Original researches

Particularities of laboratory diagnostics of *Listeria spp*

I. V. Borovik, N. M. Zazharska

Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Received: 12 November 2019

Revised: 28 November 2019

Accepted: 03 December 2019

Dnipro State Agrarian and Economic
University, Sergii Efremov Str., 25, Dnipro,
49600, Ukraine

Tel.: +38-097-231-12-54

E-mail: drlvmac@i.ua

Cite this article: Borovik, I. V., & Zazharska, N. M. (2019). Particularities of laboratory diagnostics of *Listeria spp*. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(4), 236–244. doi: 10.32819/2019.74041

Abstract. The laboratory diagnosis of *Listeria spp* is imperfect, and the detection of *Listeria spp* pathogen from the products is complicated by the presence of other microflora. Detection of *Listeria spp* under laboratory conditions has been improved. The causative agent *Listeria spp* was isolated from food (meat and meat products, sour milk and hard cheese, fish), washes from environmental objects, pathological material (poultry corpses). The morphological properties of different reference strains of *Listeria spp* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. murray*) were compared. It is noted that all species have a rod-shaped and coccylal form of microorganism. In smears it is quite rare to find a pathogen in the form of a «V» shape. Nutrient selective media from different manufacturers (Graso Biotech, Merck, Biolife Italiana, BioMerieux, HiMedia, Lab M, Difco) were used to study the growth properties and identification of the pathogen. The best results are obtained with medium from Graso Biotech and Merck. The method of primary and secondary accumulation was improved to guarantee the increase in the concentration of the *Listeria* pathogen: increasing the weight of the sample and reducing the volume of the solvent, reducing the amount of Fraser broth and increasing the volume of the original suspension. Improvements in the scheme of CAMP-test prevent the merger of the hemolysis zone of the studied cultures. It is recommended to combine CAMP-test with a hemolytic test (puncture method), which allows to observe mirror hemolysis. The reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Rhodococcus equi* are classically used for the CAMP-test, but *Listeria* exhibits hemolytic properties with other types of microorganisms. According to our practical experience also β -hemolytic cultures: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* or *Clostridium perfringens*. Cultures that do not have hemolytic properties – *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*. The determination of hemolytic properties of *Listeria* is offered by strains of microorganisms – *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. For the identification of the pathogen, the method of enzyme-linked immunosorbent fluorescence analysis on an automatic Vidas analyzer was used. This method shortens the study period to one day in case of a negative result as opposed to the classical one (5 days). We suggest using the Vidas *Listeria* Duo test system to identify *L. monocytogenes* and *Listeria spp*. Using the *Listeria*10300 API test system allows one to determine the biochemical properties of the pathogen in one day. According to the results of bioassay in mice pathogenic properties have both *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*.

Keywords: quality and safety; identification; CAMP-test; hemolysis.

Особливості лабораторної діагностики *Listeria spp*

І. В. Боровик, Н. М. Зажарська

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

Анотація. Лабораторна діагностика *Listeria spp* недосконала, так як виявлення збудника із продуктів ускладнене наявністю іншої мікрофлори. Удосконалено виявлення *Listeria spp* у лабораторних умовах. Збудника виділяли з харчових продуктів (м'ясо і м'ясопродукти, сир кисломолочний і твердий, риба), змивів з об'єктів довкілля, патологічного матеріалу (трупі птиці). Проведено порівняння морфологічних властивостей різних еталонних штамів *Listeria spp* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. murray*). Відмічено, що усі види мають паличко- і коковидну форму, і в мазках рідко зустрічається збудник у вигляді характерної «V» форми. Для вивчення ростових властивостей та ідентифікації збудника використовували живильні селективні середовища різних виробників (Graso Biotech, Merck, Biolife Italiana, BioMerieux, HiMedia, Lab M, Difco). Найкращі результати отримано на живильних середовищах фірми Graso Biotech та Merck. Удосконалено методику первинного і вторинного накопичення для гарантованого збільшення концентрації збудника *Listeria*: збільшення маси наважки та зменшення об'єму розчинника, зменшення кількості бульйону Фрезера і збільшення об'єму вихідної суспензії. Удосконалення схеми проведення CAMP-тесту попереджає злиття зони гемолізу досліджуваних культур. Рекомендовано під час проведення CAMP-тесту поєднувати його з гемолітичним тестом (методом проколу), що дозволяє спостерігати дзеркальний гемоліз. Для проведення CAMP-тесту класично використовують еталонні штами *Staphylococcus aureus* та *Rhodococcus equi*, проте *Listeria* проявляє гемолітичні властивості і з іншими мікроорганізмами. За нашими напрацюваннями β -гемолітичними властивостями також володіють культури мікроорганізмів: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* та *Clostridium perfringens*. Культури, які не володіють гемолітичними властивостями – *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*. Запропоновано визначати гемолітичні властивості *Listeria* за допомогою штамів мікроорганізмів – *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*.

