

ГЛАВА 3.9.6.

LISTERIA MONOCYTOGENES

РЕЗЮМЕ

*Инфицирование листерией моноцитогенной (*Listeria monocytogenes*) наблюдается у многих видов животных, но клинический листериоз представляет собой, главным образом, болезнь жвачных животных, проявляясь у других биологических видов только в спорадических случаях. Главными клиническими проявлениями листериоза у животных являются энцефалит, септицемия и аборт, причем эта болезнь часто бывает связана с фуражом, полученным со склада, обычно с силосным кормом. Посмертные находки и гистопатология зависят от клинических проявлений болезни.*

*Листериоз – это одна из самых важных болезней человека, связанных с пищей. Проявления болезни включают септицемию, менингит (или менингоэнцефалит) и энцефалит. У беременных женщин внутриматочные или цервикальные проявления этой инфекции могут привести к спонтанному аборту или мертворождению с предшествующей симптоматикой, напоминающей грипп, включая лихорадку. Инфекция *Listeria monocytogenes* также бывает связана с желудочно-кишечными проявлениями и лихорадкой. Хотя заболеваемость листериозом относительно невелика, смертность от системной формы болезни и энцефалита может быть очень высокой, достигая 20–30%. В Европе показатель госпитализации оценивают на уровне более 95%. К группе высокого риска заболеваемости листериозом относятся пожилые люди, беременные женщины, новорожденные и лица с ослабленным иммунитетом.*

*Для этого внутриклеточного патогена были определены многие молекулярные и клеточные детерминанты вирулентности, и, хотя по некоторым из этих детерминант вирулентности имеются доказательства полиморфизма различных штаммов *L. monocytogenes*, эта гетерогенность не связана со способностью или неспособностью микроорганизма вызывать инфекционное заболевание. В ближайшие годы должна появиться новая информация по результатам полногеномного секвенирования листерии, которая может изменить эти представления. Поэтому все штаммы *L. monocytogenes* считаются потенциально патогенными.*

Идентификация возбудителя болезни: *Для обнаружения и идентификации *L. monocytogenes* в первичной продукции, в пробах из фуража и продуктов питания, а также в образцах материала, полученного от инфицированных животных, доступно множество достаточно удобных и быстрых методов. Общепринятые методы остаются «золотым стандартом», по сравнению с которым проходят оценочную проверку другие методы. В этих методах используются селективные средства и процедуры обогащения, направленные на то, чтобы уменьшить контаминацию посторонними микроорганизмами и создать избирательные условия для размножения *L. monocytogenes*. Разработка хромогенных питательных сред обеспечила более надежное обнаружение этого микроорганизма. Полезным инструментом для диагностики энцефалитической формы болезни оказалось иммуногистохимическое выявление антигенов *L. monocytogenes*.*

*В настоящее время доступны различные уровни субтипирования штаммов *L. monocytogenes*, включая серотипирование посредством классической агглютинации склеиванием или группировку посредством полимеразной цепной реакции, а также гель-электрофорез в пульсирующем поле. Структуру популяции и филогению можно изучать при помощи мультилокусного секвенирования. Тесты субтипирования*

стандартизированы на международном уровне через совместные исследования под эгидой ВОЗ и в рамках международной сети PulseNet.

Серологические реакции: Серологические реакции на выявление антител не нашли традиционного применения для диагностики листериоза. Были испробованы многие форматы, но все они оказались недостаточно надежными из-за утраты чувствительности и специфичности. В некоторых эпидемиологических исследованиях, а также для того, чтобы поддержать диагностику инфекций центральной нервной системы с отрицательными результатами культивирования, были использованы экспериментальные серологические анализы, основанные на выявлении антитела против листериолизина O.

Требования к вакцинам: Разработка действенных вакцин против *L. monocytogenes* оказалась весьма затруднительной, поскольку для эффективной иммунной реакции на этот внутриклеточный микроорганизм требуются эффекторные Т-клетки. Продолжаются испытания различных экспериментальных вакцин, способных обеспечить защиту от инфекции *L. monocytogenes* на основе разных подходов, включая иммунизацию плазмидной ДНК, сигнализацию CD40 в комплексе с введением *L. monocytogenes*, убитых нагреванием, прививку мутантов с дефицитом листериолизина O в сочетании с инкапсулированным в липосомы листериолизин O, а также иммунизацию антигенами листерий и интерлейкином IL-12.

А. ВВЕДЕНИЕ

Инфицирование *Listeria monocytogenes* наблюдается у самых разнообразных видов животных, включая млекопитающих, птиц, рыб и ракообразных (таблица 1), хотя в большинстве случаев клинический листериоз встречается у жвачных животных. Свиньи редко заболевают листериозом, а птицы, как правило, являются субклиническими носителями этого микроорганизма. Большинство инфекций у животных протекает в субклинической форме, а инвазивная болезнь проявляется или спорадически, или в виде эпидемической вспышки. В дополнение к экономическим последствиям вспышек листериоза у жвачных и других видов животных, жвачные могут играть роль источника инфекции для человека, что, прежде всего, связано с употреблением в пищу контаминированных продуктов животного происхождения. Может также встречаться прямая передача инфекции от зараженных животных, особенно во время отела или ягнения (Wesley, 2007), но этот способ инфицирования представляет большую редкость. Относительная важность зоонозной передачи листериоза человеку неясна, и большее значение для здравоохранения имеет микробная контаминация из окружающей среды в пищевой промышленности (Roberts & Wiedmann, 2003).

Таблица 1. Виды с документированным выделением *Listeria monocytogenes*

Млекопитающие				
Крупный рогатый скот	Кошки	Кролики	Овцы	Олени
Морские свинки	Козы	Еноты	Шиншиллы	Свиньи
Крысы	Скунсы	Лошади	Мыши	Норки
Собаки	Лемминги	Хорьки	Лисы	Полевки
Лоси	Человек			
Птицы				
Канарейки	Утки	Совы	Зяблики	Орлы
Попугаи	Куры	Гуси	Куропатки	Журавли
Ястребы	Фазаны	Горлицы	Лорикеты	Голуби

Чайки	Индюки	Белые куропатки	Славки	Тетерева-глухари
Прочие				
Лягушки	Ракообразные	Иксодовые клещи	Рыбы	Муравьи
Мухи	Улитки			

Клинические проявления листериоза у животных включают ромбэнцефалит (или в некоторых случаях более распространенные изменения в головном мозге), септицемию и аборт, особенно у овец, коз и крупного рогатого скота. Во время эпидемической вспышки в стае или в стаде обычно наблюдается только одна клиническая форма листериоза. Ромбэнцефалитная форма в литературе упоминается как невреллез или «болезнь, движущаяся по замкнутому кругу» из-за тенденции кругового движения в одном и том же направлении. Эта форма представляет собой наиболее распространенное проявление листериоза у жвачных животных. Кроме того, эта форма является одной из наиболее распространенных причин неврологических расстройств у жвачных животных. Клинические признаки включают депрессию, анорексию, прижатие головы к вертикальным поверхностям или поворачивание головы в одну сторону, а также односторонний паралич черепно-мозговых нервов. Последний происходит из-за вовлечения черепно-мозговых нервов и их ядер в стволовой части головного мозга. Аборт обычно наступает в поздние сроки беременности (после 7 месяцев у крупного рогатого скота и после 12 недель у овец) (Hird & Genigeorgis, 1990; Walker, 1999). Септицемическая форма встречается относительно редко и в большинстве случаев, но не всегда, наблюдается у новорожденных. Она характеризуется депрессией, отсутствием аппетита, лихорадкой и завершается смертельным исходом. Также описан коровий и овечий офтальмит (Walker & Morgan, 1993). Инфекция *L. monocytogenes* у жвачных животных в редких случаях сопровождается маститом. У овец иногда могут наблюдаться желудочно-кишечные проявления инфекции (Clark *et al.*, 2004). У свиней основным клиническим признаком листериоза является септицемия, энцефалит наблюдается не столь часто, а аборты еще реже. Хотя птицы обычно играют роль субклинических переносчиков инфекции, в литературе описаны спорадические случаи листериоза, чаще всего в форме септицемии и намного реже в форме менингоэнцефалита. Птичий листериоз может развиваться в результате вторичной инфекции при вирусном заболевании и сальмонеллезе (Wesley, 2007).

Посмертные находки и гистопатология при листериозе у животных зависят от клинических проявлений болезни. При энцефалитической форме спинномозговая жидкость может быть мутной, а менингеальные сосуды застойными. Макроскопические повреждения обычно бывают едва различимыми и характеризуются застойными кровеносными сосудами сосудистой перегруженностью и нерезко выраженным изменением цвета ствола мозга с желтовато-коричневым оттенком. Иногда мозговое вещество показывает области размягчения (маляции) и абсцедирования. Характерные гистопатологические изменения состоят из очагов интрапаренхиматозных скоплений нейтрофилов и макрофагов (микроабсцессы) в стволовой части мозга с прилегающими периваскулярными скоплениями мононуклеарных лимфоцитов. Микроабсцессы нередко сильнее развиваются на одной стороне. Может развиваться более распространенная маляционная патология. В патологический процесс наиболее сильно вовлекаются продолговатый мозг и варолиев мост. При септицемической форме могут наблюдаться множественные участки фокального некроза в печени и, реже, в селезенке. Абортированные плоды жвачных животных демонстрируют очень мало макроскопических повреждений, но в тех случаях, когда пораженный плод задержался в матке перед выкидышем может развиваться аутолиз (Low & Donachie, 1997; Walker, 1999).

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что главными источниками загрязнения, приводящими к листериозной инфекции у животных, чаще всего являются фураж,

хранившийся на складе, и окружающая среда. В окружающей среде этот сапрофитный микроорганизм может жить в почве, воде и гниющих овощах, откуда он может попадать в корм. Самым частым источником контаминации является силос (Fenlon, 1985; Wiedmann *et al.*, 1997a). При септицемическом/абортивном листериозе главными входными воротами для инфекции после приема пищи является слизистая оболочка кишечника. Инкубационный период короток и составляет примерно 1 день. При ромбэнцефалите *B. L. monocytogenes*, вероятно, проникает в ствол мозга через черепно-мозговые нервы после прорыва через слизистую оболочку ротовой полости. Инкубационный период значительно более продолжителен по сравнению с септицемической формой и обычно составляет 2–3 недели. У овец и коз болезнь обычно протекает остро в течение 1–4 дней (Roberts & Wiedemann, 2003), хотя у рогатого скота этот период может быть более продолжительным.

