

CHARACTERISTICS OF CLINICAL MANIFESTATION OF INFECTIOUS
BOVINE RHINOTRACHEITIS IN UKRAINE

Kornieikov O. M., Oleshko A. Yu., Perfilova S. I., Gorbatenko S. K.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

According to the results of the survey of cattle in 13 regions of Ukraine, it was found that 33.8% of them had circulating herpesvirus type 1 (BHV-1), which is the causative agent of infectious rhinotracheitis (IRT). The respiratory form of IRT was found in 41.7% of farms, genital and keratoconjunctivitis in 8.3%, and asymptomatic and polysymptomatic in 25.0% and 16.7%, respectively. A significant percentage of farms with asymptomatic cases is due to the almost total use of IRT vaccination. Of particular concern is the use of vaccines containing live attenuated strains of herpesvirus type 1 in the surveyed farms (66.7% of all cases), which further complicates the epizootic situation

Keywords: Herpesvirus type 1, vaccination prophylaxis, epizootic situation

УДК 619:616.98-076:579.869.1:577.2.08(477)

DOI 10.36016/VM-2023-109-9

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ІЗОЛЯТІВ *LISTERIA*
MONOCYTOGENES, ВИДІЛЕНИХ ВІД РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН В УКРАЇНІ

Полюшко Д. П., Стегній Б. Т., Марченко Н. В., Болотін В. І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: vbolotin@hotmail.de

Визначено ПЛР-профілі 12 архівних культур лістерій, що були виділені від різних видів тварин і зберігаються в колекції мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ». Встановлено, що 10 ізолятів налічують гени *prs*, *inlB*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB*, *hly*, *iap*, що характеризує їх як високівірулентних. Ізолят *L. monocytogenes* 61052 не містить ген *inlA*, а у *L. monocytogenes* Varja не виявлено гени *actA* та *hly*. За допомогою ПЛР встановлено також приналежність 11 досліджуваних культур до серотипів 4b, 4d, 4e, а також одного ізоляту до 1/2a. Отримані дані можуть бути використані для вдосконалення діагностики лістеріозів тварин в Україні за рахунок створення високоспецифічних антигенів

Ключові слова: лістеріоз, полімеразна ланцюгова реакція, фактори вірулентності

На цей час рід *Listeria* включає шість видів, з яких епізоотичне та епідеміологічне значення мають *L. monocytogenes* та *L. ivanovii*. Для людини основним джерелом збудника є продукти харчування, у тому числі молочні, сире м'ясо, риба, а також свіжі фрукти та овочі [8, 12]. Також лістерії виділяють від хворих тварин, контамінованого ґрунту, поверхневих вод і деяких рослин. Тварини є носіями збудника, які виділяють його з фекаліями, молоком та плацентою. Так, близько 20 % клінічно здорового поголів'я ВРХ виділяють *L. monocytogenes* з фекаліями, у т.ч. підтипи, що можуть викликати спорадичні, або ензоотичні спалахи лістеріозу, призводячи до втрат серед продуктивних тварин, масових абортів та ризиків зараження персоналу в господарствах [7, 18]. Збудник викликає значне занепокоєння, оскільки смертність може сягати від 50 % до 90 % залежно від клінічної форми захворювання, виду тварини, його резистентності, тощо. *L. monocytogenes* вважається стійким у зовнішньому середовищі патогеном, здатним витримувати низькі температури, високу концентрацію солей і широкий діапазон рН (до 9,0) [8,11].

На цей час у бактерій роду *Listeria* описано 15 соматичних (O) та 5 джгутикових (H) антигенів, за комбінацією яких *L. monocytogenes* розподіляють на 13 серотипів: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e і 7. Додатково серотип 4h був описаний Yin Y. та іншими як гіпервірулентний варіант, що є поєднанням декількох серотипів. Близько 90 % випадків лістеріозу у людини обумовлюють серотипи 1/2a, 1/2b, 4b, та 3a [13, 17, 30].

