

**ПОДХОДЫ К КЛАССИФИКАЦИИ ИЗОЛЯТОВ *Listeria monocytogenes* ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ****И.Ю. ЕГОРОВА**

Патогенность листериозных культур принято определять качественно при постановке кератоконъюнктивальной пробы на морских свинках. Этим методом штаммы можно разделить на две основные группы — патогенные и непатогенные, что, в свою очередь, не позволяет проводить внутривидовое типирование патогена, необходимое для установления источника инфекции и путей ее распространения, а также оценку эпидемической значимости изолятов, выделяемых из объектов внешней среды и пищевой продукции. Целью представляемой работы было изучение патогенности различных культур *Listeria monocytogenes* и разработка подходов к созданию системы классификации изолятов листерий по вирулентности для аутбредных белых мышей. Обнаружено, что сезоны года, состав и вид питательных сред не оказывают существенного влияния на показатели вирулентности для использованных лабораторных животных. При этом установлено, что наиболее объективным показателем для проведения внутривидового типирования изолятов *L. monocytogenes* служит LD<sub>50</sub>. На основе анализа результатов определения LD<sub>50</sub> для белых аутбредных мышей у 30 культур *L. monocytogenes* разработана классификация изолятов листерий по их вирулентности. С использованием предложенной классификации показана неоднородность вида *L. monocytogenes* по проявлению вирулентных свойств в отношении белых аутбредных мышей. Разработанные подходы к оценке вирулентности культур *L. monocytogenes* позволили провести дифференциацию изолятов листерий по патогенности.

**Ключевые слова:** *Listeria monocytogenes*, белые мыши, вирулентность, LD<sub>50</sub>.

Как известно, при возникновении любого заболевания большую роль играет вирулентность возбудителя, которую следует рассматривать как фенотипический признак, проявляющийся в способности инфекционного агента вызывать поражение клеток человека или животного. Она служит индивидуальным показателем, отражающим степень проявления патогенности как качественной характеристики микроорганизма и может изменяться под влиянием как экологических факторов, так и естественного состояния внутренней среды в организме хозяина. Вирулентные свойства бактериального штамма зависят от выработки определенных токсических веществ, на что, в свою очередь, влияет способ заражения патогеном, условия его жизнедеятельности при проникновении в макроорганизм или при культивировании в специфических питательных средах, а также от физиологического и иммунологического статуса хозяина, подвергшегося заражению (1).

Классически патогенность листериозных культур принято определять качественным методом — постановкой кератоконъюнктивальной пробы на морских свинках (2). Это дает возможность разделить культуры на две основные группы (патогенные и непатогенные), но не позволяет провести внутривидовое типирование, необходимое для установления источника инфекции и путей ее распространения, а также оценку эпидемической значимости изолятов, выделяемых из объектов внешней среды и пищевой продукции.

Для этих целей в большинстве случаев используют величину LD<sub>100</sub> и LD<sub>50</sub> для лабораторных животных. Сравнением этих показателей для различных штаммов устанавливают степень их сходства, эпидемическую и эпизоотическую опасность. Наиболее эффективны такие подходы при внутривидовом типировании возбудителей особо опасных болезней животных и человека. Например, для классификации и проведения внутривидового типирования возбудителя сибирской язвы по показателям вирулентности

для лабораторных животных предложены три схемы — И.Н. Преснова, Г.И. Романова, Э.Н. Шляхова и Е.В. Груз (3-5). К сожалению, подобные схемы классификации при изучении биологии изолятов *L. monocytogenes* в настоящее время отсутствуют. В отечественной литературе имеются лишь отрывочные сведения об определении показателей вирулентности референс-культур и некоторых полевых изолятов листерий (2, 6-9). При этом все авторы отмечают неоднородность проявления вирулентных свойств листерий для лабораторных животных.

