

## МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ ЛИСТЕРИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Ескендинова С.З. , Каукабаева Г.К. , Мухлис Ш.Е. , Ахметкаримова Ж.С. 

ТОО «Национальный центр биотехнологии», Кургальжинское шоссе, здание 13/5, Астана, 010000, Казахстан

\*Автор для корреспонденции: eskendirova@biocenter.kz

## АБСТРАКТ

Листериоз это инфекционная болезнь людей и животных, вызываемая *Listeria monocytogenes*, характеризуется множеством источников проникновения возбудителя, разнообразием путей и факторов передачи, полиморфизмом клинических проявлений и высокой летальностью. Листерия уникальный пищевой патоген, поскольку имеет внутриклеточный жизненный цикл и характеризуется высокими адаптационными свойствами. В патогенезе инфекции важное значение имеют факторы патогенности *L. monocytogenes*, обеспечивающие их незавершенный фагоцитоз, внутриклеточный паразитизм, высокую скорость инфицирования клеток, формирование антибиотикорезистентности. Факторы вирулентности *Listeria monocytogenes* способствуют ее патогенности и действуют на различных этапах цикла инфицирования хозяина. Учитывая чрезвычайный полиморфизм клинических проявлений и уникальность биологии возбудителя актуальным направлением является совершенствование методов лабораторной диагностики и специфической иммунопрофилактики листериоза. В статье обобщены последние данные эпизоотологии, эпидемиологии и патогенеза листериозной инфекции, представлены основные факторы патогенности и вирулентности *Listeria monocytogenes* как ключевые мишени для совершенствования методов ускоренной идентификации листерии в пищевой продукции. Применение современных методов ускоренной идентификации листерий позволяет существенно сократить срок проведения анализа и повысить достоверность полученных результатов даже при низкой концентрации возбудителя в исследуемой пробе.

**Ключевые слова:** листериоз, иммунодиагностика, патогенез, вирулентность, антитела, возбудитель

## ВВЕДЕНИЕ

Листериоз это инфекционное заболевание человека и животных сапрозоонозного характера, возбудителем которого является *Listeria monocytogenes*. Заболеваемость листериозом невелика, однако учитывая тяжесть клинических проявлений и высокую летальность (до 20-40%), данная инфекция контролируется Всемирной организацией здравоохранения [1]. Листериоз из болезней, регистрируемых преимущественно среди животных, превратился в одну из наиболее значимых пищевых зооантропонозных болезней в мире [2,3]. *Listeria monocytogenes* является возможными контаминантами продовольственного сырья и пищевых продуктов, которые, как факторы передачи, играют ведущую роль в возникновении листериоза у людей. Вынужденная утилизация больших партий инфицированных пищевых продуктов (прежде всего, мясных и молочных) наносит огромный экономический ущерб многим странам [4,5].

*Listeria monocytogenes* относится к опасным бактериальным пищевым патогенам в мире, вызывающим тяжелые заболевания человека. Начиная с 80-х годов прошлого столетия в мире стали характерными эпидемические вспышки этой инфекции, связанные с употреблением уже готовых пищевых продуктов, контаминированных листериями. Так, описаны крупные вспышки в индустриально развитых странах Западной Европы (Франция, Великобритания, Швейцария, Финляндия) и Северной Америки (США, Канада) с числом пострадавших от нескольких десятков до 300 [6].

В настоящее время листериоз расценивается как опасная пищевая инфекция и, хотя по уровню заболеваемости (ежегодно в мире регистрируется около тысячи заболевших) он уступает сальмонеллёзу, кампилобактериозу и некоторым другим известным инфекциям с пищевым

путем передачи, значительно превосходит их по тяжести течения, отличается беспрецедентно высокой летальностью [7,8]. По данным Европейского агентства по пищевой безопасности в странах Европы с высоким уровнем лабораторной диагностики заболеваемость листериозом в период с 2006 по 2010 гг. составляла в целом 0,35 случая на 100 тыс. жителей [9]. Следует отметить, что тенденция увеличения регистрации случаев листериоза в развитых странах в последние годы сохраняется. Так, в Европейском Союзе в 2016 и 2018 гг. было сообщено о более чем 2,5 тыс. подтвержденных случаев заболевания людей, что соответствует 0,47 случ./100 тыс. жителей [10]. Вспышки листериоза с высокой летальностью среди людей регистрируют в мире по настоящее время: в ЮАР в 2017 г. при самой масштабной вспышке летальность достигла 20,4 % (193 из 948), в США в 2020 г. – 22,1 % (8 из 36), в Швейцарии в 2020 г. 29,4 % (10 из 34) [3]. Большинство вспышек были связаны с употреблением различных пищевых продуктов животного происхождения, контаминированных *L. monocytogenes*.

За период с 2010 по 2023 годы в Казахстане было зарегистрировано 36 очагов листериозной инфекции сельскохозяйственных животных. Максимальное количество неблагополучных очагов листериоза выявлены в Улытауской области 20 (55,6%), в Актюбинской области 5 (13,9%), по 3 (8,3%) очага выявлено в Алматинской и ЗКО, 2 (5,5%) очага в Туркестанской области. В Акмолинской, Жамбылской и Абайской областях выявлено по 1 (2,8%) очагу [11]. Наличие серопозитивных животных в популяциях крупного и мелкого рогатого скота во всех областях страны свидетельствует о циркуляции листерий на данных территориях (рисунок 1). Высокий уровень серопревалентности определен в Улытауской области: среди крупного рогатого скота 16,6%, среди мелкого рогатого скота 17,7%. В других областях этот показатель не превышал 15% [11].

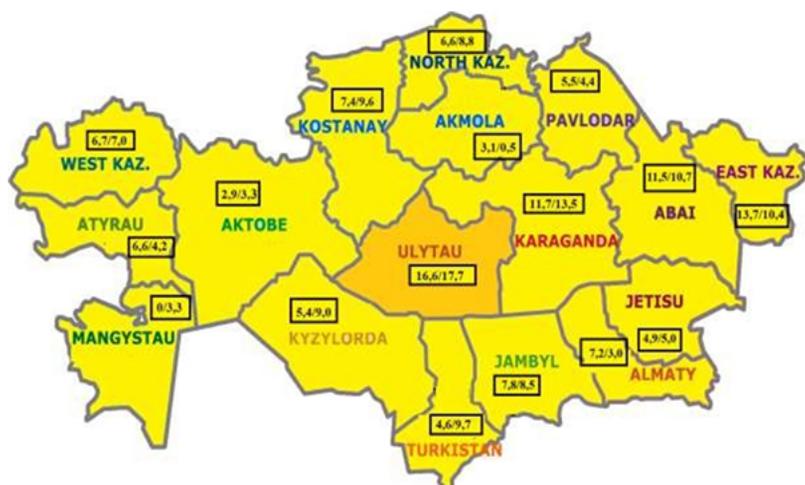


Рисунок 1. Показатели серопревалентности к листериозу сельскохозяйственных животных в РК (в числителе КРС, в знаменателе MPC) [11]

Эпидемиологическая ситуация по листериозу в РК характеризуется спорадическими случаями.

#### Эпизоотология и эпидемиология листериоза

Микроорганизмы рода *Listeria* относятся к семейству *Listeriaceae*, отряду *Bacillales*, классу *Bacilli*. Листерия – грамположительная бактерия, имеет генетические связи с *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Bacillus* [1-3]. Результаты секвенирования рРНК 16S позволили выделить эти бактерии в самостоятельное семейство *Listeriaceae* (ранее относились к *Corynebacteriaceae*, позже к *Lactobacillaceae*) [9]. Род *Listeria* в настоящее время представлен следующими видами: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. farberii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ilarinensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. marthii*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. cossartiae*, *L. fleischmannii*, *L. portnoyi*, *L. rustica*, *L. immobilis*, *L. booriae*, *L. thailandensis*, *L. goaensis*, *L. costaricensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. grayi*, *L. valentina*, *L. newyorkensis*, *L. swaminathanii*, *L. cornellensis* [5,10].

*Listeria monocytogenes* является основным возбудителем заболевания человека и животных, тогда как *L. ivanovii* является патогенным для животных [12]. Официальным открытием *Listeria* является 1924 г., когда группа исследователей (E. G. D. Murray, R. A. Webb, M. B. R. Swann) в Кембридже (Англия) выделила *L. monocytogenes* в качестве этиологического агента септического заболевания кроликов и морских свинок [7]. Поскольку листерии чрезвычайно устойчивы к действию неблагоприятных факторов и обладают уникальной пластичностью, источником и резервуаром возбудителя могут являться не только живые организмы, но и объекты внешней среды, в которых они способны сохраняться и размножаться длительное время. В связи с этим листериоз в настоящее время рассматривают как сапрозоонозную инфекцию.