Основними факторами патогенності *L. monocytogenes* служать поверхневі інвазини (*InlA*, *InlB*, *InlC*, *InlJ*), лістеріолізін O (*hly*), бактеріальний поверхневий білок (*ActA*), специфічна фосфоліпаза C (*plcA* та *plcB*) та р60 – білок пов'язаний з інвазією, що кодується геном *iap*. Всі

перелічені фактори регулюються білком PrfA, окрім р60 [20, 29]. Таке розмаїття викликане високими адаптаційними можливостями збудника, його здатністю набувати стійкість через передачу генетичного матеріалу інших видів бактерій [9]. Завдяки своїм властивостям лістерії можуть забруднювати широкий спектр харчових продуктів, що вимагає постійного моніторингу [15].

Метою досліджень було охарактеризувати архівні штами та ізоляти *Listeria monocytogenes* за допомогою молекулярно-генетичних методів.

Матеріали та методи. Для дослідження були обрані 12 архівних штамів та польових ізолятів *L. monocytogenes* з колекції мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ», що були раніше типовані бактеріологічними методами (табл. 1).

Таблиця 1 — Перелік штамів *L. monocytogenes*, що використовували в дослідженні

№	Назва штаму, або ізоляту	Рік виділення	Джерело
1.	Тернопіль	1993	Вівця, патологічний матеріал
2.	dolph	2021	Фоцена звичайна, мозок
3.	Буринь	1993	Вівця, мозок
4.	Кріль 17	1995	Кріль, мозок
5.	Varja	2021	Собака, аборт плід
6.	61052	2022	ВРХ, внутрішні органи
7.	1	1998	?
8.	9/72	1996	?
9.	9/130	1999	?
10.	9/129	1999	?
11.	9/128	1999	?
12.	9/127	1999	?

Для відновлення з ліофільного стану і культивування лістерій використовували м'ясо-пептонний агар та середовище Мартена з додаванням 1 г глюкози на 100 мл середовища.

Екстракцію ДНК проводили за допомогою набору «Indispin Pathogen Kit» згідно з інструкцією виробника. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою комерційного набору для ПЛР «Thermo Scientific Dream Taq Green PCR MasterMix». Перелік використаних у дослідженні праймерів наведений у табл. 2.

ПЛР проводили відповідно протоколів з використанням ампліфікатора виробництва компанії Biometra. В якості негативного контролю використовували деіонізовану воду.

Продукти ампліфікації піддавали електрофоретичному аналізу (110В, 300 мА) в 1,5 % агарозному гелі протягом 60 хв. Визначення довжини утворених ампліконів проводили за допомогою маркера молекулярної ваги Fast Gene 100 bp DNA Ladder RTU Nippon genetics Europe GmbH за допомогою системи візуалізації BioradGelDoc Universalhood II (USA).

Результати і обговорення. Було проаналізовано 12 культур *L. monocytogenes*, що зберігаються в ліофільно висушеному стані в умовах колекції мікроорганізмів лабораторії вивчення бруцельозу. Так, на першому етапі перевіряли наявність генів *prs* та *inlB* (рис. 1, 2). Дані маркери широко використовуються для детекції лістерій методом ПЛР [6, 19]. Ген *prs* є загальнородовим маркером, присутнім у всіх видах роду *Listeria*, окрім *L. rocourtiae*, та який кодує фермент фосфорибозилпірофосфатсинтетазу, [16]. Ген *inlB* є видоспецифічним для *L. monocytogenes* і кодує один з мембранних білків інтерналінів, завдяки яким збудник проникає в клітини господаря. Ключова роль інтерналіну В (InlB) полягає в тому, що він індукуює фагоцитоз, переважно клітин гепатоцитів, а також бере участь у формуванні біоплівки [28].

Отримані результати показують, що всі ізоляти лістерій містять зазначені гени, що підтверджує попередні результати типування збудників бактеріологічними методами.

Також нами було проведено дослідження щодо наявності інших маркерів патогенності лістерій з групи інтерналінів, а саме *inlA*, *inlC* та *inlJ* (рис. 3). На відміну від *inlB*, ці гени кодують поверхневі білки, які індукують фагоцитоз в макрофагах, ентероцитах та епітеліальних клітинах, адсорбуючись на поверхні цих клітин [26].