Хотя *L. monocytogenes* уже много лет признавалась болезнетворным микроорганизмом для животных, значительная роль листерий в качестве болезнетворного микроорганизма пищевого происхождения для человека стала очевидной только в 1980-х годах, когда было опубликовано документированное сообщение о вспышке листериоза в Канаде, прослеженной до капустного салата, контаминированного этими бактериями (Schlech *et al.*, 1983). Данные по этой вспышке и уровню контаминации капустного салата несколько лет спустя были использованы для установления микробиологического критерия 100 колониеобразующих единиц на грамм в качестве критического уровня для пищевого кодекса (Codex Alimentarius). В наши дни *L. monocytogenes* считается одним из наиболее важных инфекционных возбудителей пищевого происхождения. В литературе были опубликованы сообщения о восьмидесяти вспышках листериоза во всем мире. Хотя сообщения о вспышках происходили из разных стран, в большинстве случаев листериоз у человека носит спорадический характер. Возможные объяснения того факта, что листериоз пищевого происхождения стал серьезной проблемой для здравоохранения, включают существенные изменения в производстве, обработке и доставке продуктов питания, растущее использование холода, как основного приема для сохранения пищевых продуктов, изменения в пищевых привычках людей, особенно, растущая тенденция к быстрому питанию полностью готовыми к употреблению продуктами, а также увеличение числа людей в группах риска (пожилые люди, беременные женщины, новорожденные, лица с ослабленным иммунитетом) (Rocourt & Bille, 1997; Swaminathan & Gerner-Smith, 2007). Поскольку сообщения об инфекции *L. monocytogenes* у человека появились в нескольких странах, можно думать о том, что частота листериоза зависит от пищевых привычек, способов приготовления пищи, использования холодильников и импорта пищевых продуктов.

Агрессивные формы листериоза у человека включают септицемию, менингит (или менингоэнцефалит), и энцефалит (ромбэнцефалит). Также встречаются желудочно-кишечные проявления листериоза с лихорадкой. Хотя заболеваемость листериозом относительно невелика, смертность может достигать величин порядка 30%. У беременных женщин инфекция может привести к аборту, мертворождению или преждевременным родам с предшествующими симптомами, напоминающими грипп, включая лихорадку (Painter & Slutsker, 2007; Rocourt & Bille, 1997).

Listeria monocytogenes – это грамположительная палочка, ответственная почти за все случаи листериоза у человека, хотя в литературе имеются сообщения о редких случаях инфекции, вызванной *L. ivanovii*. У животных *L. monocytogenes* ответственна за большинство инфекций, но также были зарегистрированы случаи инфекции, вызванные *L. ivanovii* и *L. seeligeri*. Инфекция, вызванная *Listeria ivanovii*, связана с абортами и, по имеющимся данным, довольно редко приводит к развитию менингоэнцефалита у овец (таблица 2).

Хотя *L. monocytogenes* имеет явный зоонозный потенциал, эта бактерия также является одним из главных экологических загрязнителей, важных с точки зрения здравоохранения.

Для эпидемиологических исследований доступны многие методы субтипирования штаммов *L. monocytogenes*, но до сих пор остается открытым фундаментальный вопрос о том, все ли штаммы *L. monocytogenes* способны вызывать болезнь (Graves *et al.*, 2007; Jacquet *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 1992; 1993).

Были определены некоторые молекулярные детерминанты вирулентности, играющие роль в клеточной инфекции *L. monocytogenes*, и выяснение механизма их действия превратило *L. monocytogenes* в одну из самых захватывающих моделей взаимодействия между хозяином и патогеном на клеточном и молекулярном уровне. Эти детерминанты вирусного включают, среди прочих, интерналины, листериолизин О (ЛЛО), белок ActA, две фосфолипазы, металлопротеазу, белок Vip, систему исключения желчи (BilE) и гидролазу желчных солей (Cabanés *et al.*, 2005; Cossart & Toledo-Arana, 2008; Dussurget *et al.*, 2002; Sleator *et al.*, 2005). Хотя существует полиморфизм разных штаммов *L. Monocytogenes*, по некоторым из этих детерминант вирулентности ядовитости, он не проявляет корреляции со способностью или неспособностью микроорганизма вызывать развитие болезни (Jacquet *et al.*, 2002). Тем не менее, интерналины А и/или В опосредуют проникновение *L. monocytogenes* в некоторые линии культивируемых клеток человека и пересечение кишечника у песчанок или трансгенных мышей с экспрессией ее рецептора, E-кадгерина человека, в энтероцитах. Некоторые культуры *L. monocytogenes* экспрессируют усеченную нефункциональную форму интерналина. Было обнаружено, что клинические штаммы, полученные от человека, экспрессировали полноразмерный интерналин намного чаще (96%), чем штаммы, восстановленные из пищевых продуктов (65%) (Jacquet *et al.*, 2004). Среди этих клинических штаммов можно выделить штамм серовар 4b, который наиболее часто вовлечен в развитие листериоза у человека и который экспрессирует полноразмерный интерналин. Таким образом, критически важную роль интерналина в патогенезе листериоза у человека следует считать установленной, а экспрессию интерналина можно рассматривать как маркер вирулентности для человека (Bonazzi *et al.*, 2009; Jacquet *et al.*, 2004).

Таблица 2. Вирулентность разных видов *Listeria*

Виды <i>Listeria</i>	Вирулентность у человека	Вирулентность у животных
<i>L. monocytogenes</i>	+	+
<i>L. ivanovii</i> подвид <i>ivanovii</i>	_a	+
<i>L. ivanovii</i> подвид <i>londoniensis</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	_b	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	_b	+
<i>L. grayi</i> подвид <i>grayi</i> <i>L. grayi</i> подвид <i>murrayi</i>	_b	
<i>L. marthii</i>	-	-
<i>L. rocourtiae</i>	-	-
<i>L. weihenstephanensis</i>	-	-
<i>L. fleischmannii</i> подвид <i>fleischmannii</i>	-	-
<i>L. fleischmannii</i> подвид <i>coloradensis</i>		

a: описаны только 11 случаев инфекции у человека; b: описан только 1 случай инфекции у человека.

Listeria monocytogenes классифицируется по группе риска 2 для инфекций человека, и против нее должны быть приняты соответствующие меры, описанные в главе 1.1.4 *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*. Меры по биологическому сдерживанию должны быть определены посредством анализа риска, как это описано в главе 1.1.4.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация возбудителя болезни

Существует множество достаточно удобных и быстрых методов для обнаружения и идентификации *L. monocytogenes* в образцах из пищевой цепочки (образцы первичной продукции, пробы из фуража и продуктов питания, образцы материала из окружающей среды), а также образцы, полученные от животных, инфицированных листериозом. Поскольку низкий уровень *L. monocytogenes* трудно обнаружить, разработанные методы также нацелены на выявление видов листерий, которые могут служить биологическими индикаторами присутствия *L. monocytogenes* в пище, а также в образцах материала из окружающей среды и с предприятий пищевой промышленности. Обычные бактериологические методы важны для животных и человека по разным причинам: их применение позволяет получить чистую культуру микроорганизма, что полезно для регулирования, эпидемиологического наблюдения и управления эпидемическими вспышками. Они остаются «золотым стандартом», по сравнению с которым проходят оценочную проверку другие методы. Эти методы обычно весьма чувствительны и не требуют применения сложного и дорогостоящего оборудования, что позволяет широко использовать их в практике. Некоторые из недостатков этой группы методов включают относительно длительный период времени, необходимый для завершения протоколов, несколько «ручных» манипуляций, потребность во многих и разнообразных химикатах, реактивах и питательных средах, возможность контаминации посторонними микроорганизмами, маскирующими присутствие целевых листерий, включая их избыточный рост на питательной среде, возможность пропуска нетипичных вариантов целевого микроорганизма, а также относительную субъективность при интерпретации роста бактерий на чашках с селективной и дифференциальной агаровой средой (Andrews, 2002).

Выделение и идентификация *L. monocytogenes* в образцах из пищевой цепочки и в материале от животных, пораженных листериозом, требуют использования селективных средств и процедур обогащения, которые удерживают численность посторонних микроорганизмов на разумном уровне и позволяют размножиться *L. monocytogenes* на достаточном уровне для выявления этого микроорганизма. В первые годы исследований по клинической бактериологии с этой целью регулярно использовали холодное обогащение (Gray *et al.*, 1948), то есть, эксплуатировали способность листерий размножаться при низких температурах (около 4°C), тогда как контаминирующие бактерии в этих условиях не могли размножаться. Однако эта процедура требует очень долгого времени инкубации, часто месяцами, делая такой подход неприменимым для оперативных исследований при эпидемических вспышках пищевого происхождения и в спорадических случаях, а также для внедрения эффективных программ системы анализа риска в критических контрольных точках (НАССР) в индустрию по производству и переработке продуктов питания. В культуральные среды были включены многие селективные соединения, которые обеспечивают рост *L. monocytogenes* при нормальной температуре инкубации, что позволило сократить время, необходимое для селективного роста целевого микроорганизма. Примерами этих селективных соединений являются циклогексимид, колистин, цефотетан, фосфомицин, хлорид лития, налидиксовая кислота, акрифлавин, фенилэтанол, цефтазидим, полимиксин В и моксалактам. Разработка

хромогенных питательных сред создала условия для лучшего выделения этого микроорганизма в образцах материала из пищевой цепочки.