В объектах внешней среды листерии могут не только длительно сохраняться, но и размножаться [12]. При этом листерии растут в широком интервале температур (от  $-4^{\circ}\text{C}$  до  $+42^{\circ}\text{C}$ ) и pH среды (от 5,5 до 9,5), хорошо переносят охлаждение и могут размножаться при  $+4 - +6^{\circ}\text{C}$  в почве, воде, на растениях [5,9]. В пищевых продуктах (колбасные изделия, сыры, молоко, мясо и др.) размножаются

при температуре бытового холодильника. При  $+70^{\circ}\text{C}$  гибнут через 20-30 мин., при  $+100^{\circ}\text{C}$  - через 3-5 мин [9,13]. *Listeria spp.* являются факультативно анаэробными бактериями, не образующими спор, около 0,5 мкм в ширину и 1 мкм - 1,5 мкм в длину. *Listeria spp.* обычно подвижны из-за перитрихальных жгутиков в диапазоне температур от  $24^{\circ}\text{C}$  до  $28^{\circ}\text{C}$ , но неподвижны выше  $30^{\circ}\text{C}$  [12,14]. *Listeria spp.* также обладают способностью переносить солевые условия (NaCl) до 20% (вес/объем [w/v]) и растут в диапазоне pH 4,4-9,6 [13,14]. Эти условия роста способствуют их универсальности для роста и выживания в экстремальных условиях окружающей среды, возникающих на предприятиях по переработке пищевых продуктов, и становятся серьезной проблемой для пищевой промышленности.

К листериозу восприимчивы все виды домашних (крупный рогатый скот, овцы, свиньи, лошади) и многие виды диких животных, грызуны, домашняя (куры, гуси, утки) и дикая птица [1-3]. Наиболее восприимчивы молодые и беременные животные. Источником возбудителя инфекции являются больные животные, выделяющие возбудителя во внешнюю среду с истечениями из носовой полости, при абортах, с калом, мочой, молоком (при листериозных маститах), а также животные-листерионосители [10,13]. У людей особенно восприимчивы к листериозу беременные женщины, новорожденные (в первые три недели жизни), взрослые старшего возраста, а также лица с дефектами иммунной системы и микробной экологии пищеварительного тракта [2,13]. Профессиональной болезнью считается для работников животноводческих и птицеводческих ферм и комплексов, цехов первичной переработки животноводческой продукции на мясо- и птицекомбинатах, ветеринарных специалистов и работников боен. Инфекционная доза широко варьируется ( $<100$  клеток до  $10^{11}$  клеток) и зависит от количества потребленной загрязненной пищи, штамма бактерий и иммунологического

статуса хозяина [12,14].

Как патоген *L. monocytogenes* устойчив и способен адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды, таким как высокая концентрация соли, широкий диапазон температур ( $1-45^{\circ}\text{C}$ ), низкий pH и условия

ограничения кислорода, которые характерны для желудочно-кишечного тракта человека, что усугубляет инфекцию *L. monocytogenes* у людей [12,13]. Благодаря образованию биопленок и осмоадаптации *L. monocytogenes* также устойчив к высыханию и дезинфицирующим средствам [6,12]. Таким образом, *L. monocytogenes* может легко размножаться на нескольких поверхностях, увеличивая вероятность вспышек листериоза через загрязненные продукты питания.

#### Факторы патогенности и вирулентности листерии

Листерии, обладая широкими адаптивными возможностями, способны приспосабливаться к существованию в различных условиях. Высокая метаболическая активность листерий и устойчивость к неблагоприятным факторам создают возможность лёгкого перехода от сапрофитического к паразитическому типу метаболизма при попадании в организм хозяина. Окружающая среда, в которой находится патоген, влияет на экспрессию генов вирулентности. Поэтому листерии способны переключаться между сапрофитизмом и вирулентностью в зависимости от условий среды [2,4,7,10].

В патогенезе инфекции важное значение имеют факторы патогенности и вирулентности *L. monocytogenes*, обеспечивающие их незавершённый фагоцитоз, внутриклеточный паразитизм, высокую скорость заселения здоровых клеток, формирование антибиотикорезистентности. Факторы вирулентности *Listeria monocytogenes* способствуют ее патогенности и действуют на различных этапах цикла инфицирования хозяина.

В настоящее время в геноме *L. monocytogenes* детектированы многочисленные острова патогенности (*Listeria pathogenicity island- LIPI-1, LIPI-2, LIPI-3 и LIPI-4*) и стрессоустойчивости (*Stability stress island-SSI-1 и SSI-2*) [15,16]. Основные детерминанты вирулентности *L. monocytogenes* сгруппированы вдоль хромосомы в островах патогенности *Listeria-1 (LIPI-1)* [1-3]. Однако *LIPI-3* и *LIPI-4* идентифицированы как характерные для гипервирулентных штаммов *L. monocytogenes* [9,14]. Посредством полногеномного секвенирования (WGS) определены регуляторы важных факторов вирулентности: гены кла-

стера интерналинов (*inlE, inlI, inlK, inlP, inlF, inlG, inlH*), острова стрессоустойчивости (*SSI-1*, ассоциированный с устойчивостью к кислотам, солям и обеспечивающий рост в пищевых продуктах, а также *SSI-2*, обеспечивающий *L. monocytogenes* выживание в щелочных условиях и в условиях окислительного стресса) [15,16].

Важным фактором выживаемости листерий в человеческой популяции стало распространение штаммов со множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. Полногеномное секвенирование *L. monocytogenes* позволило идентифицировать гены антибиотикорезистентности, за счёт которых этот вид бактерий приобретает устойчивость к препаратам. Примерами являются ген *FosX (lmo1702)* кодирующий белок резистентности к фосфомицину, *Pbplike (lmo0441)* кодирующий пенициллин-связывающий белок и, определяющий устойчивость к β-лактамам, *Lin (lmo0919)* определяющий устойчивость к макролидам, *NorB* кодирующий *NO*-редуктазу, ассоциированную с устойчивостью к фторхинолонам, *Sul (lmo0224)* детерминирующий устойчивость к сульфаниламидам [16,17].

Наличие в геномах штаммов *L. monocytogenes* генетических детерминант островов патогенности, стрессоустойчивости и антибиотикорезистентности свидетельствует о наличии у листерии высокого патогенного потенциала. *Listeria monocytogenes* разделен на 13 серотипов ( $\frac{1}{2}a, \frac{1}{2}b, \frac{1}{2}c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7$ ) на основе соматических и жгутиковых антигенов. Эти серотипы далее группируются в четыре линии генетического разнообразия (I-IV) [17,18].

Успех *L. monocytogenes* в индуцировании инфекции обусловлен способностью преодолевать три важных барьера в организме человека, а именно кишечный эпителий, гематоэнцефалический барьер и плаценту, а затем распространяться в другие органы. Желудочно-кишечный тракт является основным местом проникновения и распространения патогенных листерий [8,12]. Процесс инфицирования клетки хозяина *L. monocytogenes* включает несколько различных стадий: адгезия и инвазия клеток хозяина, интернализация клетками хозяина, лизис вакуоли,

Таблица 1. Основные факторы патогенности и вирулентности *Listeria monocytogenes* [15,16]

Белок	Мол.масса kDa	Ген	Функция
prfA	27	prfA	Регуляция транскрипции генов, кодирующие факторы вирулентности листерии
Листерииолизин О (LLO)	58	hly	Главный фактор патогенности листерии
Фосфолипаза С (plcA)	36	plcA	Лизис первичной фагосомы
Лецитиназа (plcB)	33	plcB	Лизис вторичной фагосомы
Металлопротеаза mpl	57	mpl	Посттрансляционная модификация фосфолипазы и лецитиназы
ActA	67	actA	Полимеризация актина клетки-хозяина, обеспечивает внутриклеточные и межклеточные перемещения листерий
Интерналины inlA и inlB	88 и 64	inlA и inlB	Факторы инвазии, обеспечивающие проникновение листерий в эукариотические клетки (InlA - в эпителиальные клетки, InlB - в гепатоциты)
Муреингидролаза р60	60	iap	Внеклеточный белок, способствует межклеточным перемещениям листерии

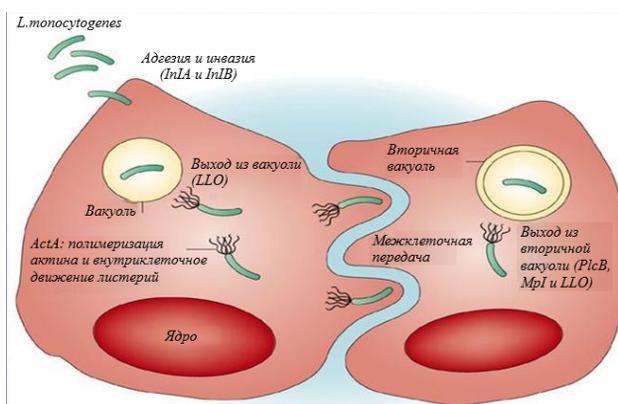


Рисунок 2. Механизм патогенеза листериозной инфекции [8,12]

внутриклеточное размножение и межклеточное распространение в соседнюю клетку (рисунок 2).