Таблиця 2 — Послідовності праймерів, що були використані під час досліджень

Назва праймера	Послідовність праймеру 5'-3'	Назва таргетного гена та продукту, що він кодує	Довжина фрагменту, п. н.	Джерело
inIA	F:ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	inIA, Internalin A	800	16
inIB	F:CATGGGAGAGTAACCCAACC R: GCGGTAACCCCTTTGTCATA	inIB, Internalin B	272	
inIC	F:AATTCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA	inIC, Internalin C	517	
inIJ	F:TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	inIJ, Internalin J	238	
actA	F:TGCATTACGATTAACCCCGACA R: AGGCTTTCAAGCTCACTATCCG	actA, Actin assembly-inducing protein	431	6
plcB	F: AGTGTTC TAGTCTTTCCGG R: ACCTGCCAAAGTTTGCTGT	plcB, Phospholipase C (PC-PLC)	792	
hly	F: ACGCAGTAAATACATTAGTG R: AATAAACTTGACGGCCATAC	hly, Listeriolysin O	372	
iap	F: TTTGCTAAAGCGGGTATCTC R: AGCCGTGGATGTTATCGTAT	iap, Invasion-associated protein (p60)	205	
Imo_0737	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	Unknown, no similarity	691	7, 14
Imo_1118	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	Unknown, no similarity	906	
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	Putative transcriptional regulator	471	
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	ORF2110, Putative transcriptional regulator	597	
prs	F: AGCTCGAAGAGATTGCGAAAGA R: TTCACCAAGAAGAGCTGCAA	prs, Regulatory protein all listeria species	350	23
Im0690	F: TTAGTAGATCAAAGTCTCC R: AAGAAAAGCCCCCTCGTCC	flaA, Flagelin protein	538	
LMOSL	F: ATGCAACATCAAGAGCAAGAA R: TGGCATTCTAAGGATGTTCTCT	Hypothetical protein	300	
LMLG	F: TGAGTTTGCAGGAAAGAAGG R: AACCGTGGTTGGAAGTGTAA	Hypothetical protein	388	

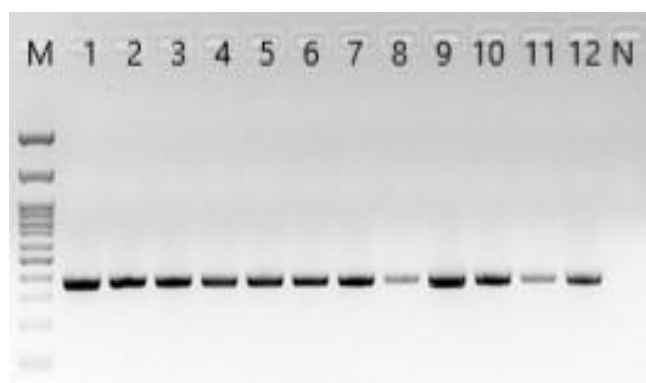


Рис. 1. Електрофорез продуктів ампліфікації специфічної ділянки гена *prs* (350 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

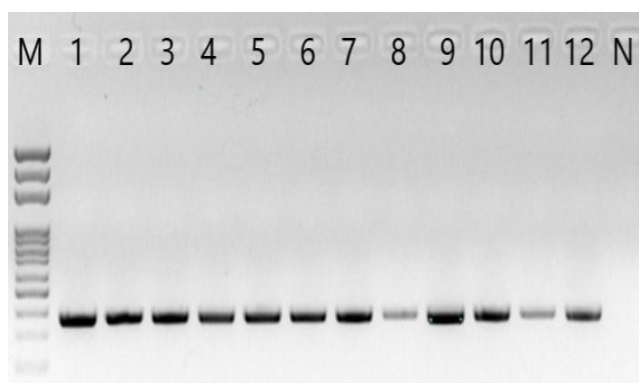


Рис. 2. Електрофорез продуктів ампліфікації специфічної ділянки гена *inIB* (272 п.н) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Встановлено, що всі культури містили досліджувані фактори патогенності, окрім ізоляту *L. monocytogenes* 61052, який не містив ген *inlA*. Цей ізолят був виділений від ВРХ.