Для ідентифікації збудника слід застосовувати метод імуноферментного флуоресцентного аналізу на автоматичному аналізаторі Vidas, що дозволяє скоротити термін дослідження до однієї доби у разі негативного результату, на відміну від класичного (5 діб). Пропонуємо використовувати тест-систему Vidas *Listeria* Duo, що дозволяє ідентифікувати *L. monocytogenes* і *Listeria spp*. Використання тест-системи API *Listeria*10300 дозволяє визначити біохімічні властивості збудника за одну добу. За результатами проведення біопроб на мишах патогенними властивостями володіють як *L. monocytogenes* так і *L. ivanovii*.

Ключові слова: якість і безпечність; ідентифікація; CAMP-тест; гемоліз.

Вступ

Останнім часом проблема розповсюдження та виявлення *Listeria spp* вийшла за межі ветеринарної медицини. Нині це питання пильнується державною службою України з питань безпечності харчових продуктів та захисту прав споживачів, бо лістеріоз це не лише ветеринарна, а й нагальна медична проблема. Проте на сьогодні відсутній план моніторингу виявлення лістеріозу. З кожного птахопереробного господарства за рахунок державних коштів досліджують у рік лише 10 трупів птахів на виявлення збудника. Отже, дати об'єктивну оцінку ситуації по розповсюдженню *Listeria spp* складно. Аналіз епідемічної ситуації свідчить про збільшення випадків харчової токсикоінфекції у людей.

Listeria spp спричиняє вагомі соціальні та економічні збитки через контамінацію продукції, вилучення її з обігу і вибракування. Виявлення *Listeria spp* на виробничих підприємствах необхідно пильнувати на усіх стадіях виробництва (Tompkin, 2002).

Інформація щодо лабораторної експрес-діагностики *Listeria spp* недостатня в результаті чого, можливі хибні результати що несуть загрозу для споживачів.

Виявлення *Listeria* з продукції та патологічного матеріалу надзвичайно ускладнене за рахунок обробки її дезінфектантами та антибіотиками, що пригнічують ростові властивості збудника (Rothrock et al., 2016; Glebenyuk et al., 2018; Zazharskyi et al., 2019a-c).

Незважаючи на те, що методика виявлення *Listeria spp* постійно удосконалюється, в сучасних лабораторних умовах практично виявити психотрофні мікроорганізми досить складно. Відповідно лишається актуальним питання не лише виявлення збудника, але й підрахунок, адже від ступеня забруднення залежить безпечність продукту. Відповідно до регламенту ЄС № 2073/2005 про мікробіологічні критерії зазначено, що загальноприйнятий рівень *L. monocytogenes* – 100 КУО/г, або у 25 г, 25 мл у харчових продуктах які готові для споживання не допускаються, за винятком продукції для немовлят і спеціальних медичних потреб. Отже якщо 1 гр продукту містить 100 КУО то, відповідно до регламенту, цей продукт являється небезпечним для вживання в їжу (Saraiva et al., 2018; Zazharska & Borovuk, 2019). За даними Kramarenko et al. (2013) в Естонії лише 2,9 та 0,8 % рибних продуктів готових до споживання містили *L. monocytogenes* у межах 100–1000 КУО / г та > 1000 КУО/г відповідно на кінець терміну зберігання, всупереч надзвичайному поширенню збудника серед сирової продукції.