При попадании в организм через загрязненную пищу *L. monocytogenes* выживает при воздействии высокой кислотности, желчных солей, неспецифических воспалительных атак и протеолитических ферментов из системы хозяина [19]. Пережив эту стадию, *L. monocytogenes* проникает в фагоцитарные клетки хозяина с помощью поверхностных белков, называемых интерналинами. Клетки фагоцитов обладают механизмами, которые используются для уничтожения поглощенных бактерий; следовательно, способность *L. monocytogenes* выживать в этих клетках обусловлена его уникальной патогенностью [12,19].

Преодоление кишечного эпителиального барьера имеет решающее значение для системного распространения инфекции. Белок адгезии листерий (*LAP*), также известный как ацетальдегид алкогольдегидрогеназа (*AdhE*), способствует прохождению бактерий через эпителиальный барьер, открывая барьер плотного контакта после взаимодействия с рецептором клетки-хозяина, белком теплового шока 60 (*Hsp60*) [19,20]. Далее происходит интернализация – проникновение бактерий в макрофаги, энтероциты и М-клетки (фагоцитирующие эпителиальные клетки кишечника, концентрирующиеся вокруг пейеровых бляшек и солитарных фолликулов). Интернализация опосредуется листериальными белками интерналинами, который взаимодействует с рецепторами фагоцитов и обеспечивает поглощение ими листерий [13,19]. В результате формируются первичные фагосомы, окружённые однослойной мембраной.

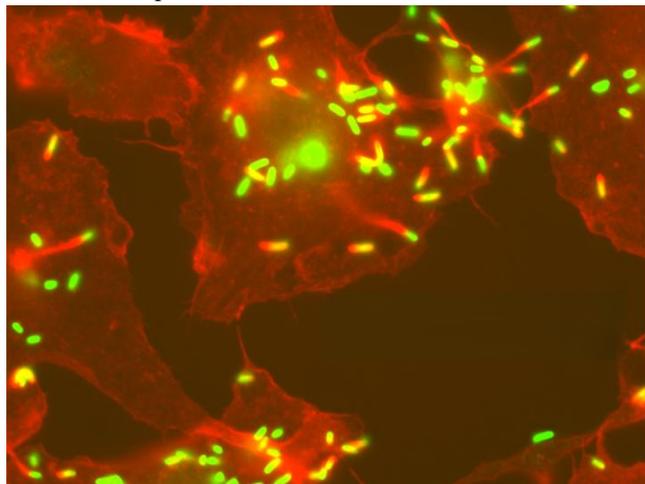


Рисунок 3. Формирование первичной фагосомы

Семейство белков интерналина это крупные поверхностные белки (70-80 кДа), такие как *inlA* и *inlB*, которые прикрепляются к бактериальной клетке через свои С-концевые регионы [12,19]. Адгезия *L. monocytogenes* к хозяину и интернализация в вакуоль обеспечивается посредством генами *inlA* и *inlB*, которые кодируются опероном *inlAB*. *InlA* отвечает за связывание между *L. monocytogenes* и белком адгезии хозяина Е-кадгерином, экспрессируемого на поверхности энтероцитов. Это связывание стимулирует поглощение *L. monocytogenes* эпителиальными клетками [21,22]. *InlB* связывает клеточный рецептор *Met* - белок тирозинкиназы, который также является эндогенным лигандом фактора роста гепатоцитов. Это связывание позволяет *L. monocytogenes* проникать в гораздо более широкий спектр типов клеток-хозяев, таких как гепатоциты, фибробласты и эпителиоидные клетки [13,22].

Проникая во внутреннюю среду клетки хозяина, *L. monocytogenes* высвобождается из фагосомальной вакуоли с помощью цитолитических ферментов листериолизина О (*LLO*) и фосфолипазы. Ген гемолизина (*hly*) отвечает за выработку порообразующего поверхностного токсина – листериолизина О (*LLO*), который необходим для лизиса мембран вакуолей и высвобождения *L. monocytogenes* в цитоплазму [19,22]. Отсутствие *LLO* характерно авирулентным штаммам *L. monocytogenes*, поскольку бактерия не достигнет цитоплазмы клетки-хозяина. Таким образом, *LLO* секретируется всеми вирулентными штаммами *L. monocytogenes* [22].

*Listeria monocytogenes* также секретируют фосфолипазы, которые помогают в лизисе мембран вакуолей фосфатидилинозитол-фосфолипаза (*plcA*) и фосфатидилхолин-фосфолипаза (*plcB*) [13,19]. Исследования показали, что *plcA* помогает *L. monocytogenes* выбраться из первичной вакуоли, тогда как *plcB* активен во время распространения бактерий от клетки к клетке [19,21]. Созревание *plcA* и *plcB* зависит от цинковой металлопротеазы, которая кодируется геном *mpl*. Металлопротеаза также помогает *hly*, *plcB* и *plcA* разрушать первичные вакуоли после вторжения в клетку-хозяина [21]. Благодаря действию этих факторов патогенности происходит лизис мембран фагосом и выход бактерий в цитоплазму, где они продолжают интенсивно размножаться и выделять токсические продукты. Таким образом, имея уникальный набор факторов патогенности, листерии не подвергаются внутриклеточному киллингу и остаются жизнеспособными (незавершенный фагоцитоз).

Механизм подвижности клетки-хозяина на основе белка актина облегчает внутриклеточное перемещение листерии через цитоплазму в соседние клетки, распространяя инфекцию без повторного воздействия внеклеточного иммунного надзора хозяина [9]. Бактериальный поверхностный белок, называемый актиновым полимеризационным белком (*ActA*), идентифицирован как фактор вирулентности для внутриклеточного перемещения *L. monocytogenes* в цитоплазме [20,22]. *ActA* вызывает полимеризацию глобулярных молекул актина в актиновые нити, что облегчает внутриклеточное и межклеточное перемещение *L. monocytogenes*. *ActA* играет решающее значение в цитоплазматическом перемещении патогена. Более низкая вирулентность серотипов листерии связана с выработкой более низких уровней белка *ActA* [22].

Муреингидролаза клеточной стенки является высококонсервативным антигеном среди рода *Listeria* (80%–90%) [17,22]. Инвазионно-ассоциированный белок (*iap*) представляет собой внеклеточный белок *p60*, который кодируется геном *iap* [16,22]. Белок *p60* рассматривается как фермент муреингидролаза, который облегчает разделение перегородок на заключительном этапе деления клетки. Он также участвует в прикреплении *L. monocytogenes* к клетке-хозяину и играет важную роль в вирулентности и патогенности бактерии. Выйдя в межклеточную среду, листерии «продавливают» цитоплазматическую мембрану соседних здоровых клеток, и инфицируют их. Образующаяся вторичная вакуоль, окруженная двойной мембраной, подвергается лизису, и листерии начинают новый цикл своего развития.

Установлено, что гены патогенности листерии *hly*, *plcA*, *plcB*, *ActA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, кодирующие факторы вирулентности, активируются при получении внешних сигналов. *PrfA* (*positive regulatory factor A*) является основным регулятором экспрессии факторов вирулентности, присутствующих в кластере генов патогенности листерии [17,22].

Экспрессия *prfA* контролируется альтернативным сигма-фактором  $\sigma B$  [21,22]. Окружающая температура влияет на выработку факторов вирулентности, поскольку вторичная структура нетранслируемой *prfA*-мРНК зависит от температуры [18,22]. При 30°C рибосомы не могут связывать и транслировать последовательность, в результате механизма положительной обратной связи транскрибируется только небольшое количество *prfA* [22]. При 37°C вторичная структура изменяется, что приводит к трансляции *prfA*-мРНК с последующим синтезом *PrfA* и увеличением количества транскрибируемого *prfA*.

#### Методы диагностики листериоза

Достоверная идентификация *L. monocytogenes* чрезвычайно важна для профилактики и контроля заболева-

ния. Бактериологический метод является «золотым стандартом» диагностики так как обеспечивает выделение и идентификацию живого возбудителя. Выделение и идентификация бактериальной культуры *L. monocytogenes* включают использование селективных агентов и процедуры обогащения. Цель селективных агентов заключается в подавлении конкурирующей микрофлоры, в то время как процедура обогащения позволяет увеличить концентрацию *L. monocytogenes* [23,24].

Для тестирования широкого спектра пищевых матриц рекомендованы различные методы. Стандарт *ISO 11290* рекомендуется для выделения *L. monocytogenes* в самых разных продуктах питания и кормах, а также в образцах окружающей среды [24]. Метод *USDA* рекомендуется для обнаружения *Listeria spp.* в продуктах питания из мяса и птицы и объектов окружающей среды [1,21,24]. Метод *Broth Listeria*, используется для выделения *Listeria spp.* из молочных продуктов, мяса, морепродуктов и овощей [1,3,24].