Третій етап дослідження був спрямований на виявлення генів *hly*, *iap* та *actA* (рис. 4). Для цього проводили мультиплексну ПЛР для одночасного виявлення зазначених генів. Перший з них відповідає за синтез лістеріолізину О (LLO) – білка, що є відповідальним за стійкість збудника до фагосом і внутрішньоклітинне розмноження лістерій.

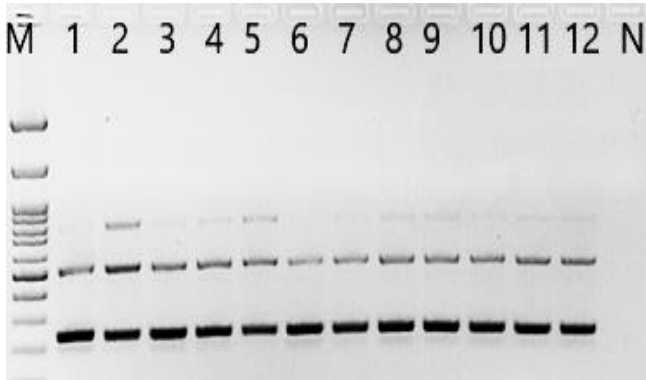


Рис. 3. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянок генів *inlA* (800 п.н.), *inlC* (517 п.н.) та *inlJ* (238 п.н) культур *L. monocytogenes*. М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

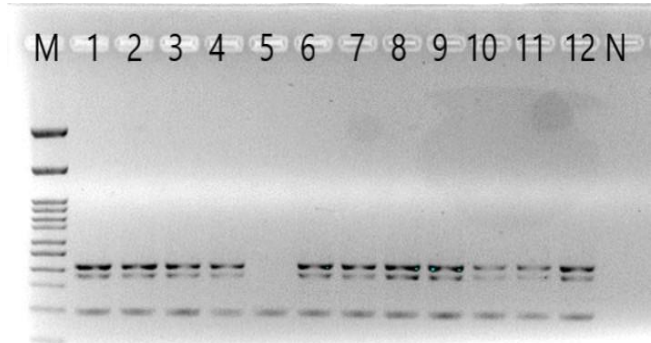


Рис. 4. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянок генів *actA* (431 п.н.), *hly* (372 п.н.) та *iap* (205 п.н) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Роль позаклітинного білка р60, що кодується геном *iap*, полягає у інвазії фагоцитів і також у розмноженні лістерій. [29]. Актиновий білок (ActA) є найбільш поширеним поверхневим секреторним бактеріальним білком, виявленим в інфікованих клітинах, який приймає участь у внутрішньоклітинному розмноженні лістерій і передачі збудника від клітини до клітини. [21]. Відповідно до отриманих результатів тільки ізолят, отриманий від абортплуду собаки, не містив гени *actA* та *hly*, що свідчить про його послаблені вірулентні властивості. Також досліджували наявність гена *plcB* (рис. 5), що є відповідальним за синтез специфічних фосфоліпаз С для підсилення лістеріолізину О, що в свою чергу сприяє більш ефективному лізису вакуолей фагоцитів [2, 27]. Виходячи з отриманих результатів всі лістерії мали ген *plcB*. Отже, за проведеними дослідженнями встановлено ПЛР-профілі культур *L. monocytogenes*, що зберігаються в колекції ННЦ «ІЕКВМ» (табл. 3).

Для виявлення факторів вірулентності, що пов'язані з окремими фрагментами гена *prs*: *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819 та ORF2110, проводили мультиплексну ПЛР (рис. 6). Ці фактори забезпечують надійне прикріплення бактерій до чутливих клітин. Також на основі зазначених маркерів було запропоновано методіку визначення серотипу збудника, оскільки встановлення цього серологічними методами потребує вартісних моноклональних сироваток [14]. Так, якщо виявляють тільки ген *lmo0737*, то такий ізолят відносять до серотипу 1/2а або 3а, а наявність тільки гена ORF2819 — до 1/2b, 3b або 7. До серотипів 1/2с або 3с можна віднести лістерії, в яких виявлено гени *lmo0737* та *lmo1118*, а якщо ORF2819 та ORF2110 — до 4b, 4d або 4е [4, 7, 23].