Деякі вчені вивчають генетичні структури підгруп *L. monocytogenes* (Liu et al., 2006; Tsai et al., 2011; Juni, 2015), маркери для генотипів *Listeria spp* (Verghese et al., 2011), фенотипові відмінності між ізолятами *L. monocytogenes* у межах роду *Listeria spp* (Glaser, et al., 2003.) Ірландські вчені методом імпульсно-польового гель-електрофорезу вивчили близько 51 ізоляту *L. monocytogenes* (Fox et al., 2011).

Доведено, що вивчення гемолітичних властивостей *Listeria spp* можливо на культурах *Bacillus*, *Staphylococcus* (Buchrieser et al., 2003; Zazharskyi et al., 2018).

Milillo et al. (2012) виявили гемолітичну *L. innocua* – патоген ізолювали зі зразків сліпої кишки курей і докілья (трава/грунт), подальша ідентифікація збудника проведена за допомо-

гою API тестів.

Виявлення збудника *Listeria spp* із продуктів ускладнене значною контамінацією супутньої мікрофлори (Zazharska & Borovuk, 2019). Тому виявлення *Listeria spp* з м'яса та м'ясних продуктів у максимально стислий термін із застосуванням нових тест-систем і проведенням гемолітичного тесту з іншими культурами мікроорганізмів являється нагальною проблемою у сучасній лабораторній практиці.

Матеріал і методи досліджень

Збудник *Listeria spp* виділяли з харчових продуктів (м'ясо і м'ясопродукти, сир кисломолочний і твердий, риба), змивів з об'єктів докілья, патологічного матеріалу (трупи птиці). Зразки на дослідження надходили з приватного сектору та з птахопереробних підприємств Дніпропетровської області: ТОВ «Союз Даг» Верхньодніпровського району, ППФ «Агроцентр» Дніпровського району, ПТФ «Дніпропетровська» Дніпровського району, ПФ «Лозуватська» Криворізького району ТОВ «Марганецька» Томаківського району, ПК «Мар'янівський» Новомосковського району, ПК «Голубовський» Новомосковського району, ЗАТ з ПП «Оріль Лідер» Петриківського району, ЗАТ «Дніпровський» Нікопольського району, ПК «Молодіжне» Солонянського району.

Лабораторну діагностику проводили на базі бактеріологічного відділу Дніпропетровської регіональної державної лабораторії державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів. Дослідження проводили відповідно до вимог міжнародного стандарту ISO 11290-1:2017(E). Використовували референт-станданти культур мікроорганізмів придбані в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів, а саме: *L. monocytogenes* ATCC 19112, *L. ivanovii*, *L. innocua* ATCC 33090, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi subsp. grayi*, *L. grayi subsp. murray*.

Забарвлення мазків з добових культур мікроорганізмів проводили за Грамом (модифікованим методом Hucker, відповідно до ДСТУ ISO 7218:2014). Для вивчення морфологічних, тинкторіальних, культуральних, ферментативних, біохімічних властивостей мікроорганізмів застосовували методи: мікроскопія, накопичення збудника, гемолітичний тест, CAMP-тест (названий за прізвищами авторів Christie–Atkins–Munch–Petersen), метод імуноферментного флуоресцентного аналізу на автоматичному аналізаторі серії VIDAS, (Франція), API-тест (Analytical profile index – індекс аналітичного профілю – система для швидкої ідентифікації мікроорганізмів; API *Listeria*10300, BioMerieux, Франція), біопроба.

Результати та їх обговорення

Відбирання проб проводять за вимогами міжнародного стандарту, що стосується певного продукту ISO 6887-1:2017, або ISO/TS 17728:2015. Для відбору зразків навколишнього середовища користуються ISO 18593:2018.

Рід *Listeria* включає групу грампозитивних психотрофних бактерій із 20 видів, проте у лабораторній практиці ідентифікують лише 7 видів лістерій згідно чинної нормативної документації.