Бактериологическая диагностика листериоза у животных традиционно включала прямой посев образцов на кровяной агар или другие обогащенные среды и параллельное использование методики «холодного обогащения» с еженедельным субкультивированием материала до 12 недель (Gray *et al.*, 1948; Quinn *et al.*, 1999; Walker, 1999). Иммуногистохимическое выявление антигенов *L. monocytogenes* в ткани, зафиксированной формалином, оказалось более чувствительным по сравнению с прямым посевом и холодным обогащением бактериальной культуры для диагностики энцефалитической формы заболевания у жвачных животных (Campero *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 1995). Это также справедливо для диагностики ромбэнцефалита у человека. Тем не менее, в отличие от медицинских исследований для человека у животных очень трудно или вообще невозможно выделить микроорганизм из спинномозговой жидкости либо идентифицировать его в спинномозговой жидкости при помощи ПЦР. Поэтому в настоящее время утвердительный диагноз листериозного ромбэнцефалита у живого животного невозможен и может быть установлен только посмертно при обнаружении характерных гистопатологических повреждений или посредством иммуногистохимии, выделения бактерий из ствола мозга или ПЦР на материале из ствола мозга.

Введение альтернативных процедур обогащения и селективных средств, облегчающих выделение *L. monocytogenes* из образцов пищи и из окружающей среды открыло возможности для использования некоторых методик такого рода для бактериологического анализа образцов от животных с листериозом. Тем не менее, надо подчеркнуть, что в тех случаях, когда эти методики используются за пределами их утвержденных свойств, невозможно обеспечить эффективные рабочие характеристики.

Несмотря на достижения в селективном выделении отборной изоляции *L. monocytogenes* в образцах из пищевой цепочки, все еще есть пространство для улучшений во многих областях. Не существует единой процедуры, которая была бы достаточно чувствительной для обнаружения *L. monocytogenes* во всех типах кормовых и пищевых продуктов (Donnelly & Nyachuba, 2007). Кроме того, в обработанных пищевых продуктах могут быть найдены сублетально поврежденные клетки *L. monocytogenes*, что связано с замораживанием, нагреванием, окислением и другими типами химического или физического воздействия. Эти сублетально поврежденные и жизнеспособные, но не культивируемые бактерии требуют особых условий культивирования, чтобы восстановиться из поврежденного состояния для их последующего обнаружения в культуре.

1.1. Методы выделения

Традиционные методы выделения *L. monocytogenes* в образцах из пищевой цепочки, которые получили международное признание в целях регулирования, включают метод Управления по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA) (Hitchins & Jinneman, 2011), официальный метод Ассоциации химиков-аналитиков, работающих в государственных организациях (АОАС, 2012), методы Европейского комитета по стандартизации (CEN, EN), Международной организации по стандартизации (ISO, 1996; 1998; 2005a; 2005b), Скандинавского комитета по пищевой безопасности (NMKL, 2007), а также метод Министерства сельского хозяйства США и Инспекции по безопасности пищевых продуктов (USDA-FSIS, 2013a; 2013bb).

Методы EN ISO, FDA, USDA и AOAC необходимо применять в соответствии с указанной областью их действия, но охватывая при этом большое разнообразие пищевых матриц. Пробы продуктов питания, предназначенные для анализа, должны быть репрезентативными во всех аспектах, включая наружную поверхность и внутреннее содержимое образца. Общепринятые методы культивирования включают процедуру

обогащения, основанную на использовании жидких питательных сред, содержащих селективные средства. Метод АОАС предполагает использование различных вариантов селективного обогащения с разными селективными средствами.

В зависимости от природы образца одни методы могут оказаться более подходящими, чем другие. Техническая комиссия ISO (ISO/TC 34) по сельскохозяйственным продуктам питания, подкомиссия SC 9 по микробиологии в согласии с технической комиссией EN (СЕН/ТК275) по анализу пищевых продуктов, а также рабочая группа 6 по микробиологии пищевой цепочки утверждают, что стандарт EN ISO 11290, части 1 и 2 (ISO, 1996; 1998; 2005), можно использовать для обнаружения *L. monocytogenes* в самых разных пищевых и кормовых продуктах, а также в производстве первичной продукции и образцах материала из окружающей среды. Признавая, что в определенных случаях этот стандарт не может быть идеально соответствующим, они рекомендуют прилагать усилия для максимального (по возможности) применения данного горизонтального метода.

Приведен принцип усовершенствованного метода EN ISO 11290, часть 1 по выявлению *Listeria monocytogenes* (ISO, 2005a), охватывающего всю пищевую цепочку и образцы первичной продукции. Вкратце, после подготовки испытуемой пробы и начальной суспензии первой стадией является засев селективной питательной среды для первичного обогащения, которая содержит один объем хлорида лития и половину объема акрифлавина и налидиксовой кислоты (половинный бульон Фрейзера), который также используется в качестве разбавляющей жидкости для испытуемой пробы. Испытуемую пробу инкубируют при температуре $30\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 3 часов. Второй стадией является засев полноценной вторичной жидкой питательной среды для обогащения (бульон Фрейзера) той культурой, которая была полученной на первой стадии. Бульон Фрейзера инкубируют при температуре от $35\pm 1^\circ\text{C}$ до $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 48 ± 3 часов. На третьей стадии образцы культур, полученных на первой и второй стадии, высевают в чашки на две твердые селективные питательные среды: «Агар для листерий по Оттавиани-Агости» (ALOA[®]) и ALOA[®]-подобный агар, содержащий хлорид лития, налидиксовую кислоту, цефтазидим, полимиксин В и амфотерицин В (или циклогексимид) или любая другая твердая селективная среда по выбору лаборатории, например, агар «Оксфорд» или PALCAM (полимиксин-акрифлавин-хлорид лития-цефтазидим-эскулин-агар с маннитом). Агар для листерий по Оттавиани-Агости инкубируют при $37\pm 1^\circ\text{C}$ и исследуют после 24 ± 3 часов инкубации, чтобы выявить присутствие характерных колоний, предположительно образованных *L. monocytogenes*. Типичные колонии *L. monocytogenes* на агаре для листерий по Оттавиани-Агости имеют зелено-синий цвет и окружены матовым ореолом (ISO, 2005a). Агар «Оксфорд» содержит в качестве селективных агентов хлорид лития, циклогексимид, колистин, акрифлавин, цефотетан и фосфомицин, а типичные колонии разных видов листерий, выросшие на этом агаре, имеют маленький размер, черный цвет и окружены черным ореолом. Вторую селективную среду инкубируют при соответствующей температуре и исследуют после соответствующего времени инкубации. Предположительную *L. monocytogenes* субкультивируют и подтверждают при помощи соответствующих морфологических, физиологических и биохимических тестов, описанных в стандарте. Для учета надо использовать только метод, описанный в EN ISO 11290, часть 2 «Агар для листерий по Оттавиани-Агости» (ISO, 2005b).

Существуют две основных группы хромогенных питательных сред для листерий. Первая группа питательных сред использует хромоген, выявляющий активность β -D-глюкозидазы, которая характерна для видов *Listeria*, а формирование четкого ореола, окружающего колонии и свидетельствующего об использовании лецитина микроорганизмами, позволяет идентифицировать *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*. Среды этой группы включают ALOA и ALOA[®]-подобный агар. Во второй группе используется хромогенный субстрат, позволяющий обнаружить активность фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы С (PI-PLC). В этой группе агаров *L. monocytogenes* и

некоторые *L. ivanovii* расщепляют хромоген, а остальные виды *Listeria* остаются белыми. В некоторые среды этой последней группы добавляют сахар (ксилозу), что позволяет отличить *L. monocytogenes* от *L. ivanovii* по наличию желтого ореола, окружающего колонии *L. ivanovii*. *Listeria monocytogenes* развивают синие колонии (положительные по PI-PLC) без желтого ореола (отрицательные по ксилозе), а *L. ivanovii* образуют зеленовато-синие колонии (положительные по PI-PLC) с желтым ореолом (положительные по ксилозе). Колонии других видов *Listeria* имеют белый цвет (отрицательные по PI-PLC). Виды *L. monocytogenes*, отрицательные по ксилозе и PI-PLC, не описаны.

В методе FDA (Hitchins & Jinnemans, 2011) основной средой для обогащения культур является забуференный обогащающий бульон для листерий (ЗОБЛ), описанный в главе 10 аналитического руководства по микробиологии (APM), доступного в сети в режиме онлайн. Для улучшения буферизирующей способности в триптон-соевый бульон с основой из дрожжевого экстракта был добавлен монокалийфосфат, а для лучшего восстановления подвергнутых стрессу или поврежденных клеток была добавлена пировиноградная кислота. Анализируемые пробы были предварительно обогащены в ЗОБЛ в течение 4 часов при 30°C, затем были добавлены селективные средства, акрифлавин HCl (10 мг/литр), налидиксовая кислота (40 мг/литр) и циклогексимид (50 мг/литр), чтобы продолжить обогащение при 30°C в течение 48 часов. Обогащенные образцы наносили штрихами через 24 и 48 часов на чашки с селективным/дифференциальным агаром, содержащими эскулин и трехвалентное железо, например, с агаром «Оксфорд» или его модификацией, агаром MOX или со средой литий хлорид/фенилэтанол/моксалактам (LPM) с добавлением Fe³⁺. В качестве факультативного варианта также рекомендуется вторичный хромогенный агар. Предположительную *L. monocytogenes* субкультивируют и подтверждают при помощи соответствующих морфологических, физиологических и биохимических тестов, описанных в методе.

Метод USDA-FSIS использует двухэтапное обогащение (USDA-FSIS, 2013a; 2013b): «первичное» обогащение проводится в среде Университета Вермонта (СУВ), содержащей налидиксовую кислоту и акрифлавин, а «вторичное» обогащение в бульоне Фрейзера, содержащем налидиксовую кислоту, хлорид лития и акрифлавин или в смешанной среде из морфолина-пропансульфоновой кислоты и забуференного обогащающего бульона для листерий (МПСК-ЗОБЛ). Условия инкубации описаны в этом методе и различаются в зависимости от матрикса, выбранного для этапа обогащения. После селективного обогащения культуры высевают в чашки с агаром MOX, содержащим хлорид лития, колистин и моксалактам. Предположительную *L. monocytogenes* субкультивируют и подтверждают при помощи соответствующих морфологических, физиологических и биохимических тестов, описанных в методе.