За результатами цих досліджень встановлено, що тільки ізолят від ВРХ можна віднести до серотипу 1/2а або 3а, а всі інші мають однаковий профіль, який включає ділянки генів ORF2819 та ORF2110, тобто їх можна віднести до серотипів 4b, 4d або 4е.

Культури лістерій також досліджували за альтернативною методикою, яка включає детекцію генів *flaA* (*lmo_0690*), *LMOSLCC2372_0308* та *LMLG_0742*. Ген *flaA* кодує флагелін – джгутиковий протеїн, що дозволяє уникати протизапального ефекту викликаного контактом з Toll-like ресептор (TLR), тим самим забезпечуючи виживання та подальше розмноження збудника. Наявність цього гена свідчить про належність лістерії до серотипу 1/2а або 3а. Гени *LMOSLCC2372_0308* та *LMLG_0742* кодують гіпотетичні протеїни, функції яких ще не повністю визначені. За цими генами можна визначити приналежність до серотипу 1/2с або 3а відповідно [1].

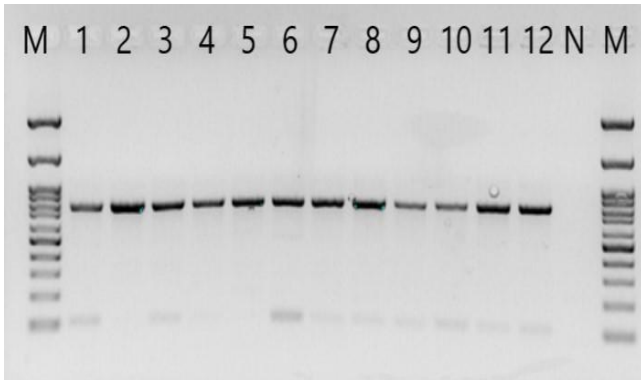


Рис. 5. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянки гена *plcB* (792 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

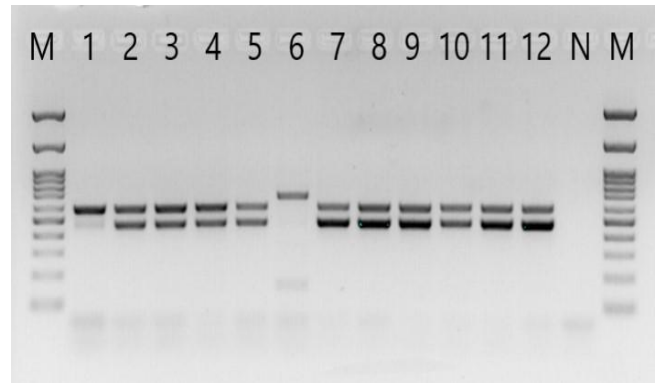


Рис. 6. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянки генів *lmo0737* (691 п.н.), *lmo1118* (906 п.н.), ORF 2819 (471 п.н.) та ORF 2110 (597 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Таблиця 3 — Результати ПЛР з досліджуваними ізолятами *L. monocytogenes* на виявлення відповідних таргентних ділянок.

№ з/п	Назва штаму	Маркери патогенності лістерій								
		<i>prs</i>	<i>inIB</i>	<i>inIA</i>	<i>inIC</i>	<i>inIJ</i>	<i>actA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>iap</i>
	Тернопіль	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	dolph	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Буринь	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Кріль 17	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Varja	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	61052	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/72	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/130	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/129	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/128	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9/127	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: (+) – утворення специфічного амплікону; (-) – відсутність утворення специфічного амплікону.

Цю методику використовували для визначення серотипу ізоляту *L. monocytogenes* 61052, який на попередньому етапі за вмістом окремих генів віднесли до серотипу 1/2a або 3a. Результати цих досліджень показано на рис. 7. Таким чином, спостерігали чітке утворення амплікону розміром 538 п.н., що вказує на наявність гена *lm_0690* та належність ізоляту до серотипу 1/2a. Інші специфічні ділянки генів LMOSLCC2372_0308 та LMLG_0742 виявлені не були. За даною методикою також було досліджено решта культур лістерій, що були віднесені до серотипу 4b (4d, 4e). Виявилось, що вісім з них містили специфічну ділянку ділянки гена LMLG_0742 (рис. 8). Оскільки зазначена методика була розроблена для диференціації виключно серотипів 1/2a, 3a та 1/2c, наявність цієї ділянки в геномі наших архівних культур потребує додаткових досліджень. Разом з тим, раніше вже повідомлялося про те, що серотип 4b може мати нетиповий профіль за ПЛР [5, 10]. Отже, було виявлено, що 10 культур лістерій містять всі основні гени вірулентності, та належать до серотипу 4b (або 4d, або 4e) (табл. 4). Ще один ізолят, віднесений до цього серотипу та отриманий з абортплоду собаки, не має гени *actA* та *hly* або мутації не дозволяють повноцінно синтезувати їх *in vitro* обраними праймерами, що може бути предметом для подальших досліджень.

