали поражение вымени – мастит. И. Иванов, Л. Икономов, Д. Тодоров (1964) у овец, зараженных листериозом внутривенно, наблюдали выделение листерий с молоком начиная со 2-го и до 13-го дня с момента заражения. Удой у больных животных при этом снижался, но видимых изменений молока не отмечали.

Применяя комбинированный способ заражения, мы в эксперименте получили смешанную форму листериоза у овец – поражение центральной нервной системы при септицемическом течении болезни. Очевидно, существование таких форм возможно и в естественных условиях. Овец заражали внутривенно и интраназально (до введения культуры наносили на слизистую оболочку носовой полости спиртовой раствор кристаллвиолета для того, чтобы нарушить ее целостность). На второй день после заражения у животных отмечали повышение температуры тела, учащение пульса и дыхания. Лихорадка длилась 5-6 дней, затем температура приходила в норму, у некоторых животных была ниже нормы. На 3-4-й день после заражения обнаруживали конъюнктивиты, сначала серозного, затем гнойного характера, а также риниты слизистого, а позднее слизисто-гнойного характера. Отмечалось сильное угнетение, потеря аппетита. Овцы больше лежали или подолгу стояли в одном положении. На 4-6-й день с момента заражения у овец отмечены признаки поражения центральной нервной системы: резкое угнетение, оглумоподобное состояние, голова низко опущена, ноги широко расставлены, некоординированные движения, судорожные сокращения мышц шеи и туловища, особенно при дотрагивании до животного.

Иногда голова запрокидывалась на спину или набок. Затем развилось нарушение равновесия, парезы задних и затем передних конечностей, при этом болевая чувствительность кожи в области задних конечностей сохранялась. На 5-7-й день отмечено обильное носовое истечение, общая слабость, параличи. Гибли животные на 6-8-й день после заражения или через 1-2 суток с момента появления признаков поражения центральной нервной системы.

У экспериментально зараженных листериозом овец мы наблюдали снижение процента гемоглобина, ускорение РОЭ, уменьшение количества лейкоцитов. В формуле белой крови отмечали сдвиг влево до юных форм, исчезновение эозинофилов и базофилов. При бактериологическом исследовании культуры листерии выделили из печени, селезенки, почек, крови и головного мозга.

Таким образом, в результате экспериментального заражения воспроизведен листериоз, протекающий в виде септицемии с одновременным поражением центральной нервной системы. Как показывают многочисленные наблюдения в естественных условиях и при экспериментальном заражении, часть овец переболевает листериозом в стертой и скрытой бессимптомной формах.

Клинические признаки у животных при стертой форме болезни ограничиваются легким недомоганием, кратковременным подъемом температуры, катаральными явлениями со стороны слизистых оболочек носовой полости и конъюнктивы. Контактирование этих животных с возбудителем листериоза удается установить на основании результатов серологических исследований. В неблагополучных по листериозу отарах овец клинически больных животных выявляется 1-3 %, а положительно реагирующих по РА и РСК до 20 % и выше. Так, например, в одной деревне Ярославской области, где мы наблюдали листериоз овец, из поголовья в 130 голов пало 11 голов (8,4 %). Обследование этой отары с помощью РА позволило выявить еще 39 голов (30 %) положительно реагирующих животных, в том числе 23 головы (17 %) в титре 1:200 и выше.

В эксперименте нам удалось воспроизвести такую стертую клиническую форму болезни. Ягнята в возрасте восьми месяцев были заражены внутривенно смывом вирулентной 2-суточной агаровой культуры листерий в дозе 5 млрд. микробных тел. На следующий день у всех овец зарегистрировали повышение температуры тела (лихорадка длилась до 7 дней), учащение пульса и дыхания, незначительное угнетение и снижение аппетита. На 3-4-й день обнаруживали серозный конъюнктивит, серозно-слизистое истечение из носовой полости. Эти проявления болезни к 8-10-му дню исчезли, и животные казались здоровыми. Положительная РА (в титре 1:200 и выше) установлена у ягнят на 5-6-й день и отмечалась более месяца (срок наблюдения).

Овец цыгайской породы в возрасте 7-7/2 месяцев заразили интраназально смывом суточной агаровой культуры в дозе 5-10 млрд. микробных тел в каждую ноздрю. На второй день отмечалось повышение температуры тела до 41,7 °С. Лихорадка продолжалась 3-5 дней. В этот период отмечали учащение дыхания и пульса. На 2-3-4-й день после заражения из крови овец выделили культуру листерий. На четвертый день РА была положительной в титре 1:100, на 15-й – в титре 1:800. Все овцы остались живы.

С. Lehnert (1964) также удалось экспериментально заразить овец листериозом через пищеварительный тракт без нарушения целостности слизистых оболочек. Заболевание у овец в этом случае протекало инапарантно или почти без симптомов (кратковременный подъем температуры, бактериемия в течение нескольких дней, выделение листерий с носовым истечением, нарастание титра агглютининов). Чаще такая инфекция приводила к скрытому поражению органов и к очень длительному выделению листерий с калом.

Листерия коз

Проявления клинического листериоза у коз и овец в значительной степени сходны: энцефалит, септицемия, выкидыш. Как и у других видов сельскохозяйственного скота, у коз отмечаются бессимптомные инфекции.

После проглатывания *L.monocytogenes* проникают в кишечный тракт и вызывают кратковременную бактериемию, что приводит к попаданию листерий в центральную нервную систему, внутренности или плаценту. Первыми признаками септицемии являются угнетенное состояние, потеря аппетита, снижение удоев и повышение температуры тела до 40 °С. У животных также может наблюдаться диарея. У суягной козы *L.monocytogenes* могут проходить через плаценту, проникать в плод, где они реплицируются и вызывают выкидыш в поздний срок сукотности. В ходе экспериментальных исследований с сукотными козами локализация *L.monocytogenes* в плаценте приводила к подъему уровня простагландина F2 и снижению уровня прогестерона. Небольшое снижение секреции сульфата эстрогена плодно-плацентарным комплексом вызывал миометриальное сокращение и выкидыш.

Наиболее часто отмечаемой формой листериоза у коз является менингоэнцефалит, смертность в результате которого достигает 60 %. Ранние признаки листерийного энцефалита являются отражением поражений соответствующих краниальных нервов, (опущенные уши, заметное слюнотечение, высунутый язык, продолжительное жевание вследствие затрудненного глотания). В зависимости от тяжести поражения головного мозга коз, таковые могут быть более чувствительны к листерийному энцефалиту, чем овцы. В ходе вспышки энцефалита и выкидышей в смешанном стаде коз и овец на территории Ирака заболеваемость (30 и 17 %) и смертность (21 и 15 %) у коз была выше, чем у овец. Высоким показателям случаев энцефалита, по-видимому, способствуют сильные дожди, холодная погода и восприимчивость беременных животных. Также, на территории Судана отмечено более частое выделение серотипа 1/2b *L.monocytogenes* у коз, чем у овец.

Листерия связан со скармливанием силоса. Вместе с тем, в ходе исследования 355 козых стад на территории штата Миссури, энцефалитный листериоз связывался с типом кормления – объеданием побегов древесных растений и локализацией стада в районах с преобладанием щелочной почвы. Интенсивное употребление в корм побегов растений, по-видимому, приводит к оральным поражениям и последующему проникновению *L.monocytogenes* в мякоть зуба или преддверие рта, что, по-видимому, и приводит к энцефалиту.

Несмотря на то, что вакцинация коз на территории Соединенных Штатов обычно не практикуется, она снизила количество случаев листериоза у

коз. Перед вакцинацией коз живыми аттенуированными штаммами на территории Норвегии доля абортосов в исследуемом стаде составляла 20-25 %. Однако после вакцинации процентный показатель инцидентности выкидышей снизился до 3 %. Живой аттенуированный штамм Aер *L.monocytogenes*, полученный с помощью трех последовательных мутаций по резистентности к стрептомицину и эритромицину, обеспечили определенную защиту от выкидышей у вакцинированных коз. Оптимальным для вакцинации коз и овец периодом, вероятно, является время непосредственно перед случкой.

Как и другие виды скота, козы экскретируют листерии в фекалиях и молоке в течение и после септицемии и способны контаминировать окружающую среду. Таким образом, новорожденные козлята, содержащиеся вместе с козами, могут заражаться через пуповину или в результате сосания грязных сосков. В немногочисленных исследованиях описано распространение *L.monocytogenes* в парном козьем молоке. В одном из сообщений отмечено обнаружение *L.monocytogenes* в 3,6 % образцов парного молока коров, при этом выделение *L.monocytogenes* в образцах молока коз и овец было значительно более низким (1 % и 2 %).

Титры сывороточных антител к *L.monocytogenes* могут не указывать на иммунный статус хозяина. У животных с септициемией развиваются высокие титры антител, тогда как животные, страдающие энцефалитом, имеют низкие титры, главным образом потому, что головной мозг является иммунологически в более «привилегированном» положении. Позднее было сделано предположение о том, что антитела к LLO могут служить специфическим критерием антительного статуса. У зараженных в экспериментальных условиях коз рост уровня антител к LLO соотносится с быстрым выведением *L.monocytogenes* из желудочно-кишечного тракта и, таким образом, позволяет прогнозировать благоприятное течение клинической инфекции.

Методы типирования листерий на основе фингерпринтинга ДНК позволяют прояснить роль животных в заражении человека. Так, например, изолят серовара 1/2b *L.monocytogenes* головного мозга козы с листериозом при риботипировании демонстрировал профиль ДНК, идентичный таковому изолята из сыра, изготовленного из козьего молока, и изолята из холодильника, в котором этот сыр хранился. Предполагается что сыр, изготовленный из зараженного козьего молока, по-видимому, контаминирован полки холодильника, и, таким образом, служит резервуаром для *L.monocytogenes*. В то же время, летальные случаи эндокардита человека с предшествовавшим незадолго до заболевания контактом с козами показывают, что изоляты людей и животных относятся к одной и той же серогруппе. Тем не менее, согласно результатам ДНК-анализа штаммы, выделенные у коз и людей, явно различались, что делает зооантропонозную передачу менее вероятной.

Клиническая картина листериоза у коз

Листертиоз коз протекает с клиническими признаками, сходными с таковыми при листериозе овец. Gall C. (1962) сообщил о появлении листериоза в отаре коз численностью 150 голов. 9 коз заболели в острой форме с наличием нервных признаков и погибли в течение 1-3 дней. 30 коз заболели вскоре после ягнения и погибли в период до четырех недель с начала заболевания или были вынуждено убиты в течение трех месяцев после ягнения. Две козы, больные хронической формой листериоза, выздоровели.

При острой форме у коз наблюдали маневные движения (всегда в одном направлении). Больные козы натывались на препятствия. Голова у них была повернута в сторону, были выражены сильное слюнотечение, истечение из носовой полости, сокращения диафрагмы. Позднее животные теряли способность стоять, совершали плавательные движения.

У коз, больных хронической формой листериоза, наблюдавшейся после ягнения, основным признаком болезни был понос. Больные животные прогрессивно худели, что приводило в течение четырех недель к смерти или к вынужденному убою в связи со слабостью этих животных. К концу заболевания у таких больных также обнаруживались признаки поражения центральной нервной системы: отвисание ушей, судороги жевательных мышц, круговые движения.

Однако у коз чаще всего наблюдается нервная форма листериоза. Заболевание протекает в две фазы: период неясных клинических признаков (период предвестников) и период выраженной клинической картины. Период предвестников характеризуется необычным поведением животного, пониженным аппетитом, сонливостью, связанностью движений, конъюнктивитами и ринитами. Температура тела может быть повышена до 41-42 °C или остается в пределах нормы. При приближении человека животное стремительно убегает прочь, часто не замечая препятствий, которые встречаются на его пути. Через 1-2 дня с момента появления первых клинических признаков заболевания обнаруживаются признаки поражения центральной нервной системы. Отмечают круговые движения, потерю равновесия, оглумоподобное состояние, искривление шеи, припадки судорог, расширение зрачков, потерю зрения. Температура тела при этом остается в пределах нормы или ниже. Молодые животные погибают, как правило, быстрее, чем старые. Гибель животных наступает через несколько часов или дней (от 1 до 14) с момента появления признаков поражения центральной нервной системы. Исход, как правило, летальный. Иногда больная коза подолгу стоит, упершись в стену. Если животное толкали, оно делало несколько быстрых, некоординированных движений, поворачивалось и падало. Затем некоторое время металось, после чего оставалось неподвижным. Больная коза ест

очень мало, клочки сена могут оставаться между челюстями и торчать изо рта. В связи с развитием паралича жевательной и глотательной мускулатуры возможно обильное слюнотечение.

Листерииоз свиней

Листерииоз свиней проявляется в первую очередь в виде септицемии. Согласно сообщениям, энцефалит встречается менее часто, аборт редки. Клиническая септицемия обычно наблюдается у новорожденных. В отличие от жвачных (КРС, овцы и козы), у которых листериоз встречается часто, листериоз у свиней, обладающих однокамерным желудком, встречается редко. Т. П. Слабоспитский (1936), впервые сообщил о случае листерийной инфекции у свиней молодого возраста, имевшем место в хозяйстве на территории России, и обозначил данный микроорганизм как *L.suis*.

При инфекциях, как в естественных, так и в экспериментальных условиях листериоз протекает более тяжело у животных молодого возраста. Поросята в результате инфекции гибнут, тогда, как взрослые обычно переживают болезнь. Листерииоз новорожденных может иметь сезонный характер, при этом пик заболеваемости приходится на начало зимы и весну.

Листерийный энцефалит у свиней бывает редко. Симптомы центральной нервной системы – дисфункция, в т.ч. отсутствие координации и прогрессирующая слабость с последующей гибелью, характерны для листериоза у животных молодого возраста. Менингоэнцефалит у свиней начинается с неожиданного отказа принимать корм, затем обычно следуют различные неврологические расстройства, включая дрожь, частичный паралич, отсутствие координации, хождение по кругу и конвульсии. Гистопатологические данные, возникающие вследствие менингоэнцефалита, включают в себя сильную инфильтрацию моноцитов. В многочисленных кровеносных сосудах, в особенности таковые в области варолиева моста, обнаруживают периваскулярное скопление лейкоцитов. Несмотря на то, что листерийный менингоэнцефалит у свиней наблюдается достаточно редко, имеется ряд сообщений о подобных вспышках, включая одно из Индии, в котором сообщается о гибели 27 из 75 свиней.

В Англии в период с 1975 по 1982 год Ветеринарный научно-исследовательский центр сообщал только о 14 случаях листериоза у свиней, тогда как у овец было зарегистрировано 666 случаев, у КРС – 472 случая. Согласно сообщениям, листериоз у свиней также на территории Нидерландов встречается редко. Листерииоз у свиней составил 1% от количества случаев листериоза на территории Западной Канады. На территории штата Айова – основном штате сосредоточения свиноводческих хозяйств, из 253

официально зарегистрированных в период с 1993 по 1997 гг. в ветеринарной диагностической лаборатории штата случаев листериоза не было ни одного случая болезни свиней. В течение того же периода 87 % зарегистрированных в штате Айова случаев листериоза приходилось на КРС. Ранее Blendon сообщал о том, что на КРС и овец приходилось 98 % (274 из 281) случаев листериоза, зарегистрированных в Диагностической лаборатории штата Миссури; на свиней приходился 1 случай.

Несмотря на то, что исследования, описывающие распространенность *L.monocytogenes* у здоровых свиней, были немногочисленны, таковую можно определить, исходя из результатов исследований выделения из фекалий, миндалин и проб с туш, взятых с помощью тампонов при забое свиней. *L.monocytogenes* культивировали из 5 % ректальных тампоновых проб и из 1,9 % проб свиных туш, собранных на территории Тринидада, что указывает на минимальный уровень контаминации туш во время переработки. *L.monocytogenes* присутствовали в 13 % свиных миндалин и в 2 % лимфатических узлов свиньи на территории Того, Западная Африка. На территории Бельгии *L.monocytogenes* были выявлены в 16 % свежих свиных фекалий (25 образцов); 5,9 % образцов свиных фекалий были положительными в Германии. В Югославии *L.monocytogenes* чаще выделяли из образцов свиных миндалин (25 %), чем фекалий (5 %), взятых у тех же животных. В Шотландии *L.monocytogenes* не были обнаружены ни в фекалиях до забоя, ни в свиных тушах. Аналогичным образом, *L.monocytogenes* не выделяли из свиных туш на территории Норвегии и Швеции.

По-видимому, на территории Восточной Европы в большей мере распространены бессимптомные носители листерий. Например, в Венгрии *L.monocytogenes* выделяли в 25,6 % свиных фекалий. В Югославии *L.monocytogenes* в миндалинах содержались у 45 % всех исследованных свиней, тогда как в фекалиях – лишь у 3 %. Высокий показатель присутствия инфекционного агента у свиней привел к выводу о том, что свиньи могут быть важным резервуаром *L.monocytogenes*.

Ответственными за разницу в инцидентности среди здоровых свиней-носителей являются технология ведения хозяйства, например, кормление свиней сухими кормами или силосом, содержание в закрытых помещениях, а также выбор объекта для взятия образца (миндалины, фекалии). Например, на территории Югославии *L.monocytogenes* чаще выделяли в миндалинах свиней, выкормленных силосом (61 %), чем у животных, выращенных на сухом корме (29 %). Интересно, что в ходе описываемого исследования *L.monocytogenes* также были выделены более чем в 19 % исследованных свиных мясопродуктов. Несмотря на то, что в образцах фекалий из SPF-стад на территории Дании *L.monocytogenes* выделены не были, таковые культивиро-

вались из 2,2 % образцов фекалий из стад, не имеющих статуса SPF. Norrung и др. обнаруживали листерии у 29 % свиней в окологлоточных лимфатических узлах (миндалины), и в 75 % образцов свиных кормов, исследованных на территории Дании. *L.monocytogenes* выделяли из лимфатических узлов 5 % забитых свиней и 8 % образцах свиней на территории Боснии и Герцеговины. Из всех случаев выделения *L.monocytogenes* в данном исследовании 76 % случаев выделения приходится на свиные туши, образцы которых брали в осенние и зимние месяцы.

Skovgaard (1974) сообщил о присутствии *L.monocytogenes* лишь в 1,7 % образцов фекалий; вместе с тем, данный патоген был обнаружен в 12 % исследованных в Дании образцов свиного фарша, что указывает на распространение листерий в процессе переработки. На территории Югославии, где *L.monocytogenes* в свином фарше выделяли чаще, чем в переработанной мышечной ткани (соответственно в 69 % и 0 %), контаминация происходит в ходе переработки свинины. Во Франции вспышка, охватившая 279 человек, была вызвана употреблением маринованных свиных языков, ставших основным фактором передачи, однако во вспышке участвовали также и другие подвергнутые высокой степени обработки готовые к применению деликатесы, контаминированные в результате контакта с объектами окружающей среды.