Для метода NMKL (NMKL, 2007), первичное обогащение в половинном бульоне Фрейзера при 30°C в течение 24 часов сопровождается вторичным обогащением в полноценном бульоне Фрейзера при 37°C в течение 48 часов. Культуры, полученные после двух этапов обогащения, высевают в чашки со специфической средой для выделения *L. monocytogenes*, включая агар ALOA[®], среду с кровавым агаром для *Listeria monocytogenes* (LMBA), хромогенную агаровую среду для листерий, которая в значительной степени похожа на ALOA[®], или другую твердую селективную среду для выделения листерий (в качестве факультативного варианта). Предположительную *L. monocytogenes* субкультивируют и подтверждают при помощи соответствующих морфологических, физиологических и биохимических тестов, описанных в стандарте.

Все приготовленные культуральные среды должны быть подвергнуты контролю качества, например, по стандарту ISO 11133 (ISO, 2003; 2009).

Первоначальная и традиционная процедура выделения *L. monocytogenes* из животных тканей включала прямой посев образцов на овечий кровяной агар или другие обогащенные среды и параллельное использование методики «холодного обогащения» с еженедельным субкультивированием материала до 12 недель (Gray *et al.*, 1948; Quinn *et al.*, 1999; Walker, 1999). В настоящее время методика холодного обогащения не применяется. Выделение микроорганизма посредством прямого посева на твердую питательную среду относительно просто, если численность целевого объекта в том участке, который обычно стерилен, достаточно велика, как это бывает при септической форме заболевания, но затруднительно, если микроорганизм представлен малочисленно, например, при энцефалитической форме листериоза или при значительной контаминации образцов посторонней микрофлорой.

При заболевании животного листериозом образцы следует выбирать в соответствии с клиническими проявлениями: материал из участков повреждений в печени, почках или селезенке в случае септической формы, спинномозговая жидкость, варолиев мост и продолговатый мозг в случае ромбэнцефалита, и плацента/ее ворсинки, сычужное содержимое плода или выделения из матки в случае аборта. При обработке, хранении и транспортировке образцов необходимо поддерживать температуру охлаждения (4°C). Если образец уже был заморожен, его надо сохранять замороженным до проведения анализа.

Протокол, рекомендуемый для выделения *L. monocytogenes* из материала, полученного при вскрытии трупов животных, описан ниже в том варианте, как он был первоначально опубликован (Eld *et al.*, 1993).

1.1.1. Процедура выделения из некротического материала от животных

- i) 10–25 г или мл образца (в зависимости от природы материала и его количества) помещают в 225 мл обогащающего бульона для листерий. При получении образцов от животных с листериозом количество материала для помещения в питательную среду может быть значительно меньше, чем рекомендуемое для пищевых образцов (25 г или мл). Если это так, то в питательную среду необходимо вносить как можно больше исследуемого материала (целевое количество 10–25 г или мл) (Eld *et al.*, 1993). (Основа обогащающего бульона для листерий: 30 г триптон-соевого бульона Oxoid, 6 г дрожжевого экстракта Difco, 1 литр воды. Селективные агенты: 2,3 мг акрифлавина, 9,2 мг налидиксовой кислоты, 11,5 мг циклогексимида; селективные агенты добавляют к 225 мл основы бульона).
- ii) Бульон инкубируют при 30°C в течение 48 часов.
- iii) 0,1 мл обогащенной бульонной культуры распределяют на плоском агаре «Оксфорд».
- iv) Чашки инкубируют при 37°C. Бактериальный рост исследуют через 24 и 48 часов.
- v) Пять колоний (или все доступные при их меньшем числе) проверяют на типичные признаки роста *L. monocytogenes*: форма клеток, окраска по Граму, гемолитическая активность на кровяном агаре (дефибринированная лошадиная кровь), подвижность кувырками при 20°C, сбраживание глюкозы (+), рамнозы (+) и ксилозы (–), гидролиз эскулина и выработка каталазы.

1.1.2. Альтернативный протокол

На национальном уровне для ветеринарных лабораторий существуют альтернативные протоколы. Здесь приводится один пример:

- i) Проверяют, не загрязнен ли образец посторонними включениями из окружающей среды. При наличии сомнений, поверхность материала стерилизуют на горелке Бунзена или прижигают раскаленным железом, например, для образца мозга, контаминированного

при извлечении из черепа. Анализируемую пробу гомогенизируют в забуференной пептонной воде измельчителем для получения стабильной первичной суспензии. Любой образец, который еще не был измельчен, сохраняют при 2–8°C.

ii) Первичную суспензию высевают в обогащающий бульон, например, бульон с сердечно-мозговым экстрактом или бульон Розенау. Если предполагают, что образец не контаминирован, то параллельно суспензию распределяют для прямого наблюдения на модифицированном агаре PALCAM и колумбийском овечьем кровяном агаре с налидиксовой кислотой (15 мг/литр) и сульфатом колистина (10 мг/литр). Основу агара PALCAM модифицируют следующим образом: готовят добавку, содержащую 100 000 международных единиц полимиксина В сульфата, 20 мг цефтазида, 5 мг акрифлавина хлоргидрата, 200 мг циклогексимида и 10 мл стерильной воды, стерилизуют ее фильтрацией и добавляют 10 мл к 1000 мл основы среды PALCAM.

iii) Материал инкубируют при 37±1°C в течение 24 часов для жидкой культуры и 24–48 часов для твердых сред.

iv) Спустя 24 часа, если в чашках Петри появляются колонии, похожие на *Listeria*, то их отбирают для дальнейшего подтверждающего тестирования. Если колонии не видны, чашки Петри повторно инкубируют при тех же условиях в течение 24 часов. Обогащающий бульон штрихами наносят на агар PALCAM и колумбийский овечий кровяной агар с налидиксовой кислотой (15 мг/литр) и сульфатом колистина (10 мг/литр), инкубируя материал при 37±1°C в течение 24 часов. Чашки с культурами со стандартным и модифицированным агаром PALCAM выставляют на воздух на 1 час, чтобы цвет среды изменился с розового на начальный фиолетовый. Спустя 24 часа виды *Listeria* вырастают на этих последних средах в виде маленьких и/или очень маленьких серовато-зеленых или оливково-зеленых колоний от 1,5 до 2 мм в диаметре, иногда с черными центрами, но всегда с черными ореолами. Спустя 48 часов виды *Listeria* проявляются в виде зеленых колоний с диаметром приблизительно 1,5–2 мм, которые имеют центральное вдавление и окружены черным ореолом. На колумбийском овечьем кровяном агаре с налидиксовой кислотой и сульфатом колистина виды *Listeria* растут в виде серых и плоских колоний, а *L. monocytogenes* дает небольшую гемолитическую зону, которую можно наблюдать после удаления колонии. *Listeria ivanovii* проявляет слабую гемолитическую активность вокруг колоний.

v) Спустя 48 часов и 72 часа, если в чашках Петри появляются колонии, похожие на *Listeria*, то их отбирают для дальнейшего подтверждающего тестирования. Если в чашке имеется пять предположительных колоний *Listeria*, то для подтверждения выбирают все колонии. Если в чашке имеется больше пяти таких колоний, то для подтверждения их принадлежности к *Listeria* выбирают только пять колоний.

Этот последний протокол имеет две модификации для фекалий, силоса и плацентарной оболочки.

Для фекалий и силоса, готовят суспензию в половинном бульоне Фрейзера в пропорции 1/10 (25 г на 225 мл) и инкубируют материал при 30±1°C в течение 24 часов. Спустя 24 часа эту суспензию штрихами наносят на модифицированный агар PALCAM и получают субкультуру в бульоне Фрейзера, внося материал в пропорции 0,1 мл на 10 мл среды. Среды инкубируют при 37±1°C в течение 24 часов. Спустя 48 часов этот инкубированный бульон Фрейзера штрихами наносят на модифицированный агар PALCAM, инкубируя чашки Петри при 37±1°C в течение 24–48 часов. Перед штриховым нанесением на модифицированный агар PALCAM бульон Фрейзера повторно инкубируют при 37±1°C в течение 24 часов.

Для плацентарной оболочки испытуемую пробу разбавляют в забуференной пептонной воде в соотношении 1/2 и 1/5 и прямым образом выделяют микроорганизм на селективных

средах. В таком случае стандартный агар PALCAM заменяют на модифицированный агар PALCAM.

ALOA[®] и другие хромогенные среды для *Listeria* обеспечивают рост большинства видов *Listeria* и могут быть использованы в клинической микробиологии для скрининга фекалий человека.

1.2. Общепринятые методы идентификации

Затем типичные колонии видов *Listeria* на чашках Петри с вышеупомянутым селективным/дифференциальным агаром отбирают для дальнейшей идентификации на уровне видов, используя батарею тестов. Тесты включают окрашивание по Граму, каталазу, подвижность (как во влажном препарате при фазово-контрастной микроскопии, так и при посеве на полутвердый агар для определения подвижности [0,2–0,4%] или в U-образную пробирку Грейги, гемолиз и использование углеводов (таблицы 3 и 4).

Чтобы наблюдать кувыркающуюся подвижность, готовят препарат в височной капле из молодой бульонной культуры, например, из триптон-соевого бульона с дрожжевым экстрактом и инкубируют материал при комнатной температуре в течение 8–24 часов. Когда для оценки подвижности используется полутвердый агар после посева уколом (приблизительно 1 см) и инкубации при 20–28°C, *Listeriae* в виде скоплений прорастают через среду, которая становится мутной. Приблизительно на 0,5 см ниже поверхности агара, наблюдается характерный слой усиленного роста, напоминающий зонтик. Это происходит из-за лучшего развития *Listeria* в аэробных условиях, в отличие от строгих анаэробных условий.