Все вышеупомянутые методы включают серию первичных и вторичных обогащений образцов в селективных средах. Метод *ISO 11290* использует среды *Half Fraser Broth* и *Fraser Broth* для первичного и вторичного обогащения соответственно. Метод *USDA* использует двухэтапное обогащение в среде Вермонта. Метод *One Broth Listeria* использует одноэтапное обогащение в бульоне *Listeria*, которое занимает 2 дня для получения результатов, в отличие от 5 и 4 дней, необходимых для методов *ISO* и *USDA*, соответственно [23,24]. Эти среды обогащения содержат различные селективные агенты, включая циклогексимид, колистин, цефотетан, фосфомицин, хлорид лития, налидиксовую кислоту, акрифлавин, фенилэтанол, цефтазидим, полимиксин В и моксалактам. Антибиотики в основном подавляют рост грамотрицательных бактерий, которые часто присутствуют в качестве конкурентов в образцах пищевых продуктов. Механизм ингибирования антибиотиков включает ингибирование синтеза белка (циклогексимид, фосфомицин и налидиксовая кислота), разрушение внешней клеточной мембраны бактерий (колистин) и бета-лактамазы (цефотетан) [23,24].

После первичного и вторичного обогащения бульон обычно высевает на селективные или дифференциальные среды. *ISO 11290* рекомендует использовать Оксфорд и *PALCAM* агар для обнаружения и выделения *L. monocytogenes*. *USDA* использует хромогенные среды, такие как *Agar Listeria* и *RAPID-L.mono*. Метод *One Broth Listeria* требует использования зеленого агара *Listeria Brilliance* [23,24]. Эти среды обычно зависят от  $\beta$ -глюкозидазной активности *Listeria*, которая расщепляет хромогенный субстрат, образуя синие или зеленые колонии. Лецитин, присутствующий в агаре, гидролизует ферментом фосфолипазой, синтезируемым только *L. monocytogenes*,

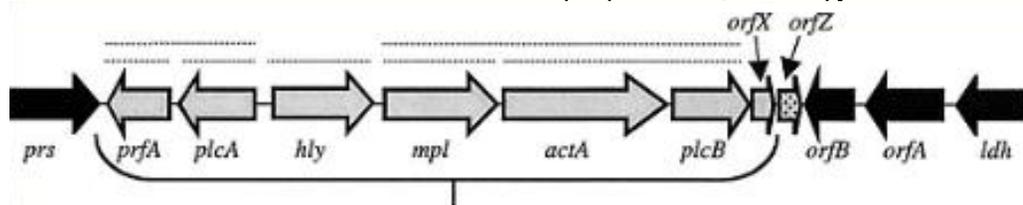


Рисунок 4. Регуляция экспрессии факторов вирулентности листерии [17,22]

что приводит к образованию непрозрачных ореолов вокруг их колоний [23]. Предполагаемые листериальные колонии на селективном агаре подтверждаются быстрыми тестами и по биохимическим свойствам, таким как окраска по Граму, каталазный тест, тест на подвижность, гемолиз на чашках с кровяным агаром.

Молекулярно-генетические методы исследования широко используются для обнаружения *L. monocytogenes*. Традиционная ПЦР нацелена на детекцию наиболее распространенных и специфических генов *L. monocytogenes*, такие как *hly*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *plcA*, *plcB* [25,26]. Традиционные методы ПЦР используются чаще, чем выделение культуры, поскольку они могут обеспечить быстрые результаты и надежно обнаружить низкие уровни *L. monocytogenes*. Метод мультиплексной ПЦР, позволил различить пять различных *Listeria* spp., включая *L. monocytogenes*, нацеливаясь на разные гены для каждого вида [27]. Мультиплексная ПЦР может обнаруживать от 1 до 100 КОЕ/мл *Listeria* однако, как и обычная ПЦР, она может переоценивать присутствие патогена [25]. Наиболее эффективно использование мультиплексной ПЦР для серотипирования культуры листерии, основанный на корреляции между серогрупповой принадлежностью изолята и наличием специфических открытых рамок считывания в его геноме. Использование этого метода позволяет выявить разнообразие культур *L. monocytogenes*, циркулирующих на разных географических территориях с дифференциацией эпидемически значимых и опасных для человека штаммов [28,29]. Хотя молекулярные методы высокочувствительны, они дорогие и требуют специальных технических знаний и оборудования. Методы ПЦР также очень восприимчивы к ингибиторам и могут не дифференцировать жизнеспособные от мертвых клеток [22,25].

Быстрое обнаружение и идентификация антигенов *L. monocytogenes* в образцах продуктов питания или объектах внешней среды обеспечит надлежащую стратегию контроля *Listeria* и потенциально сократить вспышки листериоза. Иммунологические методы - иммуноферментный анализ (ELISA) и иммунохроматографический анализ (LFIA) - являются альтернативными подходами к обнаружению *L. monocytogenes* из-за их низкой стоимости, высокой чувствительности и специфичности, а также простоты



Рисунок 5. Колонии листерии на селективном агаре [23]

в интерпретации данных. Поликлональные (*PAb*) и моноклональные (*MAb*) антитела, полученные против ключевых иммунодоминантных антигенов *L. monocytogenes*, как специфические иммунореагенты оказались полезными при разработке и модификации иммуноферментных методов контроля и профилактики листериоза.

Моноклональные антитела, полученные к *InlA*, вступали в сильное взаимодействие со штаммами листерии, принадлежащими к серотипу 1/2a, но слабо с 1/2c, 4a и 4b. Поскольку большинство вспышек листериоза включают серотип 4b, эти *MAb* оказались неэффективным для использования при скрининге пищевых продуктов. Несмотря на схожесть структуры белка с *InlA*, белок *InlB* генерировал более специфические моноклональные антитела против *L. monocytogenes* [30]. Антитела, полученные против последовательности из 17 аминокислот из N-концевой области *LLO* (58 кДа), показали высокую специфичность к *L. monocytogenes* при иммунодетекции бактерии [31]. Благодаря своей высокой иммуногенности, *LLO* также эффективно использовался в качестве антигена при разработке метода диагностики листериоза [32]. Антитела, полученные против *plcA* и *plcB* имели перекрестную реактивность в анализах на обнаружение *L. monocytogenes* в пищевых образцах, что обусловлено 55% идентичности структуры данного белка между *Listeria*, *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *St.aureus*, *Clostridium* spp [32]. Высокоспеци-

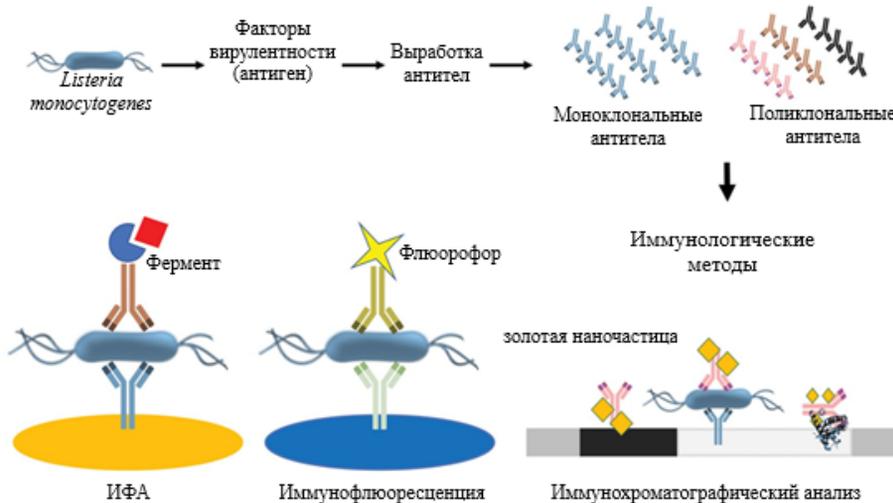


Рисунок 6. Иммунологические методы диагностики листериоза [30]. Поликлональные антитела против *plcA*, имели диагностический

потенциал для использования в *ELISA* для специфического обнаружения *L. monocytogenes* [33]. Связывание антитела анти-*ActA* с магнитными шариками также было эффективным для разделения *L. monocytogenes* из пищевых матриц [34].

Обнаружение *L. monocytogenes* с использованием *Mab* против структуры белка *p60* показало высокую специфическую реактивность [25]. Экспрессия пептида, состоящего из 11 аминокислот, уникальных для белка *p60*, позволила создать высокоспецифичные антитела для обнаружения *L. monocytogenes* [35]. Белок теплового шока *Hsp60* является рецептором эпителиальных клеток человека, который специфически взаимодействует с *LAP* – белком адгезии листерии. Константа сродства для *Hsp60-LAP* составляет  $1,68 \times 10^8$  М, что эквивалентно взаимодействию антиген-антитело [19,20]. Использование *Hsp60* в качестве молекулы захвата, связанные с парамагнитными микросферами оказалось эффективно для разработки иммуноанализа для обнаружения *L. monocytogenes* [36].