Рис. 1. *L. monocytogenes* добова бульйонна культура $\times 1000$

Рис. 2. *L. innosua* добова бульйонна культура $\times 1000$

Рис. 3. *L. ivanovii* добова бульйонна культура $\times 1000$

Рис. 4. *L. welshimeri* добова бульйонна культура $\times 1000$

Рис. 5. *L. seeligeri* добова бульйонна культура $\times 1000$

Рис. 6. *L. grayi subsp. grayi* добова бульйонна культура $\times 1000$

Мікроскопія

Listeria spp – це малі, грампозитивні мікроорганізми паличко- і коковидної форми (рис. 1–7).

Усі види *Listeria spp* короткі грампозитивні палички, поліморфні, переважно паличковидні, проте досить часто спостерігали кокоїдну або коковидну форми, що не утворюють спор $0,4\text{--}0,5 \times 1\text{--}2$ мкм. Лістерій під час мікроскопії іноді помилково можна віднести до стрептококів чи стафілококів. Характерним являється розташування лістерій у вигляді «V» форми в мазках.

На рисунках 1–7 видно, що різні види *Listeria spp* не значно відрізняються за своєю морфологією. Отже, диференціювання *Listeria spp* від інших мікроорганізмів за допомогою мікроскопії мазків-відбитків неможливо, що підтверджують і інші автори (Rowan et al., 2000; Nyila, 2018).

Накопичення *Listeria spp*

Перший етап лабораторного дослідження починається з додавання зразка до розчинника (1 : 9): 25 г проби + 225 см³

Рис. 7. *L. grayi subsp murray* добова бульйонна культура $\times 1000$ (відмічена характерна «V»-форма в мазках)

Рис. 8. Вторинне збагачення на бульйоні Фрезера

половинного бульйону Фрезера. Нами запропоновано до 50 г наважки додавати 100 см³ одного з розчинників (Фрезера, Бульйон LPT або Бульйон LMX), концентрація (1 : 2). Збільшення маси наважки та зменшення об'єму розчинника пропонується з метою збільшення концентрації збудника *Listeria*. Рекомендуємо використовувати розчинник кімнатної температури. Початкову суспензію інкубують за 30 °C протягом 24 годин. На другу добу пересівають на диференціальні поживні середовища та на бульйон Фрезера (рис. 8).

За вимогами стандарту ISO 11290-1:2017(E) використовують 10 см³ бульйону Фрезера та 0,1 см³ суспензії. Рекомендуємо збільшити концентрацію збудника: 5 см³ бульйону Фрезера та 1 см³ суспензії. Це дозволяє гарантовано накопичити збудник, якщо він присутній у дослідному зразку. Пробірки з металевими корками досліджені згідно стандарту не в усіх випадках змінили забарвлення, що свідчить про малу концентрацію збудника, проте пробірки, які мають ватно-марлеві корки в усіх випадках змінили забарвлення (див. рис. 8).

Відповідно до стандарту середовище вторинного збагачення культивують протягом 48 годин за температури 37 °C. Проте краще збагачення, за нашими спостереженнями, відбувається за температури 25–30 °C саме в таких умовах лістерія рухлива. *Listeria spp* інкубовані за температури вище 37 °C не рухливі. Для проведення тесту на рухливість рекомендуємо середовище

Listeria Motility Medium (виробник HiMedia).

У лабораторній практиці використовували живильні середовища різних виробників: Graso Biotech, Merck, Biolife Italiana, BioMerieux, HiMedia, Lab M, Difco. Найкращі результати отримані за допомогою живильних середовищ фірми Graso Biotech, та Merck.

З інкубованої початкової суспензії та вторинного бульйону Фрезера обов'язково необхідно робити пересів на два селективні середовища. Нами запропоновано на вибір: *L. mono* (ALOA), PALCAM, Oxford. Посіви проводили методом Гоулда (Gould, 1965) і прямим методом (plating out).

На середовищі *L. mono* (ALOA) усі види *Listeria spp* мають гарні ростові властивості. *L. monocytogenes* та *L. ivanovii* – у вигляді типових колоній синьо-зеленого забарвлення, правильної круглої форми, мають непрозорий ореол навколо (рис. 9).