Для определения гемолитической активности необходимо использовать плоский агар, содержащий лошадиную и овечью кровь. После инкубации при 37°C в течение 24 часов и посева уколом в питательную среду, *L. ivanovii* дает широкую зону гемолиза. Зона гемолиза, образуемая *L. Monocytogenes*, узка и часто не выходит за края колоний. В таком случае для лучшей интерпретации целесообразно удалять колонии. Редкие штаммы *L. monocytogenes* не проявляют гемолитической активности.

Тест Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) представляет собой очень полезный инструмент, помогающий идентифицировать виды *Listeria* в выделенном бактериальном материале. Он используется в стандартах ISO и некоторых протоколах AOAC, но считается факультативным в методах USDA-FSIS. Тест довольно прост для выполнения и считывания результатов. Он состоит из штрихового нанесения β-гемолитического *Staphylococcus aureus* (ATCC[™] штамм 49444[®] или 25923[®], NCTC[™] штамм 7428[®] или 1803[®]) и *Rhodococcus equi* (ATCC[™] штамм 6939[®], NCTC[™] штамм 1621[®]) одиночными прямыми параллельными линиями на чашки с овечьим кровяным агаром или чашки с двухслойным агаром и очень тонким верхним слоем кровяного агара. Штрихи должны быть достаточно разделенными, чтобы провести тест с надежным результатом и контролировать штаммы *Listeria*, наносимые перпендикулярно в промежутке между двумя индикаторными микроорганизмами, не касаясь их (расстояние 1–2 мм). После инкубации в течение 24–48 часов при 35–37°C (12–18 часов, если используется двойной агар с тонким покровным слоем кровяного агара) положительная реакция заключается в образовании расширенной зоны β-гемолиза на пересечении испытуемых/контрольных и индикаторных штаммов. *Listeria monocytogenes* дает положительную реакцию с полосами *S. aureus* и отрицательную реакцию с полосами *R. equi*, тогда как *L. ivanovii* дает противоположные реакции (Quinn *et al.*, 1999).

В пределах рода *Listeria* были таксономически описаны десять видов: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii* – подвид *ivanovii* и подвид *londoniensis*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. Grayi* – подвид *grayi* и подвид *murrayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* – подвид *fleischmannii* и подвид *coloradensis*. Новые

виды (*L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* – подвид *fleischmannii* и подвид *coloradensis*) выделены, главным образом, из образцов внешнесредового происхождения и встречаются редко (den Bakker *et al.*, 2013). *Listeria fleischmannii* можно выделить из образцов первичной продукции, а также из почвы растений и/или погребов.

Таблица 3. Принципиальные характеристики основных видов *Listeria*

Тест	Реакция биологических видов <i>Listeria</i>
Окрашивание по Граму	Положительная
Морфология клеток	Короткие (0,4–0,5 мкм × 0,5–2,0 мкм) неспорообразующие палочки с немногочисленными перитрихияльными жгутиками
Условия роста	Аэробные и факультативные анаэробные
Подвижность	Положительная подвижность кувырками или в виде зонтика в агаре для оценки подвижности при 20–28°C, отрицательная при 37°C
Каталаза	Положительная
Оксидаза	Отрицательная
Гидролиз эскулина	Положительная
Индол	Отрицательная
Уреаза	Отрицательная

Таблица 4. Дифференциация основных видов *Listeria*

Виды	β-гемолиз	Выработка кислоты из			Реакция Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMF) на овечьей крови с	
		L-рамнозы	D-ксилозы	D-маннитола	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i> подвид <i>ivanovii</i>	+	-	+	-	-	+
<i>L. ivanovii</i> подвид <i>londoniensis</i>	+	-	+	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	-	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-
<i>L. grayi</i> подвид <i>grayi</i>	-	-	-	+	-	-
<i>L. grayi</i> подвид <i>murrayi</i>	-	+	-	+	-	-

V: вариабельно; (+): слабая реакция; +: >90% положительных реакций; -: отсутствие реакции.

Дополнительными методами по выбору считаются серология, макрорестрикция ДНК, мультилокусное секвенирование (МЛС) и анализ патогенности модели на животных моделях. Был проведен обзорный анализ теста на вирулентность для *L. monocytogenes* и сделана попытка определить вирулентность этого вида листерий (Liu *et al.*, 2007).

1.3. Методы быстрой идентификации

Приведенные ниже протоколы включают общепринятые и нетрадиционные тесты, имеющиеся в рыночной продаже, а также наборы для анализа нуклеиновых кислот, помогающие в идентификации *L. monocytogenes* (Jadhav *et al.*, 2012). Полимеразная цепная

реакция (ПЦР), нацеленная на ген *hly*, оказалась достаточно чувствительной и быстрой методикой для подтвержденной идентификации предположительной *L. monocytogenes*, выделенной на чашках с селективным/дифференциальным агаром (Gouws & Liedemann, 2005).

Альтернативные методы для идентификации листерий, доступные на коммерческой основе, были аттестованы одной или несколькими признанными системами формальной проверки, такими как AOAC, MicroVal, Nordval International и Afnor Certification (Afnor certification, 2013; AOAC, 2012; Lombard & Leclercq, 2011; Microval, 2013; NordVal international, 2013). Этот список постепенно растет по мере того, как появляются новые технологии, используемые применительно к потребностям лабораторий. Регулярные обновления этих альтернативных методов публикуются в режиме онлайн на веб-сайтах аттестующих органов вместе с ключевыми ссылками и сферой действия, статусом аттестации и сертификацией метода.

Были разработаны хромогенные подтверждающие среды для идентификации *L. monocytogenes*. Они, главным образом, основаны на обнаружении активности PI-PLC и ферментации L-рамнозы. Выбирают предположительную колонию *L. monocytogenes* и размазывают ее в форме полосы (2 см). *Listeria monocytogenes* демонстрирует активность PI-PLC и желтую зону ферментации L-рамнозы. Редкие штаммы *L. monocytogenes* не ферментируют рамнозу.

Доступна поступившая в продажу система для предположительной идентификации видов *Listeria*, выделенных из образцов пищевой цепочки. Она альтернативна обычному биохимическому тестированию видов *Listeria* при выделении бактерий стандартными методами. Эта система основана на миниатюрных аналитических микропробирках, смонтированных на полоске или карте, которые дают реакции сбраживания, утилизации или ферментативной активности, которые можно наблюдать через 24 часа при температуре 37°C. При биохимической идентификации дифференциация видов *Listeria* основана на коде, полученном после добавления к каждой группе из нескольких тестов числовых значений, а также на дополнительном анализе, например, на реакциях, полученных в тесте CAMP и гемолитических характеристиках, которые оценивают отдельно. Коммерческий метод, основанный на выявлении присутствия или отсутствия ариламидазы, позволяет отличить *L. monocytogenes* от *L. innocua*, не прибегая к дальнейшим анализам на гемолитическую активность.

Идентификацию проводят посредством секвенирования 16S рДНК или генов *iap* (Bubert *et al.*, 1999). После выделения ДНК коммерческими наборами конечной точкой анализа является ПЦР для 16S ДНК или генов *iap*. Продукты ПЦР очищают и секвенируют в лаборатории при помощи секвенатора. Последовательность сравнивают с базой данных ДНК, доступной через Интернет, используя программу BLAST (основное средство поиска локального выравнивания). Недавно к онлайн-руководству АРМ по методам FDA был добавлен анализ по методике количественной ПЦР для идентификации микробных культур, который можно найти по адресу: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm279532.htm>.

Альтернативной методикой для быстрой идентификации видов *Listeria* является времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF), которая все больше и больше используется в микробиологических лабораториях. Системы идентификации MALDI-TOF основаны на сравнении масс-спектра испытуемой микробной культуры со справочными базами данных. Для культур листерий были разработаны несколько баз данных и стратегий идентификации, что позволяет точно идентифицировать только род *Listeria*, но не виды (Farfour *et al.*, 2012).

1.4 Альтернативные методы классического выявления *Listeria*

Для обнаружения *L. monocytogenes* в образцах из пищевой цепочки было разработано множество методов, основанных на иммунологических тестах или на распознавании нуклеиновых кислот. (Jadhav *et al.*, 2012). Некоторые из них были аттестованы одной или несколькими признанными системами формальной проверки, такими как AOAC, MicroVal, Nordval International и Afnor Certification (Afnor certification, 2013; AOAC, 2012; Lombard & Leclercq, 2011; Microval, 2013; NordVal international, 2013; Sewell *et al.*, 2003). Регулярное обновление этих альтернативных методов публикуется в режиме онлайн вместе с ключевыми ссылками, статусом аттестации и сертификацией метода.

Целевые последовательности ДНК для диагностики включают ген *hly*, ген *iap* и ген 16S рДНК в формате ПЦР и количественной ПЦР. Метод USDA-FSIS MLG8A.05¹ описывает использование ПЦР для скрининга пищевых продуктов на *L. monocytogenes* и основан на использовании системы ВАХ для скрининга на *Listeria monocytogenes*.

Альтернативные методы на основе ПЦР для обнаружения *Listeria* должны пройти аттестацию и применяться в соответствии с контролем качества согласно рекомендациям МЭБ, описанным в Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных и правилах или рекомендациях, описанных в региональной или национальной инструкции.

1.5. Тестирование на чувствительность к противомикробным средствам

Listeria monocytogenes изначально устойчива к цефалоспорином (цефазолин, цефтиофур, цефпиром), хинолонам (налидиксовая кислота и ранний фторхинолон, например, офлоксацин), фосфомицин и клиндамицин. Приобретенную резистентность удавалось выявить редко. Большая часть культур проявляет чувствительность к пенициллину G, амоксициллину, аминогликозидам (гентамицин), тетрациклином, фениколам, триметоприму и сульфаниламидам, рифампицину, гликопептидам (ванкомицин) (Granier *et al.*, 2011; Troxler *et al.*, 2000). С очень низкими частотами была определена резистентность к тетрациклину из различных источников: говяжье мясо, предприятия по переработке говядины, свиная щековина и баранина. Резистентность к эритромицину также была идентифицирована в образцах материала из окружающей среды и пищевых продуктов. Удивительно, что до сих пор не обнаружено никакой резистентности к пенициллину (Granier *et al.*, 2011).