Важные усовершенствования, основанные на биотехнологии и инженерии антител, такие как методы, основанные на фрагментах одноцепочечных антител (*scFv*) и антителах с тяжелой цепью (фрагменты *VHH*). Антитела *scFv* и *VHH* имеют схожую антигенсвязывающую аффинность, как и целые антитела, однако, они могут быть получены в больших количествах с использованием микробных систем экспрессии и просты в обращении и широком диапазоне применения. Показано, что использование *VHH* фрагментов антител в непрямом *ELISA* позволило снизить затраты и время для обнаружения *L. monocytogenes* в пищевых продуктах по сравнению с использованием обычных *Mab* [37]. Применение фрагментов *scFv* в качестве агента захвата было достаточным для повышения чувствительности сэндвич-*ELISA* для детекции листерии [38].

Для обеспечения безопасности пищевых продуктов и обнаружения патогенов и токсинов пищевого происхождения в последние десятилетия резко возросла актуальность *LFIA* как быстрого и недорогого теста. Чтобы быть использованным в качестве инструмента для предотвращения вспышек листериоза, *LFIA* должен быть способен обнаруживать минимально возможное количество бактериальных клеток на грамм или миллилитр образца. Предел детекции коммерческих тестов классического сэндвич-формата колеблется от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл [39]. Объединяя *LFIA* с молекулярными методами, такими как рекомбиназная полимеразная амплификация (*RPA LF*), предел детекции составила  $1,5 \times 10^1$  КОЕ/мл для чистой культуры *L. monocytogenes* [40].

Применение *LFIA* в образцах продуктов питания может быть ограничено типами используемой пищевой матрицы, которая часто влияет на биологическую активность реагентов и бактериальных антигенов, снижая чувствительность обычных тестов. Экспрессия антигена *Listeria* может серьезно подвергаться влиянию обогащающих бульонов или условий роста, используемых для культивирования бактерий или кислотных, солевых и температурных стрессов для иммунологического обнаружения.

Метод иммуномагнитного разделения и концентрирования использовались в качестве предварительной обра-

ботки образцов для уменьшения помех пищевой матрицы [34]. Разработка биосенсора иммунохроматографии нуклеиновых кислот с платформой иммуномагнитного разделения позволила достигнуть предел детекции  $3,5 \times 10^2$  КОЕ/мл в чистой культуре *L. monocytogenes* и в образцах продуктов питания [41]. Биотинилированные антитела показали лучшую способность захвата в системе иммуноразделения из-за высокого сродства стрептавидина к биотину с пределом обнаружения  $1 \times 10^2$  КОЕ/мл в чистой культуре *L. monocytogenes* [39]. Помимо снижения помех пищевой матрицы, иммуномагнитное разделение или концентрирование уменьшает длительность этапы процесса предварительной обработки, поддерживает биологическую активность образцов, а также усиливает детекцию сигналов для количественного анализа, когда магнитные наночастицы конъюгированы с моноклональными антителами [34].

Используя устройство обогащения патогенов (*PED*) для *LFIA*, достигнут предел детекции  $1,2 \times 10^2$  КОЕ/мл для *L. monocytogenes* из пищевых образцов [42]. Объединив поверхностно-усиленное рамановское рассеяние (*SERS*), достигнут показатель  $5 \times 10^1$  КОЕ/мл [43]. Однако аналогичное использование метода позволило детектировать 75 КОЕ/мл в чистой культуре и около 200 КОЕ/мл в искусственно зараженном молоке с различными концентрациями *L. monocytogenes* [44].

Несмотря на то, что «золотым стандартом» в диагностике листериоза признано бактериологическое выделение культуры возбудителя, серологические методы, позволяющие регистрировать уровень и класс специфических антител, синтезирующих-

ся в динамике болезни, всё же играют важную роль в диагностике этой инфекции.

Однако используемые на практике серологические методы (*PA* с цветным диагностикомом, *РСК*, *РИФ*, *РНАГ*), имеют низкую специфичность и малую достоверность, так как поверхностные листериозные антигены по своей структуре очень схожи с антигенами других микроорганизмов [1,2]. Проведение анализов возможно только на поздних сроках болезни, в начале второй недели заболевания, с целью регистрации нарастания титра суммарных противолистерийных антител (*IgM/IgG*) в 4 и более раз [17]. Диагноз «листериоз» может быть поставлен при достоверной разности титров антител в парных сыворотках больных с характерной клинической картиной и бактериологическом исследовании. При выраженных иммунодефицитных состояниях организм утрачивает возможность образования антител [9,12].

Высокая эффективность серологических исследований достигнута иммуноферментным тестированием наличия *IgG* к секретируемому фактору патогенности листерий листериолизину *O* [45]. Показано, что концевой полипептидный фрагмент рекомбинантной молекулы листериозина *O* наиболее специфичен при скрининге сывороток больных листериозом людей. Для выявления неинвазивных бессимптомных форм болезни при эпидемических вспышках листериоза, определена диагностическая значимость *ELISA*, основанные на гуморальном ответе других белковых антигенов, связанных с вирулентностью листерий - *LLO* и *PLC* [33].

Применение современных методов ускоренной идентификации листерий позволяет существенно сократить срок проведения анализа и повысить достоверность полученных результатов даже при низкой концентрации возбудителя в исследуемой пробе.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Листерия это инфекционная болезнь людей и животных, вызываемая *Listeria monocytogenes*, характеризуется множеством источников проникновения возбудителя, разнообразием путей и факторов передачи, полиморфизмом клинических проявлений и высокой летальностью [1-3]. Основным источником и резервуаром возбудителя инфекции признаны объекты внешней среды и природные субстраты. Листерия человека является одной из ведущих пищевых токсикоинфекций в мире с высокой степенью летальности до 20-40%. Увеличение заболеваемости листериозом связано с длительным хранением пищевых продуктов при низкой температуре, что способствует размножению в них листерий при первично слабой контаминации ими [9,12].

Листерия это уникальный патоген, поскольку имеет внутриклеточный жизненный цикл и характеризуется высокими адаптационными свойствами [10]. В патогенезе инфекции важное значение имеют факторы патогенности *L. monocytogenes*, обеспечивающие их незавершенный фагоцитоз, внутриклеточный паразитизм, высокую скорость инфицирования клеток, формирование антибиотикорезистентности [15,18]. Исследованиями биологии и генетики вирулентности возбудителя листериоза определен набор биологически активных молекул и поверхностных белков клеточной стенки патогенных листерий - листериолизин O, фосфолипаза C, лецитиназа, металлопротеиназа, интерналин, белки *ActA* и *PrfA*. Эти факторы патогенности листерий позволяют им активно проникать и размножаться не только в фагоцитах, но и эндотелиальных и эпителиальных клетках человека и животных [15,21].

Учитывая чрезвычайный полиморфизм клинических проявлений и уникальность биологии возбудителя актуальным направлением является совершенствование методов лабораторной диагностики и специфической иммунопрофилактики листериоза.

Длительность и трудоемкость традиционного бактериологического исследования на селективных средах с последующими биохимическими исследованиями, дороговизна ПЦР анализов обуславливают значимость иммунологических методов выявления возбудителя листериоза, в том числе иммуноферментного и иммунохроматографического анализов [24,25]. Поликлональные и моноклональные антитела, полученные против ключевых иммунодоминантных антигенов *L. monocytogenes*, как специфические иммунореагенты оказались полезными при разработке и модификации иммунологических экспресс-методов обнаружения *L. monocytogenes* в пищевых продуктах [1,7].

В статье обобщены последние данные эпизоотологии, эпидемиологии и патогенеза листериозной инфекции, представлены основные факторы патогенности и вирулентности *Listeria monocytogenes* как ключевые мишени для совершенствования методов ускоренной идентифика-

ции листерий в пищевой продукции.