Клиническая картина листериоза у свиней

Листериоз у свиней клинически проявляется различно в определенных возрастных группах животных. У взрослых свиней болезнь протекает остро или хронически. Длительность болезни до 2-3 недель. В этих случаях регистрируют субнормальную температуру тела, исхудание, анемию, снижение аппетита, нарушение координации движений, вялость, иногда мышечную дрожь. Отмечают также кашель, реде сыпь на коже или струпьевидную экзему. В ряде случаев у больных свиней при листериозе наблюдают множественные абсцессы в различных частях тела.

Болезнь у взрослых свиней обычно принимает септицемический характер и реде сопровождается поражением центральной нервной системы. При заболевании листериозом свиноматки часто abortируют.

У поросят (чаще всего заболевают отъемыши) листериоз протекает, как правило, с признаками поражения центральной нервной системы: расстройство координации движений, своеобразная «ходульная» походка, манежные движения, мышечная дрожь, приступы судорог, возбуждение. Болезнь длится от нескольких часов до 1-3 дней. Температура тела в начальный период болезни обычно повышена, а затем снижается и падает ниже нормы.

При септицемической форме болезни у поросят наблюдают сильное угнетение, отказ от корма, общую слабость, затрудненное дыхание, посинение

кожи в области ушей и живота, иногда катаральное состояние кишечника. Температура тела повышена. Животные погибают через 1-3 дня.

В Ярославской области наблюдали острое течение листериоза поросят с явлениями поражения центральной нервной системы. Болезнь длилась от 10 часов до 3 суток. Температура тела была в норме, у некоторых животных повышена до 41-42 °С. Пульс учащен (до 98-140 ударов в минуту), дыхание до 30-40 движений в минуту. В Кокчетавской области наблюдали сверхострое, подострое и хроническое течение болезни у свиней. Сверхострое и острое течение наблюдали у сосунов, отъемышей и подсвинков, хроническое – у свиней и подсвинков. Острое течение болезни характеризовалось повышением температуры тела до 41 °С, отказом от корма, угнетением, серозным ринитом, конъюнктивитом, запором и поносом, признаками поражения центральной нервной системы – судороги, поворачивание головы набок, хождение боком. При хроническом течении наблюдали искривление позвоночника, абсцессы, воспаление легких.

П. С. Соломкин (1959) пишет, что в начале заболевания у поросят отмечается повышение чувствительности: при прикосновении к ним животные вздрагивали и начинали визжать. С развитием клинических признаков голос у поросят становится хриплым, а затем нередко совсем пропадает. К концу заболевания у многих поросят развивались полупараличи задних, а в дальнейшем и передних конечностей.

Имеются наблюдения о бессимптомных и малозаметных формах листериоза свиней. Клинические признаки в этом случае ограничивались вялостью, капризным аппетитом, что легко можно не заметить или отнести за счет расстройства пищеварения. Увеличение количества моноцитов в периферической крови при листериозе свиней не установлено.

Листериоз плотоядных

Листериоз у лисиц описан Н. Г. Трегубовой (1949). Клинические признаки заболевания выражались в общей слабости, снижении аппетита, шаткой походке, конъюнктивитах, ринитах, поносах, пневмониях, припадках и параличах. Длительность болезни 3-4 дня; исход, как правило, летальный. У взрослых лисиц наблюдались аборт.

У песцов листериоз описан Н. А. Литвиновым, В. М. Гришиным и А. В. Ирошниковым (1964). Болезнь регистрировали у молодых (в возрасте 1-3 месяцев) и у взрослых песцов. У больных отмечали вялость, угнетение, сменявшееся возбуждением, частичный или полный отказ от корма, понижение температуры тела за несколько дней до гибели. Приступы возбуждения сопровождалось нарушением координации движений, шаткостью зада

с последующим парезом задних конечностей. У щенков наблюдали дрожание, судорожные подергивания, сокращения жевательных, затылочных и шейных мышц, усиливающиеся при движении. В отдельных случаях щенки при дотрагивании начинали двигаться по кругу или перемещались боком с запрокинутой головой. Отмечали также рвоту, поносы, причем в фекалиях обнаруживали слизь и прожилки крови. Иногда у больных щенков находили конъюнктивиты и кератиты.

У взрослых, кроме описанных признаков, наблюдали кашель, одышку, влажные хрипы в легких, затрудненное дыхание брюшного типа.

Смерть животных наступала через 7-28 дней с момента появления первых признаков болезни.

П. С. Соломкин (1959) сообщил о заболевании листериозом кошек. Болезнь наблюдалась у животных всех возрастов, внешние признаки были резче выражены у кошек 2-6-месячного возраста. Болезнь проявлялась нервными припадками, парезами и параличами конечностей, голова запрокидывалась на одну сторону. Длительность болезни 4-15 дней. Молодые кошки погибали, часть взрослых кошек выздоравливала.

Сообщение о листериозе у собак встречаются редко, он может вызывать энцефалит, движение по кругу и аборт.

При исследовании домашних животных *L.monocytogenes* были обнаружены в 1,3 % образцов собачьих (n=300) и 0,4 % кошачьих фекалий (n=275). Низкий уровень выделения может указывать на то, что домашние животные не являются серьезным фактором эпидемиологии листериоза человека, либо, что выделение имеет спорадический характер. Напротив, исследование сыворотки, свидетельствующее, что сероположительными могут быть до 90 % собак, следует интерпретировать с осторожностью ввиду перекрестной реактивности, характерной для реакций агглютинации. Одно-единственное сообщение о возможной передаче *L.monocytogenes* от людей животным служит основанием для переоценки, поскольку эти isolates позднее были идентифицированы как относящиеся к *L.innocua*. Тем не менее, выделение одногоединственного вида листерий и у людей, и у собак, находящихся в тесном контакте, может служить скорее отражением значительной контаминации окружающей среды, чем факта передачи от человека собаке.

У собак листериоз протекает с признаками поражения центральной нервной системы и напоминает нервную форму чумы. У больных животных отмечали подергивание мышц морды и шеи, понос, насморк, гнойный конъюнктивит. Болезнь длится 3-7 дней и заканчивается гибелью молодых животных. Взрослые собаки чаще выздоравливают.

Листерииоз птиц

Листерииоз птиц был впервые описан в 1935 году, спустя 3 года Ten Broeck выявил *L.monocytogenes* (тогда *Bacterium monocytogenes*) у больных цыплят. Птицы, как дикие, так и домашние, в том числе индейки, утки, гуси и фазаны являются наиболее обширной группой бессимптомных носителей. Исследование здоровых городских грачей указывало на носительство *L.monocytogenes* (33 %), *L.innocua* (24 %) и *L.seeligeri* (8 %). Аналогичным образом, *L.monocytogenes* были обнаружены в 9,5 % образцов фекалий внешне здоровых делаверских чаек (*Larus delawarensis*), обитающих на территории Монреаля. Напротив, образцы от голубей, обитающих на территории Барселоны, были отрицательными, тогда как *L.monocytogenes* обнаруживались в 1 % образцов от голубей, обследованных в Германии.

До 33% всех здоровых цыплят могут бессимптомно выделять *L.monocytogenes* с фекалиями. Наиболее вероятным является заражение птиц при склевывании контаминированной листериями почвы, фекалий или погибших животных; вместе с тем, контаминированный фекальный материал может также составлять угрозу другим сельскохозяйственным животным. У четырех коров, содержавшихся в стойлах, где в качестве подстилки использовали подстилку из-под птицы, развился листериозный энцефалит. Серогруппа 4b *L.monocytogenes* выделялась из головного мозга, подстилки и содержимого кишечника 4,1 % птиц-доноров. В другом исследовании возросшая встречаемость *L.monocytogenes* у грачей совпадала с сезоном гнездования и пиком листериоза овец, который, в свою очередь, был связан с потреблением контаминированного силоса. Так, например, несмотря на то, что истинная инцидентность листериоза у птиц и сельскохозяйственного скота, несомненно, значительно выше таковой, указываемой в опубликованных сообщениях, клинический листериоз у домашней птицы не имеет широкого распространения.

Несмотря на наличие большого количества спорадических случаев птичьего листериоза, зарегистрированного на протяжении последних 60 лет, данная болезнь у птиц распространена в гораздо меньшей степени, чем среди овец, коз и КРС. Например, листериозная инфекция была обнаружена только у 13 из более чем 38000 цыплят, подвергнутых обследованию в хозяйствах на территории штата Пенсильвания в период между 1960 и 1965 гг. Кроме того, широкомасштабные вспышки листериоза среди цыплят, по-видимому, являются редким явлением. В ходе одной из вспышек на территории Индии, охватившей ранневозрастных цыплят, гибель (показатель смертности составлял 60%) была внезапной и обычно без предшествующей симптоматики. У некоторых птиц проявлялись такие

симптомы, как слабость, утомление и склонность стоять изолированно в темном месте.

Листериоз у птиц может являться вторичной инфекцией, связанной с вирусными инфекциями, а также с сальмонеллезом, ньюкаслской болезнью, чумой птиц, ринитом, кокцидиозом, инвазиями гельминтов, клещами, энтеритом, лимфоматозом, опухолями яичников и другими подавляющими иммунитет состояниями. В 1988 году было сообщение об энцефалитной форме листериоза среди цыплят-бройлеров на территории Калифорнии. Предрасполагающие условия, которые, по-видимому, форсировали возникновение вспышки, включали в себя проведенную незадолго до этого обрезку клюва и вакцинацию модифицированной живой вакциной против вирусного артрита, сделанной подкожно в шею. Выделяли *L.monocytogenes* серотип 4b из образцов печени и большом количестве образцов головного мозга. Спустя три года произошла вторая вспышка среди племенного ремонтного молодняка, охватившая 0,3 % из 54000 птиц, содержавшихся в стае. Бактерии *L.monocytogenes* выделяли из почвенных образцов, взятых вблизи примыкающего к птичнику молочного хозяйства, однако на других участках данного хозяйства указанный микроорганизм выделен не был. Возможно, что этой вспышке способствовали: стресс, связанный с необычно холодной погодой, описанной в сообщении, а также стресс, обусловленный вакцинацией цыплят 7-10-дневного возраста.

Наиболее частым проявлением листериоза у кур и других видов домашней птицы является септицемия, характеризующаяся очаговым некрозом внутренних органов, в особенности печени и селезенки. Часто, хотя и не во всех случаях, развиваются сердечные поражения, в свою очередь, ведущие к закупорке сердечных сосудов, перикардиту и возрастанию количества перикардиальной жидкости. Другие состояния, вызываемые септицемической формой птичьего листериоза, включают в себя увеличение селезенки, нефрит, перитонит, энтерит, язвы в подвздошной и слепой кишках, некроз яйцевода, общий или легочный отек, воспаление воздушных мешков и конъюнктивит. В острых случаях поражения, образующиеся в результате этих состояний, могут частично заглушаться закупоркой сосудов и геморрагиями внутренних органов. К сожалению, куры и другая домашняя птица, страдающая от листериозной септицемии, обычно слабо проявляет явные признаки болезни, за исключением прогрессирующего истощения, и обычно погибают спустя 5-9 суток после начала болезни. *L.monocytogenes* также могут вызывать менингоэнцефалит у домашней птицы, хотя он встречается значительно реже, чем септицемическая форма листериоза. У домашней птицы, страдающей листериозным менингоэнцефалитом, проявляется ряд выраженных изменений в поведении, в том числе - потеря координации,

треморы, кривошеесть, одно- или двусторонний паралич пальцев, опущение крыльев, все они связаны с нарушениями центральной нервной системы. Подобные инфекции практически всегда дают летальный исход. Посмертное обследование обычно выявляет гиперемию и некротизированные очаги головного мозга, а также многие из указанных состояний, характерных для листериозной септицемии. Микроскопическое исследование птиц при листериозном энцефалите выявляет глиоз и сателлитоз (satellitosis) мозжечка и микроскопические абсцессы, содержащие грамположительные бактерии, в среднем и продолговатом мозге.

Бактерии *L.monocytogenes* способны инфицировать как куриные эмбрионы, так и молодую птицу, при этом птица более старшего возраста более резистентна. После орального контрольного заражения цыплят клетками *L.monocytogenes* в дозе 10^2 или 10^6 , Bailey (1996) чаще обнаруживали данный патоген в слепой кишке, селезенке, печени и клоачных тампоновых образцах у цыплят 1-дневного возраста, чем у птицы в возрасте 14-35-суток. При экспериментальной инфекции отмечаются диарея и истощение, способствующие распространению возбудителя с фекалиями и носовыми выделениями. Позднее, в ходе исследований, листериями в экспериментальных условиях заражали цыплят 2-дневного возраста. Несмотря на то, что большинство инокулированных цыплят внешне выглядели здоровыми, спустя 2-5 суток после инокуляции отмечались подавленное состояние, взъерошенность перьев, вялость и диарея, с последующей гибелью. У нескольких особей также наблюдались более умеренные симптомы, например анорексия и сонтичность. Спустя 5 суток после заражения *L.monocytogenes* присутствовали в 100 % образцов слепой кишки. Вместе с тем, процентный показатель положительных по *L.monocytogenes* птиц снижался, и на 28 сутки *L.monocytogenes* выделялись в слепой кишке только у 10 % птиц, зараженных в экспериментальных условиях. В другом сообщении о проведении тестов на меньшем количестве особей, *L.monocytogenes* обнаруживали только в первые сутки после заражения в 15 % образцов фекалий. Эти данные указывают на то, что у зараженных птиц быстро происходит удаление *L.monocytogenes*, что свидетельствует о том, что заражение цыплят имеет кратковременный характер, и маловероятно, что они являются резервуаром *L.monocytogenes*. Интересно, что после искусственного заражения листериями Pustovaia обнаружила, что представители голубиных (голуби, горлицы), воробьиных и куриных (индейки и фазаны) являлись чувствительными к бактериям *L.monocytogenes*, тогда как соколиные (соколы, ястребы) и совиные (совы) были резистентны.

Бактерии *L.monocytogenes* могут выделяться у зараженных цыплят в результате инокуляции эмбрионов 10-дневного возраста. Введение в эмбрион было предложено в качестве реакции, способной заменить тест на мышах

для оценки вирулентности *L.monocytogenes*. Например, *L.monocytogenes* и *L.ivanovii* являются летальными для заражения в экспериментальных условиях 10-дневных куриных эмбрионов. Напротив, эмбрионы, зараженные непатогенными видами *L.innocua*, *L.seeligeri* и *L.welshimeri*, обычно выживают.

Бактерии *L.monocytogenes* могут присутствовать в организме до 33 % здоровых птиц, при этом контаминация тушке птицы в розничной продаже колеблется от 17 до 70 %. Предложена связь между стрессом, полученным в результате транспортировки, и выделением *L.monocytogenes* с фекалиями.

В одном из исследований *L.monocytogenes* были обнаружены в 33 % пулов образцов фекалий, собранных в клетках, что возможно связано со стрессом, вызванным перевозкой. Вместе с тем, никаких данных, касающихся статуса этих птиц по *L.monocytogenes* перед транспортировкой, не предоставлено.

Присутствие листерий у ремонтной птицы, вероятно, является следствием контаминации в ходе обработки, а не статусом самой птицы. В ходе попыток прослеживания источника *L.monocytogenes* у ремонтной птицы был обнаружен низкий уровень естественного носительства (5 %) в слепой кишке птицы из родительских стад, являющихся источником поставки бройлеров. В исследованиях проведенных в Дании *L.monocytogenes* не выделялись из образцов слепой кишки, взятых у более чем 2000 голов бройлеров (90 стад). Вместе с тем, *L.monocytogenes* обнаруживали у птицы, прошедшей переработку. Сравнительный анализ фингерпринтинг-моделей ДНК на основе метода гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) указывал, что живые птицы мало участвовали в контаминации данной продукции в целом.

После начала процесса переработки процентная доля положительных по листериям образцов возрастает. Исследование птицебоен не обнаружило присутствия *L.monocytogenes* в ряде органов, в том числе кишечном тракте и в частности слепой кишке. Вместе с тем, таковые обнаруживались в используемой при переработке воде, образцах мяса, освобожденного от костей механическим способом, а также на руках и перчатках у 34 % работников, занимающихся разделкой, что указывает на перекрестную контаминацию в ходе переработки. Позднейшие исследования с использованием ДНК-профилей *L.monocytogenes*, образцов собранных в ходе переработки, указывают на их значительную контаминацию. Спорадические случаи листериоза человека эпидемиологически были связаны с потреблением не прошедшей достаточной кулинарной обработки продукции птицеводства. Анализ факторов риска, связанных со спорадическим листериозом человека в США, указывал на то, что вероятность того, что раковые больные и лица с ослабленным иммунитетом, на которых приходится 69% случаев листериоза, употребляли в

пищу мясо птицы, не прошедшее достаточной кулинарной обработки, была выше, чем у контрольных (коэффициент относительного риска = 3,3).

Клиническая картина листериоза у птиц

У птиц листериоз обычно протекает как септическое заболевание. Заболевают цыплята и молодые куры. При этом они теряют аппетит, становятся малоподвижными, наблюдаются конъюнктивиты, дыхание учащается, наступает прогрессирующая слабость, наблюдаются судороги, параличи и вскоре наступает смерть.

У гусей и уток наблюдается угнетение, сменяющееся возбуждением. Птица находится в полусонном состоянии, затем внезапно взлетает, падает на землю, начинает беспорядочно кружиться. Отмечают параличи мышц, конечностей, крыльев, шеи. При осмотре больных птиц обнаруживают конъюнктивиты, иногда с потерей зрения.

При заражении внутримышечно кур в дозе 6 млрд. микробных тел на второй день появляются клинические признаки болезни: угнетение, атаксия, параличи конечностей и крыльев. Все зараженные куры пали в течение 7-15 суток.

Считается, что куры являются высокочувствительным объектом по отношению к внутривенному заражению листериозом. Весьма чувствительны также канарейки – заражение в мышцу ведет к гибели через 3 дня.