Целью представляемой работы было изучение патогенности различных культур *Listeria monocytogenes* и разработка подходов к созданию системы классификации изолятов листерий по их вирулентности для лабораторных животных.

**Материалы.** Использовали 30 штаммов и изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из разнообразных источников и на различных географических территориях в разное время.

Патогенность культур определяли постановкой кератоконъюнктивальной пробы на морских свинках. Для этого на конъюнктиву глаза животного наносили 1-2 капли бактериальной суспензии ( $10^9$  м.т./см<sup>3</sup>), которую готовили с использованием оптического стандарта мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва). За морскими свинками наблюдали в течение 10 сут. Патогенными признавали культуры, которые вызывали формирование гнойного кератоконъюнктивита в течение 2-5 сут после инокуляции возбудителя.

Вирулентность оценивали вычислением показателей LD<sub>100</sub> и LD<sub>50</sub> в биопробах на аутбредных белых мышах. Для заражения использовали бактериальную агаровую культуру в экспоненциальной фазе роста, из которой готовили 5-кратные серийные разведения на физиологическом растворе. Мышей объединяли в 5 групп (по 6 гол.) по принципу аналогов. Животным каждой группы вводили внутрибрюшинно препараты возбудителя ( $0,50 \pm 0,05$  см<sup>3</sup>, титры  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^6$  и  $1,6 \times 10^6$  м.т.).

Для получения достоверной информации о показателях вирулентности определяли содержание жизнеспособных клеток в первой заражающей дозе высевом серийных разведений на агаризованные питательные среды с вычислением по формуле:

$$C = \frac{\bar{X}_n + X_{n+1}}{1,1} \cdot \frac{1}{V} \cdot 10^n,$$

где  $C$  — число жизнеспособных клеток в 1 см<sup>3</sup> бактериальной суспензии;  $\bar{X}_n$  — среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при высеве из разведения  $10^{-n}$ ;  $\bar{X}_{n+1}$  — среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при высеве из разведения  $10^{-(n+1)}$ ; 1,1 — постоянный коэффициент;  $V$  — объем высеянной бактериальной суспензии;  $10^n$  — разведение бактериальной суспензии, используемое при определении числа жизнеспособных клеток.

За показатель LD<sub>100</sub> принимали минимальную из испытанных доз, вызывающую гибель 100 % взятых в опыт животных. Величину LD<sub>50</sub> рассчитывали по формуле Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (10).

**Результаты.** Перед разработкой подходов к классификации листерий по вирулентности для лабораторных животных оценивали патогенные свойства штаммов/изолятов листерий общепринятым способом — пробой Антона. Из 30 изучаемых штаммов/изолятов 29 вызывали формирование гнойного кератоконъюнктивита у морских свинок на 2-4-е сут

после инокуляции патогена. При этом два штамма вызывали гибель морских свинок на 8-10-е сут после постановки кератоконъюнктивальной пробы. Подобный феномен также наблюдали Р.В. Гребенюк с соавт. (6), изучавшие патогенность изолятов листерий, выделенных от диких животных и членистоногих.

Согласно данным литературы, наиболее доступной и удобной моделью для определения вирулентности листерий считается белая мышь. Установлено, что белые мыши с живой массой менее 18 г при заражении летальными дозами интрацеребрально и внутрибрюшинно погибают в 100 % случаев, при внутривенном и подкожном заражении — в 75 % случаев (2). Мы для оценки степени патогенности листерий использовали аутбредных белых мышей с живой массой 14-16 г. Показатели вирулентности определяли на животных обоих полов.

Известно, что вирулентность одного и того же штамма микроорганизма может варьировать в зависимости от условий получения культуры, метода заражения, массы тела животного, сезона года и других факторов (11). Поэтому на первом этапе мы изучили влияния состава питательных сред и сезонов года на показатели LD<sub>100</sub> и LD<sub>50</sub> для белых аутбредных мышей. Опыты проводили с использованием референс-штамма *L. monocytogenes* № 766 (I серогруппа). Бактериальную массу листерий получали с использованием твердых (триптон-соевый и дрожжевой триптон-соевый агары) и жидких (сердечно-мозговой бульон) питательных сред. Определение показателей LD<sub>100</sub> и LD<sub>50</sub> проводили в зимний и весенне-летний периоды (табл. 1).