Тестирование чувствительности обычно показано для тех бактериальных патогенов, которые вызывают инфекционные заболевания, требующие антибактериального лечения, а также в той ситуации, когда идентификация микроорганизма недостаточна для надежного прогноза эффективности такого лечения.

При лечении инфекции, вызванной *L. monocytogenes*, чувствительность к противомикробным средствам все еще предсказуема, и терапия в широком масштабе проводится на эмпирической основе. Тем не менее, тест на чувствительность может быть полезным инструментом для эпидемиологических исследований или для оценки новых лекарственных препаратов с противомикробным действием. Кроме того, поскольку *L. monocytogenes* считается прихотливым организмом в отношении условий роста, методология тестирования на чувствительность к противомикробным средствам и интерпретация результатов плохо стандартизированы, а немногочисленные опубликованные исследования иногда сомнительны.

Недавно, эти проблемы методологии были рассмотрены двумя разными учреждениями. Европейская организация Eucast (www.eucast.org), в 2011 году предложила методологию для тестирования чувствительности *L. monocytogenes* посредством диффузии на дисках. В США два документа из Института клинических и лабораторных стандартов

¹ Доступно из Qualicon-Dupont, Уилмингтон, США.

(www.clsi.org): M31-A3 (относительно тестов на чувствительность бактерий от животных) и M45-A2 (относительно тестов на чувствительность бактерий, требовательных к условиям роста) содержат руководящие указания и критерии интерпретации для оценки восприимчивости *L. monocytogenes* методом микроразведения в бульоне.

1.6. Методы субтипирования

Большая часть нормативных методов выявления *L. monocytogenes* не требует специфического субтипирования бактериальных культур. Однако схемы субтипирования могут быть полезными при исследовании эпидемических вспышек, отслеживании угроз из окружающей среды и санитарно-эпидемиологическом надзоре.

Listeria monocytogenes может быть субтипирована различными способами, включая серотипирование, фаготипирование, рестрикционный анализ ДНК (использование для разделения фрагментов или рестриктаз с частыми разрезами и общепринятого гель-электрофореза, или рестриктаз с редкими разрезами и гель-электрофореза в пульсирующем поле [PFGE]), а также типирование, основанное на секвенировании нуклеиновых кислот, и микроматричный анализ.

В связи с необходимостью использования специфических реактивов, строгих процедур гарантии качества и весьма сложного оборудования, рекомендуется, чтобы субтипирование культур *L. monocytogenes* было передано в соответствующие справочные центры. Эти справочные лаборатории могут действовать на национальном, региональном или международном уровне. На международном уровне существует только партнерский центр всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по листериозу пищевого происхождения (Институт Пастера, Париж).

1.6.1. Серотипирование и геносеротипирование (группа ПЦР)

Согласно протоколу Зеелигера и Хене (Seeliger and Hühne, 1979) штаммы *L. monocytogenes* на основе комбинаций их соматических (O) и жгутиковых (H) антигенов могут быть отнесены к 13 различным сероварам (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, и 7). Серотипирующие антигены являются общими для *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* и *L. welshimeri*. Известен только один коммерческий набор со всем этими антифакторными сыворотками (Denka Seiken, Токио, Япония). Хотя все эти виды считаются потенциально патогенными, большинство клинических культур, полученных от человека (>95%), принадлежат к трем сероварам: 1/2a, 1/2b, и 4b. Серотипирование имеет плохую дискриминационную способность по сравнению с другими методами субтипирования, но может предоставить ценную информацию, облегчающую исключение бактериальных культур, которые не являются частью вспышки или проведение исследований в спорадических случаях заболевания у человека. Бактериальные культуры из пищевых продуктов и из источников, связанных с окружающей средой, часто не поддаются типированию с использованием коммерческих стандартных антифакторных сывороток и требуют применения дополнительных сывороток. В таком случае типирование можно провести в партнерском центре ВОЗ по листериозу пищевого происхождения (Институт Пастера, Париж).

Поскольку серотипирование не рентабельно, требуя технической экспертизы и применения антисывороток, вместо него часто используют быстрый и воспроизводимый метод на основе ПЦР (Doumith *et al.*, 2004), который нацелен на четыре фрагмента ДНК гена *prs*: *ORF2110*, *ORF2819*, *lmo1118* и *lmo0737*. Этот последний метод геносеротипирования теперь признан на международном уровне и официально разрешен для применения. Все виды *Listeria*, кроме *L. rocourtiae* обладают амплифицируемым фрагментом гена *prs*. Серологическая группа ПЦР Па включает штаммы сероваров 1/2a и 3a (амплификация фрагментов ДНК *prs* и *lmo0737*); серологическая группа ПЦР Пб включает штаммы сероваров 1/2b, 3b, и 7 (амплификация фрагментов ДНК *prs* и

ORF2819); серологическая группа ПЦР Пс включает штаммы сероваров 1/2с и 3с (амплификация фрагментов ДНК *prs*, *lmo0737* и *lmo1118*); серологическая группа ПЦР IVb включает штаммы сероваров 4b, 4d и 4е (амплификация фрагментов ДНК *prs*, *ORF2819* и *ORF2110*). И, наконец, серологическая группа ПЦР L включает штаммы других сероваров *L. monocytogenes* и другие виды кроме *L. rocourtiae*.

1.6.2. Клеточные линии

После серотипирования, *L. monocytogenes* можно классифицировать на три группы клеточных линий, из которых группа линий I охватывает серовары 1/2b, 3b, 4b, 4d и 4е; группа линий II включает серовары 1/2a, 1/2с, 3a, и 3с, а группа линий III включает серовары 4a, 4с и атипичный серовар 4b (Wiedmann *et al.*, 1997). Линейный статус сероваров 4ab и 7 остается неясным из-за ограниченной доступности таких штаммов. В пределах группы линий III после сравнительного анализа последовательностей генов *actA* and *sigB* были идентифицированы три генетически различных подгруппы (IIIА, IIIВ и IIIС). Фенотипически штаммы из группы линий IIIа ведут себя как типичные *L. monocytogenes*, обладая способностью ферментировать рамнозу, тогда как штаммы из групп линий IIIВ и IIIС явно дефицитны по утилизации рамнозы. Группы линий I и II документированы в случаях клинического листериоза у человека, а группа линий III редко проявляет связь со вспышками инфекции, несмотря на частое выделение из пищевых и внешнесредовых образцов. Листерии, выделенные из группы клеточных линий I и II, по-видимому, в равной степени распространены среди животных.

1.6.3. Анализ хромосомной ДНК рестрикционными эндонуклеазами

Поскольку эти ферменты высоко специфичны в распознавании нуклеотидных последовательностей, полученные в результате фрагменты расщепления ДНК, имеющие разный размер и разную электрофоретическую подвижность, отражают геномные различия, приводящие к специфическим «отпечаткам пальцев» среди сходных в других отношениях штаммов. Вследствие специфичности рестрикционных эндонуклеаз метод обладает высокой воспроизводимостью. Самыми полезными из рестрикционных эндонуклеаз, испытанных на *L. monocytogenes* в многоцентровом исследовании ВОЗ, оказались *HaeIII*, *HhaI* и *CfoI* (Bille & Rocourt, 1996; Graves *et al.*, 2007). Однако из-за потенциально большого числа сайтов распознавания ферментом в бактериальном геноме иногда развиваются сложные отпечатки пальцев с перекрывающимися или плохо разрешимым бендингом, затрудняющим интерпретацию. Поэтому методика недостаточна для сравнения большого количества паттернов штаммов, или для построения динамических баз данных (Graves *et al.*, 2007).

Комбинируя РА с саузерн-гибридизацией, используя меченые хромосомные зонды, можно выявить только специфические рестрикционные фрагменты, связанные с соответствующими хромосомными локусами, что позволяет значительно уменьшить количество анализируемых фрагментов ДНК. Эта методика известна как анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДФ). Если используются рибосомные зонды РНК/ДНК, можно обнаружить только специфические рестрикционные фрагменты, связанные с хромосомными локусами для рРНК. Эта методика известна как риботипирование, она широко использовалась для субтипирования *L. monocytogenes*, главным образом, с помощью рестрикционной эндонуклеазы *EcoRI*. Однако эта методика оказалась менее эффективной для различения, чем фаготипирование, РА или мультилокусный ферментативный электрофорез (МФЭ). Компания Qualicon разработала автоматическую систему риботипирования RiboPrinter, которая генерирует, анализирует и сохраняет в памяти паттерны рибопринтинга бактерий, включая *Listeria*.

Когда для расщепления необрезанной хромосомной ДНК, такой как *ApaI*, *SmaI*, *NotI* и *AscI*, используются рестрикционные эндонуклеазы, которые делают нечастые разрезы, можно получить очень большие фрагменты. Из-за своего размера эти большие фрагменты

не разделяются при стандартном электрофорезе в агарозном геле. Однако при периодическом изменении направления электрического поля в геле через импульсы большие фрагменты могут «сползть» через агарозный матрикс и разделяться в соответствии с размером. Эта методика, известная под названием гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE), коренным образом изменила точное разделение фрагментов ДНК размером более 40 килобаз. Методика PFGE, примененная к субтипированию *L. monocytogenes*, оказалась способной к дифференциации на очень высоком уровне с хорошей воспроизводимостью. PFGE особенно полезен для субтипирования культур серотипа 4b, которые плохо поддаются субтипированию при использовании многих других методов. Основными недостатками методики PFGE являются время, необходимое для завершения процедуры (2–3 дня), потребность в большом количестве дорогостоящих рестриктаз и в специализированном, дорогостоящем оборудовании (Graves *et al.*, 2007). Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC) в США создали PulseNet, сеть, объединяющую органы здравоохранения и лаборатории, занимающиеся регулятивным контролем питания на национальном и/или международном уровне, которые систематически занимаются субтипированием патогенных бактерий пищевого происхождения на основе PFGE. Лаборатории сети PulseNet используют высоко стандартизированные протоколы PFGE для *Listeria* с рестрикционными эндонуклеазами *ApaI* и *AscI* и могут быстро сравнивать через Интернет паттерны PFGE из разных локализаций. *Listeria monocytogenes* была включена в PulseNet в 1999 году (Swaminathan, 2001), а последний протокол опубликован в 2009 году (Graves *et al.*, 2001, Halpin *et al.*, 2009). В Европе Европейский центр по профилактике и контролю заболеваний (ECDC) и Европейское управление по контролю качества продуктов питания (EFSA) создают базы данных с профилями PFGE для *L. monocytogenes*, выделенной от человека в случаях заболевания, из пищи и ветеринарных источников, соответственно, с целью исследования межнациональных или международных эпидемических вспышек.

