

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ІЗОЛЯТІВ РОДУ *LISTERIA* З РЕФЕРЕНТНИМИ ШТАМАМИ БЕЛЬГІЙСЬКОЇ КОЛЕКЦІЇ КУЛЬТУР

В. А. Ковтун, В. О. Ушкалов, Л. М. Виговська

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

*Наведено результати порівняльного вивчення основних біологічних властивостей ізолятів бактерій роду *Listeria* з референтними штамми Бельгійської колекції культур. Теоретично обґрунтовано та експериментально доведено необхідність вдосконалення внутрішньородової діагностики мікроорганізмів роду *Listeria* бактеріологічним методом. Відпрацьовано різні строки інкубування культур під час визначення їх гемолітичних властивостей. За результатами проведених досліджень ізолятів, відібрано найбільш перспективні кандидати, що будуть використані під час розробки набору еталонних тест-культур для внутрішньородової типізації лістерій бактеріологічним методом і перевірки якості та ростових властивостей поживних середовищ. Отримані результати дали підстави для складання паспортів на штами та проведення процедури їх депонування в депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).*

Ключові слова: ІЗОЛЯТИ РОДУ *LISTERIA*, РЕФЕРЕНТНІ ШТАМИ, БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД

Лістеріоз є інфекційною сапронозною хворобою тварин, що може проявлятися у вигляді менінгоенцефалітів, абортів, метритів, маститів, септицемії. Продукти харчування, уражені бактеріями роду *Listeria*, можуть спричинити захворювання людини на лістеріоз. Небезпечно це тим, що дане захворювання має високий відсоток летальності. Мікроорганізми роду *Listeria* виявляють в молочних продуктах, м'ясі тварин та птиці, овочах, салатах, морських продуктах [1, 2]. У результаті чого, важливе значення має швидке та правильне ідентифікування виявлених мікроорганізмів з вивченням їх біологічних властивостей. Згідно з ДСТУ ISO 11290-1 для ідентифікації певного виду *Listeria* проводять культурально-морфологічні, біохімічні, гемолітичні дослідження (на чашках із агаром з баранячою кров'ю та застосовуючи CAMP-test).

У Національному центрі штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів підтримується колекція бактерій роду *Listeria*, що використовуються для контролю якості поживних середовищ та для внутрішньородової диференціації. Поповнення колекції перспективними штамми з числа епізоотичних забезпечить можливість створення нових засобів діагностики та профілактики.

Метою досліджень було порівняльне вивчення основних біологічних властивостей ізолятів роду *Listeria* з референтними штамми Бельгійської колекції культур. А також експериментальне визначення оптимальних строків культивування мікроорганізмів під час внутрішньородової диференціації бактеріологічним методом.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були епізоотичні ізоляти відповідно до таблиці 1, виділені із матеріалу тваринного та рослинного походження, а також отримані із Запорізької обласної санітарно-епідеміологічної станції. Матеріал тваринного походження було відібрано прижиттєво в умовах приватних господарств України. Відбір матеріалу для виділення ізолятів проводили враховуючи літературні дані [3, 4].

Об'єктом досліджень були основні біологічні властивості штамів та ізолятів, а також умови їх культивування.

Перелік ізолятів, що було відібрано для дослідження

Природа матеріалу		Кількість виділених ізолятів
Матеріал тваринного походження	Змиви зі слизових оболонок статевих органів	5
	Абортовані плоди	3
	Фекалії шиншилл	2
Матеріал рослинного походження	Листя злакових (кукурудза)	2
	Проби ґрунту	2

Під час вивчення основних біологічних властивостей епізоотичних ізолятів, в якості контролів, використовували референтні штами Бельгійської колекції культур з завідомо відомими біологічними властивостями, а саме *Listeria ivanovii* LMG 11388, *Listeria seeligeri* LMG 11386, *Listeria grayi* LMG 16490 та *Listeria grayi* LMG 16491 (типовий штам для *L. murrayi*).

Виділення ізолятів проводили з використанням селективних середовищ Oxford та Palcam з подальшим підтвердженням родової приналежності за рухливістю і каталазною активністю.

Визначення каталазної активності проводили за стандартними методиками [4], при цьому колонії розчиняли у краплі розчину пероксиду водню на предметному склі. Визначення рухливості дослідних та референтних мікроорганізмів проводили через 24-години культивування за температури 25 ± 1 °C [5].

Морфологічні властивості ізолятів вивчали шляхом виготовлення мазків з добової бульйонної та агарової культур, та фарбуванням їх за Грамом.