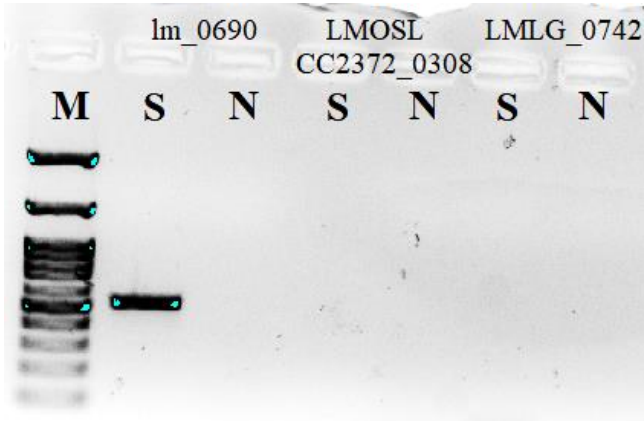


Рис. 7. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянок окремих генів lm_0690, LMOSLCC2372_0308 та LMLG_0742 культури *L. monocytogenes* 61052: М – маркер молекулярної ваги; S – зразок ДНК культури; N – деіонізована вода.

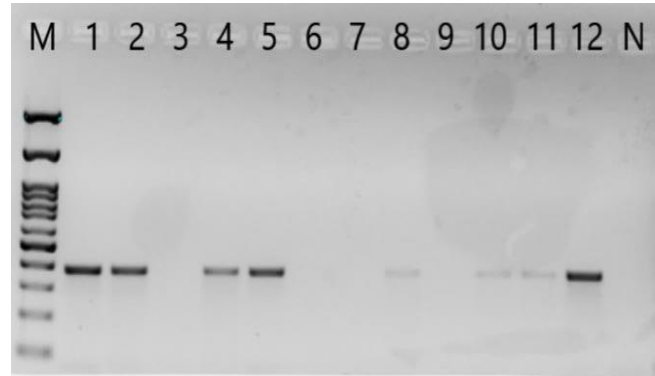


Рис. 8. Електрофорез продуктів ампліфікації ділянки гена LMLG_0742 (388 п.н.) культур *L. monocytogenes*: М – маркер молекулярної ваги; 1-12 культури *L. monocytogenes*; N – деіонізована вода.

Патогенність *L. monocytogenes* доведена, зокрема за наявність групи інтерналінів, бактеріальних поверхневих білків відповідаючих за входження збудника в клітини, зокрема фаго- та гепатоцити і розповсюдження між клітинами.

Група, для якої збудники представляють потенційну загрозу, включає ДРХ, ВРХ, свиней, переважно вагітних самок, молоді тварини віком від 1,5 до 5 місяців, ослаблені неповноцінною годівлею чи хворобою тварини, а також різноманітні птахи, дрібні ссавці та навіть риба [3].

Таким чином, встановлено належність однієї культури лістерії до серотипу 1/2a, а інших – до 4b (або 4d, або 4e). Необхідно зазначити, що поліморфізм та виникнення мутацій у послідовностях генів сприяє адаптації до несприятливих факторів та може призводити до ослаблення вірулентності *L. monocytogenes* [24].