Listeria spp також мають синьо-зелені колонії, правильної круглої форми, проте відсутній непрозорий ореол навколо – це основна відмінність. Однак під впливом стресових умов, особливо зміни pH у кислу сторону, деякі штами *L. monocytogenes* не мають ореолу, або він дуже слабкий, цей фактор інколи ускладнює діагностику. У такому випадку пропонуємо ідентифікувати *L. monocytogenes* за допомогою Vidas.

На середовищі PALCAM типові колонії мають вигляд сіро-оливкового-зеленого кольору з чорним ореолом навколо

Рис. 9. Пікт *Listeria spp* на середовищі *L. mono* (ALOA)

Рис. 10. Ріст *Listeria spp* на середовищі PALCAM

Рис. 11. Ріст *Listeria spp* на середовищі Oxford

(рис. 10). Після добової інкубації складно ідентифікувати типові колонії, проте після 2-ої доби інкубації виявити типову колонію досить легко бо в ній з'являється втягнутий центр. На цьому середовищі активно проявляють ростові властивості усі види *Listeria spp*. На жаль ідентифікувати *Listeria* за формою колоній складно.

На середовищі Oxford ростуть всі види *Listeria spp* (рис. 11). Типові колонії сіро-зеленого кольору оточені чорним ореолом навколо, на 2-гу добу з'являється втягнутий центр. Також ідентифікування *Listeria* за формою колоній не можливо.

Відповідно до стандарту для підтвердження *Listeria spp* пересівають виділені колонії на триптичний соєвий з екстрактом дріжджів агар або кров'яний агар. Але нами рекомендовано для подальших досліджень використовувати типові колонії з живильних середовищ *L. mono* (ALOA), PALCAM, Oxford.

Всі види *Listeria spp* є каталазо-позитивними при вирощуванні на звичайних середовищах (МПБ) (Unanue & Carrero, 2012). Спостерігаються штами каталазо-негативних *L. monocytogenes* за умов використання живильних середовищ з високим вмістом глюкози (Nyila, 2018).

Однак реакція каталази виконана з колонією, що походить із кров'яного агару, іноді може приводити до помилково-позитивних результатів.

Гемолітичний тест

Використання кров'яного агару (Columbia Blood Agar Base) з додаванням стерильних еритроцитів барана дозволяє спостерігати гемоліз уже на початковому етапі у разі позитивного результату. Нами досліджено, що оптимальна кількість середовища для реакції не повинна перевищувати 10–15 см³ (термін придатності готового середовища до 7–10 діб). Якщо об'єм середовища більший то ускладнюється облік результатів, якщо менший – середовище висихає.

Яскравими гемолітичними властивостями володіє *L. ivanovii*, а *L. monocytogenes* демонструє незначну зону гемолізу, *L. innocua* – гемоліз відсутній (рис. 12).

Якщо на агарі немає ознак гемолізу, то тест ще раз має виконуватися шляхом проколу (рис. 13).

L. grayi, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. murray* майже не володіють гемолітичними властивостями

Рис. 12. Гемолітичний тест з *Listeria spp* на кров'яному агарі (перша доба)

Рис. 13. Гемолітичний тест (проколом)

Рис. 14. Схематична відстань між нанесенням культур

CAMP-тест

Для проведення CAMP-тесту під час ізолювання типових колоній *Listeria spp* класично використовують еталонні штами *St. aureus* та *Rh. equi*, але лістерія проявляє гемолітичні властивості і з іншими видами мікроорганізмів. За нашими напрацюваннями β -гемоліз можливий з однієї з культур *St. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* чи *Clostridium perfringens*. γ -гемолітичні культури – *Rh. equi*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*.

Референтні культури (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *St. aureus*, *Rh. equi*) накопичують одну добу в бульйоні, на 2-гу добу висівають на напівскошений МПА та інкубують за температури 370 °C близько доби. У разі слабких ростових властивостей культури, необхідно продовжити термостатування ще на добу. З практики, якщо CAMP-тест робити з бульйонних культур, як позначено в стандарті, результат може бути негативний або хибний, чітка інтерпретація неможлива.