Голуби оказались устойчивыми к подкожному и внутримышечному заражению возбудителем листериоза и только внутривенное заражение вызывало их гибель. Голубь, по мнению Донкер-Вот, является единственным животным, способным сопротивляться даже тяжелой экспериментальной листериозной инфекции. Голуби в течение длительного периода могут быть носителями возбудителя. В наших опытах голуби оказались устойчивыми к внутримышечному заражению культурами листерий, переносили без видимых отклонений в состоянии организма дозы в 2 млрд. микробных тел, в том числе штаммами, выделенными от птиц.

Листериоз прочих видов животных

Листериоз диагностировался у ряда других видов сельскохозяйственных животных – лам, животных, выращиваемых с целью получения шкур, у домашних животных, оленей и приматов. Пути передачи и симптомы аналогичны таковым у КРС, овец и коз.

У новорожденных лам листериоз проявляется в виде септицемии с менингитом, у взрослых животных он чаще вызывает асимметричное вестибулярное заболевание. В наибольшей степени поражаются животные на отъеме и находящиеся на подножном корме или получающие грубые

корма, но не силос. У двух взрослых лам диагностировали многоочаговый гнойный энцефалитический листериоз, причем оба животных были беременны. *L.monocytogenes* выделяли из образцов одного из двух животных и с применением флюоресцеинконъюгированных антител к *L.monocytogenes* наблюдали поражения в стволе головного мозга обеих лам. В другом сообщении указывалось, что *L.monocytogenes* вызывала летальный менингоэнцефаломиелит у ламы 3-5-месячного возраста. У животного проявилась односторонняя периферическая болезнь, развившаяся в энцефалит. Источник инфекции у животных, описанных в этих двух сообщениях, не установлен.

Листериоз может влиять на состояние хозяйств, занимающихся производством шкур. Одна вспышка рассеянного висцерального листериоза шиншилл на территории провинции Нова Скоша была связана с потреблением контаминированной мякоти сахарной свеклы, хотя *L.monocytogenes* в корме обнаружены не были. Данная вспышка произошла в колонии, при этом у племенных шиншилл доля смертности составила 23 %. Приблизительно за 4 суток до гибели у животных наблюдалась анорексия, они горбились, у некоторых наблюдалась кривошеесть. Вместе с тем, многие животные были найдены погибшими, хотя при жизни клинических признаков болезни не наблюдалось. Ответственным за вспышку листериоза у шиншилл подозревали сено, контаминированное фекалиями грызунов, птицы или жвачных. Вероятен перенос *L.monocytogenes* вследствие капрофагии, поскольку животные испражнялись в емкости для пылевых ванн, которые переносили из одной клетки в другую.

В ходе энзоотической вспышки листериоза в кроличьем хозяйстве *L.monocytogenes* 1/2а выделяли из образцов корма и тканей кроликоматки, погибшей в результате септического метрита.

Литература описывает листериоз у диких жвачных, включая северного оленя, косулю и газель Гранта, ранее имевших контакт с зараженными листериями овцами. *L.monocytogenes* выделяли при аутопсии животных, содержащихся в зоопарках. Менингоэнцефалит был зимой и ранней весной у 42 из 1800 оленей в зоопарке на территории Дании. В течение предыдущей весны ему предшествовала гибель шести оленей, у которых наблюдалось хождение по кругу и слепота. В последующем году первым признаком болезни было обвисание ушей, вызываемое параличом лицевого нерва, и слабовыраженная способность следовать вместе со стадом. Внешний источник *L.monocytogenes* не выявлялся, факторами, потенциально способствующими заболеванию, являлись стресс вследствие плохого урожая буковых (poor beech-mast crop) и рост концентрации животных в результате повышения численности поголовья при вероятном внедрении бессимптомных носителей, а также внезапная смена погоды.

Листерия также может развиваться у нечеловекообразных приматов, у которых он проявляется в виде септицемии, менингоэнцефалита и мертворождений, о чем свидетельствуют данные, собранные в крупной колонии этих животных, живущей на открытом воздухе в Калифорнии. Передача может происходить в результате потребления контаминированных кормов. Были предприняты попытки заражения обезьян (*Macaca fascicularis*) через корм и с помощью аэрозолей в экспериментальных условиях. Несмотря на то, что у этих обезьян выделяли *L.monocytogenes* из фекалий до 21 суток после проглатывания листерий в количестве 10^9 КОЕ/г ни о септицемии, ни об энцефалите не сообщалось, что свидетельствует о том, что нормальные здоровые приматы резистентны к *L.monocytogenes*.

Листерия рыб и ракообразных

Потребность в морепродуктах возрастает, индустрия аквакультуры реагирует на рост спроса организацией поставок рыбы, выращенной на рыбных фермах. В 1980 году на территории Новой Зеландии Леннон и др. сообщали о вспышке из 22 случаев перинатального листериоза человека. Было установлено наличие слабой связи между этими случаями заболевания и потреблением контаминированной сырой рыбы и ракообразных. Facinelli et al. описали случай спорадического листериоза, в ходе которого клинические изоляты и таковые, выделенные в рыбе, не прошедшей достаточной кулинарной обработки и хранящейся в холодильнике пациента, по данным ДНК-фингерпринтинга были идентичны.

Первое сообщение о листериях в рыбе поступило из Румынии в 1957 году. В ходе этого исследования *L.monocytogenes* выделяли во внутренних органах прудовой радужной форели, предположительно зараженной после скармливания ей контаминированного ослиного мяса. Результаты современных исследований указывают на то, что листерии отсутствуют в живой морской рыбе, но присутствуют у живых представителей пресноводных рыб. Бактерии не удавалось обнаружить в кишечном тракте, коже и жабрах 10 особей живого лосося. Аналогичным образом, *L.monocytogenes* не были обнаружены ни в лососе (n=199), ни в образцах окружающей среды, взятых на рыбной ферме в Бергене, Норвегия. Наоборот, *L.monocytogenes* выделили в двух из пяти кишечных трактов пресноводной рыбы, приобретенной на рынке на территории Индии.

Наиболее широко культивируемым в США видом является канальный сомик (*Ictalurus punctatus*), большинство хозяйств по промышленному выращиванию которого расположено в юго-восточной части страны. Исследование сомика, воды и корма, взятых в университетских прудах в Ала-

баме, указывало на присутствие *L.monocytogenes* на коже и во внутренних органах (среднее расчетное количество составляет 1,99 log КОЕ/гр массы во влажном состоянии). *L.monocytogenes* не были обнаружены ни в воде, ни в корме. К сожалению, авторы не предоставили данных о процентной доле *L.monocytogenes*-положительной рыбы, однако они сделали вывод о том, что бактериальные концентрации во внутренних органах свидетельствуют о возможности перекрестной контаминации во время потрошения. Исследование, проведенное в трех хозяйствах по выращиванию радужной форели, расположенных в Швейцарии, показало, что в одном из хозяйств *L.monocytogenes* присутствуют в фекалиях (40 %) и на чешуе (33 %; 5 из 15) рыбы, однако *L.monocytogenes* обнаружили в конечной продукции, изготовленной только из 6 % рыбы с данной фермы. Напротив, *L.monocytogenes* не были обнаружены в фекалиях, чешуйном покрове рыбы, и не были обнаружены в двух из упомянутых хозяйств, где рыба выращивается в прудах с бетонным покрытием и перед сбором выдерживается без корма в течение 3-7 дней. Аналогичным образом, *L.monocytogenes* не выделяли из чешуи, жабр, кишечника полосатого окуня, выращенного в емкостях с водной рециркуляцией. Заражение полосатого данио (*Brachydanio rerio*) в экспериментальных условиях указывало на то, что показатель LD₅₀ у рыб выше, чем у мышей, и что *L.monocytogenes* не размножаются в рыбе. Проведенное в экспериментальных условиях заражение повышало выработку гранулоцитов и моноцитов. В противоположность *L.monocytogenes*, штаммы *L.welshimeri*, *L.innocua* и *L.seeligeri* вызывали гибель более 50 % рыбы спустя 7 суток после заражения.

Brackett (1973) предположил, что на распространение *L.monocytogenes* могут влиять контаминация рыбы, ракообразных и моллюсков через воду. Потенциальными факторами, способствующими заносу листерий в водную среду, могут быть поверхностные воды, сброс сточных вод и сельскохозяйственные стоки. Кроме того, дополнительным источником контаминации моллюсков и ракообразных может являться присутствие *L.monocytogenes* у морских чаек. В 1959 году *L.monocytogenes* были обнаружены у ракообразных, собранных в районе Русского течения (Russian stream). Позднее было проведено исследование побережья Мексиканского залива США, в ходе которого обследовались креветки, устрицы в водах эстуариев на наличие *L.monocytogenes*. Данный патоген был обнаружен у 11 % особей необработанной креветки (n=74), но не был обнаружен в устрицах (n=75), хотя некоторые из них были собраны в запрещенных местах выращивания ракообразных. В исследовании, проводившимся параллельно в пресноводных притоках, вытекающих из залива Гумбольдта-Аркада (Humboldt-Arcata Bay) в Северной Калифорнии, *L.monocytogenes* обнаруживали в образцах

пресной воды, куда поступали стоки с близлежащих ферм. Вместе с тем, *L.monocytogenes* не были обнаружены ни в устрицах, обследованных в ходе проведения данного эксперимента, ни в устрицах, содержащихся в живом виде в цистернах на рынках морепродуктов в г. Сиэтл. В целом, эти данные свидетельствуют о том, что маловероятно, что рыба, ракообразные и моллюски в живом виде являются носителями *L.monocytogenes*. Для обнаружения *L.monocytogenes* в маринованной радужной форели, контаминированной в экспериментальных условиях, использовали тесты на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Учитывая возрастающий интерес к вопросу о присутствии *L.monocytogenes* в рыбе и морепродуктах, следует отметить, что данная чувствительная методика может эффективно использоваться для оперативного проведения скрининга живых ракообразных, моллюсков и рыбы на наличие *L.monocytogenes*. Тем не менее, малочисленность сообщений о присутствии *L.monocytogenes* в живой рыбе, ракообразных и моллюсках свидетельствует о том, что обнаружение видов листерий в продуктах, взятых в системе розничной торговли, скорее всего, является результатом контаминации, происшедшей после вылова.

Таким образом, листериоз у животных наблюдается в нескольких формах:

1. Нервная форма протекает в две фазы: первая характеризуется вялостью, снижением аппетита, повышением температуры тела, ринитами и конъюнктивитами; вторая – круговыми движениями, неестественной походкой, потерей равновесия, оглумоподобным состоянием, припадками судорог, расширением зрачков, парезами и параличами конечностей.
2. Септицемическая форма проявляется недомоганием, лихорадкой, потерей аппетита, поносами.
3. Смешанная форма – септицемическое течение, сопровождающееся поражением центральной нервной системы.
4. Поражение половой системы проявляется абортами, задержаниями последов, эндометритами и метритами.
5. Листерийные маститы – бывают у крупного рогатого скота и овец, сопровождаются длительными выделениями листерий во внешнюю среду с молоком.
6. Стертая форма характеризуется неясными признаками (угнетение, снижение аппетита, кратковременная лихорадка).
7. Бессимптомная форма («здоровое» носительство) характеризуется длительным пребыванием возбудителя листериоза в организме животного при отсутствии клинически выраженных признаков болезни.

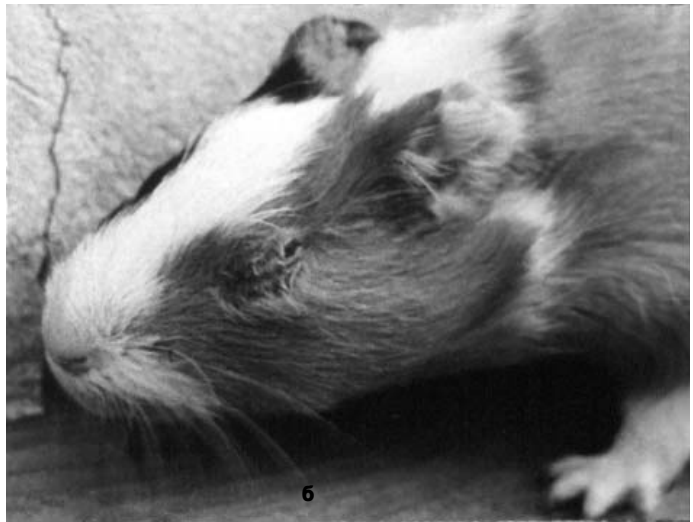


Рис 6.1. Клиническая картина экспериментального листериоза у морских свинок: а – здоровая свинка, б – конъюнктивит у зараженной листериозом морской свинки.



Рис. 6.2. Клиническая картина листериоза буйволов (буйволица 5 лет, искривление шеи, животное погибло на вторые сутки с момента появления признаков заболевания).



Рис. 6.3. Клиническая картина листериоза у овцы. Потеря способности сохранять равновесие, овца опирается о стенку сарая.



Рис. 6.4. Клиническая картина листериоза у овцы: ригидность мышц шеи.



Рис. 6.5 а. Клиническая картина спонтанного листериоза у овец – круговые движения, «вертячка», парез тазовых конечностей.

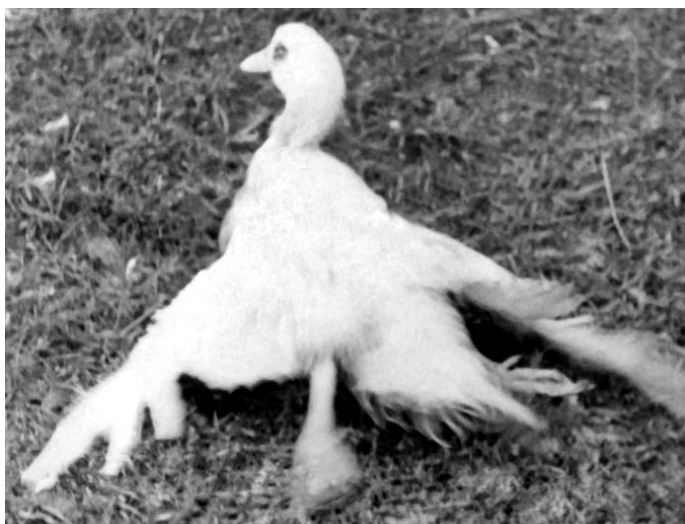
Рис. 6.5 б. Клиническая картина спонтанного листериоза у овец – стадия параличей, плавательные движения.



Рис. 6.6. Клиническая картина листериоза свиней: общая слабость, параличи конечностей, резкое угнетение.



Рис. 6.7. Клиническая картина спонтанного листериоза у уток: параличи крыльев и конечностей.



ЧАСТЬ VII

ПРОФИЛАКТИКА И МЕРЫ БОРЬБЫ С ЛИСТЕРИОЗОМ ЖИВОТНЫХ

Меры профилактики и борьбы регламентированы Санитарными и Ветеринарными правилами (СП 3.1.088-96 и ВП 13.4.1311-96 соответственно). Настоящие Правила обязательны для выполнения на всей территории Российской Федерации государственными органами, предприятиями и другими хозяйственными субъектами, учреждениями, организациями, общественными объединениями, независимо от их принадлежности и форм собственности, должностными лицами и гражданами в области профилактики и борьбы с листериозом человека и животных.

С целью профилактики листериоза необходимо соблюдать следующие правила: комплектование поголовья проводить за счет хозяйств благополучных по листериозу; карантинировать всех поступающих на комплектование хозяйства животных в течение 30 дней, содержать их изолированно от остальных, проводить периодические осмотры при необходимости с измерением температуры тела и проводить бактериологические и серологические исследования на листериоз. В хозяйстве должна проводиться постоянная работа по выявлению и уничтожению грызунов, которых желательно периодически исследовать на наличие возбудителя листериоза. Постоянно контролировать качество кормов и при необходимости проводить их лабораторное исследование. В случае заболевания или гибели животных направлять соответствующие материалы для лабораторного исследования.

Оздоровление неблагополучных хозяйств

Хозяйство объявляют неблагополучным и вводят ограничения – запрещается вывоз животных, за исключением вывоза на убой; вывоз мяса от вынужденно убитых больных листериозом животных в сыром виде, за исключением его вывоза для переработки на мясокомбинаты; вывоз кормов, имевших контакт с больными животными или подозрительных на инфицирование листериями. При обнаружении в хозяйстве больных листериозом животных ветеринарный специалист, обслуживающий хозяйство обязан немедленно сообщить вышестоящим ветеринарным и медико-санитарным

органам, не дожидаясь их решения проводить тщательный эпизоотологический анализ обстановки, исследовать поголовье, больных и подозрительных по заболеванию животных изолировать от остального стада, для уточнения диагноза взять пробы патологического материала и направить их для исследования в лабораторию, организовать проведение тщательной уборки, удаление навоза и складирование его для дальнейшего обеззараживания, инфекции, после уточнения диагноза больных животных направляют на санитарный убой на мясоперерабатывающие предприятия, молоко от серопозитивных животных – кипятят или перерабатывают на топленое масло. Корма, подозрительные в контаминации листериями тщательно исследуют на наличие грызунов, при обнаружении последних проводят дератизацию.

Хозяйство объявляют благополучным по листериозу через два месяца после последнего случая выделения клинически больных животных и проведения заключительной дезинфекции помещений и территории фермы. В связи с тем, что листериоз относится к категории зооантропонозов при проведении противолистерийных мероприятий работникам хозяйства необходимо соблюдать меры санитарной безопасности.

ЧАСТЬ VIII

ЛИСТЕРИОЗ У ЛЮДЕЙ

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о том, что в настоящее время отсутствует единое мнение о патоморфогенезе и клинических формах листериоза. В значительной степени это связано с многообразием клинических проявлений листериоза, которые зависят от пути проникновения микроба в организм человека, реакции иммунной системы и целого ряда других сопутствующих факторов (возраст, пол, онкологические заболевания, диабет, СПИД, алкогольный цирроз, нефрит, сердечная недостаточность и т.д.).

КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ЛИСТЕРИОЗА У ЛЮДЕЙ

Главным недостатком существующих клинических классификаций листериоза является разграничение заболевания на местные и общие формы, которое имеет искусственный характер и несколько условно, так как местные изменения нередко приводят к общему заболеванию, а общее заболевание может сопровождаться преимущественным поражением тех или иных внутренних органов. По одной из наиболее распространенных классификаций принято выделять листериоз беременных, листериоз новорожденных и клинические формы в зависимости от ведущего клинического синдрома (Ryser E. T., Marth E. H., 1999). При этом разные авторы, несмотря на одинаковую симптоматику проявления болезни, предлагают различные названия клинических форм. Так, Seeliger H. P. R. (1961) различает ангинозно-септическую с мононуклеозом, окуло-глангулярную и септико-тифозную формы, листериоз центральной нервной системы, септико-грануломатозную у плодов, новорожденных и матерей и глазо-железистую формы. По мнению Сахарова П. П. и Гудковой Е. И. (1959) проявления листериоза имеют че-

тыре формы: ангинозно-септическую, нервную, септико-гранулематозную у плодов и новорожденных, глазо-железистую. Н. И. Морозкин (1962) выделяет висцеральную (тифоподобную), железистую, ангинозно-железистую и глазо-железистую формы, нервные формы – менингиальную и менингоэнцефалическую, а также смешанные формы – сочетание указанных форм. Септическая форма, выделяемая в отдельных сообщениях (Л. П. Ускова, 1962), в других именуется септико-гранулематозной, септико-тифозной или септицемией, а некоторыми авторами отдельно описывается тифоподобная форма (Т. М. Зубик и др., 1991). Помимо перечисленных форм, существуют и другие типы клинического проявления листериоза: бактериальный эндокардит, уретрит у мужчин, первичная атипичная пневмония, изолированные абсцессы (Nichols W., Gagliardi C. A., 1964), листериозный психоз (А. Н. Тимофеева и др., 1953), бессимптомное течение болезни и т.п.

Учитывая достоинства и недостатки предлагаемых клинко-анатомических классификаций листериоза, И. С. Тартаковским с сотр., (2002) разработана новая клинко-патогенетическая классификация, построенная не на клинических и патоморфологических признаках заболевания, а на основе уже известных механизмов патогенеза болезни. По мнению разработчиков в клинике листериоза целесообразно выделять следующие формы:

I. ПЕРВИЧНО-ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ:

- конъюнктивит, кератит, кератоконъюнктивит;
- дерматит, подкожные абсцессы;
- уретрит, вагинит, проктит;
- стоматит, тонзиллит, паротит.

II. ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ:

- гастроинтестинальная форма;
- септическая форма;
- листериозный менингит, менингоэнцефалит, абсцесс мозга;
- редкие формы (эндокардит, пиелит, перитонит, абсцессы печени и селезенки, пневмонии, плеврит, остеомиелит, артрит и др.).

III. ЛИСТЕРИОЗНОЕ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЬСТВО:

- острое;
- хроническое;
- транзиторное.

В настоящее время эта классификация в основном отражает совокупность накопленных о листериозе у человека данных. Но следует учитывать, что, несмотря на более чем столетнюю историю знакомства человека с листериозом, в РФ в целом, и в частности в Москве официальная регистрация листериоза начата лишь с 1992 г и поэтому анализ клиники болезни в нашей стране нередко проводился на основе наблюдений, не подтвержденных бактериологи-

чески или подтвержденных не стандартизованными методами. Кроме того, постановка диагноза листериоза по клинико-эпидемиологическим и эпизоотологическим данным из-за полиморфизма клинических проявлений и невозможности, в ряде случаев, установить источник инфекции также вызывает определенные трудности. Указанные обстоятельства и данные литературы о листериозе среди людей в различных странах мира могут свидетельствовать о достаточно широком распространении этой болезни в РФ и о том, что регистрируемая заболеваемость значительно меньше истинной. Таким образом, по мере улучшения диагностики и накопления новых данных о патогенезе листериоза представленная клинико-патогенетическая классификация может претерпеть некоторые изменения.

Систематизация листериоза по течению болезни также не однозначна. В одних источниках различают сверхострое (вплоть до тяжелого злокачественного распространения инфекции у новорожденных), острое, подострое, хроническое, субклиническое, абортное или инапаратное течение болезни, в других – только острую, подострую и хроническую формы листериоза (И. А. Бакулов, 1967; В. И. Покровский и др., 1996; А. Г. Рахманова и др., 1999; И. С. Тартаковский с сотр., 2002).

Длительность инкубационного периода при листериозе у людей колеблется в широких пределах – от 1 – 2 дней, и даже 9 часов, до 1,5 – 2,5 месяцев. Наиболее короткий инкубационный период характерен для гастроинтестинального листериоза и зависит от величины заражающей дозы и индивидуальных особенностей макроорганизма (сопутствующие заболевания инфекционной и не инфекционной этиологии, иммунодефицитные состояния и др.). Так, во время эпидемии в Италии среди взрослых прежде здоровых людей период от употребления зараженной пищи (салат с рисом) до появления первых признаков гастроэнтерита составил в среднем 18 часов, а во время эпидемической вспышки листериоза в Лос-Анжелесе в 1985 году (употребление контаминированного мягкого мексиканского сыра) варьировал от 11 до 70 дней, в среднем составляя 31 день (Linnan M. J. et al., 1988). При определении продолжительности инкубационного периода следует учитывать и тот факт, что нередко встречаются случаи листериозного бактерионосительства и в ряде случаев может наблюдаться активизация скрытой инфекции.

С момента официального открытия листерий в качестве инфекционного агента в 1926 году и до начала 80-х годов большинство случаев выявления первично-локализованных форм листериоза в виде поражений кожи, слизистых, конъюнктивы регистрировалось у лиц, профессионально связанных с животноводством (работники скотобоен, фермеры-животноводы, доярки, ветеринарные специалисты) или работающих с животными (цирки, зоопарки, ви-

вариант), и поэтому на основе преимущественной заболеваемости большее внимание уделялось контактно-бытовому и аэрогенному механизмам передачи.

В литературе имеются сообщения о заражении ветеринарных работников при гинекологических исследованиях животных, родовспоможении, и прямом контакте с больными животными, у сотрудников лабораторий при работе с патогенными культурами и у лиц в быту контактировавших с различными видами животных. Donker-Voet J. (1965) пишет, что у ветеринарных работников, лечивших гинекологические заболевания у коров, отмечали листериозные поражения кожи рук. При этом из материала проб кожи рук и из плодов коров были выделены культуры листерий одного и того же серотипа. Описан кожный листериоз, протекающий в виде фурункулеза и папулезной экзантемы у ветеринарных работников после гинекологических исследований животных. В. А. Постовит и Т. Т. Черная (1952) приводят случай заболевания фолликулярной ангиной листериозной этиологии в результате попадания крови в рот при взятии ее пипеткой из уха кролика. В. В. Шмелевой (1953) описаны три случая глазо-железистой формы листериоза, связанные с заражением от животных: в одном случае – контакт с кошкой, перенесшей заболевание не выясненной этиологии; в другом – работа с нутриями и крупным рогатым скотом на студенческой практике; в третьем – заражением в результате контакта с собаками и кошками. Н. А. Плетнева и В. Н. Стикова (1950) обнаружили данную форму болезни у 8 детей и одного взрослого. Помимо глазо-железистой формы, В. М. Чередниченко (1962) зарегистрировал также эндогенные воспалительные поражения сосудистого тракта глаза при листериозе у людей. Листерии способны вызывать длительно протекающие воспалительные процессы слизистых оболочек мочепоолового аппарата. Это обстоятельство является причиной заражения людей половым путем. Toaff R. и Krochik N. (1962) обследовали мужей 60 женщин, которые имели неоднократные выкидыши. В трех случаях было установлено заболевание листериозом. Листерии при этом выделяли из секрета шейки матки и из спермы мужчин. Полученные культуры оказались одного и того же серотипа. У мужчин выявили хроническую инфекцию придатков семенников, в одном случае листерии локализовались в тестикулах. Было установлено, что листериоз может поражать половые органы внешне здоровых мужчин и нарушать их воспроизводительную способность.

Первично-локализованные формы листериоза в виде дерматитов и конъюнктивитов нередко регистрируются у новорожденных в случаях инфицирования во время родов, а также в процессе ухода за кожей и слизистыми, но чаще специфические конъюнктивиты встречаются в сочетании с другими проявлениями септической формы или листериозного менингита.

Листериозный конъюнктивит (глазо-железистая форма) может развиваться в результате попадания в глаз инфицированного материала либо являться одним из симптомов генерализованной формы болезни. В первом случае поражение бывает односторонним, проявляется гиперемией и отеком конъюнктивы. При осмотре глаз обнаруживается инфильтрация переходной складки и слизистой оболочки слезного мешка, наличие множественных и различной величины васкуляризованных фолликулов на измененной переходной складке и частично даже на конъюнктиве глаза. Отдельные фолликулы могут иметь грибовидную форму и достигать 3 мм в диаметре. По данным отдельных исследователей фолликулы представляют собой листериозные гранулемы. Поражение конъюнктив сопровождается отечностью и уплотнением век, сужением глазной щели, гнойным отделяемым, увеличением и болезненностью околоушного, а нередко подчелюстного и затылочного лимфоузлов на пораженной стороне. Для листериозных конъюнктивитов характерно длительное течение с возможными рецидивами.

Листериозные кератиты и кератоконъюнктивиты протекают более неблагоприятно. Им свойственно образование язвенных дефектов, рубцовых изменений. Заболевание может осложниться эндофтальмитом и в большинстве случаев значительно страдает зрительная функция. У Felsenfeld O. (1951) описан случай конъюнктивита у 2 служащих птицефермы, где среди птицы была листериозная инфекция. Поражение носило характер фолликулярного и гипертрофического конъюнктивита, а у одной из больных заболевание перешло с правого глаза на левый, где образовалась плоская язвочка без выраженной границы.

Листериозный дерматит обычно ограничивается зоной непосредственного контакта с инфицированным биоматериалом и часто носит неспецифический характер. У ветеринарных специалистов, отделявших плаценту больных животных, поражается кожа кистей и предплечий, у новорожденных наблюдаются мацерация кожи в областях, подвергающихся наибольшему сдавливанию во время родов. В типичных случаях листериозного дерматита в зонах контакта с инфицированным материалом отмечаются краснота и отечность кожи, больные ощущают жжение, покалывание, иногда боли, реже зуд. В дальнейшем у части больных появляются мелкие везикулезные элементы, которые при подсыхании покрываются корочками или могут сливаться, образуя фликтены с нагнаивающимся содержимым, окруженные гиперемизованным валиком. Если фликтены сливаются, в последующем участок пораженной кожи покрывается толстыми желто-зелеными корками, характерными для пиодермии. Регионарные лимфоузлы нередко припухают и становятся болезненными. Листериозный дерматит у новорожденных следует отличать от элементов распространенной макуло-папулезной

сыпи, являющихся вторичным проявлением листериозного сепсиса и представляющих собой специфические гранулемы.

У взрослых течение дерматита, как правило, благоприятное. В отдельных случаях образуются пустулезные элементы, и заболевание может осложняться образованием подкожных абсцессов, что чаще наблюдается на фоне значительной иммунной недостаточности.

Листериозные уретриты и вагиниты могут сопровождаться чувством жжения, чрезмерным слизисто-гнойным отделяемым, дизурическими явлениями, что особенно характерно для сочетанного течения листериоза с трихомониазом, гарднереллезом, кандидозом. Однако в большинстве случаев листериоз такой локализации протекает бессимптомно, что при современном уровне диагностики не позволяет выделить его в самостоятельную форму болезни. Существует мнение, что беременность может активизировать скрытое течение локального листериоза уретры и влагалища, который в этот период склонен распространяться в восходящем направлении с вовлечением в процесс оболочек плодного пузыря, а возможно и плода.

Листериозный проктит является довольно редкой формой первично-локализованного листериоза. Описан случай внутрибольничного заражения новорожденных вследствие применения ректальных термометров без достаточной их обработки и передачи листериоза ВИЧ-инфицированному при гомосексуальной связи с развитием анального воспаления специфической природы.

Первично-локализованный листериоз слизистых оболочек полости рта регистрируется достаточно редко, главным образом вследствие благоприятного течения и случайного характера бактериологических исследований. Ряд исследователей локальные поражения слизистой оболочки полости рта рассценивают как начальные проявления последующего генерализованного листериоза. В тех же случаях, когда процесс был местно ограничен, чаще всего регистрировались тонзиллиты. Заболевания начиналось остро с недомогания, ознобов, повышения температуры до 39 – 40 °С, болей в горле. При фарингоскопии отмечаются отек нёбных дужек, увеличение миндалин, на поверхности последних, а также на прилегающих слизистых возможны различные изменения - от катаральных до язвенно-некротических. Регионарные лимфатические узлы увеличены и болезненны. Процесс выздоровления нередко затягивается. Лихорадочный период обычно длится 5-7 дней. Типичные катаральные и фолликулярные ангины листериозной этиологии описаны в работах Е. И. Гудковой с соавт. (П. П. Сахаров, Е. И. Гудкова, 1959), когда были выделены в посевах из миндалин заболевших чистые культуры *L. monocytogenes*. Клинически заболевания имели особенности катаральной, фолликулярной и лакунарной ангины. Длительность катаральной и фолликулярной ангин не

превышала 5-6 дней, а при катаральной форме чаще ограничивалась 3-4 днями. Температура не поднималась выше 38,5 °С. Моноцитоз не был выражен. Изменения в зеве напоминали изменения зева при стрептококковой ангине.

Заболевание человека листериозом в гастро-интестинальной форме является, как правило, результатом проникновения возбудителя в организм через желудочно-кишечный тракт. Об опасности пищевого пути передачи листерий широко начали говорить вначале 80-х годов прошлого столетия, когда было установлено, что причиной эпидемии в приморских провинциях Канады послужило употребление салата из капусты, инфицированной *L.monocytogenes* (Schlech W. F., et al., 1983). После этого эпидемические вспышки листериоза с пищевым путем передачи были зарегистрированы в США, Швейцарии, Великобритании, Франции, Италии, Финляндии и др. Анализ заболеваемости во время этих эпидемий показал, что попадание листерий в организм с инфицированной пищей в случае полноценной функции желудка может не вызвать болезни, так как при нормальной кислотности желудочного сока возбудитель не попадает в другие отделы кишечника и, соответственно, инфекционный процесс не развивается. В группу риска, таким образом, могут быть отнесены лица с нарушенной функцией желудка, принимающие антациды, перенесшие резекцию желудка. Преодолев желудочный барьер, *L.monocytogenes* попадает в тонкий кишечник, где слабощелочная или нейтральная среда химуса благоприятствует их выживанию. Через эндотелиальные клетки листерии проникают в стенку тонкой кишки, после чего начинается процесс «интернализации» — проникновение патогена в макрофаги. В случаях, когда локальные (Пейеровы бляшки и солитарные фолликулы) и региональные (регионарные лимфоузлы) механизмы защиты организма не могут предотвратить агрессию листерий, они попадают в кровоток и диссеминируют в разные органы, вызывая патологический процесс с клиническими проявлениями, характерными для поражения соответствующего органа. Поражение желудочно-кишечного тракта может быть как единственным проявлением болезни, так и явиться предвестником последующего развития генерализованных форм с развитием сепсиса, листериозного менингита, менингоэнцефалита и др.

Для гастроинтестинального листериоза («висцеральная форма») характерны начальные проявления, связанные с приемом инфицированной пищи: быстрое повышение температуры тела, выраженная диарея и лихорадка. Инкубационный период при этой форме листериоза колеблется от 9 часов до 7-10 дней и более (Linnan M. J. et al., 1988), что зависит от величины заражающей дозы и индивидуальных особенностей макроорганизма. Начало заболевания острое, иногда внезапное с симптомами общей интоксикации: повышение температуры тела до 39-40 °С сопровождающееся вы-

раженным ознобом, головная и мышечные боли. Лихорадка при этом чаще бывает неправильная, ремитирующего типа. Тошнота, мучительная, чаще не обильная, рвота появляются спустя 1-2 часа. Затем появляются боли в животе схваткообразного характера, частый жидкий стул, который обычно сохраняет каловый характер, содержит примесь слизи, а иногда и крови. Примером гастро-интестинальной формы может служить эпидемия в Италии среди взрослых практически здоровых лиц, где более чем у 70% основными симптомами были выраженная диарея и лихорадка.

Вместе с тем более яркие начальные гастро-интестинальные проявления листериоза, связанные. Летальность гастро-интестинальной формы листериоза высока и, по средним данным эпидемий последнего десятилетия, составляет 20%. В значительной степени такая летальность обусловлена переходом заболевания в септическую форму, поражением ЦНС, что особенно часто имеет место в группах риска – у беременных, новорожденных, престарелых, онкобольных, лиц с иммунодефицитами и т.д.

Среди генерализованных форм, по-видимому, встречается часто, хотя определение его удельного веса затруднительно в связи с относительно высокой частотой «здорового» бактерионосительства, нередкого сочетания листериоза с другими заболеваниями, в том числе острыми кишечными инфекциями. Вместе с тем наиболее крупные эпидемии листериоза были вызваны употреблением инфицированных пищевых продуктов и сопровождались гастроинтестинальными проявлениями, которые в части случаев в группах риска приводили к развитию сепсиса, поражению ЦНС и другим вариантам генерализованного листериоза. Примером может служить эпидемия листериоза во Франции в 1992 г., вызванная употреблением в пищу инфицированного листериями свиного языка в желе, когда среди 279 заболевших не было беременных и новорожденных, во всех случаях отмечались гастроинтестинальные симптомы и при этом 85 человек умерли.

Объективно отмечается гиперемия лица, инъекция сосудов склер. Язык, как правило, обложен густым налетом, в ряде случаев ярко выражена гиперемия мягкого нёба. Живот обычно вздут, отмечается равномерная болезненность во всех отделах, в типичных случаях наиболее выраженная в илеоцекальной области. Со стороны сердечно-сосудистой системы отмечаются приглушенность тонов сердца, значительная тахикардия, первоначальный подъем артериального давления, особенно у пожилых лиц, быстро сменяется гипотонией. Мочевыделение у больных снижается, моча приобретает интенсивную желто-коричневую окраску. Вместе с тем симптомы обезвоживания выражены слабо, и в клинической картине доминирует интоксикация. Уже на ранних этапах болезни нередко наблюдается головокружение, повторные коллапсы, в дальнейшем возможно развитие инфекционно-

токсического шока. Лихорадка сохраняется даже при благоприятном течении не менее 5 – 7 дней, температурная кривая носит ремиттирующий характер и обрывается коротким лизисом.

Если листериоз начинается менее остро, что обычно сочетается с продолжительным инкубационным периодом, тяжесть заболевания нарастает постепенно, местные проявления также менее демонстративны. Характерен непродолжительный продромальный период в виде недомогания, головной боли, познабливания, слабости, тошноты. Однако и в этих случаях температура в течение 1-2 дней достигает высоких значений, отмечаются головная боль, ознобы, миалгия головокружения. Рвота может отсутствовать, живот длительное время остается вздутым, при пальпации болезненным, стул становится жидким и частым на 2-3-й день болезни. Температурная кривая при подостром развитии и благоприятных исходах может напоминать трапецию, однако ее восходящая и нисходящая части более круты по сравнению с аналогичной кривой при классическом течении брюшного тифа.

