

Ștefan PLUGARU¹, Svetlana PRUDNICIONOC²,
Alexandru CALANCEA¹,
Olga COTEȚ², Elena ZARICIUC²

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
N. Testemițanu,

²Centrul Național Științifico-Practic
de Medicină Preventivă

LISTERIILE ȘI LISTERIOZA

Summary

Listerias and listeriosis (general aspects)

Listerias and its adjacent sicknesses are widely spread. In order to find listerias, in the republic of Moldova, laboratory researches are not conducted and the epidemiology and the role of the listerias within the marginal pathology are not studied. The majority of the specialists are not enough informed about the biology of the listerias, their role, in the infectious pathology and about contemporan microbiological methods of the diagnosis of the listerioses.

In this work-research we provide the contemporan classification of listerias we describe their morphobiological properties, including the morphology, their cultural and biochemical properties, their antigen structure, the factors of pathogen, the stability towards environment factors, we describe the sources of infection and the tools of transmission, the pathogenesis and the clinical forms.

In the section of microbiological diagnosis we give a research – list of the samples from, the environment and from the sick persons, we indicate the methods of the laboratory diagnosis, and we present the main tests for determining the gender and for making the difference between the forms. In conclusion its a description of actual situation in Republic of Moldova.

Key words: *marginal pathology, classification of listerias, factors of pathogen, sources of infection, clinical forms.*

Резюме

Листерии и листериоз

Листерии и вызываемые ими заболевания имеют повсеместное распространение. В Республике Молдова лабораторные исследования на выявление листерий не проводятся, эпидемиология и роль листерий в краевой патологии не изучены. Основная масса специалистов недостаточно информированы относительно биологии листерий, их роли в инфекционной патологии и в вопросах современных микробиологических методов диагностики листериозов.

В настоящей работе дана современная классификация листерий, описаны их морфобиологические свойства, включая морфологию, культуральные, биохимические свойства, антигенная структура, факторы патогенности, устойчивость к факторам внешней среды, описаны источники инфекции и механизмы передачи, патогенез и клинические формы.

В разделе микробиологической диагностики перечислены материалы исследуемые из внешней среды и от больного, указаны методы лабораторной диагностики, представлены основные тесты для определения рода и дифференциации видов. Описывается ситуация по данной проблеме в Республике Молдова.

Ключевые слова: *листерии, краевая патология, факторы патогенности, источники инфекции, патогенез, клинические формы.*

Introducere

Listeriile reprezintă microorganisme condiționat patogene, care pot cauza infecții grave la persoanele receptive. Germenii au fost descriși pentru prima dată în anul 1926 de către E.S. Murray, R. Webb, M. Swann, fiind izolați din sângele cobailor și a iepurilor infectați în timpul unei epizootii care a avut loc în crescătoria Universității din Cambridge (Anglia). Agentul izolat a fost numit *Bacterium monocytogenes*, din cauză că determina o monocitoză în sângele periferic.

În 1927 J. H. Pirie a izolat același agent de la unele rozătoare, în special de la popândăi, în Africa de Sud. Agentul care afecta grav ficatul a fost numit *Listerella hepatolytica*, în cinstea renumitului chirurg J. Lister. În 1940 este propusă denumirea speciei *Listeria monocytogenes*, care se păstrează și în prezent.

Agentul a fost izolat de la om pentru prima dată de către A. Nyfeldt în anul 1929, în cazul unei angine monocitare. Boala cauzată de acest agent se numește *listerioză*. A.F. Bilibin în 1949 descrie *listerioza la om* în Rusia, în cazul unei meningoencefalite cauzate de listerii. În 1950 *listerioza* este depistată în România de către V. Volintir, C. Ungureanu, V. Roșca la animale, iar în 1959 listeriile sunt izolate de la om în cazuri de angine, meningite, encefalite.

Clasificarea listeriilor

Conform determinantului Bergey's manual of systematic bacteriology, 2001, listeriile sunt apreciate în clasa *Bacilli*; ordinul *Bacillales*, familia *Listeriaceae*, genul *Listeria*, care reunește specii cu rol în patologia umană: *L. monocytogenes* (specia-tip) și *L. ivanovii*, precum și specii saprofite: *L. innocua*, *L. welshmeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. denitrificans*.

L. monocytogenes se diferențiază în 16 serovariante și 8 fagovaruri. Sero-

varurile 1, 3, 4 se divizează în subvariante. 90% din toate cazurile de listerioză la om sunt cauzate de serovariantele 1 și 4. În Europa de Est se depistează subvariantele 1/2a, 1/2b. În Europa Occidentală și SUA – 4a și 4b.