Для вивчення культуральних властивостей мікроорганізми висівали в рідкі та на щільні (з додаванням 5 % сироватки коня і 1 % глюкози) середовища, а також елективні середовища Oxford та Palcam (культивування 24–48 годин) [3, 5].

Дослідження біохімічної активності культур проводили шляхом їх культивування в середовищах Гісса з різними вуглеводами протягом 7 діб за температури 37 ± 1 °C, при цьому пробірки продивлялись у пронизуючому світлі щодоби [3, 5].

Гемолітичні властивості визначали шляхом культивування за температури 37 ± 1 °C на щільному середовищі з додаванням дефібринованої крові барана та проведенням CAMP-test з використанням двошарового кров'яного середовища. На кров'яному агарі β-гемоліз визначали шляхом нанесення бактеріологічною петлею колоній на середовище. Для проведення CAMP-test дводобові агарові культури гемолітичних штамів *Staphylococcus aureus* та *Rhodococcus equi* засівали на кров'яний агар з еритроцитами барана двома паралельними штрихами на відстані 5,0–5,5 см. Між вертикальними штрихами *S. aureus* та *R. equi* засівали паралельними штрихами агарові культури лістерій на відстані один від одного не менше 1 см і від вертикальних штрихів — 0,5 см. Інкубацію проводили за температури 37 ± 1 °C протягом 24 (відповідно до ДСТУ ISO 11290), 48 та 72 годин.

Під час обліку результатів визначали форму і розміри зон гемолізу біля вертикальних штрихів росту *S. aureus* та *R. equi* [3, 5, 6].

Результати й обговорення

Під час вивчення біологічних властивостей епізоотичних ізолятів за необхідне вважалося підтвердження їх приналежності до роду *Listeria*. Для цього було проведено: пробу на каталазу, посів на індикаторні середовища Oxford та Palcam, мікроскопію, а також визначено рухливість культур (табл. 2).

Зведені результати першого досліду, відображені в таблиці 2, вказують на те, що усі відібрані ізоляти, за характером росту на Oxford та Palcam агарам, морфологією культур, зафарбовуванням за Грамом, рухливістю і каталазною активністю, відносяться до роду *Listeria*.

Таблиця 2

Результати визначення родової приналежності виділених ізолятів

Мікро організми	Назва ізоляту/штаму	Ріст на Oxford	Ріст на Palcam	Рухливість	Каталазна активність	Зафарбовування за Грамом
Ізоляти	1/0811	+	+	+	+	+
	2/0811	+	+	+	+	+
	3/0811	+	+	+	+	+
	4/0811	+	+	+	+	+
	5/0811	+	+	+	+	+
	6/0811	+	+	+	+	+
	7/0811	+	+	+	+	+
	8/0811	+	+	+	+	+
	9/0811	+	+	+	+	+
	10/0811	+	+	+	+	+
	11/0811	+	+	+	+	+
	12/0811	+	+	+	+	+
	13/0811	+	+	+	+	+
	14/0811	+	+	+	+	+
Референтні штами	<i>L.ivanovii</i> LMG 11388	+	+	+	+	+
	<i>L.seeligeri</i> LMG 11386	+	+	+	+	+
	<i>L.grayi</i> LMG 16490	+	+	+	+	+
	<i>L.murrayi</i> LMG 16491	+	+	+	+	+

Під час культивування дослідних ізолятів та референтних штамів в МПБ через 24 години спостерігали ріст у вигляді рівномірного помутніння з наявністю невеликої кількості пластівців на дні пробірки. На МПА добові культури утворювали округлі, напівпрозорі, випуклі колонії S-форми, діаметром 0,5–1,5 мм молочно-білого кольору з цільними краями та гладенькою поверхнею. На середовищі Palcam дослідні та контрольні (референтні) культури після 24 годин культивування утворювали колонії S-форми діаметром до 1,5 мм, округлі, правильної форми, трохи випуклі, сіро-зелені, оточені чорним ореолом. На середовищі Oxford 24-годинні культури утворювали колонії S-форми діаметром до 1,3 мм, округлі, правильної форми, трохи випуклі, сірого кольору, оточені чорним ореолом.

В мазках, виготовлених з 24-годинних агарових культур та зафарбованих за Грамом, культури мали вигляд однорідних грампозитивних дрібних коротких паличок правильної форми діаметром 0,4–0,5 мкм та довжиною 0,5–2 мкм з заокругленими кінцями, розмішених в мазках поодинокі, в коротких ланцюжках, у вигляді римської букви «V» чи штахетника. У мазках з рідкого середовища культури мали вигляд овоїдів, що є характерним для бактерій роду *Listeria*.