Продолжительный лихорадочный период является отличительной особенностью листериозных гастроэнтеритов, особенно в США и странах Западной Европы, где крайне редко регистрируются тифопаратифозные и паразитарные заболевания, характеризующиеся столь же продолжительной гипертермией. Лихорадка в известной мере объясняется бактериемией (листериемией), которая обнаруживалась даже при однократных, чаще запоздалых, исследованиях более чем у 10 % больных данной формой. Варианты с постепенным началом заболевания близки по клиническим проявлениям брюшному тифу и паратифам, что, вероятно, давало основание отдельным авторам на более ранних этапах изучения выделять тифоподобное течение (в других описаниях – септико-тифоидная форма).

Септическая форма листериоза может развиваться и без предшествующей симптоматики со стороны желудочно-кишечного тракта или при ее минимальной выраженности, выявляемой лишь при целенаправленном сборе анамнеза, что типично для новорожденных и беременных. Однако даже в тех случаях, когда в начальном периоде острого листериозного сепсиса имеют место гастро-интестинальные симптомы, они отступают на второй план, что и позволяет рассматривать эти формы как самостоятельные. Развитие сепсиса после первоначально диагностированной гастро-интестинальной формы обычно происходит на фоне стихания симптоматики со стороны желудочно-кишечного тракта, снижения температуры тела вплоть до нормальных значений, улучшения общего состояния. Такой светлый промежуток может быть кратковременным и на температурной кривой выражаться лишь небольшим «врезом», но нередко кажущееся выздоровление продолжается 5-7 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первое издание книги «Листерии и листериоз» (2008) написано коллективом авторов под научным руководством академика РАСХН, профессора, доктора ветеринарных наук И. А. Бакулова, в составе Д. А. Васильева – доктора биологических наук, профессора, Д. В. Колбасова – доктора ветеринарных наук, Т. И. Кольпиковой – кандидата ветеринарных наук, Ю. О. Селянинова – доктора биологических наук, И. Ю. Егоровой – кандидата биологических наук. Упомянутым коллективом проделана большая работа по систематизации результатов своих исследований о листериозе за период с 1967 года.

При подготовке второго издания произошли изменения в авторском коллективе. В 2010 году умер академик РАСХН, Герой социалистического труда, лауреат Государственной премии, профессор, доктор ветеринарных наук И. А. Бакулов. Вместо Т. И. Кольпиковой – специалиста в области листериозных бактериофагов – в состав авторов вошла Е. Н. Ковалева – кандидат биологических наук, бактериофаголог. И. Ю. Егорова защитила докторскую диссертацию на тему «Листерии в фауне Центрального региона России (распространение, биологические и филогенетические особенности)».

Материалы по листериям и листериозу представленные авторами в первом и втором изданиях являются в первую очередь результатами научно-исследовательской деятельности, проведенной учениками научной школы И. А. Бакулова за более чем полувековой период работы в области листериозной инфекции. Дополнительно дан анализ большому числу отечественных и зарубежных статей по указанной проблеме. Проводимая параллельно научно-исследовательская работа по изучению листерий, разработке новейших методов диагностики, профилактики и лечения листериоза позволила использовать накопленный собственный опыт при написании книги.

Нам представляется, что ее материалы будут использованы в практической деятельности специалистов бактериологов, ветеринарных и медицинских исследователей, а также для определенного круга биологов,

занимающихся проблемами бактериологии, экологии, эпизоотологии и эпидемиологии. Материалы книги могут быть использованы для более глубокого изучения вопросов, связанных с листериозом.

Замечания и предложения о материалах, изложенных в данном издании, просим направлять по адресу dav_ul@mail.ru

Д. А. Васильев

*д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

УКАЗАТЕЛЬ ТАБЛИЦ

Табл. 1.1. Междовая дифференциация листерий.	22
Табл. 1.2. Внутривидовая дифференциация рода <i>Listeria</i> (Д. А. Васильев, 1991).	31
Табл. 1.3. Устойчивость возбудителя листериоза во внешней среде.	43
Табл. 1.4. Неселективные питательные среды для выделения бактерий рода <i>Listeria</i>	56
Табл. 1.5. Селективные питательные среды для выделения и идентификации бактерий рода <i>Listeria</i>	56
Табл. 1.6. Контроли, необходимые при постановке НМФА и НМПА.	73
Табл. 2.1. Антигенная структура и типовая принадлежность <i>L.monocytogenes</i> (J. S. Paterson).	80
Табл. 2.2. Уточненная схема антигенов <i>L.monocytogenes</i> (H. P. R. Seeliger, G. Linzenmeier).	80
Табл. 2.3. Деление 4-го серотипа на подтипы (J. Donker-Voet).	80
Табл. 2.4. Антигенная структура листерий (J. S. Paterson, модифицированная и расширенная H. P. R. Seeliger, J. Donker-Voet) (Д. А. Васильев, 1994).	81
Табл. 2.5. Схема проведения адсорбции сывороток.	82
Табл. 2.6. Результаты исследования овец неблагополучных и благополучных по листериозу хозяйств с помощью реакции агглютинации.	89
Табл. 2.7. Титрование гемолитической сыворотки.	97
Табл. 2.8. Титрование комплимента в гемолитической системе.	98
Табл. 2.9. Титрование в бактериолитической системе.	99
Табл. 2.10. Матрица оценки результатов РНГА.	108
Табл. 2.11. Значения титров антител суммарной активности и 7S-антител.	108
Табл. 2.12. Результаты перекрестной РА между группоспецифическими сыворотками кролика и антигенами.	112
Табл. 3.1. Индуцированная продукция бактериофагов у листериозных культур (Капырина Н. А., 1973)	120
Табл. 3.2. Результаты обработки данных электронно-микроскопического исследования семи листериозных бактериофагов (Капырина Н. А., 1973).	126
Табл. 3.3. Проверка специфичности действия листериозных бактериофагов (Капырина Н. А., 1973)	130

Табл. 3.4. Чувствительность листериозных культур с фагам (Капырина Н. А., 1973)	132
Табл. 3.5. Связь между серотипом и фаговым типом штаммов (Ralovich B., 1984).	139
Табл. 3.6. Соотношение типизируемых и нетипизируемых штаммов листерий в двух странах (Ralovich B., 1984).	140
Табл. 4.1. Регистрация случаев заболевания листериозом сельскохозяйственных и домашних животных в различных странах земного шара по данным Всемирной организации здравоохранения с 1957 по 1963 гг. (Animall health year-book. Fao-Who-Ole).	161
Табл. 4.2. Эпизоотологические данные по листериозу за 2003 год.	162
Табл. 4.3. Результаты бактериологического исследования на листериоз материала от млекопитающих и членистоногих.	166
Табл. 4.4. Заболеваемость листериозом сельскохозяйственных животных в СССР с 1956 по 1964 гг. (количество больных животных на 10 тыс. голов).	186
Табл. 4.5. Смертность сельскохозяйственных животных от листериоза в СССР с 1956 по 1964 гг. (количество больных животных на 10 тыс. голов).	186
Табл. 4.6. Смертность сельскохозяйственных животных от листериоза в СССР с 1956 по 1964 гг. (в %).	186
Табл. 4.7. Результаты бактериологического исследования мышей, павших от экспериментального листериоза.	188

ЛИТЕРАТУРА

1. *Listeria monocytogenes*: опасный патоген, который нашел применение как вектор для нового поколения вакцин / М.В. Ткачук, Ф.О. Яровинский, А.Г. Тоневицкий // Вопросы мед. химии. – 2000. – №3. – С. 5-9.
2. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс. – М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
3. Алимов, М.А. ПЦР-анализ контаминированности продуктов и кормов *Listeria monocitogenes* / М.А. Алимов // Генодиагностика инфекционных заболеваний: IV-я Всероссийская науч.-практич. конф., Москва, 22 – 24 октября 2002 г.: сб. тезисов. – М., 2002. – С. 315.
4. Анализ антигенов листерий иммунохимическими методами / Н.М. Александрова [и др.] // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных, Ульяновск, 21 – 23 июня 2006 г.: материалы Междунар. науч. конф., Ульяновская ГСХА. – Ульяновск, 2006. – С.22-25.
5. Анализ деятельности центров Госсанэпиднадзора РФ по лабораторной диагностике листериоза / МЗ РФ. – М., 2000. – 13 с.
6. Бакулов, И.А. Биологические свойства компонентов листериозной клетки / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, В.М. Котляров, В.Е. Белоусов // Ветеринария, 1988, №4. – С 26-29.
7. Бакулов, И.А. Биологический контроль пищевых продуктов на наличие листерий: Методическое пособие / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев // Ульяновск, 1999. – 36 с.
8. Бакулов, И.А. Биохимический экспресс-метод дифференциации бактерий вида *L.monocytogenes* / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, А.А. Цыганова, В.М. Котляров // Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве на современном этапе: Тезисы докладов, МВА им. К.И. Скрябина. – М., 1999. – С. 77.
9. Бакулов, И.А. Выделение мембран и рибосом из клеток листерий вирулентного штамма / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, В.Е. Белоусов, А.А. Цыганова, Н.Б. Бакалдина, Г.В. Архипова // Ветеринария, 1988, №12. – С 35-38.
10. Бакулов, И.А. Изучение химического состава структурных компонентов листериозной клетки / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.А. Васильев, А.А. Цыганова // Ветеринария, 1984, №7. – С 27-30.
11. Бакулов, И.А. К вопросу таксономии рода *Listeria* / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.А. Васильев, А.А. Цыганова // Ветеринария, 1983, №7 – С. 31-35.
12. Бакулов, И.А. Листериоз животных в 2003 году XXI столетия / И.А. Бакулов // Болезни диких животных: труды Междунар. науч.-практ. конф., ВНИИВВиМ. – Покров, 2003. – С. 106-108.
13. Бакулов, И.А. Листериоз за рубежом (по материалам иностранной печати и сборника ISOPOL XV) / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.В. Колбасов // Сибирская язва и другие опасные инфекционные болезни животных: материалы по теме работы круглого стола приуроченного к 80-летию академика РАСХН Бакулова И.А., ВНИИВВиМ. – Покров, 2005. – С. 31-34.
14. Бакулов, И.А. Листериоз как пищевая инфекция и современные методы лабораторной диагностики / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Т.Е. Фирсова, Т.И. Кольпикова, С.С. Чевелева // Болезни диких животных: Труды Междунар. науч.-практ. конф., ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров, 2004. – С. 102-106.
15. Бакулов, И.А. Листериоз как пищевая инфекция. Монография / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев. – Ульяновск, 1991. – 78 с.
16. Бакулов, И.А. Листериоз на рубеже тысячелетий / И.А. Бакулов // Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – 262 с.
17. Бакулов, И.А. О серологической диагностике листериоза / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.А.

- Васильев, В.Е. Белоусов // Ветеринария, 1988, №10. – С 64-65.
18. Бакулов, И.А. Основные вехи истории изучения листериоза животных и людей / И.А. Бакулов // Листериоз на рубеже тысячелетий: материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 43-48.
 19. Бакулов, И.А. Перспективы создания компонентов вакцины против листериоза / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.А. Васильев, С.Ф. Чевелёв, В.Е. Белоусов // Проблемы ветеринарной иммунологии. – М., Агропромиздат, 1985. – С 72-73.
 20. Бакулов, И.А. Пищевой листериоз – новое проявление известной болезни / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1995, №2. – С. 69-72.
 21. Бакулов, И.А. Получение фракций цитоплазмы и клеточных стенок / И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.А. Васильев // Ветеринария, 1981, №3. – С 34-36.
 22. Бакулов, И.А. Современные проблемы сибирской язвы и листериоза - зооантропонозных болезней бактериальной этиологии / И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Труды Междунар. науч. - практ. конф., посвященной 45-летию института, 24-26 сентября 2003 г., ГНУ ВНИИВВиМ. – Ч. 1. – С. 22-26.
 23. Беленева, И.А. Условно-патогенные бактерии, обнаруживаемые в культивируемых мидиях/ И.А. Беленева, Э.Ф. Масленикова // Микробиология. – 2002. - №2. – С. 81-82.
 24. Беспалова, И.А. Электронно-микроскопическое изучение развития вирусов бактерий в клетке-хозяине / И.А. Беспалова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1967. – 22 с.
 25. Бузолева, Л.С. Влияние температуры культивирования на содержание нуклеиновых кислот у бактерий *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* / Л.С. Бузолева, Т.И. Бурцева, Г.П. Сомов // ЖМЭИ. – 2000. - №. 6. – С. 22-25.
 26. Бузолева, Л.С. Влияние газообразных метаболитов почвенных бактерий на размножение *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* / Л.С. Бузолева, М.Л. Сидоренко // ЖМЭИ. – 2005. - №2. – С. 7-11.
 27. Бузолева, Л.С. Влияние температуры на изменчивость *Listeria monocytogenes* при длительном обитании в проточных почвенных колонках / Л.С. Бузолева, Л.М. Исачкова, А.С. Исаченко // ЖМЭИ. – 2004. - №2. – С. 29-33.
 28. Васильев, Д.А. Бактериологическая характеристика вакцинных листериозных штаммов из Ульяновской области / Д.А. Васильев, А.А. Маничев, Б.И. Шморгун // Сб. научных трудов ВГНКИ, т.57. – М., 1995. – С. 158-166.
 29. Васильев, Д.А. Биохимический экспресс-метод дифференциации вакцинного и вирулентных штаммов листерий / Д.А. Васильев, И.А. Бакулов, А.А. Цыганова // Сб. Международного симпозиума по пищевым зоонозам. – М., 1995. – С. 104.
 30. Васильев, Д.А. Биохимический экспресс-метод дифференциации листерий / Д.А. Васильев, И.А. Бакулов, А.А. Цыганова // Сб. Международного симпозиума по пищевым зоонозам. – М., 1995. – С. 103.
 31. Васильев, Д.А. Использование ИФА для диагностики листериоза / Д.А. Васильев, П.И. Барышников // Ветеринария. – 1989, №1. – С. 60-62.
 32. Васильев, Д.А. Обработка пищевых продуктов для быстрого выделения листерий / Д.А. Васильев // Сб. Международного симпозиума по пищевым зоонозам. – М., 1995. – С. 63-64.
 33. Васильев, Д.А. Роль пищевых продуктов в распространении листериоза / Д.А. Васильев // Ветеринария. – 1992, №4. – С. 46-48.
 34. Васильев, Д.А. Селективные среды для выделения листерий из продуктов / Д.А. Васильев // Сб. Международного симпозиума по пищевым зоонозам. – М., 1995. – С. 103.
 35. Васильев, Д.А. Ускоренный метод выделения листерий из пищевых продуктов / Д.А. Васильев // Сб. Международного симпозиума по пищевым зоонозам. – М., 1995. – С. 100-103.
 36. Васильев, Д.А. Устойчивость листерий к физико-химическим факторам / Д.А. Васильев // Ветеринария. – 1992, №3. – С. 52-53.
 37. Галатюк, А.Е. Листериоз лошадей / А.Е. Галатюк, В.П. Онофрийчук // Вет. медицина Украины. – 2000, №1. – С. 20.
 38. Генодиагностика листериоза / Д.В. Колбасов, В.М. Котляров, Т.Т. Жаргалова, Т.Е. Фирсова // Генодиагностика инфекционных заболеваний. IV Всероссийская науч.-практич. конф., Москва, 22-24 октября 2002 г.: Сб. тезисов; под ред. В.И. Покровского. – М., 2002. – С. 339-340.
 39. Генотипирование хромосомной ДНК различных штаммов листерий с помощью ПЦР / Т.С. Чевелева, Л.Я. Цыбанова, В.М. Котляров, С.Ж. Цыбанов // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 84-86.
 40. Гены, кодирующие факторы инвазии у штаммов *Listeria monocytogenes*, изолированных в Европейской части и Дальневосточном регионе России / Е.А. Зайцева [и др.] // ЖМЭИ. – 2006. - №4. – С. 42-45.

41. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – 299 с.
42. ГОСТ Р 51921-2002 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*. Дата введения 2003-07-01. – М.: Госстандарт России, 2002. – 18 с.
43. Дмитриева, Е.Ю. Постоянный контроль за распространением листерий на производстве – основа выпуска безопасной рыбной продукции / Е.Ю. Дмитриева, Л.Б. Мухина // интернет-инф., 2004.
44. Ермолаева, С.А. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monogytogenes* под влиянием внешних условий / С.А. Ермолаева, Ю.Ф. Белый, И.С. Тартаковский // Молекул. ген., микроб. и вирусология. – 2000. - Н 1. – С. 17-20.
45. Ермолаева, С.А. Регуляция экспрессии факторов вирулентности у *Listeria monocytogenes* / С.А. Ермолаева, И.С. Тартаковский // ЖМЭИ. – 2001. - № 3. – С. 106-111.
46. Жаргалова, Т.Т. Идентификация патогенных листерий в рыбных продуктах / Т.Т. Жаргалова, В.М. Котляров // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: Материалы Международной научно-практической конференции 16-18 апреля 2002 г., ВНИИВВиМ. – Покров, 2002. – С. 257-258.
47. Жигалева, О.Н. Характеристика генома листериозных бактериофагов / О.Н. Жигалева, Д.В. Колбасов, В.А. Цыбанова, Т.И. Кольпикова // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. науч. конф. (21-23 июня 2006 г.), Ульяновская ГСХА. – Ульяновск, 2006. – С. 70-72.
48. Зайцева, Е.А. Микробиологическая характеристика *Listeria monocytogenes*, изолированных из различных источников в Приморском крае / Е.А. Зайцева, Г.П. Сомов // ЖМЭИ. – 2006. - №2. – С. 3-6.
49. Зубаиров, М.М. Скрининг антилистерийных химиотерапевтических соединений различных классов / М.М. Зубаиров, А.В. Киселев, Э.Л. Бударкова // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 138-139.
50. Зыкин, Л.Ф. Современные методы лабораторной диагностики листериоза / Л.Ф. Зыкин, Л.В. Савельева, И.А. Касьян // Ветеринария. – 1999. - № 10. – С. 8-10.
51. Идентификация экспериментальных инфекций листерий / И. Бордаров [и др.] // Вет. мед. – 1999. – Т.5, № 3-4. – С. 169-172.
52. Изоляция *Listeria monocytogenes* из различных объектов в Приморском крае и их биологические свойства / Е.А. Зайцева [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. - №1. – С. 47-49.
53. Использование методов диагностики листериоза в лабораторной практике / Т.Е. Фирсова, В.М. Котляров, S. Singh, Д.М. Соколов //Болезни диких животных: Труды Междунар. науч.- практ. конф., ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров, 2004. – С. 111-115.
54. Исследование листерий с помощью праймеров, комплементарных аста гену / Л.Я. Цыбанова, Д.В. Колбасов, В.М. Котляров, С.Ж. Цыбанов // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 86-88.
55. Капырина, Н.А. Изучение листериозного бактериофага и использование его для идентификации возбудителя болезни / Н.А. Капырина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Покров, 1973. – 22 с.
56. Карпова, Т.И. Размножение листерий в молочных продуктах / Т.И. Карпова, Н.М. Шустрова // ЖМЭИ. – 2001. - № 1. – С. 80-81.
57. Каттер Э. Бактериофаги : биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.
58. Книзе, А.В. Эпизоотическая ситуация по листериозу в странах мира и России / А.В. Книзе, А.И. Бузун // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 118-123.
59. Колбасов, Д.В. Выявление патогенных листерий в рыбной продукции / Д.В. Колбасов, В.А. Цыбанова, Т.Е. Фирсова // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. науч. конф. (21-23 июня 2006 г.), Ульяновская ГСХА. – Ульяновск, 2006. – С. 105-107.
60. Колбасов, Д.В. Генотипирование патогенных листерий, выделенных из рыбной продукции, методом RAPD-FINGERPRINT / Д.В. Колбасов, И.М. Калабеков, В.А. Цыбанова //Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. науч. конф. (21-23 июня 2006 г.), Ульяновская ГСХА. – Ульяновск, 2006. – С. 102-104.
61. Колбасов, Д.В. Характеристика листерий, выделенных из проб головного мозга енотовидной собаки / Д.В. Колбасов, И.М. Калабеков, Т.Е.Фирсова // Профилактика, диагностика и лечение

- инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. науч. конф. (21-23 июня 2006 г.), Ульяновская ГСХА. – Ульяновск, 2006. – С. 107-109.
62. Кольпикова, Т.И. Использование листериозных бактериофагов при диагностике и индикации листерий / Т.И. Кольпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 64-68.
 63. Кольпикова, Т.И. Использование реакции нарастания титра фага для обнаружения листериоза / Т.А. Кольпикова // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Покров, 1981. – 19 с.
 64. Кольпикова, Т.И. Фаготипирование листерий / Т.И. Кольпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Ветеринария. – 1990. – № 6. – С. 31 – 32.
 65. Контаминированность объектов ветеринарного надзора возбудителем листериоза / Н.М. Александрова [и др.] // Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний: материалы Междунар. симпозиума. Ч. II. – Казань, 2005. – С.9-13.
 66. Котляров, В.М. Обнаружение комплементсвязывающих антител при листериозе / В.М. Котляров, И.А. Бакулов, Л.В. Макеева // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 88-90.
 67. Котляров, В.М. Проблема листериоза на рубеже тысячелетий / В.М. Котляров // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 48-52.
 68. Крылова, М.Д. Фаготипы бактерий / М.Д. Крылова. – М., 1963.
 69. Лаврусенко, Г.П. Сравнительный анализ вторичных иммунодефицитов при листериозе и интоксикации диоксинами / Г.П. Лаврусенко, В.А. Желтов // Листериоз на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 93-97.
 70. Ларионова, О.С. Применение ПЦР для индикации *L.monocytogenes* в пищевых продуктах / О.С. Ларионова, Л.М. Ивашенцева // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Труды Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 45-летию института, 24-26 сентября 2003 г., ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров, 2003. – Ч.1. – С. 282-286.
 71. Лиманский, А.П. Идентификация гипервариабельных и консервативных фрагментов генома листерий / А.П. Лиманский // ЖМЭИ. – 2001. - № 5. – С. 62- 65.
 72. Листерии и листериоз / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов [и др.] // монография. – Ульяновск, УГСХА, 2008. – 168 с.
 73. Листериоз: методические рекомендации (№ 11) / Правительство Москвы. Комитет здравоохранения / Л.Г. Костомарова, А.П. Сельцовский; сост. Н.А. Малышев [и др.] – М., 2001. – 10с.
 74. Методические указания от 27.01.2002 г. № МУ 3.1.7.1104-02 «Эпидемиология и профилактика листериоза»: Утв. Гл. гос. сан. врачом РФ Г.Г.Онищенко 27 января 2002 г. Дата введения: 1 апреля 2002г. – М., 2002.
 75. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Порядок контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах: Метод. указания МУК 4.2. – М., 2001. – 23с.
 76. Мирзоева, Л.М. Профилактика листериоза в Норвегии / Л.М. Мирзоева // Рыбное хозяйство: сер. болезни гидробионтов в аквакультуре: Аналит. реф. информ. – 2000. – Вып. 3. – С. 29-30.
 77. Нечаев, А.Ю. Оценка эффективности выявления патогенных листерий в пищевых продуктах / А.Ю. Нечаев // Ветеринарный консультант. – 2006. - № 19. – С. 21- 22.
 78. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* / Т.И. Карпова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т.3, №3. – С. 22.
 79. Окраинные моря северо-западной части Тихого океана как среда обитания *Listeria monocytogenes* и эпидемиологическое значение этого явления / В.Е. Терехова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. - №1. – С. 43-46.
 80. Омарова, С.М. Комплекс отечественных сухих питательных сред и микротест-систем для диагностики листериоза / С.М. Омарова, Ш.М. Меджидов / Медицинская микробиология – 21 век: Материалы Всероссийской научно-практической конференции / под ред. В.В. Кутырева. – Саратов, 2004. – С. 168- 169.
 81. Омарова, С.М. Питательные среды для выделения и накопления листерий / С.М. Омарова, Ш.М. Меджидов, Э.М. Ахмедова // ЖМЭИ. – 2000. - № 1. – С. 45- 48.
 82. Особенности листериозного менингита / Е.П. Деконенко [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. - №5. – С. 47-49.
 83. Павленко, И.В. Разработка основных технологических процессов промышленного производства сухой вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных: Автореф. дис. канд. биол. наук / ВНИИТИБП. – Щелково, 2003. – 24 с.

84. Патогенетическая сущность листериоза / С.Ф. Чевелев, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Листериоз на рубеже тысячелетий: материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 116-118.
85. Пищевой листериоз: возбудители и способы подавления их роста, рекомендации для предприятий / Ю.Г. Костенко, Т.С. Шагова, К.С. Янковский, Т.С. Фофанова // Все о мясе. – 1999. – № 3. – С. 46-50.
86. Простой метод дифференциации *Listeria monocytogenes* от других видов листерий на основе реакции гидролиза лецитина / Т.И. Карпова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 10. – С. 24.
87. Профилактика инфекционных заболеваний. Эпидемиология и профилактика листериоза: метод. указания. МУ 3.1.7.-10104-02. – М., 2002. – 12с.
88. Пульс-электротипы культур *Listeria monocytogenes*, выделенных в Москве / Н.Я. Салова [и др.] // ЖМЭИ. – 2005. – №4. – С. 19-22.
89. Раутенштейн, Я.И. Лизогения культур *Bacillus cereus var. gallariae* и особенности содержащихся в них фагов / Я.И. Раутенштейн, Н.Г. Мисюрева, Л.С. Хачатрян // Микробиология. – 1964. – № 33 (6). – С. 1011 – 1018.
90. Родина, Л.В. Факторы и пути заражения листериозом населения Москвы / Л.В. Родина, Г.М. Маненкова, В.В. Тимошков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. – № 4. – С. 48- 50.
91. Родина, Л.В. Эпидемиологические проявления эпизоотического процесса листериоза в популяциях грызунов Москвы / Л.В. Родина, Г.М. Маненкова, В.В. Тимошков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. – №2. – С. 11-13.
92. Середа, А.Д. Иммуитет и защита при листериозе / А.Д. Середа, В.М. Котляров // Листериоз на рубеже тысячелетий: материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 52-61.
93. Середа, А.Д. Иммуитет при листериозе / А.Д. Середа, В.М. Котляров, И.А. Бакулов // ЖМЭИ. – 2000. – № 5. – С. 98-102.
94. Сидоренко, М.Л. Влияние летучих метаболитов сапрофитной микрофлоры почв на размножение патогенных бактерий / М.Л. Сидоренко, Л.С. Бузолева // ЖМЭИ. – 2004. – №3. – С. 18-23.
95. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т.2, №2. – С. 15-19.
96. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева. – М.: Медицина для всех, 2002. – 195 с.
97. Тартаковский, И.С. Факторы патогенности листерий и их роль в патогенезе и лабораторной диагностики листериоза / И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева // ЖМЭИ. – 2003. – №4. – С. 31-36.
98. Терехова, В.Е. Выделение и идентификация *Listeria monocytogenes* из различных видов рыб и морских гидробионтов / В.Е. Терехова, Е.А. Зайцева // Рыбохозяйственные исследования мирового океана: Труды Междунар. науч. конф. – Владивосток, 1999. – С. 54.
99. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., 1962. – 32 с.
100. Тимченко, Н.Ф. Взаимодействие *Yersinia*, *Listeria* и *Salmonella* с растительными клетками / Н.Ф. Тимченко, В.П. Булгаков, Е.В. Буллах // ЖМЭИ. – 2000. – № 1. – С. 6-10.
101. Типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиформизма генов факторов патогенности / Т.И. Карпова, Т.Е. Фирсова, Л.В. Родина, В.М. Котляров, И.С. Тартаковский, С.А. Ермолаева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – Т. 5, №3. – С. 251-258.
102. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: Наука, 1968 – С. 89.
103. ТУ 46-20-1457-83 Набор листериозных бактериофагов сухих для идентификации листерий и остановки реакции нарастания титра фага // ВНИИВВиМ. – Покров, 1984.
104. Усовершенствование метода получения антилистерийного фитц-коньюгата, используемого для обнаружения возбудителя листериоза / Б.В. Новиков, В.М. Котляров, С.С. Чевелева, Э.Л. Бударкова // Листериоз на рубеже тысячелетий: материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 76-78.
105. Фирсова, Т.Е. Листериоз диких животных / Т.Е. Фирсова // Болезни диких животных: труды Междунар. науч.- практ. конф., ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров, 2004. – С. 108-110.
106. Фирсова, Т.Е. Разработка и совершенствование экспресс-метода индикации листерий: автореф. дис. канд. вет. наук. – Щелково, 2005. – 22с.
107. Хассон, Аль-Асбахи Надия. Гетерогенность популяций *Listeria monocytogenes* по идентифика-

- ционным признакам в окружающей среде и рыбных продуктах: Автореф. дис. . канд. биол. наук / Санкт-Петербургский гос. ун-т. – Санкт-Петербург, 2003. – 17 с.
108. Цыбанов, С.Ж. Использование методов анализа генома для идентификации патогенных листерий / С.Ж. Цыбанов, В.М. Котляров // Листерия на рубеже тысячелетий: материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 83-84.
 109. Честнова, Т.В. Два случая листериоза, диагностированных в Тульской области / Т.В. Честнова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. - №2. – С.50-51.
 110. Честнова, Т.В. Логико-математические модели дифференциальной диагностики / Т.В. Честнова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. - №5. – С. 49-50.
 111. Шарма, Р.К. Совершенствование бактериологического анализа для индикации листерий в продуктах, импортируемых в Россию: Автореф. дис. . канд. вет. наук. – Покров, 1999. – 24 с.
 112. Шафикова, Н.Э. Термогенез культур листерий / Н.Э. Шафикова, А.М. Алимов // Ветеринария. – 2001. - № 11. – С. 22-23.
 113. Шлыгина, К.Н. Сравнительное изучение лабораторных методов диагностики листериоза / К.Н. Шлыгина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1970. – 21 с.
 114. Щеглова, М.К. Листерия фог и перспективы его использования / М.К. Щеглова // Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Саратов, 1969. – 23 с.
 115. Щеглова, М.К. Некоторые свойства листериозного бактериофага / М.К. Щеглова // ЖМЭИ. – 1962. – № 1.
 116. Щеглова, М.К. Фаготипы и серотипы листерий / М.К. Щеглова // Ветеринария. – 1968. – № 5.
 117. Экспресс- контроль продуктов для обнаружения листерий / Ж. Лемиус, О. Мурзак, В.М. Котляров, Т.И. Кольпикова, О.О. Грохалевич, Р. Шарма // Листерия на рубеже тысячелетий: Материалы междунар. симпозиума, ВНИИВВиМ. – Покров, 1999. – С. 73-76.
 118. Этиопатогенез, эколого-эпизоотологические и эпидемиологические характеристики листериоза животных и людей (диагностика болезни, индикация возбудителя, меры борьбы с инфекцией). Работа на соискание Гос. премии РФ в обл. науки и техники. / И.А. Бакулов, Т.И. Кольпикова, В.М. Котляров [и др.]. – М., 2001. – Т. 2. – 42 с.
 119. Эффект конститутивной активности генов патогенности у *Listeria monocytogenes* / Т.И. Карпова, Б.И. Маракуша, Т.П. Сапенко, И.С. Тартаковский, J.A. Vazquez-Boland, С.А. Ермолаева // ЖМЭИ. – 2005. - №3. – С. 3-8.
 120. A Gross-Sectional Study on the Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York Dairy Herds / L. Hassan [et al.] // J. Dairy Sci. – 2000. – V.83, N.11. – P. 2393-2720.
 121. A Multi-Centre Study on the Phage Typing of *Listeria monocytogenes* / J.Y. Rocourt [et al.] // Zbl. Bakt. Hyg. – 1985. – Vol. 259, N4. – P. 489-497.
 122. A nucleic acid sequence-based amplification system for detection of *Listeria monocytogenes* hlyA sequences / B.W. Blais, G. Turner, R. Sooknanan, L.T. Malek // Appl. Environment. Microbiol. – 1997. – Vol.63, N 1. – P. 310-313.
 123. Acha, P.N. Listeriose / P.N. Acha, B. Szyfres // Zoonoses et maladies transmissibles communes al homme et aux animaux; OIE. – Paris, 1989. – P. 98-105.
 124. Analysis of the Molecular Evolution of *Listeria monocytogenes* Isolated from Japanese Meats and Environment / F. Ueda [et al.] // Jpn. J. Infect. Dis. – 2005. – Vol.58. – P.320-322.
 125. Apostolos, S. Identification of OpuC as a Chill-Activated and Osmotically Activated Carnitine Transporter in *Listeria monocytogenes* / S. Apostolos, A.S. Angelidis, L.T. Smith // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68, N 6. – P. 2644-2650.
 126. Audurier, A. Phage typing of *Listeria monocytogenes* / A. Audurier, C. Martin // Inter. J. of Food Microbiology. – 1989. – Vol.8. – P.251-257.
 127. Bacteriophage administration reduces the concentration of *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal tract and its translocation to spleen and liver in experimentally infected mice/ M. Volker [et al.] // Inter. J. of Microbiol. – 2010. – P.1 – 6.
 128. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application / R.M. Carlotto [et al.] // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2005. – Vol. 43. – P. 301 – 312.
 129. Bansal, N.S. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods / N.S. Bansal // Letters Appl. Microbiol. – 1996. – Vol.22. – P. 353-356.
 130. Beuchat, L.R. Inhibitory Effects of Raw Carrots on *Listeria monocytogenes* / L.R. Beuchat, R.E. Brackett // Applied. and Environmental Microbiology. – 1990. – Vol.56, N6. – P. 1734- 1742.
 131. Beumer, R.R. *Listeria* spp. In domestic environments / R.R. Beumer, M.C. Giffel // Letters in Applied Microbiology. – 1997. – N24. – P. 421-425.

132. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes / H. Anany [et al.] // Appl. and Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, N 18. – P. 6379 – 6387.
133. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin / B. Leverentz [et al.] // Appl. and Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, N 8. – P. 4519 – 4526.
134. Chand, P. Qutbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India / P. Chand, J.R. Sadana // Vet. rec. – 1999. – Vol. 145, N 3. – P. 83- 84.
135. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) / Wang Chinling, Li-Feng Zhang. [et al.] // J.Vet.Res. – 1998. – Vol. 59, N 9. – P. 1125-1128.
136. Clokie, M.R.J. Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions / M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, 2009, Humana Press, 301 p.
137. Comparison of Genomic Structures in the Serovar 1/2 a *Listeria mon.* Isolated from neats and Listeriosis Patients in Japan / F. Ueda [et al.] // Jpn. J. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 58. – P. 289-293.
138. Comparison of Genomic Structures in the Serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* Isolated from Japanese Meats and Listeriosis Patients in Japan / F. Ueda [et al.] //Jpn. J. Infect.Dis. – 2005. – Vol.58. – P. 289-293.
139. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes* / M. Louie, P. Jayaratne, L. Luchsinger [et al.] // J. Clinical Microbiol. – 1996. – Vol.34, N 1. – P. 15-19.
140. Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes* / R. Henry [et al.] // Cell Microbiol. – 2006. – Vol. 8. – P. 107 – 119.
141. Cytotoxic T-cell, delayed type hypersensitive and listeriolysin O responses in experimental bovine listeriosis / S.B. Barbuddhe, S.V.S. Malik, S. Bhatnagar, L.K. Gupta // Vet.Microbiol. – 1999. – Vol.64, N 4. – P. 333-341.
142. DNA Relatedness Among *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* Bacteriophages / J. Rocourt, M. Gilmore, W. Goebel, H.P.R. Seeliger // System.Appl.Microbiol. – 1986. – Vol.8, N1-2. – P. 42-47.
143. Drebot, M. Differentiation of *Listeria* isolates by PCR amplicon profiling and sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer loci / M. Drebot, S. Neal, W. Schlech, K. Rozee // J. Appl. Bacteriol. – 1996. – Vol.80. – P. 174-178.
144. Dupuis, M. Genome organization and characterization of the virulent lactococcal phage 1358 and its similarities to *Listeria* phages / M. Dupuis, S. Moineau // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, N 5. – P. 1623 – 1632.
145. Effect of in vitro monocyte activation by *Listeria monocytogenes* antigens on phagocytosis and production of reactive oxygen and nitogen radicals in bovines / S.B. Barbuddhe, S.V.S. Malik, Lavleen K.Gupta // Vet.immun.and immunopat. – 1998. – Vol. 64. – N 2. – P. 149-159.
146. EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2012; 10(3):2615, p. 43.
147. Einsatz der Real-Time PCR zur raschen Detektion von *Listeria monocytogenes* in Milch und Milchprodukten / I. Hein [et al.]. //Wien. Tierarztl. Mschr. – 2002. – Vol.89, N 11. – P. 312-318.
148. Estela, L.A. Comparison of conventional and reversed phage typing procedures for identification of *Listeria* spp. / L.A. Estela, J.N. Sofos // Appl. and Environ. Microbiol. – 1993. – Vol. 59, N 2. – P. 617 – 619.
149. Experimental mixed infection with *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in guinea pigs / H. Naidenski [et al.] // J. Vet. med. – 1998. – B.45. – P. 611-620.
150. Farber, J.M. Effect of Prior Heat Shock on Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* in Meat / J.M. Farber, B.E. Brown // Applied and Environmental Microbiology. – 1990. – Vol.56, N6. – P. 1584-1587.
151. Fraser, D.K. Host range mutants and semi-temperature mutants of bacteriophage / D.K. Fraser // Virology. – 1957. – Vol. 3, N 3. – P. 527 – 553.
152. Gardan, R. Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Involved in Salt and Alkaline-pH Tolerance / R. Gardan, P. Cossart // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol. 69, N 6. – P. 3137-3143.
153. Gardan, R. Role of ctc from *Listeria monocytogenes* in Osmotolerance / R. Gardan // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol. 69, N1. – P. 154-161.
154. Genus- and species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the 16S/23S intergenic spacer region of the rRNA operon / T. Graham, E.J. Golsteyn-Thomas, V.P.-J. Gannon, J.E. Thomas // Can. J. Microbiol. – 1996. – Vol. 42. – P. 1155-1162.