Caracteristica morfobiologică a listeriilor

Listeriile reprezintă bastonașe scurte, uneori cocobacterii (în culturi vechi – filamente), dispuse în lanțuri scurte (câte 3-5 exemplare din colonii R) sau sub aspect de palisadă, solitar, litere latine V, Y (din colonii S). Sunt mobili (peritrihi în culturi crescute la 18-22°C) și imobili (la 37°C și 4°C). Nu formează spori, capsulă. Se colorează gram pozitiv.

Sunt anaerobi facultativi, mezofili, însă se multiplică și la temperaturi joase, inclusiv în frigider. Se cultivă și pe medii uzuale, dar se multiplică lent. Creșterea este favorizată în medii de cultură artificiale solide, suplimentate cu glucoză, glicerină, extract de drojdii, ser, țesut hepatic.

Pentru inhibarea microflorei asociate sunt recomandate medii speciale selective cu antibiotice, coloranți, clorură de litiu, feniletanol ș.a. Aceleași suplimente se utilizează și în medii lichide pentru acumularea listeriilor, care se realizează la 30°C timp de 24-48 de ore. Acumulările la temperatura frigiderului și la 37°C necesită timp îndelungat (până la 7-10 zile și mai mult).

În prezent, diferite firme, inclusiv *Hi Media*, propun 13 variante de medii utilizate pentru cultivare, acumulare și diferențiere a listeriilor. Sunt recomandate mediile:

- agarul nutritiv și bulionul nutritiv cu 1% glucoză;
- geloză-tripton cu soie și extract din drojdii, hidrolizat de cazeină, glucoză (TSYEA) sau bulion cu aceeași ingrediente (TSYEB);
- bulionul Freizer – mediul selectiv care conține hidrolizat de cazeină, peptonă, extract apos din carne, extract de drojdii, esculină, componenți selectivi – acid nalidixic, acriflavină, hidroxid de sodiu pentru îmbogățirea primară, iar în concentrație dublă – pentru acumularea ulterioară a culturii pure;
- PALCAM – agar (polimixină – acriflavină – clorură de litiu – ceftazidimă – esculină – manitol – agar) – mediu selectiv, diferențial diagnostic pentru izolarea listeriilor;
- Oxford – agar, care conține peptonă de origine animalieră, amidon din porumb, clorid de sodiu, esculină, clorid de litiu, citrat feric amoniacal, glucoză agar. Componentele selective sunt acriflavina, plomixina B, ceftazidima. Este un mediu selectiv, diferențial diagnostic pentru izolarea listeriilor;

- mediu pentru determinarea lecitinazei – conține cărbune activat, suspensie de gălbenuș de ou;
- geloză sânge (cu sânge defibrinat de ovine) pentru determinarea hemolizei.

Listeriile formează colonii forma S sau R. Pe agarul Oxford coloniile sunt negre, iar pe mediul PALCAM coloniile au diametrul de 2 mm, de culoare verde-surie, cu centrul negru concav și halou negru pe fondul roșu al mediului. Înnegrirea coloniilor pe aceste medii se explică prin capacitatea listeriilor de a hidroliza esculina până la esculină care, reacționând cu sarea de fier, formează un sediment negru.

Pe geloză sânge listeriile formează o zonă îngustă de hemoliză completă (β).

Pe geloză semilichidă (0,2-0,4%) listeriile cresc sub aspectul unei „umbre inversate”.

În bulionul glucozat sau triptonizat culturile de listerii formează un sediment floconos, iar la o incubare prelungită se determină un depozit dens și aderent, care la agitare se ridică sub formă de tirbușon.

Listeriile sunt **biochimic** destul de active față de multiple glucide și alcooli poliatomici. Fermentează până la acid (fără gaz) glucoza, maltoza, ramnoza, levuloza, esculina, salicina; numai o parte din tulpinile izolate fermentează lent zaharoza, glicerina și lactoza.

Nu produc indol, nu coagulează laptele, hidrogen sulfurat se formează numai în medii care conțin aminoacizi cu sulf. Sunt catalazopozitive și oxidazonegative.

La listerii au fost puse în evidență 14 antigene somatice (O) termorezistente și 5 antigene flagelare termolabile, combinația dintre care face posibilă diferențierea lor în 16 serovariante și în subserovaruri descrise mai sus.

Factorii de patogenitate sunt prezentați la listerii prin **internalină** – o proteină membranară care facilitează pătrunderea bacteriilor în macrofagi și endoteliocite; **listeriolizina O** – o hemolizină, factorul principal de virulență; **fosfolipaze** cu rol în adeziune și invazie (penetrează peretele celular și pătrund în celule fiind protejate de acțiunea anticorpilor); generațiile descendente prin mecanisme speciale dereglează mobilitatea macrofagilor, determinând acumularea lor în sângele periferic.