На кров'яному агарі наносять *St. aureus* і *Rh. equi* у вигляді вертикальних ліній на відстані 4,5–5 см (рис. 14а). Між верти-

кальними лініями з штамами *St. aureus* і *Rh. equi* рекомендуємо засівати досліджувані культури паралельно на відстані один від одного не менше 1–1,5 см. Якщо відстань менша ніж 1 см після інкубації можливо злиття зони гемолізу досліджуваних культур. Наступний критичний момент – висів культур не доводити до референтних ближче ніж 3–5 мм (рис. 14б). За стандартом ця відстань – 1–2 мм, але це, за нашим практичним досвідом, позбавлене сенсу, тому що унеможливорює облік «стрілоподібного» гемолізу.

Після культивування за температури 37 ± 1 °C (24 години) відмічають зони гемолізу (появу розширення і просвітлення) біля вертикальних ліній з штамами *St. aureus* і *Rh. equi* (рис. 15).

L. monocytogenes і *L. seeligeri* в більшості випадків проявляють позитивну реакцію (гемоліз) біля *St. aureus* і негативну (відсутність гемолізу) – біля *Rh. equi*. *L. ivanovii* навпаки, проявляє гемолітичні властивості тільки біля *Rh. equi* (табл. 1).

Вважають, що *L. innocua* не проявляє гемолітичні властивості, однак Milillo et al. (2012) виявили гемолітичні штами, що суперечить класичному CAMP-тесту.

З практики, доцільно проводити CAMP тесту з типовими колоніями з селективних середовищ *L. mono* (ALOA), PALCAM, Oxford та додаткових гемолітичних проколів біля зовнішніх ліній з еталонними штамами *St. aureus* та *Rh. equi*. Отже, на одній чашці ми проводимо гемолітичний і CAMP-тест (рис. 16).

Під час обліку реакції можна спостерігати явище «дзеркальної парасольки» біля вертикальних ліній *L. monocytogenes* (*St. aureus*) і *L. ivanovii* (*Rh. equi*).

Рис. 15. Класичний гемоліз (парасолька) під час CAMP тесту *L. ivanovii*

Таблиця 1. Гемолітичні властивості *Listeria spp*. (за Bergey's Manual, 2015)

Бактерії роду <i>Listeria</i>	β -гемоліз	CAMP-тест	
		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	70 - 90 %	+	–
<i>L. innocua</i>	< 10 %	–	–
<i>L. ivanovii</i>	100%	–	+
<i>L. seeligeri</i>	> 90 %	(+)	–
<i>L. welshimeri</i>	< 10 %	–	–
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	< 10 %	–	–
<i>L. grayi subsp. murray</i>	< 10 %	–	–

Рис. 16. Поєднання гемолітичного і CAMP-тесту (дзеркальний гемоліз)

Рис. 17. Внесення культури до лунки стрипу в прилад VIDAS

Проте треба врахувати, що під час постановки CAMP-тесту на другу добу інкубації зона гемолізу вздовж *St. aureus* може збільшитися до 2 см (рис. 16), і облік результатів буде ускладнений.

Для ідентифікації мікроорганізмів користуються молекулярно-генетичними (ПЛР, ПЛР-РЧ) і серологічними методами (ІФА-Listeria-Tek, TLVIA, ІФА-Vidas, імунохроматографічні та інші).

Для ідентифікації *Listeria* добре зарекомендував себе метод імуноферментного флуоресцентного аналізу на автоматичному аналізаторі серії Vidas, Франція (рис. 17).

Застосування Vidas спрощує та прискорює виявлення *Listeria spp*.

Біохімічні властивості *Listeria spp* класично визначають за ферментацією лише двох цукрів: рамнози та ксилози. У сучасній світовій лабораторній практиці біохімічні властивості *Listeria spp* визначають за допомогою API-тесту (API Listeria10300, BioMerieux, Франція).

У розчин в ампулі вносять типові колонії добової культури з кров'яного агару. Суспензію розливають у лунки планшету API-тесту. Облік реакції проводять за зміною забарвлення лунок через 18–24 години інкубації за $36 \pm 2^\circ \text{C}$ (рис. 18, табл. 2).