Применение современных методов ускоренной идентификации листерий позволяет существенно сократить срок проведения анализа и повысить достоверность полученных результатов даже при низкой концентрации возбудителя в исследуемой пробе.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант №BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям»).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lopes-Luz L., Mendonça M., Bernardes Fogaça M., Kipnis A., Bhunia A.K., Bühner-Sékula S. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays // Crit Rev Microbiol. – 2021. – Vol. 47. – P. 647-666. doi: 10.1080/1040841X.2021.1911930.
2. Matle I., Mbatha K.R., Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis // Onderstepoort J Vet Res. – 2020. – Vol. 87. – P. 1-20. doi: 10.4102/ojvr.v87i1.1869.
3. Queda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., Dessaux C., García-Del Portillo F., Pucciarelli M.G., Ortega A.D. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology // Virulence. – 2021. – Vol. 12. – P. 2509-2545. doi: 10.1080/21505594.2021.1975526.
4. Buchanan R.L., Gorris L.G.M., Hayman M.M., Jackson T.C., Whiting R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments // Food Control. – 2016. – Vol. 75. – P. 1-13. doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.016.
5. Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M.J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health // J Food Prot. – 2014. – Vol. 77. – P. 150-170. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-150.
6. Lee B.H., Cole S., Badel-Berchoux S., Guillier L., Felix B., Krezdorn N., Hébraud M., Bernardi T., Sultan I., Piveteau P. Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study // Front Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 2698. doi: 10.3389/fmicb.2019.02698.
7. Radoshevich L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis // Nat Rev Microbiol. – 2018. – Vol. 16 – P. 32-46. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126.
8. Roberts B.N., Chakravarty D., Gardner J.C. 3rd, Ricke S.C., Donaldson J.R. *Listeria monocytogenes* Response to

- Anaerobic Environments // Pathogens. – 2020. – Vol. 9. – P.210. doi: 10.3390/pathogens9030210.
9. Orsi R.H., Bakker H.C, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics // International Journal of Medical Microbiology. – 2011. – Vol. 301. – P. 79-96. doi: 10.1016/j.ijmm. 2010.05.002.
10. Kühn S., Enninga J. The actin comet guides the way: How *Listeria actin* subversion has impacted cell biology, infection biology and structural biology // Cell Microbiol. – 2020. – Vol. 22. – P. 1-11. doi: 10.1111/cmi.13190.
11. Кузембекова Г.А., Киркимбаева Ж. С., Сарыбаева Д. А., Жылкайдар А. Ж., Мурзабаев К.Е. Эпизоотологическая характеристика территории страны по листериозу животных // Наука и образование. ЗКАТУ имени Жангир-Хана. – 2024. – № 3.– С. 247-256. doi: 10.52578/2305-9397-2024-3-1-247-256.
12. Bai X., Liu D., Xu L., Tenguria S., Drolia R., Gallina N.L.F., Cox A.D., Koo O.K., Bhunia A.K. Biofilm-isolated *Listeria monocytogenes* exhibits reduced systemic dissemination at the early (12-24 h) stage of infection in a mouse model // NPJ Biofilms Microbiomes. – 2021. – Vol.7. – №.18. – P. 1-16. doi: 10.1038/s41522-021-00189-5.
13. Bhunia A.K. *Listeria monocytogenes* // In: Foodborne Microbial Pathogens. Food Science Text Series: Springer, NY. – 2018. – 229 p. doi.10.1007/978-1-4939-7349-1\_13.
14. Pouillot R., Klontz K. C., Chen Y., Burall L. S., Macarisin D., Doyle M., Bally K. M., Strain E., Datta A. R., Hammack T.S., Van Doren J.M. Infectious Dose of *Listeria monocytogenes* in Outbreak Linked to Ice Cream // Emerg Infect Dis. – 2016. – Vol. 12. – P. 2113-2119. doi: 10.3201/eid2212.160165.
15. Wiktorczyk-Kapischke N., Skowron K., Walecka-Zacharska E. Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*-overview of selected aspects // Front. Mol. Biosci. – 2023. – Vol. 10. – P. 1161486. doi: 10.3389/fmolb.2023.1161486.
16. Duma M.N.; Ciupescu L.M.; Dan S.D.; Crisan-Reget O.L.; Tabaran A. Virulence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Food Products in Romania // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12 – P. 954. doi:10.3390/microorganisms12050954.
17. Meireles D., Pombinho R., Cabanes D. Signals behind *Listeria monocytogenes* virulence mechanisms // Gut Microbes. – 2024. – Vol.16. – №1. – P. 2369564. doi: 10.1080/19490976.2024.2369564.
18. Hain T., Ghai R., Billion A., Kuenne, C.T., Steinweg C., Izar B. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes* // BMC Genomics – 2012. – Vol.13. – P. 144. doi: 10.1186/1471-2164-13-144.
19. Drolia R., Tenguria S., Durkes A.C., Turner J.R., Bhunia A.K. *Listeria* Adhesion Protein Induces Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction for Bacterial Translocation // Cell Host Microbe. – 2018. – Vol.23. – P. 470-484. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.004.
20. Drolia R., Bhunia A.K. Crossing the Intestinal Barrier via *Listeria* Adhesion Protein and Internalin A // Trends Microbiol. – 2019. – Vol.27. – №5. – P. 408-425. doi: 10.1016/j.tim.2018.12.007.
21. Hurley D., Luque-Sastre L., Parker C.T., Huynh S., Eshwar A.K., Nguyen S.V., Andrews N., Moura A., Fox E.M., Jordan K., Lehner A., Stephan R., Fanning S. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period // mSphere. – 2019. – Vol.4. – №4. – P. 1-14. doi: 10.1128/mSphere.00252-19.
22. Johansson J., Freitag N.E. Regulation of *Listeria monocytogenes* Virulence // Microbiol Spectr. – 2019. – Vol. 4. – P. 1-19. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0064-2019.
23. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review // FEMS Microbiol Rev. – 2005. – Vol. 29. – №5. – P. 851-875. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.002.
24. Leong D., NicAogáin K., Luque-Sastre L., McManamon O., Hunt K., Alvarez-Ordóñez A. 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland // International Journal of Food Microbiology – 2017. – Vol. 249. – P. 18-26. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015.
25. Wang Y., Salazar J.K. Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices // Compr Rev Food Sci Food Saf. – 2016. – Vol.15. – №1. – P. 183-205. doi: 10.1111/1541-4337.12175.
26. Chen J.Q., Healey S., Regan P., Laksanalamai P., Hu Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources // Food Sci Human Wellness – 2017. – Vol.6. – P. 39-59. doi: 10.1016/j.fshw.2017.03.001.
27. Ryu J., Park S.H., Yeom Y.S., Shrivastav A., Lee S.H., Kim Y.R. Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR // Food Control – 2017. – Vol.32. – P. 659-664. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.048.
28. Shaker E.M., Hassanien A.A. PCR Techniques detection of some virulence associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from table eggs and clinical human samples // Assiut Veterinary Medical Journal – 2015. - Vol.61 – P. 219-225.
29. Chenal-Francisque V., Maury M.M., Lavina M., Touchon M., Leclercq A., Lecuit, M., Clonogrouping, a rapid multiplex pcr method for identification of major clones of *Listeria monocytogenes* // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol.53 – P. 3355-3358. doi:10.1128/JCM.00738-15.
30. Hearty S., Leonard P., Quinn J., O’Kennedy R. Production,characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes* // J Microbiol Methods. – 2015. – Vol.66. – №.2. – P. 294-312. doi: 10.1016/j.mimet.2005.12.009.
31. Day J.B., Hammack T.S. Immuno-detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in stone fruits // J Appl Microbiol. – 2019. – Vol.127. - P. 1848-1858. doi: 10.1111/jam.14440.
32. Suryawanshi R. D., Malik S. V. S., Jayarao B.,

Chaudhari S. P., Savage E., Vergis J., Kurkure N. V., Barbuddhe S. B., Rawool D. B. Comparative diagnostic efficacy of recombinant LLO and PI-PLC-based ELISAs for detection of listeriosis in animals // *Journal of Microbiological Methods*. – 2017. – Vol. 137. – P. 40-45. doi: 10.1016/j.mimet.2017.04.005.

33. Lathrop A., Bailey T., Kim K., Bhunia A. Pathogen-specific antigen target for production of antibodies produced by comparative genomics // *Antibody Technology Journal*. – 2014 – Vol.4. – P. 13-22. doi: 10.2147/ANTI.S54848.

34. Xu L., Bai X., Bhunia AK. Current state of biosensors development and their application in foodborne pathogen detection // *J Food Prot*. – 2011. – Vol. 84. – P. 1213-1227. doi:10.4315/JFP-20-464.

35. ETTY M.C., D'Auria S., Shankar S., Salmieri S., Coutu J., Baraketi A., Jamshidan M., Fraschini C., Lacroix M. New immobilization method of anti-PepD monoclonal antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* p60 protein – part A: optimization of a crosslinked film support based on chitosan and cellulose nanocrystals (CNC) // *Reactive Functional Polymers*. – 2011. – Vol. 146. – P. 104313-104313. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.06.021.

36. Koo O.K., Aroonnuan A., Bhunia A.K. Human heat-shock protein 60 receptor-coated paramagnetic beads show improved capture of *Listeria monocytogenes* in the presence of other *Listeria* in food // *J Appl Microbiol*. – 2011. – Vol. 111 – P. 93-104. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05040.x.

37. Tu Z., Chen Q., Li Y., Xiong Y., Xu Y., Hu N., Tao Y. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk // *Anal Biochem*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1-7. doi: 10.1016/j.ab.2015.09.023.