Listeriile au o răspândire cosmopolită, fiind rezistente în mediul extern. Persistă 1-2 ani în stare uscată în sol (bălegar) și circa 3 ani la temperatura camerei. În apă rezistă până la un an. Suportă ușor temperaturile joase și se multiplică la temperaturi de refrigerare.

Sunt rezistente la mulți agenți chimici folosiți ca substanțe inhibitoare pentru microflora asociată

în procesul de izolare a listeriilor. Ele posedă o rezistență stabilă la acidul nalidixic și polimixina B.

Listerioza este o boală infecțioasă zoantropoză, determinată de listerii și caracterizată printr-un variat polimorfism al manifestărilor clinice și o mortalitate crescută printre nou-născuți și persoanele imunocompromise.

Agentul cauzal al listeriozei a fost izolat de la peste 90 de specii de animale sălbatice și domestice:

- de la multiple specii de rozătoare (șoareci de câmp, chițcani, șoareci de casă, șobolani cenușii ș.a.);
- de la iepuri, vulpi, nurci, veverițe, enoți, cerbi, mistreți;
- de la animale domestice (porci, bovine, oi, capre, cai, câini, pisici);
- de la păsări (gâște, găini, rațe, curci, porumbei, papagali, canari);
- de la pești și nevertebrate;
- din diferite substraturi naturale (sol, noroi, ape de canal, furaje; din alimente – lapte, ouă, carne și alte produse obținute de la animale bolnave).

Sursa infecției o constituie animalele bolnave și cele purtătoare de listerii, care elimină agentul cu urina, excrementele, secretul nazal, laptele și lichidul amniotic. Animalele se infectează pe cale alimentară și transmisivă prin intermediul artropodelor hematofage și în special a căpușelor.

Căile și condițiile principale de contaminare a omului cu listerii sunt diferite:

- *alimentară* – prin utilizarea produselor contaminate, insuficient prelucrate termic sau fără prelucrare termică (carne, produse din carne, produse lactate, pește, produse marine, legume, înghețată ș.a.);
- *contact direct* prin tegumente și membrane mucoase în rezultatul nerespectării regulilor de igienă personală în timpul îngrijirii animalelor și păsărilor bolnave, la contactul direct cu carnea crudă, prin intermediul produselor lactate contaminate în perioada fabricării și în condiții casnice;
- *aerogenă* – în timpul lucrului cu nutrețurile contaminate;
- *transmisivă* – prin mușcăturile căpușelor și altor insecte hematofage infectate;
- *transplacentală* – de la mame bolnave sau în timpul nașterii.

Listeriile pătrund în organismul omului prin membranele mucoase ale cavității bucale, căilor respiratorii, prin tegumentele lezate. Pe cale limfogenă listeriile diseminează la început în ganglionii limfatici, apoi în organele parenhimate (amigdale, ficat,

splină, suprarenale, creier), în care se dezvoltă granulome – listeriome cu necroză în centru. Intoxicarea și răspândirea limfogenă determină formele clinice și generalizarea posibilă a procesului infecțios.

Sunt descrise diferite forme clinice: anginozo-septică; oculoglandulară; septico-tifoidă; forme nervoase (meningite, encefalite, meningoencefalite); listerioza cutanată, caracteristică lucrătorilor din veterinarie. Primele trei forme au o evoluție benignă. Formele nervoase, în lipsa tratamentului adecvat, determină o letalitate de 50-70%. În listerioza gravidelor în 80% din cazuri se nasc copii morți.

În funcție de evoluția formelor clinice de boală, se deosebesc forme acute, subacute, cronice.

Diagnosticul de laborator

Examenului microbiologic sunt supuse diverse obiecte ale mediului și biosubstrate:

- produse alimentare: de origine animalieră (carne și produse din carne, lactate, cașcavaluri, brânză, produse acidolactice, unt); de origine vegetală (legume, produse finite și semifabricate din legume);
- obiecte din mediu (solul, apele de suprafață, apele reziduale, cele din fântâni);
- lavaje de pe suprafața interioară a frigiderelor și utilajului din rețeaua de comerț;
- furaje;
- de la bolnavi se recoltează biosubstrate în funcție de forma clinică: sânge, lichid cefalorahidian, mucozități rinofaringiene, punctat din ganglionii limfatici, secret vaginal; de la nou-născuți – meconiu; de la decedați se examinează fragmente de țesuturi (creier, splină, ficat, ganglioni limfatici).

Metodele examenului microbiologic

Microscopia are o valoare secundară din cauza polimorfismului listeriilor. În cazul meningitei listerioase în frotiuri din lichid cefalorahidian listeriile se pot detecta în aproximativ 40% din cazuri. Microscopia este mult mai utilă pentru studierea organelor animalelor decedate sau a nou-născuților decedați de listerioză. Frotiurile-amprente se fixează prin metode chimice și se colorează Gram sau Giemse. Listeriile se evidențiază sub forma unor bastonașe scurte, groase, gram pozitive, uneori ca filamente aranjate solitar sau în grupuri.