1.6.4. Типирование на основе последовательностей нуклеиновых кислот

Хотя были опубликованы некоторые сообщения об анализе последовательности единичных генов, как инструмента для типирования штаммов *L. monocytogenes*, недавно было введено определение аллельной вариабельности множественных генов, которое представляется основой для очень перспективной методологии субтипирования этого микроорганизма. Этот подход описан как перспективный для нескольких других микроорганизмов, и известен под названием мультилокусное секвенирование (МЛС) (Chenal-Francisque *et al.*, 2011; Ragon *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2003; Spratt, 1999). Прямая амплификация и нуклеотидное секвенирование показали хорошую способность к дифференциации анализируемых штаммов. Поскольку МЛС основано на нуклеотидной последовательности, оно имеет высокую разрешающую способность в дифференциации и дает совершенно однозначные результаты. МЛС позволяет определить клональный комплекс, что дает возможность оценить структуру популяции и филогению в пределах популяции или бактериальных культур. Некоторая часть этого клонального комплекса была вовлечена в эпидемические вспышки или связана с клиническими формами, что дает дополнительную информацию о бактериальных изолятах для управления риском. Новая информация формирует полногеномное секвенирование, которые можно использовать в научных исследованиях, и молекулярное наблюдение над *Listeria* в ближайшие годы может изменить наши представления (den Bakker *et al.*, 2010).

2. Серологические реакции

Серологические реакции на выявление антител не нашли традиционного применения для диагностики листериоза. Они очень ненадежны из-за утраты чувствительности и специфичности. Многие форматы анализа, применяемые для доказательной диагностики листериоза у человека через бактериальную культуру, включая твердофазный

иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), дот-блот анализ и микроагглютинацию (реакция Грубера-Видаля) были в основном неудачны даже при отсутствии иммунодепрессии. Наблюдалась значительная перекрестная реактивность с аллергенными детерминантами других грамположительных микроорганизмов. С другой стороны, *L. monocytogenes* является повсеместным микроорганизмом в окружающей среде, благодаря чему животные и люди регулярно контактируют с ним. Многие здоровые люди (2–6%) являются кишечными носителями листерий, а сывороточные антитела против *L. monocytogenes* по данным литературы встречаются в популяции с высокой частотой (до 53%). Частота носительства у животных близка к показателям для человека, некоторые различия зависят от биологического вида носителей, причем уровень инфицирования немного повышается в зимний сезон, когда животные находятся в помещении, по сравнению с сезоном выпаса животных на открытом воздухе (Husu, 1990; Iida *et al.*, 1991).

То открытие, что гемолизин *L. monocytogenes*, листериолизин О (ЛЛО), является главным фактором вирулентности, способным стимулировать выработку антител, недавно возобновило интерес к возможности использования серологических тестов в диагностике листериоза, особенно при вовлечении центральной нервной системы, при стерильной крови и спинномозговой жидкости, а также при перинатальном листериозе. Непрямой твердофазный ИФА, основанный на выявлении антитела против ЛЛО, был использован для диагностики экспериментального листериоза у овец (Low *et al.*, 1992). Однако ЛЛО как аллерген близок ко многим цитолизинам, включая стрептолизин О (СЛО) от *Streptococcus pyogenes*, пневмолизин от *S. pneumoniae* и перфринголизин от *Clostridium perfringens*. Проблемы перекрестной реактивности антитела против ЛЛО с этими цитолизинами, особенно СЛО и пневмолизином, осложняли разработку надежных и специфичных серологических тестов, основанных на выявлении антитела против ЛЛО. Кроме того, антитела против ЛЛО были найдены у некоторой части здоровых людей и больных с другими бактериальными, грибковыми или вирусными инфекциями (в общей сложности 27%), хотя и в более низких титрах, чем у больных с листериозом. Поглощение диагностических антисывороток с СЛО дает лишь частичный эффект в устранении всей перекрестной реактивности. Эти экспериментальные анализы были использованы в некоторых эпидемиологических исследованиях, а также для поддержки диагностики в случаях инфекций с вовлечением центральной нервной при отрицательных результатах культивирования. В качестве диагностического антигена в дот-блот анализе вместо ЛЛО дикого типа были исследованы рекомбинантные формы ЛЛО. (Lhopital *et al.*, 1993). Необходима полная аттестационная проверка этих серологических тестов для диагностики листериоза, но для этого должен быть создан биобанк сывороток.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Разработка действенных вакцин против *L. monocytogenes* оказалась весьма затруднительной, поскольку для эффективной иммунной реакции на этот внутриклеточный микроорганизм требуются эффекторные Т-клетки. В целях создания защиты от инфекции *L. monocytogenes* с использованием разных подходов на лабораторных животных исследуются экспериментальные вакцины, но эти разработки все еще далеки от создания доступных вакцин, эффективных для человека и сельскохозяйственных животных. Эти экспериментальные подходы включают иммунизацию плазмидной ДНК, сигнализацию CD40 и убитыми нагреванием *L. monocytogenes*, посев ЛЛО-дефицитных мутантов вместе с инкапсулированным в липосомы ЛЛО и иммунизацию антигенами листерий вместе с ИЛ-12.

В качестве эффективного вакцинного вектора для экспрессии, секреции и внутриклеточной доставки чужеродных антигенов, способных индуцировать мощные иммунные реакции против вирусных антигенов и опухолевых клеток, также рассматривают генетические модификации *L. monocytogenes*.

Однако самым реальным и практичным средством для снижения заболеваемости листериозом у человека являются мероприятия, связанные с обработкой пищевых продуктов и приготовлением пищи, которые не только уменьшают риск инфицирования листериями, но и способствуют профилактике других распространенных инфекций пищевого происхождения, вызванных такими возбудителями как *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* и *Campylobacter*. Эти профилактические мероприятия включают тщательную кулинарную обработку сырых продуктов животного происхождения, хранение сырого мяса отдельно от овощей, приготовленных блюд и готовых кулинарных продуктов, тщательное мытье сырых овощей перед едой, мытье рук, ножей и разделочных досок после обработки сырых продуктов, а также отказ от использования непастеризованного молока или продуктов из такого молока. Лица с ослабленным иммунитетом, пожилые люди, беременные женщины и другие лица из группы повышенного риска по листериозу должны избегать продуктов, эпидемиологически связанных с этой болезнью, например, мягких сыров, рыбы холодного копчения и паштетов. Эти люди также должны избегать употребления других готовых продуктов, если они предварительно не будут пропарены до горячего состояния.

Пищевая индустрия и органы здравоохранения играют основную роль в предотвращении листериоза пищевого происхождения, разрабатывая и внедряя эффективные программы НАССР, направленные на уменьшение присутствия *L. monocytogenes* во всех критических точках пищевой цепочки, связанных с производством и распределением продуктов питания (от сельского хозяйства до рынка).

Более того, отсутствие хорошо разработанных и проверенных вакцин для животных означает, что эффективная борьба с листериозом у животных достижима посредством охраны окружающей среды для предотвращения условий, способствующих распространению инфекции. Хорошо установлена связь между силосным кормом и листериозом и, поскольку *L. monocytogenes* повсеместно распространена в природе, а животные и птицы действуют как переносчики инфекции, бактериальная контаминация силоса не является редкостью. Поэтому при заготовке силоса необходимо уделять внимание снижению вероятности размножения листерий, которому способствует среда с уровнем pH более 5, особенно при неэффективном брожении и сопутствующем росте плесневых грибов. Необходимо прилагать все усилия к тому, чтобы производить силос хорошего качества, с ранним скашиванием травы, ее минимальным загрязнением почвой или фекалиями и обеспечением оптимального анаэробного брожения, что возможно при уровне pH ниже 5,0, когда рост всех видов *Listeria* подавлен. Необходимо отбирать лучший кормовой силос, особенно для овец, отбраковывая материал с явными признаками контаминации плесенью. Кроме того, необходимо удалять в отходы часть силосного материала, находящуюся в промежутке нескольких сантиметров от вершины, передней и боковых частей открытой кипы или контейнера с силосом. Недоеденный силос также необходимо удалять в отходы (Low & Donachie, 1997).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ANDREWS W. (2002). Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. In: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

AFNOR² Certification, NF Validation (2013). Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse. Liste des méthodes validées en 2013. La Plaine Stade de France, France. <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-agroalimentaire/agroalimentaire.html>

² AFNOR: Association Française de Normalisation

AOAC³ International (2012). Official methods of analysis. Chapter 17: *Listeria*. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

BILLE J. & ROCOURT J. (1996). WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study – rationale and set-up of the study. *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 251–262.

BONAZZI M., LECUIT M. & COSSART P. (2009). *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cell. Microbiol.*, **11**, 693–702.

BUBERT, A., HEIN I., RAUCH M., LEHNER A., YOON B., GOEBEL W. & WAGNER M. (1999). Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4688–4692.

CABANES D., SOUSA S., CEBRIÁ A., LECUIT M., GARCÍA-DEL PORTILLO F. & COSSART P. (2005). Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *The EMBO Journal*, **24** (15), 2827–2838.

CAMPERO C.M., ODEÓN A.C., CIPOLLA A.L., MOORE D.P., POSO M.A. & ODRIOZOLA E. (2002). Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J. Vet. Med. [B]*, **49**, 379–383.

CHENAL-FRANCISQUE, V., LOPEZ J., CANTINELLI T., CARO V., TRAN C., LECLERCQ A., LECUIT M. & BRISSE S. (2011). Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 1110–1112.