38. Liu A., Xiong Q., Shen L., Li W., Zeng Z., Li C., Liu S., Liu Y., Han G. A sandwich-type ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* using the well-oriented single chain Fv antibody fragment // *Food Control*. – 2017. – Vol. 79. – P. 156–161. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.042.

39. Cho I.H., Irudayaraj J. Lateral-flow immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes* // *Anal Bioanal Chem*. – 2013. – Vol. 405. – P. 3313-3319. doi: 10.1007/s00216-013-6742-3.

40. Du X.J., Zang Y.X., Liu H.B., Li P., Wang S. Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strip for *Listeria monocytogenes* Detection in Food // *J Food Sci*. – 2018. – Vol. 83. – P. 1041-1047. doi: 10.1111/1750-3841.14078.

41. Li F., Li F., Luo D., Lai W., Xiong Y., Xu H. Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes* // *Anal Chim Acta*. – 2018. – Vol. 1017. – P. 48-56. doi: 10.1016/j.aca.2018.02.009

42. Hahm B.K., Kim H., Singh A.K., Bhunia A.K. Pathogen enrichment device (PED) enables one-step growth, enrichment and separation of pathogen from food matrices for detection using bioanalytical platforms // *J Microbiol Methods*. – 2015. – Vol.117. – P. 64-73. doi: 10.1016/j.mimet.2015.07.016.

43. Stambach N.R., Carr S.A., Cox C.R., Voorhees K.J.

Rapid Detection of *Listeria* by Bacteriophage Amplification and SERS-Lateral Flow Immunochromatography // *Viruses*. – 2015. – Vol.3. – P. 6631-6641. doi: 10.3390/v7122962.

44. Wu Z. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* by a SERS-based lateral flow immunochromatographic assay // *Food Anal Methods*. – 2025. – Vol.12. – P. 1086-1091. doi: 10.1007/s12161-019-01444-4.

45. Boerlin P., Boerlin-Petzold F., Jemmi T. Use of listeriolysin O and internalin A in a seroepidemiological study of listeriosis in Swiss dairy cows // *J Clin Microbiol*. – 2003. – Vol.3. – P. 1055-1061. doi: 10.1128/JCM.41.3.1055-1061.2003.

## REFERENCES

1. Lopes-Luz L., Mendonça M., Bernardes Fogaça M., Kipnis A., Bhunia A.K., Bühner-Sékula S. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays // *Crit Rev Microbiol*. – 2021. – Vol. 47. – P. 647-666. doi: 10.1080/1040841X.2021.1911930.

2. Matle I., Mbatha K.R., Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis // *Onderstepoort J Vet Res*. – 2020. – Vol. 87. – P. 1-20. doi: 10.4102/ojvr.v87i1.1869.

3. Queda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., Dessaux C., García-Del Portillo F., Pucciarelli M.G., Ortega A.D. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology // *Virulence*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2509-2545. doi: 10.1080/21505594.2021.1975526.

4. Buchanan R.L., Gorris L.G.M., Hayman M.M., Jackson T.C., Whiting R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments // *Food Control*. – 2016. – Vol.75. – P. 1-13. doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.016.

5. Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M.J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health // *J Food Prot*. – 2014. – Vol. 77. – P. 150-170. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-150.

6. Lee B.H., Cole S., Badel-Berchoux S., Guillier L., Felix B., Krezdorn N., Hébraud M., Bernardi T., Sultan I., Piveteau P. Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study // *Front Microbiol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2698. doi: 10.3389/fmicb.2019.02698.

7. Radoshevich L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis // *Nat Rev Microbiol*. – 2018. – Vol. 16 – P. 32-46. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126.

8. Roberts B.N., Chakravarty D., Gardner J.C. 3rd, Ricke S.C., Donaldson J.R. *Listeria monocytogenes* Response to Anaerobic Environments // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – P.210. doi: 10.3390/pathogens9030210.

9. Orsi R.H., Bakker H.C, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and

- phenotypic characteristics // International Journal of Medical Microbiology. – 2011. – Vol. 301. – P. 79-96. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002.
10. Kühn S., Enninga J. The actin comet guides the way: How *Listeria actin* subversion has impacted cell biology, infection biology and structural biology // Cell Microbiol. – 2020. – Vol. 22. – P. 1-11. doi: 10.1111/cmi.13190.
11. Kuzembekova G.A., Kirkimbaeva Zh.S., Sarybaeva D.A., Zhylkaidar A.Zh., Murzabaev K.E. Epizootological characteristics of the country's territory for animal listeriosis // Science and education. ZKATU named after Zhangir-Khan. – 2024. – No.3. – P. 247-256. doi: 10.52578/2305-9397-2024-3-1-247-256.
12. Bai X., Liu D., Xu L., Tenguria S., Drolia R., Gallina N.L.F., Cox A.D., Koo O.K., Bhunia A.K. Biofilm-isolated *Listeria monocytogenes* exhibits reduced systemic dissemination at the early (12-24h) stage of infection in a mouse model // NPJ Biofilms Microbiomes. – 2021. – Vol.7. – №.18. – P. 1-16. doi: 10.1038/s41522-021-00189-5.
13. Bhunia A.K. *Listeria monocytogenes* // In: Foodborne Microbial Pathogens. Food Science Text Series: Springer, NY. – 2018. – 229 p. doi:10.1007/978-1-4939-7349-1\_13.
14. Pouillot R., Klontz K. C., Chen Y., Burall L. S., Macarasin D., Doyle M., Bally K. M., Strain E., Datta A. R., Hammack T.S., Van Doren J.M. Infectious Dose of *Listeria monocytogenes* in Outbreak Linked to Ice Cream // Emerg Infect Dis. – 2016. – Vol. 12. – P. 2113-2119. doi: 10.3201/eid2212.160165.
15. Wiktorczyk-Kapischke N., Skowron K., Wałęcka-Zacharska E. Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*-overview of selected aspects // Front. Mol. Biosci. – 2023. – Vol. 10. – P. 1161486. doi: 10.3389/fmolb.2023.1161486.
16. Duma M.N.; Ciupescu L.M.; Dan S.D.; Crisan-Reget O.L.; Tabaran A. Virulence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Food Products in Romania // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12 – P. 954. doi:10.3390/microorganisms12050954.
17. Meireles D., Pombinho R., Cabanes D. Signals behind *Listeria monocytogenes* virulence mechanisms // Gut Microbes. – 2024. – Vol.16. – №1. – P. 2369564. doi: 10.1080/19490976.2024.2369564.
18. Hain T., Ghai R., Billion A., Kuenne, C.T., Steinweg C., Izar B. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes* // BMC Genomics – 2012. – Vol.13. – P. 144. doi: 10.1186/1471-2164-13-144.
19. Drolia R., Tenguria S., Durkes A.C., Turner J.R., Bhunia A.K. *Listeria* Adhesion Protein Induces Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction for Bacterial Translocation // Cell Host Microbe. – 2018. – Vol.23. – P. 470-484. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.004.
20. Drolia R., Bhunia A.K. Crossing the Intestinal Barrier via *Listeria* Adhesion Protein and Internalin A // Trends Microbiol. – 2019. – Vol.27. – №5. – P. 408-425. doi: 10.1016/j.tim.2018.12.007.
21. Hurley D., Luque-Sastre L., Parker C.T., Huynh S., Eshwar A.K., Nguyen S.V., Andrews N., Moura A., Fox E.M., Jordan K., Lehner A., Stephan R., Fanning S. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period // mSphere. – 2019. – Vol.4. – №4. – P. 1-14. doi: 10.1128/mSphere.00252-19.
22. Johansson J., Freitag N.E. Regulation of *Listeria monocytogenes* Virulence // Microbiol Spectr. – 2019. – Vol. 4. – P. 1-19. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0064-2019.
23. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review // FEMS Microbiol Rev. – 2005. – Vol. 29. – №5. – P. 851-875. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.002.
24. Leong D., NicAogáin K., Luque-Sastre L., McManamon O., Hunt K., Alvarez-Ordóñez A. 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland // International Journal of Food Microbiology – 2017. – Vol. 249. – P. 18-26. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015.
25. Wang Y., Salazar J.K. Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices // Compr Rev Food Sci Food Saf. – 2016. – Vol.15. – №1. – P. 183-205. doi: 10.1111/1541-4337.12175.
26. Chen J.Q., Healey S., Regan P., Laksanalama P., Hu Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources // Food Sci Human Wellness – 2017. – Vol.6. – P. 39-59. doi: 10.1016/j.fshw.2017.03.001.
27. Ryu J., Park S.H., Yeom Y.S., Shrivastav A., Lee S.H., Kim Y.R. Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR // Food Control – 2017. – Vol.32. – P. 659-664. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.048.
28. Shaker E.M., Hassanien A.A. PCR Techniques detection of some virulence associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from table eggs and clinical human samples // Assiut Veterinary Medical Journal – 2015. – Vol.61 – P. 219-225.
29. Chenal-Francois V., Maury M.M., Lavina M., Touchon M., Leclercq A., Lecuit, M., Clonogrouping, a rapid multiplex pcr method for identification of major clones of *Listeria monocytogenes* // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol.53 – P. 3355-3358. doi:10.1128/JCM.00738-15.
30. Hearty S., Leonard P., Quinn J., O'Kennedy R. Production,characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes* // J Microbiol Methods. – 2015. – Vol.66. – №.2. – P. 294-312. doi: 10.1016/j.mimet.2005.12.009.
31. Day J.B., Hammack T.S. Immuno-detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in stone fruits // J Appl Microbiol. – 2019. – Vol.127. – P. 1848-1858. doi: 10.1111/jam.14440.
32. Suryawanshi R. D., Malik S. V. S., Jayarao B., Chaudhari S. P., Savage E., Vergis J., Kurkure N. V., Barbuddhe S. B., Rawool D. B. Comparative diagnostic efficacy of recombinant LLO and PI-PLC-based ELISAs for detection of listeriosis in animals // Journal of Microbiological

*Methods.* – 2017. – Vol. 137. – P. 40-45. doi: 10.1016/j.mimet.2017.04.005.