**1. Показатели LD<sub>100</sub> и LD<sub>50</sub> референс-штамма *Listeria monocytogenes* № 766 (I серогруппа) для аутбредных белых мышей в зависимости от состава питательных сред и сезона года**

Питательная среда	Производитель	Сезон года	Вирулентность для белых мышей, м.т./гол.	
			LD <sub>100</sub>	LD <sub>50</sub>
СМБ	«Difco» (США)	Зима	4,00×10 <sup>8</sup>	3,58×10 <sup>7</sup>
СМБ	«Merk» (Германия)	Зима	> 3,75×10 <sup>8</sup>	1,97×10 <sup>7</sup>
СМБ	«Merk» (Германия)	Весна	> 5,65×10 <sup>8</sup>	2,97×10 <sup>7</sup>
ТСА	«HiMedia» (Индия)	Зима	> 5,75×10 <sup>8</sup>	3,03×10 <sup>7</sup>
ДТСА	«HiMedia» (Индия)	Весна	3,24×10 <sup>8</sup>	4,97×10 <sup>7</sup>

Примечание. СМБ — сердечно-мозговой бульон, ТСА — триптон-соевый агар, ДТСА — дрожжевой триптон-соевый агар; м.т./гол. — микробных тел в расчете на 1 голову.

Полученные данные свидетельствуют о том, что состав питательной среды и сезон года не оказывали существенного влияния на вирулентность листерий для аутбредных белых мышей с живой массой 14-16 г — значения LD<sub>100</sub> и LD<sub>50</sub> соответствовали одному числовому порядку. Однако необходимо отметить, что в некоторых случаях, определяя показатель LD<sub>100</sub> (как и в дальнейшем, когда устанавливали вирулентность полевых изолятов листерий), наблюдали выживание 1-2 особей в группах животных, зараженных максимальными дозами возбудителя, при гибели 100 % мышей, инфицированных меньшими дозами. Это согласуется с результатами экспериментов И.А. Бакулова с соавт. (2), показавшими, что иногда часть зараженных летальными дозами лабораторных животных выживает. По мнению авторов, это связано с индивидуальной устойчивостью, а также половой принадлежностью особей. Так, 93 % самцов морских свинок оказались устойчивыми к заражению возбудителем листериоза.

Анализ имеющихся в специальной литературе публикаций подтверждает, что в настоящее время чаще всего применяется значение LD<sub>50</sub>, тогда как LD<sub>100</sub> практически не используется. Для определения величины LD<sub>50</sub> требуется меньшее число животных, а учитываемые показатели, под-

вергнутые статистической обработке, более точны (12). В настоящем исследовании при создании схемы классификации изолятов листерий по вирулентности для аутбредных белых мышей в дальнейшем использовали только показатель LD<sub>50</sub>, позволяющий оперировать объективными данными. Для получения достоверной информации определяли верхние и нижние границы доверительного интервала, в котором с вероятностью 95 % находится действительная величина LD<sub>50</sub>. Значения LD<sub>50/max</sub> и LD<sub>50/min</sub> для некоторых полевых изолятов представлены в таблице 2.

## 2. Показатели LD<sub>50</sub> у некоторых штаммов/изолятов *Listeria monocytogenes* для аутбредных белых мышей

Условное обозначение штамма/изолята	Источник и год выделения	Показатель LD <sub>50</sub> , м.т./гол.	
		LD <sub>50/max</sub>	LD <sub>50/min</sub>
«А»	Пастбищный клещ, 1952	Не титруется <sup>а</sup>	Не титруется
61-06	Фекалии кабана, 2006	3,59×10 <sup>6</sup>	5,20×10 <sup>5</sup>
69-06	Лещ, 2006	2,32×10 <sup>7</sup>	4,63×10 <sup>6</sup>
71-06	Густера, 2006	2,82×10 <sup>7</sup>	5,51×10 <sup>6</sup>
76-06	Головной мозг овцы, 2006	1,82×10 <sup>7</sup>	3,64×10 <sup>6</sup>
134-08	Грунт подкормочных площадок, 2008	2,52×10 <sup>7</sup>	4,30×10 <sup>6</sup>
139-08	Фекалии кабана, 2008	2,18×10 <sup>7</sup>	4,35×10 <sup>6</sup>
243-09	Фекалии пятнистого оленя, 2009	2,67×10 <sup>6</sup>	5,34×10 <sup>5</sup>
311-07	Окунь, 2007	6,14×10 <sup>6</sup>	1,23×10 <sup>6</sup>
431-09	Фекалии пятнистого оленя, 2009	2,16×10 <sup>7</sup>	2,67×10 <sup>6</sup>
434-09	Фекалии кабана, 2009	1,23×10 <sup>6</sup>	1,78×10 <sup>5</sup>
488-09	Фекалии пятнистого оленя, 2009	5,00×10 <sup>7</sup>	8,52×10 <sup>6</sup>
633-09	Фекалии кабана, 2006	3,00×10 <sup>7</sup>	4,35×10 <sup>6</sup>
699-09	Фекалии пятнистого оленя, 2009	9,48×10 <sup>6</sup>	1,37×10 <sup>6</sup>
39-12	Кровь сердца аборт-плода КРС, 2012	1,16×10 <sup>7</sup>	1,69×10 <sup>6</sup>
Референс-штамм № 634 (II серогруппа)	Головной мозг овцы, 1978	1,35×10 <sup>8</sup>	2,69×10 <sup>7</sup>
Референс-штамм № 766 (I серогруппа)	Труп свиньи, 1955	6,64×10 <sup>7</sup>	1,33×10 <sup>7</sup>
12 <sup>с</sup>	Человек	2,30×10 <sup>6</sup>	2,00×10 <sup>6</sup>
138 <sup>б</sup>	Человек	3,20×10 <sup>6</sup>	2,95×10 <sup>5</sup>
Костюченко <sup>б</sup>	Человек	2,30×10 <sup>5</sup>	2,00×10 <sup>5</sup>
Нелюбова <sup>б</sup>	Человек	5,60×10 <sup>6</sup>	5,35×10 <sup>6</sup>

Примечание. КРС — крупный рогатый скот, а — показатель LD<sub>100</sub> выше 10<sup>9</sup> м.т./гол.; б — изоляты, полученные от больных людей, показатели LD<sub>50</sub> определены Б.И. Маракушей, К. Дарвишем и И.С. Тартаковским (1996; НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва).

Установлено, что изучаемые культуры отличались друг от друга по показателю LD<sub>50</sub>, хотя для большинства из них LD<sub>50/min</sub> и LD<sub>50/max</sub> находились в пределах 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> м.т./гол. На основе анализа результатов определения LD<sub>50</sub> у 30 культур *L. monocytogenes* была предложена схема дифференциации изолятов листерий по их вирулентности для белых аутбредных мышей.

Как оказалось, в зависимости от величины LD<sub>50/min</sub> и LD<sub>50/max</sub> изоляты разделяются на пять групп, которые условно можно обозначить как высоковирулентные штаммы (LD<sub>50/min</sub> и LD<sub>50/max</sub> в пределах 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> м.т./гол.), вирулентные (LD<sub>50/min</sub> и LD<sub>50/max</sub> — 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> м.т./гол.), умеренно вирулентные (LD<sub>50/min</sub> и LD<sub>50/max</sub> — 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> м.т./гол.), слабовирулентные (LD<sub>50/min</sub> и LD<sub>50/max</sub> — 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> м.т./гол.) и авирулентные, у которых LD<sub>50</sub> не титруется (LD<sub>100</sub> выше 10<sup>9</sup> м.т./гол.).

На основании разработанной нами схемы классификации изолятов *L. monocytogenes* по показателю LD<sub>50</sub> для белых мышей были оценены вирулентные свойства у 30 полевых изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из различных источников. Установлено, что изоляты, полученные от восприимчивых особей и диких животных-листерионосителей, относились, как правило, к группе высоковирулентных и вирулентных. В частности, изолят № 39-12, который вызвал в 2012 году в Нижегородской области вспышку листериоза среди поголовья крупного рогатого скота, сопровождающуюся абортами, вошел в группу вирулентных. Примеры дифференциации некоторых культур листерий представлены в таблице 3.

### 3. Дифференциация некоторых культур *Listeria monocytogenes* по степени патогенности в соответствии с предлагаемой классификацией

Условное обозначение штамма/изолята	LD <sub>50</sub> /min и LD <sub>50</sub> /max, КОЕ/гол.	Оценка вирулентности
№ 61-06	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	Высоковирулентный
№ 69-06	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	Вирулентный
№ 39-12	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	Вирулентный
Референс-штамм № 634 (II серогруппа)	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	Умеренно вирулентный
«А»	Не титруется	Авирулентный

Принадлежность некоторых штаммов *L. monocytogenes*, обнаруженных у представителей дикой фауны, к группам высоковирулентных и вирулентных культур, к которым относятся и клинически значимые изоляты листерий, выделенные от людей с различной патологией, позволяет оценить их как эпизоотически и эпидемически значимые. При наличии определенных факторов (иммунодефицитные состояния животных и человека, суровые и голодные зимы, стресс, беременность и т.п.) изоляты из этих групп могут вызвать вспышки листериозной инфекции не только среди животных, но также у человека.

Таким образом, разработанные нами подходы к оценке вирулентности культур *Listeria monocytogenes* позволяют проводить их дифференциацию по патогенности и могут быть использованы для характеристики эпизоотической и эпидемической значимости изолятов, выделяемых от животных-листерииносителей и из объектов внешней среды. Это, в свою очередь, позволит своевременно корректировать проводимые противоэпизоотические мероприятия.

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии,  
601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,  
e-mail: iegorova@list.ru

Поступила в редакцию  
5 марта 2013 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2013, № 4, pp. 70-75

#### APPROACH TO CLASSIFICATION OF *Listeria monocytogenes* ISOLATES ON THEIR VIRULENCE FOR THE EXPERIMENTAL ANIMALS

I. Yu. Egorova

All-Russian Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Pokrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail iegorova@list.ru  
Received March 5, 2013

doi: 10.15389/agrobiol.2013.4.70eng

#### Abstract

A pathogenicity of *Listeria* isolates is usually determined in the qualitative keratoconjunctival test on guinea pigs. That test allows to subdivided the strains into two main groups, i.e. pathogenic and non-pathogenic, but not to carry out an intraspecific typing of the pathogen, which is necessary for establishing the source of infection and the ways of its expansion, and also for the evaluation of epidemiological significance of isolates from the environment and food products. In our study, the pathogenicity of different *Listeria monocytogenes* cultures was investigated in test with outbred white mice, and the approach to *Listeria* classification is proposed on the base of the virulence manifested after an intraperitoneal injection of different bacterial culture. It is shown that the seasons, as well as the composition and type of media, used for bacteria cultivation, did not affect significantly the virulence of the isolates for laboratory animals. The LD<sub>100</sub> and LD<sub>50</sub> were estimated, and LD<sub>50</sub> was found to be the most reliable index for intraspecific typing of *L. monocytogenes* isolates. The LD<sub>50</sub> for white outbred mice was estimated in 30 cultures of *L. monocytogenes*. According to the LD<sub>50</sub>/min and LD<sub>50</sub>/max, all isolates were divided into five groups, which can be designated as a highly virulent strains (LD<sub>50</sub>/min and LD<sub>50</sub>/max within 10<sup>4</sup> to 10<sup>6</sup> colony-forming unit per animal), virulent strains (LD<sub>50</sub>/min and LD<sub>50</sub>/max of 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> CFU per animal), the strains of moderate virulence (LD<sub>50</sub>/min and LD<sub>50</sub>/max of 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU per animal) and low virulence (LD<sub>50</sub>/min and LD<sub>50</sub>/max within 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU per animal), and the avirulent ones, which LD<sub>50</sub> has not been titrated (LD<sub>100</sub> more then 10<sup>9</sup> CFU per animal).