Прискорена ідентифікація виділених мікроорганізмів до роду проводиться за допомогою тестів і тест-систем: Listeria Latex Kit, Singlepath Listeria, Vidas Listeria Duo (LDUO). Ідентифікація виділених бактерій до виду *L. monocytogenes* можлива з використанням Vidas Listeria monocytogenes II (LMO2), Singlepath L'mono, BAX System PCR assay for *L. monocytogenes*, BAX System PCR assay for *L. monocytogenes* 24e, TaqMan Listeria monocytogenes Detection Kit і PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent, Foodproof Listeria monocytogenes Detection Kit, 5'nuclease.

Отже, наявність сучасного обладнання та реактивів дозволяє виявити *Listeria spp* із харчових продуктів, кормів, патологічного та біологічного матеріалу, змивів з об'єктів довкілля.

Рис. 18. API-тест з еталонними тест-штамами (API Listeria10300)

Таблиця 2. Ідентифікація відсотка позитивних реакцій API Listeria10300

API LISTERIA Тест	Колір позитивної і негативної реакції	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murray</i>
DIM (ферментативний субстрат)	+ Блідо бежева, рожево-бежева, сіро-бежева – Оранжева	0	99	88	97	90	99	98
ESC (ескулінзаліза цитрат)	+ Блідо-жовта – Чорна	100	100	100	100	100	100	100
αMAN (4-нітрофеніл-αD- маннопіранозид)	+ Безколірна – Жовта	98	98	0	5	96	99	93
DARL (D-арабіт)		97	100	99	99	100	100	100
XYL (D-ксилоза)		0	2	97	99	98	1	5
RHA (L-рамноза)		98	66	4	0	76	16	45
MDG (Метил-αD-глюкопіранозид)	+ Червона, червоно-оранжева – Жовта, жовто-оранжева	100	98	99	99	99	33	34
RIB (D-рибоза)		0	0	33	0	0	100	100
GIP (Глюкозо-1-фосфат)		5	0	91	0	0	0	0
TAG (D-тагатоza)		0	0	0	0	97	0	0

Біопроба

Зараження лабораторних тварин проводять для визначення патогенності *Listeria spp*, яка ізольована з патологічного матеріалу. Зараження мишей проводили внутрішньочеревно в дозі 0,5 мл добової культури (0,1 одиниць за стандартом каламутності McFarland). Спостерігали за тваринами до 15 діб.

У мишей, загинувших на 8–15-ту добу, спостерігали ознаки ка-

нібалізму (рис. 19а), кон'юнктивіт, заціпеніння, паралічі кінцівок, а також зміни у внутрішніх органах – збільшення печінки, селезінки і головного мозку (рис. 19в-е). У грудній і черевній порожнинах виявляли червонуватий ексудат (рис. 19б).

За нашими спостереженнями, патогенними властивостями володіють як *L. monocytogenes* так і *L. ivanovii*.

Рис. 19. Патологоанатомічні зміни у мишей при біопробі: а – ознаки канібалізму; б – геморагічний ексудат у черевній порожнині; в – ознаки гепатиту; г – ознаки спленіту; д – ознаки менінгоенцефаліту; е – головний мозок здорової миші.

Висновки

Проведено порівняння 7 видів *Listeria spp* за мікроскопією та визначено, що класичну форму з еталонних штамів знайти складно, частіше спостерігали палички або кокобацили. Описані ростові властивості *Listeria spp* на різних селективних живильних середовищах.

Удосконалення схеми проведення CAMP-тесту попереджають злиття зони гемолізу досліджуваних культур.

Запропоновано поєднання гемолітичного і CAMP-тесту, що надає можливість спостерігати дзеркальне відображення гемолітичної парасольки.

Для проведення CAMP-тесту замість *St. aureus* та *Rh. equi* запропоновано використовувати культури мікроорганізмів *B. subtilis* і *E. coli*.

Запропоновано проведення лабораторної діагностики *Listeria spp* за одну добу на відміну від класичного методу (5 діб). Ідентифікація *Listeria spp* в максимально стислий термін можлива лише за умови використання Vidas. Також скорочує термін дослідження використання нових тест-систем: *Listeria* Latex Kit, Singlepath *Listeria*.