Наступним етапом було вивчення біохімічних та гемолітичних властивостей для видової диференціації ізолятів. Результати вивчення біохімічних властивостей культур відображено в таблиці 3.

Так, референтні штами ферментували з утворенням кислоти без газу лактозу, глюкозу, мальтозу. Ксилозу ферментували *L.ivanovii* LMG 11388 та *L.seeligeri* LMG 11386. Маніт ферментували *L.grayi* LMG 16490 та *L.grayi* LMG 16491 (типовий штам для *L.murrayi*). Референтний штам *L.ivanovii* LMG 11388 ферментував ще й сахарозу. Подібну до референтних штамів ферментативну активність відмічено у наступних ізолятах: 5/0811,

8/0811,11/0811,12/0811, 1/0811, 4/0811, 9/0811, 10/0811, 14/0811. Всі вищезгадані ізоляти ферментували глюкозу, мальтозу, лактозу. Ізоляти 1/0811, 4/0811, 5/0811, 8/0811, 9/0811 ферментували ксилозу, 1/0811, 4/0811, 5/0811 та 9/0811 — сахарозу, 10/0811, 14/0811, 11/0811, 12/0811 — маніт. Решта, п'ять ізолятів: 2/0811, 3/0811, 13/0811, 6/0811 та 7/0811 мали ферментативну активність не схожу до жодного з референтних штамів. Їх особливістю було те, що окрім спільних до інших ізолятів вони ферментували рамнозу.

Таблиця 3

Результати визначення біохімічної активності культур (n=5)

Мікроорганізми	Назва ізоляту/штаму	Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Ксилоза	Сахароза	Маніт	Рамноза	Сорбіт	Дульцит	Інозит	Арабіноза
Ізоляти	1/0811	++	+++	++	+++	+	-	-	-	-	-	-
	2/0811	++	+	++	-	-	-	+++	-	-	-	-
	3/0811	++++	+	+++	-	+	-	++	-	-	-	-
	4/0811	++++	+	++++	++	+	-	-	-	-	-	-
	5/0811	++++	+++	++++	++++	+	-	-	-	-	-	-
	6/0811	+++	+++	+++	-	-	-	++	-	-	-	-
	7/0811	++++	++	++	-	-	-	+	-	-	-	-
	8/0811	++++	++	+++	++++	-	-	-	-	-	-	-
	9/0811	++++	+	++++	++	+	-	-	-	-	-	-
	10/0811	+++	+	++	-	-	+++	-	-	-	-	-
	11/0811	++++	++++	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-
	12/0811	++++	++++	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-
	13/0811	+++	+	+	-	-	-	+++	-	-	-	-
	14/0811	++++	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-
Референтні штамми	L.ivanovii LMG 11388	++++	+++	++++	++++	+	-	-	-	-	-	-
	L.seeligeri LMG 11386	++++	++	+++	++++	-	-	-	-	-	-	-
	L.grayi LMG 16490	++++	++++	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-
	L.murrayi LMG 16491	++++	++++	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-

Примітка: Ступінь ферментативної активності визначали візуально за системою чотирьох плюсів, де «+» відповідає розчепленню 25 %, «++» — 50 %, «+++» — 75 %, «++++» — 100 % середовища Гісса після 24 годин культивування штаму, «-» — відсутність ферментації

Результати визначення гемолітичних властивостей на кров'яному агарі та в CAMP-test досліджених культур при різних строках культивування відображено у таблицях 4 та 5.

Таблиця 4

Результати порівняльного вивчення гемолітичної активності виділених ізолятів на кров'яному агарі (n=5)

Термін культивування, годин	Епізоотичні ізоляти														Референтні штамми			
	1/0811	2/0811	3/0811	4/0811	5/0811	6/0811	7/0811	8/0811	9/0811	10/0811	11/0811	12/0811	13/0811	14/0811	L.ivanovii LMG 11388	L.seeligeri LMG 11386	L.grayi LMG 16490	L.murrayi LMG 16491
24	+	+	+	(+)	+	+	+	(+)	+	-	-	-	+	-	+	(+)	-	-
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-

Примітка: «+» — позитивна реакція; «-» — негативна реакція, «(+）」 — слабо позитивна реакція