Таблиця 4 — Узагальнюючі дані за результатами ПЛР з метою визначення серотипу лістерій

№ з/п	Назва штаму	Гени <i>L. monocytogenes</i>								Серотип за ПЛР
		Lmo 0737	Lmo 1118	ORF 2819	ORF 2110	Lm 0690	LMO*	LML#	GLT	
1	Тернопіль	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
2	dolph	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
3	Буринь	-	-	+	+	-	-	-	-	4b, 4d, 4e
4	Кріль 17	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
5	Varja	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
6	61052	+	-	-	-	+	-	-	-	1/2a
7	1	-	-	+	+	-	-	-	-	4b, 4d, 4e
8	9/72	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
9	9/130	-	-	+	+	-	-	-	-	4b, 4d, 4e
10	9/129	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
11	9/128	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e
12	9/127	-	-	+	+	-	-	+	-	4b, 4d, 4e

Примітки: * - LMOSLCC2372_0308; # - LMLG_0742; (+) – утворення специфічного амплікону; (-) – відсутність утворення специфічного амплікону.

Виходячи з цього, відсутність або наявність тих чи інших генів вірулентності може бути інструментом для підтвердження потенційної патогенності досліджуваних штамів, оцінки ризиків спалаху захворювання в господарствах, потенційного зараження людини через харчові продукти, отримані від інфікованих тварин [22, 25].

Раніше повідомлялося, що в Україні рівень захворюваності на лістеріоз серед тварин значно зріс у період 2011-2015 рр. При цьому випадки реєстрували в 10 областях (найбільший відсоток припадав на Житомирську та Дніпропетровську області) [31]. Ця тенденція може бути обумовлена відсутністю надійних вакцин проти лістеріозу та несвоєчасним виявленням джерела інфекції, що спонукає до більш детального вивчення циркулюючих ізолятів, проведення постійного моніторингу щодо лістеріозу тварин і розроблення дієвої системи контролю цієї інфекції.

Висновки. 1. Охарактеризовано 12 архівних культур *L. monocytogenes* з використанням молекулярно-генетичних методів. Встановлено, що всі культури містять фактори вірулентності *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB*, *hly*, *iap*, окрім двох – *L. monocytogenes* Varja, яка не містила *inlA*, та *L. monocytogenes* 61052, в якій не було виявлено *actA* і *hly*.

2. За допомогою відповідних протоколів ПЛР встановлено належність однієї культури лістерії до серотипу 1/2a, а інших – до 4b (або 4d, або 4e). Отримані дані можуть бути використані для вдосконалення діагностики лістеріозів тварин в Україні за рахунок створення високо специфічних антигенів.

Список літератури

1. Al-Ali H. J. (2018). Molecular detection of serotype groups of *Listeria monocytogenes* isolated from gallbladder of cattle and sheep in Iraq. *Veterinary World*. 2018. Vol. 11, No 4. P. 431–436. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.431-436>.
2. Alberti-Segui C., Darren R., Higgins E. Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. *Cellular Microbiology*. 2007. Vol. 9. P. 179–184. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00780.x>.
3. Al-Ghanim A., Abbas B. Detection of *Listeria monocytogenes* in frozen food using a specific *inlB* virulence gene. *Journal of Physics: Conference Series*. 2021. Vol. 66. P. 328–333. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1879/2/022011>.
4. Boukili M. et al. Prevalence, characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from beef meat in Meknes city, Morocco. *Germs*. 2020. Vol. 10, No 2. P. 74–80. DOI: <https://doi.org/10.18683/germs.2020.1180>.
5. Camargo A. C. et al. Molecular Serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil Using PCR. *Journal of Food Protection*. 2016. Vol. 79, No 1. P. 144–147. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-294>.
6. Cao X. et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the blackheaded gull feces in Kunming, China. *Journal of Infection and Public Health*. 2018. Vol. 11. P. 59–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.03.003>.
7. Doumith M. et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. Vol. 42, No 8. P. 3819–3822. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.8.3819-3822.2004>.
8. Gandhi M., Chikindas M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. Vol. 113, No 1. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>.
9. Hingston P. et al. Genotypes associated with *Listeria monocytogenes* isolates displaying impaired or enhanced tolerance to cold, salt, acid, or desiccation stress. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8 P. 369–378. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00369>.
10. Huang B. et al. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011. Vol. 49. P. 426–429. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01207-10>.
11. Johnson J. et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. Vol. 70, No 7. P. 4256–4258. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.70.7.4256-4266.2004>.
12. Kasalica A. et al. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2011. Vol. 27, No 3. P. 1067–1082. DOI: <https://doi.org/10.2298/BAH1103067K>.
13. Nightingale K. *Listeria monocytogenes*: knowledge gained through DNA sequence-based subtyping, implications, and future considerations. *Journal of AOAC International*. 2010. Vol. 93, No 4. P. 1275–1286. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.4.1275>.
14. Kérouanton A. et al. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*. 2010. Vol. 80, No 2. P. 134–137. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.008>.
15. Leong D., Alvarez-Ordóñez A., Jordan K. (2014). Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Frontiers in Microbiology*. 2014. Vol. 5. P. 436. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00436>.
16. Liu D. et al. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*. 2007. Vol. 71, No 2. P. 133–140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007>.