33. Lathrop A., Bailey T., Kim K., Bhunia A. Pathogen-specific antigen target for production of antibodies produced by comparative genomics // *Antibody Technology Journal.* – 2014 – Vol.4. – P. 13-22. doi: 10.2147/ANTI.S54848.

34. Xu L., Bai X., Bhunia AK. Current state of biosensors development and their application in foodborne pathogen detection // *J Food Prot.* – 2011. – Vol. 84. – P. 1213-1227. doi:10.4315/JFP-20-464.

35. ETTY M.C., D'Auria S., Shankar S., Salmieri S., Coutu J., Baraketi A., Jamshidan M., Fraschini C., Lacroix M. New immobilization method of anti-PepD monoclonal antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* p60 protein – part A: optimization of a crosslinked film support based on chitosan and cellulose nanocrystals (CNC) // *Reactive Functional Polymers.* – 2011. – Vol. 146. – P. 104313-104313. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.06.021.

36. Koo O.K., Aroonnuan A., Bhunia A.K. Human heat-shock protein 60 receptor-coated paramagnetic beads show improved capture of *Listeria monocytogenes* in the presence of other *Listeria* in food // *J Appl Microbiol.* – 2011. – Vol. 111 – P. 93-104. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05040.x.

37. Tu Z., Chen Q., Li Y., Xiong Y., Xu Y., Hu N., Tao Y. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk // *Anal Biochem.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1-7. doi: 10.1016/j.ab.2015.09.023.

38. Liu A., Xiong Q., Shen L., Li W., Zeng Z., Li C., Liu S., Liu Y., Han G. A sandwich-type ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* using the well-oriented single chain Fv antibody fragment // *Food Control.* – 2017. – Vol. 79. – P. 156–161. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.042.

39. Cho I.H., Irudayaraj J. Lateral-flow immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes* // *Anal Bioanal Chem.* – 2013. – Vol. 405. – P. 3313-3319. doi: 10.1007/s00216-013-6742-3.

40. Du X.J., Zang Y.X., Liu H.B., Li P., Wang S. Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strip for *Listeria monocytogenes* Detection in Food // *J Food Sci.* – 2018. – Vol. 83. – P. 1041-1047. doi: 10.1111/1750-3841.14078.

41. Li F., Li F., Luo D., Lai W., Xiong Y., Xu H. Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes* // *Anal Chim Acta.* – 2018. – Vol. 1017. – P. 48-56. doi: 10.1016/j.aca.2018.02.009

42. Hahm B.K., Kim H., Singh A.K., Bhunia A.K. Pathogen enrichment device (PED) enables one-step growth, enrichment and separation of pathogen from food matrices for detection using bioanalytical platforms // *J Microbiol Methods.* – 2015. – Vol.117. – P. 64-73. doi: 10.1016/j.mimet.2015.07.016.

43. Stambach N.R., Carr S.A., Cox C.R., Voorhees K.J. Rapid Detection of *Listeria* by Bacteriophage Amplification and SERS-Lateral Flow Immunochromatography // *Viruses.* – 2015. – Vol.3. – P. 6631-6641. doi: 10.3390/v7122962.

44. Wu Z. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* by a SERS-based lateral flow immunochromatographic assay // *Food Anal Methods.* – 2025. – Vol.12. – P. 1086-1091. doi: 10.1007/s12161-019-01444-4.

45. Boerlin P., Boerlin-Petzold F., Jemmi T. Use of listeriolysin O and internalin A in a seroepidemiological study of listeriosis in Swiss dairy cows // *J Clin Microbiol.* – 2003. – Vol.3. – P. 1055-1061. doi: 10.1128/JCM.41.3.1055-1061.2003.

## METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF PATHOGENIC LISTERIA IN FOOD PRODUCTS

Eskendirova S.Z.\*, Kaukabayeva G.K., Mukhlis S.E., Akhmetkarimova Z.S.

National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Highway, Astana, 010000, Kazakhstan

\*eskendirova@biocenter.kz

## АБСТРАКТ

Listeriosis is an infectious disease that affects both humans and animals and is caused by *Listeria monocytogenes*. It is characterized by multiple sources of pathogen entry, a wide range of transmission routes and factors, polymorphic clinical manifestations, and high mortality rates. *L. monocytogenes* is considered a unique foodborne pathogen due to its intracellular lifecycle and remarkable adaptive capabilities. The pathogenesis of listeriosis is largely driven by the virulence factors of *L. monocytogenes*, which enable incomplete phagocytosis, intracellular parasitism, rapid host cell invasion, and the development of antibiotic resistance. These virulence determinants act at various stages of the host infection cycle, enhancing the pathogen's ability to evade immune responses and establish persistent infections. Given the pronounced polymorphism of clinical manifestations and the unique biology of the pathogen, improving laboratory diagnostic methods and developing targeted immunoprophylactic strategies are of paramount importance. This article reviews recent advances in the epizootiology, epidemiology, and pathogenesis of listeriosis. It also highlights key pathogenicity and virulence factors of *L. monocytogenes* as critical targets for the development of rapid identification techniques in food products. The implementation of modern rapid detection methods significantly reduces analysis time and increases the accuracy of results, even when the pathogen is present in low concentrations within the tested samples.

**Keywords:** Listeriosis, immunodiagnostics, pathogenesis, virulence, antibodies, pathogen.

## ТАҒАМ ӨНІМДЕРІНДЕ ПАТОГЕНДІ ЛИСТЕРИЯЛАРДЫ АНЫҚТАУ ӘДІСТЕРІ

Ескендірова С.З.\*, Каукабаева Г.К., Мухлис Ш.Е., Ахметкаримова Ж.С.

Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

\*eskendirova@biocenter.kz

## АБСТРАКТ

Листерияоз бұл *Listeria monocytogenes* қоздыратын адамдар мен жануарлардың жұқпалы ауруы, қоздырғыштың ену көздерінің көптігімен, таралу жолдары мен факторларының әртүрлілігімен, клиникалық көріністердің полиморфизмімен және жоғары өлім-жітімімен сипатталады. Листерия ерекше азық-түлік патогені, себебі ол жасуша ішіндегі өмірлік циклге ие және жоғары бейімделу қасиеттерімен ерекшеленеді. Инфекцияның патогенезінде *L. monocytogenes* патогенділік факторлары маңызды рөл атқарады, олар толық емес фагоцитозды қамтамасыз етіп, жасуша ішіндегі паразитизмді, жасушаларды жоғары жылдамдықпен жұқтыруды және антибиотикке төзімділіктің қалыптасуын туындатады. *Listeria monocytogenes* вируленттік факторлары оның патогенділігін арттырып, иесінің инфекция циклінің әртүрлі кезеңдерінде әрекет етеді. Клиникалық көріністердің ерекше полиморфизмі мен қоздырғыш биологиясының бірегейлігін ескере отырып, листерияозды лабораториялық диагностикалау әдістерін және арнайы иммунопрофилактиканы жетілдіру өзекті бағыт болып табылады. Мақалада листерияоз инфекциясының эпизоотологиясы, эпидемиологиясы және патогенезі туралы соңғы мәліметтер жинақталып, *Listeria monocytogenes* патогенділік және вируленттік негізгі факторлары ұсынылған, олар азық-түлік өнімдеріндегі листерияны жылдам анықтау әдістерін жетілдіру үшін негізгі мақсаттар болып табылады. Листерияны жылдам анықтаудың заманауи әдістерін қолдану зерттеу үлгісіндегі қоздырғыштың төмен концентрациясында да талдау уақытын айтарлықтай қысқартуға және алынған нәтижелердің сенімділігін арттыруға мүмкіндік береді.

**Кілтті сөздер:** листерияоз, иммунодиагностика, патогенез, вируленттілік, антиденелер, қоздырғыш.