Так, колонії референтного штаму *L.ivanovii* LMG 11388, ізолятів 5/0811, 1/0811,9/0811 на кров'яному агарі були оточені широкою зоною β-гемолізу. Референтний штам *L.seeligeri* LMG 11386, ізоляти 8/0811 та 4/0811 на 24 годину давали слабку зону гемолізу навколо уколу, а на 48-72 години культивування – зона гемолізу набувала більш яскравих рис та чітко візуалізувалась. Референтні штами *L.grayi* LMG 16490 та *L.murrayi* LMG 16491, ізоляти 10/0811, 11/0811,12/0811 та 14/0811 на кров'яному агарі не мали гемолітичної активності. Ізоляти 2/0811, 3/0811, 13/0811, 6/0811 та 7/0811 навколо уколу мали чітку вузьку зону просвітлення β-гемолізу.

Таблиця 5

Результати порівняльного вивчення гемолітичної активності виділених ізолятів в CAMP-test (n=5)

Термін культивування, годин	Епізоотичні ізоляти														Референтні штами			
	1/0811	2/0811	3/0811	4/0811	5/0811	6/0811	7/0811	8/0811	9/0811	10/0811	11/0811	12/0811	13/0811	14/0811	<i>L.ivanovii</i> LMG 11388	<i>L.seeligeri</i> LMG 11386	<i>L.grayi</i> LMG 16490	<i>L.murrayi</i> LMG 16491
24 <i>S.aureus</i>	-	+	+	(+)	-	+	+	(+)	-	-	-	-	+	-	(+)	-	-	
<i>R.equi</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
48 <i>S.aureus</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
<i>R.equi</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
72 <i>S.aureus</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
<i>R.equi</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	

Примітка: «+» — позитивна реакція; «-» — негативна реакція, «(+))» — слабо позитивна реакція

Референтний штам *L.ivanovii* LMG 11388 та ізоляти 5/0811, 1/0811, 9/0811 у CAMP-test мали позитивну реакцію навколо культури *Rhodococcus equi* у вигляді широкого «стрілкоподібного» гемолізу. Референтний штам *L.seeligeri* LMG 11386 та ізоляти 4/0811, 8/0811 давали позитивну реакцію біля штриха *S. aureus*, утворюючи невелике розширення зони гемолізу біля штриха, що було досить помітно через 48–72 години культивування. Референтні штами *L.grayi* LMG 16490 та *L.murrayi* LMG 16491, ізоляти 10/0811, 11/0811,12/0811 та 14/0811 не мали гемолітичної активності. Ізоляти 2/0811,3/0811, 13/0811, 6/0811 та 7/0811 утворювали невелике розширення біля штриха *S. aureus*.

Таким чином, за результатами визначення рухливості, морфологічних та культуральних властивостей, ферментативної, каталазної та гемолітичної активності встановлено, що серед дослідних ізолятів п'ять віднесено до *L.monocytogenes*, три — до *L.ivanovii*, дві — до *L.seeligeri* та по два до *L.grayi* та *L.murrayi* [7]. При цьому серед ізолятів, віднесених до *L.ivanovii* найбільш подібні до референтного штаму *L.ivanovii* LMG 11388 властивості мав ізолят 5/0811 (перейменованій у подальшому на 0811i). Серед ізолятів, віднесених до *L.seeligeri* найбільш подібні властивості до *L.seeligeri* LMG 11386 мав ізолят 8/0811(перейменованій в подальшому на 0811s). Близька схожість біологічних властивостей референтного штаму *L.grayi* LMG 16490 мав ізолят 11/0811 (перейменованій в подальшому на 0811g), а ізолят 12/0811 (перейменованій в подальшому на 0811m) мав схожі властивості зі штамом *L.murrayi* LMG 16491 (таблиця 6).

Результати визначення видової приналежності дослідних ізолятів

Мікроорганізми	Назва ізоляту/штаму	Видова приналежність
Ізоляти	1/0811	<i>L.ivanovii</i>
	2/0811	<i>L.monocytogenes</i>
	3/0811	<i>L.monocytogenes</i>
	4/0811	<i>L.seeligeri</i>
	5/0811	<i>L.ivanovii</i>
	6/0811	<i>L.monocytogenes</i>
	7/0811	<i>L.monocytogenes</i>
	8/0811	<i>L.seeligeri</i>
	9/0811	<i>L.ivanovii</i>
	10/0811	<i>L.grayi</i>
	11/0811	<i>L.grayi</i>
	12/0811	<i>L.murrayi</i>
	13/0811	<i>L.monocytogenes</i>
	14/0811	<i>L.murrayi</i>

Висновки

1. У результаті визначення культурально-морфологічних властивостей, каталазної активності та рухливості встановлено, що відібрані для порівняльних досліджень ізоляти відносяться до роду *Listeria*.