References

- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., & Glaser, P. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 207–213.
- Fox, E. M., Leonard, N., & Jordan, K. (2011). Molecular diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from Irish dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5), 635–641.
- Glaser, P., Rusniok, C., & Buchrieser, C. (2003). *Listeria* genomics. *Listeria monocytogenes*: pathogenesis and host response, 33–62.
- Glebenyuk, V. V., Borovik, I. V., Kuchuk, T. V., & Litvinenko, O. O. (2018). Etiological structure of bacteriosis of animals in the Dnipropetrovsk region for 2014–2016. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(83), 260–263 (in Ukrainian).
- Juni, E. (2015). *Psychrobacter*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1–10.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Põltsama, P., & Elias, T. (2013). *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*, 30(1), 24–29.
- Liu, D., Lawrence, M. L., Wiedmann, M., Gorski, L., Mandrell, R. E., Ainsworth, A. J., & Austin, F. W. (2006). *Listeria monocytogenes* Subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4229–4233.
- Milillo, S. R., Stout, J. C., Hanning, I. B., Clement, A., Fortes, E. D., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., & Rieke, S. C. (2012). *Listeria monocytogenes* and hemolytic *Listeria innocua* in poultry. *Poultry Science*, 91(9), 2158–2163.
- Nyila, M. A. (2018). Introductory chapter: *Listeria monocytogenes*. *Listeria Monocytogenes*.
- Rothrock, M. J., Hiatt, K. L., Guard, J. Y., & Jackson, C. R. (2016). Antibiotic resistance patterns of major zoonotic pathogens from all-natural, antibiotic-free, pasture-raised broiler flocks in the southeastern United States. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 593–603.
- Rowan, N. J., Anderson, J. G., & Candlish, A. A. G. (2000). Cellular morphology of rough forms of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical and food samples. *Letters in Applied Microbiology*, 31(4), 319–322.
- Saraiva, C., Garcia-Diez, J., Fontes, M. da C., & Esteves, A. (2018). Modeling the behavior of *Listeria monocytogenes* in meat. *Listeria Monocytogenes*.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65(4), 709–725.
- Tsai, Y.-H. L., Maron, S. B., McGann, P., Nightingale, K. K., Wiedmann, M., & Orsi, R. H. (2011). Recombination and positive selection contributed to the evolution of *Listeria monocytogenes* lineages III and IV, two distinct and well supported uncommon *L. monocytogenes* lineages. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 1881–1890.
- Unanue, E. R., & Carrero, J. A. (2012). Studies with *Listeria monocytogenes* lead the way. *Advances in Immunology*, 1–5.
- Verghese, B., Lok, M., Wen, J., Alessandria, V., Chen, Y., Kathariou, S., & Knabel, S. (2011). comKProphage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3279–3292.
- Zazharska, N. M., & Borovuk, I. V. (2019). Monitoring of the *Listeria* spp. identification from the poultry products in the Dnipropetrovsk region. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnology*, 21(93), 103–108 (in Ukrainian).
- Zazharskyi, V., Davydenko, P., Kulishenko, O., Borovik, I., Brygadyrenko, V., & Zazharska, N. (2019a). Antibacterial activity of herbal infusions against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 141(11), 693–704.
- Zazharskyi, V., Parchenko, M., Fotina, T., Davydenko, P., Kulishenko, O., Zazharskaya, N., & Borovik, I. (2019b). Synthesis, structure, physicochemical properties and antibacterial activity of 1,2,4-triazoles-3-thiols and furan derivatives. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*, (6), 74–82.
- Zazharskyi, V. V., Davydenko, P. O., Kulishenko, O. M., Borovik, I. V., & Brygadyrenko, V. V. (2019c). Effect of ethanol plant extracts on *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*. *Scientific and Technical Bulletin Of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology*, 20(2), 154–161 (in Ukrainian).
- Zazharskyi, V. V., Davydenko, P. O., Kulishenko, O. M., & Borovik, I. V. (2018). Bacterial properties of ethanol extracts of phytopreparation a *staphylococcus* spp. *Bulletin of Veterinary Biotechnology*, 32(2), 185–193 (in Ukrainian).