Keywords: *Listeria monocytogenes*, white mice, virulence, LD<sub>50</sub>.

## REFERENCES

1. Borisov L.B., Smirnova A.M., Freidlin I.S. et al. *Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya, immunologiya* [Medical microbiology, virology, immunology]. Moscow, 1994.
2. Bakulov I.A., Vasil'ev D.A., Kolbasov D.V., Kol'pikova T.I., Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu. *Listerii i listerioz* [Listeria and listeriosis]. Ul'yanovsk, 2008.
3. Presnov I.N. *Veterinariya*, 1966, 7: 25-29.
4. Romanov G.I. *Materialy IX plenarnogo zasedaniya mezhdedomstvennoi komissii po bor'be s sibirskoi yazvoi «Voprosy effektivnosti protivosibireyazvennykh meropriyatii»* [Proc. IX Session of Interdepartmental Commission on Anthrax Control]. Moscow, 1974: 124-125.
5. Shlyakhov E.N., Gruz E.V. *Materialy X plenarnogo zasedaniya mezhdedomstvennoi komissii po bor'be s sibirskoi yazvoi «Dostizheniya i perspektivy bor'by s sibirskoi yazvoi v SSSR»* [Proc. X Session of Interdepartmental Commission on Anthrax Control]. Moscow, 1978: 97-99.
6. Grebenyuk R.V., Chirov P.A., Kadysheva A.M. *Rol' dikikh zivotnykh i krovososushchikh chlenistonogikh v epizootologii listerioza* [Role of wild animals and blood-sucking arthropods in epizootology of listeriosis]. Frunze, 1972.
7. Marakusha B.I., Darvish K., Tartakovskii I.S. *ZHMEI*, 1996, 3: 60-64.
8. Efimochkina N.R. *Emerdzhentnye bakterial'nye patogeny v pishchevoi mikrobiologii* [Emergent pathogenic bacteria in food microbiology]. Moscow, 2008.
9. Zaitseva E.A. *Sistema analiza mikrobiologicheskikh i molekulyarno-geneticheskikh markerov dlya vyyavleniya vysokovirulentnykh shtammov Listeria monocytogenes. Doktorskaya dissertatsiya* [Analysis of microbiological and molecular markers for indication of high-virulent strains of *Listeria monocytogenes*. DSc Thesis]. Moscow, 2010.
10. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh* [Statistics in microbiological examinations]. Leningrad, 1962.
11. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Stepanov A.V., Staritsin N.A., Pomerantsev A.P., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S. *Mikrobiologicheskaya diagnostika sibirskoi yazvy* [Microbiological diagnostics of anthrax]. Moscow, 1999.
12. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharechko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoi N.V., Kozhukhov V.V. *Sibirskaya yazva: aktual'nye aspekty mikrobiologii, epidemiologii, kliniki, diagnostiki, lecheniya i profilaktiki* [Actual aspects of anthrax: microbiology, epidemiology, symptomatology, diagnostics, treatment and profilaxy]. Moscow, 1999.