17. Lopez-Valladares G. et al. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958-2010). *Epidemiology & Infection*. 2014. Vol. 142. P. 2251–2260. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0950268813003385>.
18. Matereke L., Okoh A. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence. A Review. *Pathogens*. 2020. Vol. 9, No 7. P. 528. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9070528>.
19. Momtaz H., Yadollahi S. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. *Diagnostic Pathology*. 2013. Vol. 8. P. 149. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-149>.
20. Moors M. A. et al. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 1999. Vol. 67, No 1. P. 131–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.67.1.131-139.1999>.
21. Moors M. A. et al. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 1999. Vol. 67, No 1. P. 131–139. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.67.1.131-139.1999>.
22. Muchaamba F. et al. Different shades of *Listeria monocytogenes*: strain, serotype, and lineage-based variability in virulence and stress tolerance profiles. *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 12 P. 792-811. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.792162>.
23. Nho S. W. et al. Identification of high-risk *Listeria monocytogenes* serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2015. Vol. 119, No 3. P. 845–852. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12876>.
24. Orsi R., Bakker H., Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011. Vol. 301, No 2. P. 79–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>.
25. Parussolo L. et al. Detection of virulence gene sandanti microbial susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from artisanal cheese produced in the Southern region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2021. Vol. 93, No 3. P. 207–208. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-376520210190200>.
26. Portnoy D. A. et al. Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. *Infection and Immunity*. 1992. Vol. 60, No 7. P. 2710–2717. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2710-2717.1992>.
27. Quereda J. J. et al. Role in virulence of phospholipases, listeriolysin O and listeriolysin S from epidemic *Listeria monocytogenes* using the chicken embryo infection model. *Veterinary Research*. 2018. Vol. 49. P. 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0496-4>.
28. Wiśniewski P. et al. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. *Pathogens*. 2022. Vol. 11, No 10. P. 1099. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11101099>.
29. Wuenschel M. D. et al. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of Bacteriology*. 1993. Vol. 175, No 11. P. 3491–3501. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3491-3501.1993>.
30. Yin Y. et al. A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates. 2019. *Nature Communications*. Vol. 10, No 1. P. 4283. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12072-1>.
31. Уховська Т. М. та ін. Моніторинг лістеріозу тварин та засоби його профілактики. *Ветеринарна медицина*. 2017. Т. 103 С. 222–226. URL: http://jvm.kharkov.ua/sbornik/103/3_50.pdf.

MOLECULAR GENETIC STUDIES OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATES FROM DIFFERENT ANIMAL SPECIES IN UKRAINE

Poliushko D. P., Stegnyy B. T., Marchenko N. V., Bolotin V. I.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

The PCR-profiles of 12 archival cultures of listeria isolated from different species of animals and stored in the collection of microorganisms of the NSC IECVM were determined. It was established that 10 isolates have genes *prs*, *inlB*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB*, *hly*, *iap*, which characterizes them as highly virulent. The *L. monocytogenes* 61052 isolate did not contain the *inlA* gene, and the *actA* and *hly* genes were not detected in *L. monocytogenes* Varja. Using PCR, it was also established that 11 studied cultures belong to serotypes 4b, 4d, 4e, as well as one isolate to 1/2a. The obtained data can be used to improve the diagnosis of animal listeriosis in Ukraine due to the creation of highly specific antigens

Keywords: listeriosis, polymerase chain reaction, virulence factors