155. Greer, G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria / G.G. Greer // J. Food Prot. – 2005. – Vol. 68, N 5. – P. 1102 – 1111.
156. Guenther, S. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses / S. Guenther, M.J. Loessner // Bacteriophage. – 2011. – Vol. 1, N 2. – P. 94 – 100.
157. Guerra, M.M. Characterization of the inhibitors of *L.monocytogenes* produced by ripening microflora of Alentejo's traditional cheeses / M.M. Guerra, F.M. Bernardo // Rev. Port. Cienc. Vet. – 2001. – V 96, N 538. – P. 65-69.
158. Hershey, A.D. Conservation of nucleic acids during bacterial growth / A.D. Hershey // J. Gen. Physiol. – 1954. – Vol. 38, N 2. – P. 145 – 148.
159. Hill, C. *Listeria monosytogenes*: role of stress in virulence and survival in food Irish / C. Hill, C. Gahan // J. of Agricultural and Food Research. – 2000. – Vol. 39, N2. – P. 195-201.
160. Holck, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures / A. Holck, J. Berg // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75, N 21. – P. 6944 – 6946.
161. Huss, H.H. How to Cope with the listeria problem / H.H. Huss // Salmon Summit 2000. – P. 153-158.
162. Identification of the insulin-like growth II receptor as a novel receptor for binding and invasion by *Listeria monocytogenes* / U. Gasanov [et al.] // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74. – P. 566 – 577.
163. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament Nucleation / M.D. Welch, J. Rosenblatt, J. Skoble [et al.] // Science. – 1998. –Vol.281, N 5373. – P. 103-108.
164. Isolation of Bacteriophages from *Listeria monocytogenes* Serovar 5 and *Listeria innocua* / J.Y. Rocourt [et al.] // Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. – 1985. – Vol. 251, N4. – P. 505-511.
165. Jasinska, S. Bacteriophage of lysogenic strains of *Listeria monocytogenes* / S. Jasinska // Acta Microbiol. Polon. – 1964. – Vol. 13, N 1. – P. 29 – 43.
166. Jersek, B. Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria* / B. Jersek, E. Tcherneva, N. Rijpens, L. Herman // Letters Appl. Microbiol. – 1996. – Vol.23. – P. 55-60.
167. Kellenberger, E. Vegetative bacteriophage and the maturation of virus particles / E. Kellenberger // Advance Virus. Res. – 1961. – N 3. – P. 1 – 61.
168. Kim, J.-W. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States / J.-W. Kim, R.M. Siletsky, S.Kathariou // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74, N 21. – P. 6623 – 6630.
169. Kim, J.-W. Temperature-Dependent Phage Resistance of *Listeria monocytogenes* Epidemic Clone II / J.-W. Kim, S. Kathariou // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75, N 8. – P. 2433 – 2438.
170. Levinthal, C. The structural development of a bacterial virus / C. Levinthal, H. Fischer // Biochim. Biophys. Acta. – 1952. – Vol. 9, N 4. – P. 419 – 429.
171. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA / Daniel Weller, Alexis Andrus, Martin Wiedmann, Henk C. den Bakker // Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. – 2015. – 65. – P. 286–292.
172. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese / David Bertsch, Jorg Rau, Marcel R. Eugster [et al.] // Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. – 2013. – 63. – P. 526–532.
173. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments / Henk C. den Bakker, Steven Warchocki, Emily M. Wright [et al.] // Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. – 2014. – 64. – P. 1882–1889.
174. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest / Lewis M. Graves, Leta O. Helsel, Arnold G. Steigerwalt [et al.] // Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. – 2010. – 60. – P. 1280–1288.
175. *Listeria monocytogenes* als Ursache von entzündlichen Augeweränderungen bei Rindern / A. Weber, E. Arand [et al.] // Tierartztl. Umschau. – 1999. – V.54. – P. 143-147.
176. *Listeria monocytogenes* in Faeces from Clinically Healthy Dairy Cows in Sweden / B.H. Unnerstad [et al.] // Acta vet. scand. – 2000. – V.41, N2. – P. 167-171.
177. *Listeria monocytogenes* septicemia in a Thoroughbred foal / P. Wilkins [et al.] //J.of Vet.Diag. – 2000. – Vol.12., N.2. – P. 173-176.
178. *Listeria rocourtiae* sp. nov. / Alexandre Leclercq, Dominique Clermont, Chantal Bizet [et al.] // Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. – 2010. – 60. – P. 2210–2214.
179. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond / Evi Lang Halter, Klaus Neuhaus, Siegfried Scherer // Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. – 2013. – 63. – P. 641–647.
180. Loc-Carrillo, C. Pros and cons of phage therapy / C. Loc-Carrillo, S.T. Abedon // Bacteriophage. –

2011. – Vol. 1, N 2. – P. 111 – 114.

181. Loessner, M.J. Bacteriophage Typing of *Listeria* Species / M.J. Loessner, M. Busse // *Applied. and Environmental Microbiology*. – 1990. – Vol.56, N6. – P. 1912-1918.
182. Loessner, M.J. Bacteriophage typing of *Listeria* species / M.J. Loessner, M. Busse // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56, N 6. – P. 1912 – 1918.
183. Loessner, M.J. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage **A511: luxAB** for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods / M.J. Loessner, M. Rudolf, S. Scherer // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 8. – P. 2961 – 2965.
184. Loessner, M.J. Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages / M.J. Loessner // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – Vol. 57, N 3. – P. 882 – 884.
185. McLauchlin, J. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967-1984; the use of serotyping and phage typing / J. McLauchlin, A. Audurier, A.G. Taylor // *J. Med. Microbiol.* – 1986. – Vol. 22. – P. 367 – 377.
186. McLauchlin, J. The evaluation of a phage-typing system for *Listeria monocytogenes* for use in epidemiological studies / J. McLauchlin, A. Audurier, A.G. Taylor // *J. Med. Microbiol.* – 1986. – Vol. 22 – P. 357 – 365.
187. Mee-Marquet, N. Evaluation of seven experimental phages for inclusion in the international phage set for the epidemiological typing of *Listeria monocytogenes* / N. van der Mee-Marquet, M. Loessner, A. Audurier // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 9. – P. 3374 – 3377.
188. Mee-Marquet, N. Proposals for optimization of the international phage typing system for *Listeria monocytogenes*: combined analysis of phage lytic spectrum and variability of typing results / N. van der Mee-Marquet, A. Audurier // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61, N 1. – P. 303 – 309.
189. Methods of *Listeria* indication and identification in Russia/ V.M. Kotlyarov, T.Y. Firsova, D.V. Kolbasov [et al.] // *XV International Symposium on Problems of Listeriosis: Abstract.* – Uppsala; Sweden, 2004. – 125 abstr.
190. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food / N.S. Bansal, F.H.Y. McDonell, A. Smith [et al.] // *Internat. J. Food Microbiol.* – 1996. – Vol.33. – P. 293-300.
191. Nau, J.-Y. Une «alerte grave» a la listeriose est lancee apres deux deces / J.-Y.Nau // *Le Monde*. – 08.01.2000.
192. Nichterlein, T. Effect of various antibiotics on *Listeria monocytogenes* multiplying in L 929 cells / T. Nichterlein, H. Hof // *MMV medizin Verlag GmbH Munchen.* – Munchen, 1991. – P. 234-238.
193. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue / B. Leverentz [et al.] // *J. Food Prot.* – 2004. – Vol. 67, N 8. – P. 1682–1686.
194. Ortel, S. Fine structure of *Listeria monocytogenes* under the effect of ampicillin / S. Ortel // *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* – 1972. – N 19. – P. 311 – 323.
195. Paoli, G.C. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes* / G.C. Paoli, C.Y. Chen, J.D. Brewster // *J. Immunol. Methods.* – 2004. – Vol. 289. – P. 147 – 155.
196. Pathogen detection using engineered bacteriophages / A.E. Smart [et al.] // *Anal Bional Chem.* – 2012. – Vol. 402, N 10. – P. 3127 – 3146.
197. PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Milk Products and Diferentiation of Suspect Isolates / I. Holko, J. Urbanova, M. Kantikova [et al.] // *Acta Vet. Brno.* – 2002. – Vol. 71. – P. 125-131.
198. Peek, R. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products / R. Peek, K. R. Reddy // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 131. – P. 1370 – 1372.
199. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption / V.Nanduri [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2007. – Vol. 22. – P. 986 – 992.
200. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calciumions / J. Bickley, J.K. Short, D.G. McDowell, H.C. Parkes // *Letters Appl. Microbiol.* – 1996. – Vol.22. – P. 153-158.
201. Presencia de *Listeria monocytogenes* Y *Listeria* sp. en longanizas frescas y curadas. Utilizacion de distintas condiciones de tiempo y temperatura de incubacion / C. Rota, J. Yanguela, D. Blanco [et al.] // *J.Vet.Med.Reihe B.* – 1997. – Vol.44, N 10. – P. 617-624.
202. Prostaglandin E2 Increases Bovine Leukemia Virus tax and pol mRNA Levels via Cyclooxygenase 2: Regulation by Interleukin-2, Interleukin 10, and Bovine Leukemia Virus / D. Pyeon [et al.] // *J. of Virol.* – 2000. – V.74, N12. – P. 5740-5745.
203. Ralovich, B. Listeriosis research. Present situation and perspective / B. Ralovich. – Budapest, 1984. – 222 p.
204. Rapid molecular typing of listeria monocytogenes by pulsedfield gel electrophoresis / K. Katsuda [et al.] // *Res. in Vet. Scien.* – 2000. – Vol.69, N 1. – P. 99-100.

205. Rayevskaya, M. Safety and Immunogenicity in Neonatal Mice of a Hyperattenuated *Listeria* Vaccine Directed against Human Immunodeficiency Virus / M. Rayevskaya, N. Kushni, R. Frankel // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76, N 2. – P. 918-922.
206. Recombinant single chain antibodies in bioelectrochemical sensors / I. Benhar [et al.] // Talanta. – 2001. – Vol. 55. – P. 899 – 907.
207. Rees, C.E. Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food / C.E. Rees, C.E. Dodd // Adv. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 59. – P. 159 – 186.
208. Ripp, S. Bacteriophage-based pathogen detection / S. Ripp // Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. – 2010. – Vol. 118. – P. 65 – 84.
209. Role of Macrophage Scavenger Receptors in Response to *Listeria monocytogenes* Infection in Mice / T. Ishiguro [et al.] // Am. J. of Pathol. – 2001. – V. 158. – P. 179-188.
210. Roy, D. Analysis of the Role of OpuC, an Osmolyte Transport System, in Salt Tolerance and Virulence Potential of *Listeria monocytogenes* / D. Roy, R.D. Sleator, J. Wouters // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, N6. – P. 2692-2698.
211. Ryser, E. *Listeria*. Listeriosis and Food Safety / E. Ryser, E. Marth. – New York, 1991. – P. 496-512.
212. Schmelcher, M. Bacteriophage: powerful tools for the detection of bacterial pathogens: Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems / M. Schmelcher, M. Loessner // Edited by M. Zourob et al. – Springer Science+Business Media, LLC. – 2008. – P. 731 – 754.
213. Schofield, D.A. Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens / D.A. Schofield, N.J. Sharp, C. Westwater // Bacteriophage. – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 105 – 283.
214. Schultz, E.W. *Listerella* infections, areview / E.W. Schultz // Sanford med. Bull. – 1945. – Vol. 3. – P. 135 – 151.
215. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish / EFSA // EFSA Journal. – Vol. 10, N 3. – 43 p.
216. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis / L.L. Lenz [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences, US, 2003. – Vol. 100. – P. 12432 – 12437.
217. Selective Discrimination of *Listeria monocytogenes* Epidemic Strains by a Mixed-Genome DNA Microarray Compared to Discrimination by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Ribotyping, and Multilocus Sequence Typing / K.M. Borucki [et al.] // J. Clinical Microbiology. – 2004. – Vol. 42, N11. – P. 5270-5276.
218. Serodiagnosis and treatment of listeriosis in repeat breeder cattle / D. Tripathi, N.C. Sharma, S.V.S. Malik [et al.] // Ind. J. Anim. Sc. – 2001. – Vol. 71, N1. – P. 3-4.
219. Siragusa, G.R. Monoclonal Antibody Specific for *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* / G.R. Siragusa, M.G. Jonson // Applied. and Environmental Microbiology. – 1990. – Vol. 56, N6. – P. 1897-1904.
220. Studies on the Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* / W. Goebel, T. Chakraborty, E. Domann [et al.] // Infection. – 1991. – Vol. 19, N4. – P. 195-197.
221. Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Apple Slices and Its Interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum* / W.S. Conway [et al.] // Plant Disease. – 2000. – V. 84, N2. – P. 177-181.
222. Sword, C.P. Bacteriophage typing of *Listeria monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // Bacteriol. – 1958. – Vol. 1. – P. 38 – 40.
223. Sword, C.P. The isolation and characterization of bacteriophage from *L. monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // Gen. microbial. – 1961. – Vol. 25, N 2. – P. 241 – 248.
224. The effectiveness of alginates to reduce the transfer of radiocesium to the milk of dairy goats / N.A. Beresford, R.W. Mayers, P.J. MacEachern [et al.] // J. Envir. rad. – 1999. – Vol. 44. – P. 43-54.
225. The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-Like *Myoviruses* of gram-positive bacteria / J. Klumpp [et al.] // J. of Bacteriol. – 2008. – Vol. 190, N 17. – P. 5753 – 5765.
226. Tubylevicz, H. Studies on the lysogeny of *Listeria monocytogenes* strains / H. Tubylevicz // Bull. de L. Academie Pol. Des Sci. – 1963. – Vol. 1, N 11. – P. 515 – 518.
227. Tzora, A. The effects of inoculation of *Listeria monocytogenes* into the ovine mammary gland / A. Tzora, G.C. Fthenakis, K. Linde // Vet. microbiol. – 1998. – Vol. 59, N 2-3. – P. 193-202.
228. US FDA. Department of health and Human services Food and Drug Administration, 21 CFR Part 172 [Docket No. 2002F-0316 (formerly 02F-0316)], Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Bacteriophage Preparation. Agency: Food and Drug Administration, HHS. Action: Final rule. Federal Register Vol. 71, N 160, Rules and Regulations. – P. 47729 – 47732.

229. Use of the Molecular Typing Methods to Evaluate the Control of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Raw Milk and Dairy Products / L. Tkacikova [et al.] // Avian Pat. – 2000. – V.29, N4. – P. 157-160.
230. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods / S. Guenther [et. al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75, N 1. – P. 93 – 100.
231. Waak, E. *Listeria monocytogenes*. Farm and Dairy Studies: Doct. dissert. – Swedish, 2002. – 35 p.
232. Wagner, M. Differenzierung von human pathogenen *Listeria monocytogenes* – isolaten, Serotyp 4b, mittels Random Amplified Polymorphic DNA-Technik und DNA/DNA Hybridisierung / M. Wagner, A. Lehner, A. Maderner // Wien. Tierarztl. Mschr. – 1997. – Vol.84. – P. 74-78.
233. Wagner, M. Random amplification of polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria* contamination in a cheese plant / M. Wagner, A. Maderner, E. Brandl // J. Food protection. – 1996. – Vol.59, N 4. – P. 384-389.
234. Wang, Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria / Y. Wang, Z. Ye, Y. Ying // Sensors (Basel). – 2012. – Vol. 12, N 3. – P. 3449 – 3471.
235. Watson, B.B. The application of the phage-fluorescent antiphage staining system in specific identification of *Listeria monocytogenes* / B.B. Watson, W.C. Eveland // J. Infect. Diseases. – 1965. – Vol. 115, N 4. – P. 363 – 369.
236. WHO-sponsored international collaborative study to evaluate methods for subtyping *Listeria monocytogenes*: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using ribotyping and Southern hybridization with two probes derived from *L.monocytogenes* chromosome / B. Swaminathan, S.B. Hunter, P.M. Desmarchelier [et al.] // Internat.J.Foot Microbiol. – 1996. – Vol.32. – P. 263-278.
237. Zink, R. Classification of Virulent and Temperate Bacteriophages of *Listeria* spp. on the Basis of Morphology and Protein Analysis / R. Zink, M.J. Loessner //Appl. and Environmental Microbiol. – 1992. – P. 296-302.
238. Zink, R. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis / R. Zink, M.J. Loessner // Appl. and Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58, N 1. – P. 296 – 302.
239. Zur Rolle von Stickoxyd bei der Listerienenzephalitis der Wiederkauer und bei intrazisternal infizierten Ratten / K.A. Remer [et al.]. // Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. – 2002. – B.115, N 7-8. – S. 259-266.
240. Zur Rolle von Stickoxyd bei der Listerienenzephalitis der Wiederkauer und bei intrazisternal infizierten Ratten // Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. – 2002. – Vol.115, N 7-8. – P. 259-266.
241. www.intralytix.com. Сайт компании Intralytix.
242. www.micreos.com. Сайт компании Microeos.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ	6
ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ	14
ЧАСТЬ I. ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛИСТЕРИОЗА.	17
ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА	17
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПОЗИЦИЯ РОДА <i>LISTERIA</i>	19
МЕЖРОДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ	22
ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА <i>LISTERIA</i>	23
Морфология	23
Культивирование	24
Метаболизм и биохимические свойства	25
Таксономия рода <i>Listeria</i>	28
ВНУТРИРОДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ	32
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИСТЕРИОЗА	41
Устойчивость листерий к воздействию физико-химических факторов	45
КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА.	49
Культивирование листерий на искусственных питательных средах	49
Подбор селективных сред для листерий	54
Усовершенствованные и «быстрые» методы выделения листерий.	58
Методы подготовки пищевого продукта для бактериологического исследования на листерии и схемы посева на питательные среды	60
Общие схемы исследования пищевого продукта	62
КЛЕТОЧНОЕ СТРОЕНИЕ ЛИСТЕРИЙ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТКИ	62
ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ БАКТЕРИЙ РОДА <i>LISTERIA</i>	65
L-ФОРМЫ ЛИСТЕРИЙ.	67
Методы обнаружения L-форм листерий	70
Микробиологическое исследование	70
Окраска при непрямом методе флюоресцирующих антител (НМФА)	72
Окраска по непрямому методу пероксидазных антител (НМПА)	74
Получение гипериммунных сывороток против стабильных L-форм листерий протопластного типа.	75
Схема гипериммунизации.	65

ЧАСТЬ II. АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ЛИСТЕРИЙ И СЕРОТИПИРОВАНИЕ	79
Техника серологического исследования	82
Серологическая диагностика	85
РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)	87
РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)	95
РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ (РП)	101
РЕАКЦИЯ ГЕМОЛИЗА (РГ)	102
РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА)	103
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ	107
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУННОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)	
ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА	113
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА,	
ИНДИКАЦИИ ЛИСТЕРИЙ В ОБЪЕКТАХ ВЕТЕРИНАРНОГО	
И МЕДИЦИНСКОГО НАДЗОРА	114
АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА	116
ПРОБА АНТОНА	117
 ЧАСТЬ III. ЛИСТЕРИОЗНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ	118
ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ	118
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ	122
БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ФАГОВ ЛИСТЕРИЙ	135
Моно/смесь фагов	135
Хранение биопрепарата листериозных бактериофагов	135
ИДЕНТИФИКАЦИЯ	136
ФАГОТИПИРОВАНИЕ	138
ДЕТЕКЦИЯ	142
ФАГОВЫЙ БИОПРОЦЕССИНГ	147
 ЧАСТЬ IV. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ЛИСТЕРИОЗА	157
ЭКОЛОГИЯ ЛИСТЕРИЙ	157
ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ЖИВОТНЫХ РАЗНЫХ ВИДОВ	163
ИСТОЧНИКИ ИНФЕКЦИИ, ПУТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО АГЕНТА	
ВО ВНЕШНЮЮ СРЕДУ, СПОСОБЫ ЗАРАЖЕНИЯ, ПУТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ БОЛЕЗНИ	167
ХАРАКТЕР ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ В ХОЗЯЙСТВЕ, СЕЗОННОСТЬ, ПОВТОРЯЕМОСТЬ,	
ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ, СМЕРТНОСТЬ, ЛЕТАЛЬНОСТЬ	177
Пищевые продукты как фактор передачи листериоза человеку	189
Роль пищевых продуктов в возникновении листериоза людей	194
 ЧАСТЬ V. ИММУНИТЕТ ПРИ ЛИСТЕРИОЗЕ	206
ФОРМИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ИММУНИТЕТА ПРИ ЛИСТЕРИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ	206

ЧАСТЬ VI. ПАТОГЕНЕЗ ЛИСТЕРИОЗА	213
ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ПАТОГЕННОСТЬ ЛИСТЕРИЙ	223
Факторы патогенности	214
Адсорбция и инвазия	215
Роль в патогенезе субклеточного и внеклеточного листериозного субстрата	216
Что влияет на вирулентность штаммов <i>Listeria</i>	221
Способы определения вирулентности листерий	223
Патогенность лабораторных животных	226
ПАТОГЕНЕЗ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ	231
ПАТОЛОГОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ	241
Патологоанатомические изменения у лабораторных животных	241
Патологоанатомические изменения у сельскохозяйственных животных	241
ОБОСНОВАНИЕ ГИПОТЕЗЫ БАКУЛОВА, ЧЕВЕЛЕВА И ДР. О ПАТОГЕНЕЗЕ	
ЛИСТЕРИОЗА	250
Формулировка гипотезы патогенеза листериоза	256
КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА ЛИСТЕРИОЗА У ЖИВОТНЫХ	257
Листериоз лошадей	258
Листериоз КРС	260
Листериоз овец	269
Листериоз коз	280
Листериоз свиней	283
Листериоз плотоядных	286
Листериоз птиц	288
Листериоз прочих видов животных	292
Листериоз рыб и ракообразных	294
 ЧАСТЬ VII. ПРОФИЛАКТИКА И МЕРЫ БОРЬБЫ С ЛИСТЕРИОЗОМ	
ЖИВОТНЫХ	300
 ЧАСТЬ VIII. ЛИСТЕРИОЗ У ЛЮДЕЙ	302
КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ЛИСТЕРИОЗА У ЛЮДЕЙ	302
 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	311
 УКАЗАТЕЛЬ ТАБЛИЦ	313
 ЛИТЕРАТУРА	315

CONTENTS

PREFACE TO THE FIRST EDITION	6
PREFACE TO THE SECOND EDITION	14
 PART I. LISTERIOSIS CAUSATIVE AGENT	17
HISTORICAL BACKGROUND.....	17
PHYLOGENETIC POSITION OF LISTERIA GENUS.....	19
INTERGENETIC DIFFERENTIATION OF LISTERIA.....	22
SPECIFIC CHARACTERISTICS OF LISTERIA GENUS BACTERIA.....	23
Morphology.....	23
Cultivation.....	24
Metabolism and biochemical properties.....	25
Taxonomy of Listeria Genus.....	28
INTRAGENETIC DIFFERENTIATION OF LISTERIA.....	32
BIOLOGICAL DESCRIPTION OF LISTERIOSIS CAUSATIVE AGENT.....	41
Resistance of listeria to physico-chemical factors.....	45
PROPERTIES OF THE CULTURE.....	49
Cultivation on listeria in artificial nutrient media.....	49
Choosing selective media for Listeria.....	54
Improved and «fast» methods of Listeria isolation.....	58
Methods of foodstuff preparation for bacteriological investigation for listeria detection and schemes of media inoculation.....	60
General schemes of foodstuff investigation.....	62
LISTERIA CELLULAR TEXTURE AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE CELL	
STRUCTURAL COMPONENTS.....	62
CHEMICAL COMPOSITION OF STRUCTURAL COMPONENTS OF LISTERIA GENUS	
BACTERIA L-FORMS OF LISTERIA.....	67
Detection methods of listeria L-forms.....	70
Microbiological investigation.....	70
Colouring within enhancement fluoroimmunoassay.....	72
Colouring according to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	74
Obtaining of hyperimmune sera against stable listeria L-forms of the protoplast type.....	75
Scheme of hyperimmunization.....	65

PART II. LISTERIA ANTIGENIC STRUCTURE AND SEROTYPING	79
Technology of serologic examination	82
Serum diagnostics	85
AGGLUTINATION REACTION	87
COMPLEMENT-FIXATION REACTION	95
PRECIPITATION REACTION	101
HEMOLYSIS REACTION	102
INDIRECT HEMAGGLUTINATION TEST	103
APPLICATION OF LUMINESCENT ANTIBODY METHOD	107
APPLICATION OF IMMUNE-ENZYME ANALYSIS FOR LIFE-TIME DIAGNOSTICS OF LISTERIOSIS	113
USING PCR-TEST FOR LISTERIOSIS DIAGNOSTICS, LISTERIA INDICATION IN THE OBJECTS OF VETERINARY AND MEDICAL SUPERVISION	114
ALLERGY DIAGNOSTICS	116
ANTON PROBE	117
 PART III. LISTERIOSIS BACTERIOPHAGES	118
ISOLATION OF LISTERIOSIS BACTERIOPHAGES	118
BIOLOGICAL PROPERTIES OF LISTERIOSIS BACTERIOPHAGES	122
BIOPREPARATION BASED ON LISTERIA PHAGES	135
Mono/blend of phages	135
Storing listeriosis bacteriophages biopreparation	135
IDENTIFICATION	136
PHAGE-TYPING	138
DETECTION	142
PHAGE BIOPROCESSING	147
 PART IV. LISTERIOSIS SPREAD	157
LISTERIA ECOLOGY	157
SUSCEPTIBILITY OF ANIMALS OF DIFFERENT SPECIES	163
SOURCES OF INFECTION, WAYS OF INFECTION AGENT RELEASE INTO ENVIRONMENT, WAYS OF CONTAMINATION, MEANS OF DISEASE SPREADING	167
CHARACTER OF CLINICAL COURSE IN FARMS, SEASONAL CHARACTER, RECURRENCE, SICKNESS RATE, DEATH RATE, LETHALITY	177
Foodstuffs as a factor of listeriosis pathogenesis to human beings	189
Role of foodstuffs in human listeriosis occurrence	194
 PART V. IMMUNITY WITHIN LISTERIOSIS	206
FORMATION OF IMMUNITY MECHANISM WITHIN LISTERIOSIS INFECTION	206

PART VI. LISTERIOSIS PATHOGENESIS	213
VIRULENCE AND PATHOGENESIS OF LISTERIA	223
Pathogenic factors	214
Adsorption and invasion	215
Role of the subcellular and extracellular Listeriosis substance in pathogenesis	216
What influences Listeria strains' virulence	221
Ways of Listeria virulence detection	223
Pathogenicity of laboratory animals	226
PATHOGENESIS WITHIN CONTAMINATION	231
PATHOLOGOMORPHOLOGICAL CHANGES	241
Pathologoanatomical changes in laboratory animals	241
Pathologoanatomical changes in farm animals	241
ARGUMENTS IN SUPPORT OF THE HYPOTHESIS OF LISTERIOSIS PATHOGENICITY STATED BY BAKULOV, TCHEVELEV ET AL	250
Statement of the hypothesis of listeriosis pathogenesis	256
CLINICAL PRESENTATION OF LISTERIOSIS IN ANIMALS	257
Listeriosis in horses	258
Listeriosis in cattle	260
Listeriosis in sheep	269
Listeriosis in goats	280
Listeriosis in swine	283
Listeriosis in carnivorous animals	286
Listeriosis in birds	288
Listeriosis in other species of animals	292
Listeriosis in fish and crustaceans	294
 PART VII. PREVENTION AND ACTIONS AGAINST ANIMAL LISTERIOSIS	300
 PART VIII. LISTERIOSIS IN HUMAN BEINGS	302
CLINICAL FORMS OF HUMAN LISTERIOSIS	302
 CONCLUSION	311
 УКАЗАТЕЛЬ ТАБЛИЦ	313
 BIBLIOGRAPHY	315

Печатается в авторской редакции.

Подписано в печать 00.00.2016.

Тираж 300 экз. Заказ № 0/00/00.

Художественное оформление и компьютерное обеспечение М. Н. Василькиной

Отпечатано в типографии ООО «Колор-Принт»

г. Ульяновск, ул. Ленина, д. 75

Тел.: (8422) 42-28-45, т/ф: 41-82-23

www.color73.ru

ИЗДАННЫЕ НАУЧНЫЕ МОНОГРАФИИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИННОВАЦИОННОГО ЦЕНТРА МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ



Д. А. Васильев, А. И. Калдыркаев, Н. А. Феоктистова, А. В. Алёшкин

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS* НА ОСНОВЕ ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Научное издание.

Книга «Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики» является иллюстративным источником бактериологических тестов используемых для идентификации бактерий *Bacillus cereus*, позволяющим внести ясность в схему таксономической систематики бактерий данного вида. Достоинства книги – подробное описание и иллюстративное сопровождение классических бактериологических тестов, воспроизводимых в условиях стандартной бактериологической лаборатории.

Книга может служить практическим справочным пособием для специалистов-бактериологов, работающих в области биологии, медицины, ветеринарии, биотехнологии, агрономии и пищевой промышленности.



БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ ЗНАЧИМЫХ, ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И ЧЕЛОВЕКА

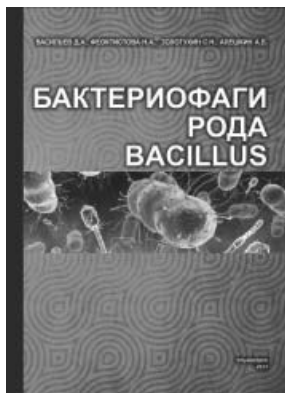
Научное издание.

Под редакцией Д. А. Васильева и С. Н. Золотухина

Коллектив авторов: А. В. Алёшкин, Н. А. Барт, И. И. Богданов, Ю. Б. Васильева, Д. А. Викторов, Д. С. Золотухин, Н. П. Журавская, А. И. Калдыркаев, Н. Н. Карамышева, Е. Н. Ковалева, Б. М. Коритняк, Е. А. Ляшенко, Н. И. Молофеева, Е. Н. Пожарникова, Л. П. Пульчеровская, Е. Н. Семанина, Н. А. Феоктистова, А. Г. Шестаков, М. А. Юдина

Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П. А. Столыпина

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П. А. Столыпина, по бактериофагам, проведенные за последние 15 лет. Освещены вопросы по выделению, селекции и изучению биологических свойств бактериофагов микроорганизмов, представляющих определенный интерес как для практических ветеринарных и медицинских работников, микробиологов и биотехнологов, так и для научных сотрудников, аспирантов и студентов этих направлений. Также описаны схемы и параметры практического применения выделенных и селекционированных штаммов бактериофагов, разработанные авторами.



Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова, С. Н. Золотухин, А. В. Алешкин

БАКТЕРИОФАГИ РОДА BACILLUS

Научное издание.

В книге приводится анализ литературы по бактериофагам рода *Bacillus*, включая фаги *Bacillus anthracis*, написанный на материалах научных публикаций в полувековом разрезе. Описана морфология и ультраструктура бациллярных вирусов, дана характеристика наиболее изученным бактериофагам, приведены данные по распространению и применению фагов *Bacillus*.

Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также на студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.



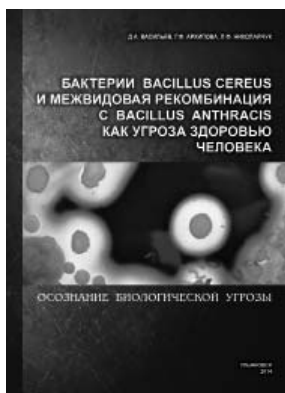
Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, С. Н. Золотухин

ЛИСТЕРИОЗНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

Научное издание.

В книге приводится обзор отечественных и иностранных публикаций по тематике бактериофагов бактерий рода *Listeria*. Описаны методики выделения и изучения основных биологических свойств листерийных бактериофагов, дана характеристика изученным фагам, приведены данные по практическому применению фагов рода *Listeria*.

Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.

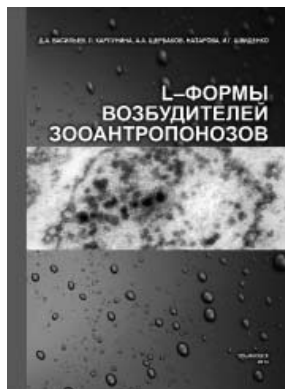


Д. А. Васильев, Г. Ф. Архипова, Л. Ф. Николайчук

БАКТЕРИИ BACILLUS CEREUS И МЕЖВИДОВАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ С BACILLUS ANTHRACIS КАК УГРОЗА ЗДОРОВЬЮ ЧЕЛОВЕКА

Научное издание.

В течение нескольких лет на кафедре Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии проводятся исследования по выяснению возможной степени опасности для животных и человека бактерий вида *Bacillus cereus*, как инфекционного агента, способного вызывать отравление бактериальным токсином, схожим по патогенезу действия с сибиреязвенным. Эта тема НИР является продолжением исследований проводимых в НИИ ВВиМ. В монографии представлены материалы по распространению *Bacillus cereus* в пищевых продуктах, а также результаты получения межвидовых рекомбинантных штаммов рода *Bacillus*, в частности *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, что в естественных условиях может привести к возникновению бактерий-«химер» и создавать трудности при установлении диагноза. Наличие механизма рекомбинации у бактерий создаёт предпосылки для передачи некоторых биологических свойств от сибиреязвенного микроорганизма к бациллам других видов, в частности, *Bacillus cereus*, что может значительно усложнять диагностику и лечение заболеваний (пищевых отравлений) у человека.



Д. А. Васильев, Л. Карпунина, А. А. Щербаков, Назарова, И. Г. Швиденко

L-ФОРМЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗООАНТРОПОНОЗОВ

Научное издание.

В предлагаемой монографии приводятся данные об L-форме микроорганизмов: их структура на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях, условиях культивирования, методах диагностики. Подробно описываются L-формы микроорганизмов, играющих важную роль в патологии сельскохозяйственных животных и человека: бруцеллы, микобактерии туберкулеза, листерии, возбудитель рожи свиней, энтеробактерии, бацилл, чумной микроб.

Включены материалы, полученные с помощью новых методов: полимеразной цепной реакции, иммуноферментного и радиоиммунного анализа и др. Описываются так называемые некультивируемые

микроорганизмы.

В книге представлены и оригинальные результаты исследований в данном направлении.

Учитывая незначительный объём информации по L-формам микроорганизмов, представленный в вузовских учебниках, предлагаемая книга была написана по заказу кафедры микробиологии Ульяновской ГСХА для студентов по специальности микробиология.



Д. А. Васильев, Ю. Б. Васильева, А. В. Мاستиленко, Д. Г. Сверкалова, Е. Н. Семанина, О. Ю. Борисова, С. Н. Золотухин, И. Г. Швиденко

БОРДЕТЕЛЛЁЗ ЖИВОТНЫХ: ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ И ВОЗБУДИТЕЛЯ, РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

Научное издание.

Издание знакомит с эпизоотологией, диагностикой и профилактикой бордетеллёза. В работе приведены результаты исследований по изучению биологии бактерий *Bordetella bronchiseptica*, методам их индикации и идентификации полученные исследовательской группой по бордетеллёзу кафедры микробиологии.

Книга ориентирована на работников бактериологических лабораторий, ветеринарных специалистов, преподавателей, аспирантов, студентов ветеринарных факультетов, а также владельцев домашних животных.



Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии

Кафедра микробиологии Ульяновской ГСХА им. П.А.Столыпина