Izolarea și identificarea culturii pure. Listeriile se izolează utilizând mediile de cultură descrise mai sus.

Testul CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen) constă în capacitatea *L. monocytogenes* și *L. ivanovii* de a produce un factor difuzibil, care acționează

sinergic cu β -lizina stafilococică, determinând liza completă a hematiliilor de ovine sau bovine. Pentru *L. monocytogenes* se folosește *S. aureus*, iar pentru *L. ivanovii* – *Rhodococcus equi* din familia *Nocardiaceae*. Se pot utiliza discuri din hârtie de filtru, impregnate cu β -lizină stafilococică.

Identificarea serologică: cultura pură se testează în RA cu antiseriuri ale serovariantelor 1 și 4 (mai frecvent izolate de la om). Tipizarea moleculară se realizează în PCR. Se utilizează test-sisteme care permit determinarea *L. monocytogenes* virulente în substrat biologice de la bolnavi, în lapte și alte produse alimentare.

Anticorpii la bolnavii cu listerioză pot fi detectați din a doua săptămână de boală în RFC cu antigen standard (titrul diagnostic 1:5 și mai mult).

În Republica Moldova morbiditatea printre animale nu este studiată. Nutrețurile, materia primă, produsele de proveniență vegetală și animală, alte obiecte ale mediului nu se supun controlului de laborator pentru depistarea listeriilor. Nu se efectuează nici supravegherea sanitaro-epidemiologică a infecției menționate.

Morbiditatea cu listerioză printre persoanele mature, copii și femei gravide la fel nu este studiată, diagnosticul de laborator nu este implementat în practica laboratoarelor bacteriologice.

În prezent, în laboratorul de microbiologie sanitară a Centrului Național Științifico-Practic de Medicină Preventivă se efectuează cercetări microbiologice ale obiectelor mediului, inclusiv ale produselor alimentare în scopul depistării microorganismelor din genul *Listeria*. Rezultatele obținute vor permite argumentarea necesității introducerii în Standardul național a *L. monocytogenes* ca un indicator microbiologic de impurificare a produselor alimentare.

De asemenea, se presupune elaborarea unor recomandări metodice cu privire la depistarea agentului în cauză.

Tabelul 1

Teste pentru determinarea genului *Listeria*

Teste	Reacția
Mobilitatea la temperatura camerei	+
Catalaza	+
Hidrogen sulfurat	-
Acid din glucoză	+
Producerea indolului	-
Utilizarea citratului de sodiu	-
Ureaza	-
Voghes-Proskauer	+
Reacția cu roșu de metil	+

Legenda: „+” – reacție pozitivă; „-” – reacție negativă.

Tabelul 2

Teste pentru diferențierea speciilor

Specii	Caractere											
	Fermentare				CAMP		Hidroliza			Mobilitatea	Acetoina	Roșu de metil
	Manitol	Xiloza	Ramnoza	Hemoliza	<i>S. aureus</i>	<i>S. equi</i>	Catalaza	Esculina	Hipurat			
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. seeligeri</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>L. weslimeri</i>	-	+	V	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>L. grayi</i>	+	-	V	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Legendă: „+” – reacție pozitivă; „-” – reacție negativă; „V” – reacție variabilă.

Bibliografie

- Bălbăe N. Pozsgi, *Bacteriologia medicală*, București, 1985, p. 593-600.
- Buiu Dumitru, Neguț Marian, *Tratat de microbiologie clinică*, București, 1999, p. 689-695.
- Catimet B., Rocourt J., *Listeria. Protocole des travaux pratiques.*, Inst. Pasteur, Paris, 1994, p. 1-32.
- Roșca V et al., *Unele aspecte ale listeriozei umane*, în *Viața medicală*, 1970, nr. 9, p. 403.
- Voiculescu Marin Gh., *Boli infecțioase*, vol.2, București, 1990.
- Volintir V., Ungureanu C., *Identificarea listeriozei la animale în RPR.*, în *An. IPIA*, 1950, nr. 2, p.162.
- Алешукина А. В., *Медицинская микробиология*, Ростов на Дону, 2003, с. 278-284.
- Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Ширококов В.П., *Медицинская и санитарная микробиология*, Москва, 2003, с. 178-181.
- Москаленко В.Ф., *Биологические свойства и патогенный потенциал листерий, циркулирующих на Украине*, 2003.
- Поздеев О.К., *Медицинская микробиология*, Москва, 2001, с. 305-309.
- Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А., *Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика*, Москва, 2002.

Prezentat la 19.05.2009