CLARK R.G., GILL J.M. & SWANNEY S. (2004). *Listeria monocytogenes* gastroenteritis in sheep. *NZ Vet. J.*, **52**, 46–47.

COSSART P. & TOLEDO-ARANA A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes infection*, **10**, 1041–1050.

DEN BAKKER H.C., CUMMINGS C.A., FERREIRA V., VATTA P., ORSI R. H., DEGORICIA L., BARKER M., PETRAUSKENE O., FURTADO M.R. & WIEDMANN M. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, **11**, 688.

DEN BAKKER H.C., MANUEL C.S., FORTES E.D., WIEDMANN M. & NIGHTINGALE K.K. (2013). Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradensis* subsp. nov., a novel *Listeria fleischmannii* subspecies isolated from a ranch in Colorado. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, DOI/10.1099/IJS,0.048587-0

DONNELLY C.W. & NYACHUBA D.G. (2007). Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 215–256.

DOUMITH M., BUCHRIESER C., GLASER P., JACQUET C. & MARTIN P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3819–3822.

³ AOAC: Association of Official Analytical Chemists

- DUNBAR S.A., VANDER ZEE C.A., OLIVER K.G., KAREM K.L. & JACOBSON J.W. (2003). Quantitative multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 245–252
- DUSSURGET O., CABANES D., DEHOUX P., LECUIT M., BUCHRIESER C., GLASER P. & COSSART P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.*, **45**, 1095–1106.
- ELD K., DANIELSSON-THAM M.-L., GUNNARSSON A. & THAM W. (1993). Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. *Vet. Microbiol.*, **36**, 185–189.
- FARFOUR E., LETO J., BARRITAU M., BARBERIS C., MEYER J., DAUPHIN B., B. LE GUERN B., LEFLECHE A., BADELL E., GUISO N., LECLERCQ A., LE MONNIER A., LECUIT M., RODRIGUEZ-NAVA V., BERGERON E., RAYMOND J., VIMONT S., BILLE E., CARBONNELLE E., GUET-REVILLET H., LECUYER H., BERETTI J. L., VAY C., BERCHE P., FERRONI A., NASSIF X. & JOIN-LAMBERT O. (2012). Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 2702–2707.
- FENLON D.R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 537–543.
- GAHAN C.G.M. & HILL C. (2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1345–1353.
- GOUWS P.A. & LIEDEMANN I. (2005). Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Technol. Biotechnol.*, **43**, 201–205.
- GRANIER S.A., MOUBARECK C., COLANERI C., LEMIRE A., ROUSSEL S., DAO T.T., COURVALIN P. & BRISABOIS A. (2011). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl. Envir. Microbiol.*, **77**, 2788–2790.
- GRAVES L.M. & B. SWAMINATHAN (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, **65**, 55–62.
- GRAVES L.M., SWAMINATHAN B. & HUNTER S.B. (2007). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 283–304.
- GRAY M.L., STAFSETH J., THORP JR F., SHOLL L.B. & RILEY W.F. (1948). A new technique for isolating Listerellae from the bovine brain. *J. Bacteriol.*, **55**, 471–476.
- HALPIN J.L., GARRETT N.M., RIBOT E.M., GRAVES L.M. & COOPER K.L. (2009). Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**, 293–298.

HIRD D.W. & GENIGEORGIS C. (1990). *In: Listeriosis in Food Animals: Clinical Signs and Livestock as a Potential Source of Direct (Nonfoodborne) Infection for Humans*, Miller A.J., Smith J.L. & Somkutti G.A., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 31–39.

HITCHINS A.D. & JINNEMAN K. (2011). Chapter 10. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. *In: Bacteriological Analytical Manual*. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>

HUSU J.R. (1990). Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 276–282.

IIDA T., KANZAKI M., MARUYAMA T., INOUE S. & KANEUCHI C. (1991). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 873–875.

ISO⁴ (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290-1, Geneva, Switzerland.

ISO (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. International Standard ISO 11290–2, Geneva, Switzerland.

ISO (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. International Standard ISO/TS 11133-1, Geneva, Switzerland.

ISO (2005a). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290-1, Amendment 1, Geneva, Switzerland.

ISO (2005b). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. International Standard ISO 11290-2, AMENDMENT 1, Geneva, Switzerland.

ISO (2009). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media International Standard ISO/TS 11133-2, Geneva, Switzerland.

JACQUET C., GOUIN E., JEANNEL D., COSSART P. & ROCOURT J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 616–622.

JACQUET C., DOUMITH M., GORDON J. I., MARTIN P. M., COSSART P. & LECUIT M. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.*, **189**, 2094–2100.

JADHAV S., BHAVE M. & PALOMBO E.A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods*, **88**, 327–341.

⁴ ISO: International Organization for Standardization

- JOHNSON G.C., FALES W.H., MADDOX C.W. & RAMOS-VERA J.A. (1995). Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 223–228.
- LHOPITAL S., MARLY J., PARDON P. & BERCHE P. (1993). Kinetics of antibody production against listeriolysin O in sheep with listeriosis. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1537–1540.
- IIDA T., KANZAKI M., MARUYAMA T., INOUE S. & KANEUCHI C. (1991). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 873–875.
- LIU D., LAWRENCE M.L., AINSWORTH A.J. & AUSTIN F.W. (2007). Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. J. Food. Microbiol.*, **118**, 101–115.
- LOMBARD B. & LECLERCQ A. (2011). Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. *Food Analytical Methods*, **4**, 163–172.
- LOPEZ J., KARPOWICZ E., HARGROVE W. & BECKER S. (1992). Comparison of the Intestinal Cell Uptake of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Human Clinical Cases of Listeriosis and From Meat Products, 92nd General Meeting Abstracts, American Society for Microbiology, P-38, 330.
- LOPEZ J., SINGH U., KARPOWICZ E., HARGROVE W. & ADAMS S. (1993). Comparison of the Intracellular Survival and Multiplication of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Human Clinical Cases of Listeriosis and From Meat Products, 93rd General Meeting Abstracts, American Society for Microbiology, P-80, 346.
- LOW J.C., DAVIES R.C. & DONACHIE W. (1992). Purification of listeriolysin O and development of an immunoassay for diagnosis of listeric infection in sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2505–2708.
- LOW J.C. & DONACHIE W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.*, **153**, 9–29.
- MICROVAL⁵ (2013). MICROVAL validated and certified alternative microbiological methods. NEN, Microval Secretariat, Delft, The Netherlands. <http://www.microval.org/contact.html>
- NMKL⁶ (2007). Method no. 136, Fourth Edition, *Listeria monocytogenes*. Detection in foods and feeding stuffs and enumeration in foods. NMKL, Secretary General, c/o Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norway.
- NORDVAL INTERNATIONAL (2013). List of methods. NMKL, Oslo, Norway. <http://www.nmkl.org/>
- PAINTER J. & SLUTSKER L. (2007). Listeriosis in humans. *In: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 85–110.

⁵ Microval: European Validation and Certification Organisation

⁶ NMKL: Nordic Committee on Food Analysis

- QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby International, Edinburgh, Scotland, UK.
- RAGON M., WIRTH T., HOLLANDT F., LAVENIR R., LECUIT M., LE MONNIER A. & BRISSE S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.*, **4**:e1000146.
- ROBERTS A.J. & WIEDEMANN M. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 904–918.
- ROCOURT J. & BILLE J. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.*, **50**, 67–73.
- SALCEDO C., ARREAZA L., ALCALA B., DE LA FUENTE L. & VAZQUEZ J.A. (2003). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 757–762.
- SCHLECH W.F. 3RD, LAVIGNE P.M., BORTOLUSSI R.A., ALLEN A.C., HALDANE E.V., WORT A.J., HIGHTOWER A.W., JOHNSON S.E., KING S., NICHOLLS E.S. & BROOME C.V. (1983). Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 203–206.
- SEELIGER H. P. R. & HÖHNE K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Methods in Microbiology, Volume 13, Bergan T. & Norris J. R., eds. Academic Press, London, UK, New York, USA.
- SEWELL A.M., WARBURTON D.W., BOVILLE A., DALEY E.F. & MULLEN K. (2003). The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **81**, 123–129.
- SLEATOR R.D., WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., GAHAN C.G.M., ABEE T. & HILL C. (2005). A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, **55**, 1183–1195.
- SPRATT B.G. (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 312–316.
- SWAMINATHAN B. & GERNER-SMIDT P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.*, **9**, 1236–1243.
- TROXLER R., VON GRAEVENITZ A., FUNKE G., WIEDEMANN B. & STOCK I. (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.*, **6**, 525–535.
- USDA-FSIS⁷ (2012). Procedure for the use of a *Listeria monocytogenes* PCR Screening Test. In: Microbiology Laboratory Guidebook, 8A.05, 1–4. Available online: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook#.UcLqZazHnlc>

⁷ USDA-FSIS: United States Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service

USDA-FSIS (2013a). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. *In: Microbiology Laboratory Guidebook*, 8.09 pp 1–20, Available online:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook#.UcLqZazHnlc>

USDA-FSIS (2013b). Flow charts for Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. *In: Microbiology Laboratory Guidebook*, 8 appendix 1.01. Available online:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook#.UcLqZazHnlc>

WALKER J.K. & MORGAN J.H. (1993). Ovine ophthalmitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Vet. Rec.*, **132**, 636.

WALKER R.L. (1999). *Listeria*. *In: Veterinary Microbiology*, Hirsh D.C. & Zee Y.C., eds. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, USA, 225–228.

WESLEY I.V. (2007). Listeriosis in animals. *In: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 55–84.

WIEDMANN M., ARVIK T., BRUCE J.L., NEUBAUER J., DEL PIERO F., SMITH M.C., HURLEY J., MOHAMMED H.O. & BATT C.A. (1997). Investigation of a listeriosis epizootic in sheep in New York State. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 733–737.

WIEDMANN M., BRUCE J.L., KEATING C., JOHNSON A.E., MCDONOUGH P.L. & BATT C.A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.*, **65**, 2707–2716.