2. Порівняльні дослідження ферментативної та гемолітичної активності показали відповідність ізоляту 0811i референтному штаму *L.ivanovii* LMG 11388, ізоляту 0811s — *L.seeligeri* LMG 11386, 0811g — *L.grayi* LMG 16490, 0811m — *L.grayi* LMG 16491.

3. Отримані результати дали підставу для складання проекту паспортів на кожен з дослідних штамів з метою їх депонування в Депозитарії ДНКІБШМ.

4. Встановлено, що культура *L.seeligeri* потребує більш тривалого часу культивування при внутрішньородовій диференціації бактеріологічним методом.

5. У результаті отриманих даних, перспективними вважаються ґрунтовні дослідження щодо вдосконалення методики постановки CAMP-test.

Перспективи подальших досліджень. Подальшим кроком у вивченні даних ізолятів буде їх дослідження в полімеразній ланцюговій реакції.

V. A. Kovtun, V. O. Ushkalov, L. M. Vygovska

A COMPARATIVE STUDY OF LISTERIA ISOLATES WITH REFERENCE STRAINS BELGIAN COLLECTION OF CULTURES

S u m m a r y

The comparative study results of a basic biological properties of isolated bacteria from the genus *Listeria* with their reference strains from the Belgian Co-ordinated Collection Microorganisms are presented. Theoretically substantiated and experimentally proved the need of improving diagnosis in intrageneric microorganisms *Listeria* genus with bacteriological method. Worked through different periods of incubation of culture at the time for the study of hemolytic properties. As a result of isolates studies, were selected the most promising candidate to be used during the development of a set for standard test-strains for intrageneric typing method and *Listeria* bacteriological quality control and growth properties of media. These results were the basis for the preparation of the strains passports and for the procedure of depositing in the depository of the State

В. А. Ковтун, В. А. Ушкалов, Л. Н. Выговская

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИЗОЛЯТОВ РОДА *LISTERIA* С РЕФЕРЕНТНЫМИ ШТАММАМИ БЕЛЬГИЙСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР

А н н о т а ц и я

Приведены результаты сравнительного изучения основных биологических свойств изолятов бактерий рода *Listeria* с референтными штаммами Бельгийской коллекции культур. Теоритически обоснована и экспериментально доказана необходимость усовершенствования внутриродовой диагностики микроорганизмов рода *Listeria* бактериологическим методом. Отработаны разные сроки инкубирования культур во время изучения гемолитических свойств. По результатам проведенных исследований изолятов, отобраны наиболее перспективные кандидаты, которые будут использованы во время разработки набора эталонных тест-культур для внутриродовой типизации листерий бактериологическим методом, а также проверки качества и ростовых свойств питательных сред. Полученные результаты послужили основанием для составления паспортов на штаммы и проведения процедуры их депонирования в депозитарии Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов.

1. Сапронозні інфекційні хвороби тварин [Текст] / Л. Є. Корнієнко и др. ; ред. Л. Є. Корнієнко, В. О. Бусол. — Біла Церква : БДАУ, 2009. — С. 89–117.
2. Бакулов И. А. Бактериологический контроль пищевых продуктов на наличие листерий: методическое пособие / И. А. Бакулов, А. А. Васильев. — Издательство Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 1999. — С. 3–11.
3. Бондар Т. О. Лабораторна діагностика лістеріозутварин :методичні рекомендації / Т. О. Бондар та ін. — К., 2007. — С. 4–30.
4. ДСТУ ISO 11290-2:2003. Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeriamonocytogenes*. — К. : Держспоживстандарт України, 2005. — 16 с.
5. Определитель бактерий Берджи : в 2-х т. [Текст] / Ред. Дж. Хоулт и др. — М. : Мир, 1997. — Т. 2. — С. 574–578.
6. Антонов Б. И. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции / Б. И. Антонов, В. В. Борисова, П. М. Волкова. — ВО «Агропромиздат», 1986. — С. 151–169.
7. *Ryser T. Listeria, listeriosis, and foodsafety* / E. T. Ryser, E. H. Marth. — New York, 1999. — 739 p.

Рецензент: кандидат ветеринарных наук Бабкін М. В., Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів.