

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет ТВШТСБ

Кафедра біотехнології та біоінженерії

Спеціальність 162– «Біотехнології та біоінженерія»

Ступінь вищої освіти «Бакалавр»

Допустити до захисту

Рекомендувати до захисту

Декан _____ Михайло ГИЛЬ

В.о. зав. кафедри _____ Олена КАРАТЄЄВА

“ ____ ” _____ 2026р.

“ ____ ” _____ 2026р.

**БІОТЕХНОЛОГІЧНА СИСТЕМА ІДЕНТИФІКАЦІЇ *LISTERIA*
MONOCYTOGENES ТА АНАЛІЗ ЇЇ МЕТАБОЛІТІВ У ПРОДУКТАХ
ХАРЧУВАННЯ**

04.02. – КР. 76-О. 26 05 19. 007

Виконавець:

здобувачка вищої

освіти IV курсу _____ Анастасія ШЕШУНОВА

Науковий керівник:

доцентка _____ Олена КАРАТЄЄВА

Рецензент:

доцент _____ Євген БАРКАРЬ

Миколаїв - 2026

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	3
РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Історичні етапи вивчення бактерій роду <i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.2. Біологічні та патогенні властивості <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.3. Епідеміологічне значення та харчові шляхи передачі	13
1.4. Методи ідентифікації <i>Listeria monocytogenes</i>	19
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, УМОВИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ	24
2.1. Місце та об'єкт досліджень	24
2.2. Методика виконання роботи	25
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
3.1. Таксономічний статус та морфолого-культуральні властивості	29
3.2. Виділення видів <i>Listeria monocytogenes</i> та <i>Listeria ivanovii</i> методом мікробіологічного скринінгу	32
3.3. Біохімічна та імунологічна ідентифікація бактерій роду <i>Listeria</i>	40
3.4. Технологічна частина та розрахунок матеріалів для процесу виділення	47
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	57
ВИСНОВКИ	63
ПРОПОЗИЦІЇ	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	66
Додаток А	72
Додаток Б	73
Додаток В	74

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ALOA – Ottaviani and Agosti agar (хромогенне поживне середовище)

BSL-2 – Biosafety Level 2 (другий рівень біологічної безпеки)

CAMP-тест – Christie, Atkins, Munch-Petersen test (тест для диференціації лістерій)

ДСТУ – Державний стандарт України

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (імуноферментний аналіз)

HEPA – High-Efficiency Particulate Air (високоєфективний фільтр для очищення повітря)

KBMA-вакцини – Killed But Metabolically Active vaccines (вакцини на основі інактивованих, але метаболічно активних бактерій)

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*

LLO – Listeriolysin O (лістеріолізін O)

MLPA – Multilocus Phylogenetic Analysis (мультилокусний філогенетичний аналіз)

PALCAM – Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol (селективне поживне середовище)

PD-1 – Programmed cell death protein 1 (білок програмованої клітинної смерті)

pH – показник кислотності середовища

Spike-тест – метод контролю правильності аналізу з додаванням відомої кількості бактерій

УФ – ультрафіолетове (опромінення)

ЦНС – центральна нервова система

ЗІЗ – засоби індивідуального захисту

β-гемоліз – повне руйнування еритроцитів навколо колоній бактерій

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 75 сторінках основного тексту. Список використаних джерел налічує 36 найменувань. Робота містить 6 таблиць, 10 рисунків та 3 додатки.

Тема роботи: «Біотехнологічна система ідентифікації *Listeria monocytogenes* та аналіз її метаболітів у продуктах харчування».

Мета роботи: обґрунтування та моделювання алгоритму біотехнологічної системи ідентифікації *Listeria monocytogenes* у харчових продуктах з метою забезпечення контролю їх якості та безпеки.

Завдання дослідження:

1. Охарактеризувати таксономічний статус та морфолого-культуральні властивості.
2. Провести виділення видів *Listeria monocytogenes* та *Listeria ivanovii* методом мікробіологічного скринінгу.
3. Здійснити біохімічну та імунологічну ідентифікацію бактерій роду *Listeria*.
4. Надати технологічну частину та здійснити розрахунок матеріалів для процесу виділення.
5. Оцінити стан охорони праці на підприємстві.

Об'єктом дослідження є бактерії роду *Listeria* у харчових продуктах.

Предметом дослідження виступають методи ідентифікації та визначення метаболітів *Listeria monocytogenes* у зразках продуктів харчування.

Основні методи: в роботі використано метод лабораторного моніторингу харчових продуктів (висів на ескулінові та хромогенні середовища), метод моделювання (Spike-тест) для перевірки чутливості системи, а також методи диференціації (латекс аглютинація, гемолітичний та САМР-тест).

Результати та висновки: у ході проведеного моніторингу харчових продуктів наявність *L. monocytogenes* не була виявлена. На основі отриманих

даних, з метою демонстрації принципу функціонування біотехнологічної системи ідентифікації *L. monocytogenes*, проведено моделювання системи ідентифікації з використанням Spike-тестів. Це підтвердило здатність представленого алгоритму (поєднання хромогенних середовищ та диференціальних тестів) ефективно виявляти навіть мінімальні концентрації збудника. Доведено, що запропонована методика є надійною для лабораторного контролю якості.

Практичне значення досліджень з даної проблеми полягає в набутті навичок виявлення та ідентифікації лістерії в зразках продуктів харчування із застосуванням класичних та сучасних методів.

ВСТУП

На сучасному етапі, у зв'язку з постійним зростанням населення планети та продовольчою кризою, активно розвивається харчова промисловість і відбувається глобалізація ринку харчової продукції.

Глобалізація постачання продуктів харчування та сільськогосподарської сировини з інших країн тягне за собою ризики ввезення і розповсюдження патогенних мікроорганізмів в країнах світу, в тому числі і лістерії. Для України в умовах війни дані ризики можуть бути подвоєними у зв'язку з ввезенням в країну гуманітарної продовольчої допомоги, продуктів харчування та сировини з інших країн.

Воєнні дії на території України призводять до руйнування та затоплення місць захоронення сільськогосподарських тварин, загибелі риби та інших живих істот. Патогени таким чином вивільняються у повітря, потрапляють у воду, розносяться по ґрунту та розподіляються по його поверхневих та глибинних шарах.

Також контамінація може відбуватися на всіх етапах виробництва від вирощування сировини до її реалізації. На виробництві патогенні мікроорганізми проникають в сировину та продукти харчування з погано обробленого обладнання, інструментів, повітря виробничих приміщень, одягу та рук персоналу тощо.

Перелічені вище негативні фактори потребують посиленого контролю безпеки та якості продуктів харчування, їх відповідності санітарним нормам та стандартам виробництва, доброчесності та відповідальності виробників харчових продуктів.

Якість продуктів харчування є однією з головних складових у забезпеченні здоров'я населення та благополуччя споживачів. Одним з найпоширеніших та небезпечних патогенів, які контамінують продукти харчування є *Listeria monocytogenes*.

Сучасний стан питання бактеріального забруднення продуктів харчування характеризується активним розвитком методів ідентифікації мікроорганізмів в них, в тому числі і *Listeria monocytogenes*.

Оскільки *Listeria monocytogenes* володіє специфічним комплексом біохімічних ознак. Експрес-індикація збудника в сучасних лабораторних системах базується на аналізі її ключових метаболітів та позаклітинних ферментів (β -глюкозидази, лецитинази та специфічних органічних кислот), що виділяються у процесі життєдіяльності мікроорганізму.

Ефективна реєстрація цих метаболічних маркерів напряму залежить від стабільності, чутливості та селективності використовуваних поживних середовищ.

Застосування високотехнологічних комерційних дегідратованих порошкоподібних середовищ та хромогенних агарів (зокрема *ALOA*, *PALCAM*, *Fraser*) дозволяє візуалізувати ферментативну активність лістерій безпосередньо на етапі культивування за рахунок утворення специфічних кольорових зон та ореолів опалесценції (поява каламутності) при взаємодії метаболітів лістерії зі специфічними компонентами поживних середовищ.

Проте відновлення (гідратація) та підготовка таких складних комерційних систем у лабораторії потребують суворого технологічного контролю. Будь-які неточності на етапі автоклавування чи введення селективних добавок можуть порушувати або блокувати ферментативні реакції, що в подальшому призводить до помилок в аналізі метаболітів та отриманні хибнонегативних або результатів. У зв'язку з цим, оптимізація вхідного контролю якості поживних систем, впровадження прецизійних алгоритмів (методів) оцінки ростових і культуральних властивостей на базі акредитованих установ котрі виконують мікробіологічні дослідження, а також діджиталізація (цифровізація) обліку витрат сухих порошоків є надзвичайно актуальним науково-практичним завданням для сучасної біотехнології.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Історичні етапи вивчення бактерій роду *Listeria*

Історія вивчення лістерії починається з 1924 року, коли англо-канадський бактеріолог Р. Дж. Е. Мюррей виділив даний мікроорганізм з крові лабораторних кролів, котрі хворіли септицемією. Вчений не зміг віднести патоген до жодного з відомих на той час родів мікроорганізмів. Мюррей назвав щойно відкритий мікроорганізм *Bacterium monocytogenes* [1]. Назва походила від латинізованих грецьких слів “mono” – один, “cyto” – клітина та “genes” – утворювати, що відображає здатність збудника викликати моноцитоз у інфікованих організмів.

Пізніше, у 1927 році, британський лікар Дж. Пірі запропонував переіменувати рід нещодавно відкритих бактерій на *Listerella* на честь англійського хірурга Дж. Лістера. Однак у 1939 році на Третньому Міжнародному конгресі мікробіологів Пірі дізнався, що таку назву вже має інший об’єкт – слизовик *Listerella paradoxa*. Таким чином, вченим була запропонована альтернативна унікальна назва *Listeria*, котра закріпилася і до сьогодні [2, 3].

Масштаби небезпечності лістерії для людини були оцінені лише після епідемії лістеріозу в Німеччині у 1949 році. В цей період було визначено, що лістерія є збудником хвороб не лише у тварин, а й у людей і особливо небезпечна для вагітних жінок, ще ненароджених плодів та немовлят. Німецький бактеріолог Й. Потель з університету в Галле в той час визначив гранулематоз у мертвонароджених немовлят [4].

Також, німецький бактеріолог Г. Зеелігер зібрав колекцію штамів лістерії в період з 1927 по 1987 рік. В колекції налічується близько 6000 представників роду *Listeria*. До цього вважалося, що даний рід налічує лише

один вид, бо штами були схожі між собою і їх вдалося відрізнити лише після того, як науковець підібрав специфічні антитіла для їх ідентифікації [5].

Вивчення лістерії та лістеріозу не припинилися і до сьогодні. На даний момент також ведуться активні дослідження в цій галузі як серед закордонних, так і серед вітчизняних науковців й дослідників. Не зважаючи на те, що *Listeria monocytogenes* є патогеном і викликає небезпечні захворювання, на сучасному етапі вчені розглядають цей мікроорганізм та його властивості як інструмент імунотерапії.

Ракові захворювання в даний час залишаються нагальною проблемою, оскільки універсального та ефективного лікування проти різних типів раку досі не існує. Традиційні методи лікування такі, як хірургічні втручання, опромінення та хімічна терапія все ще недосконалі та мають ризики й побічні ефекти для пацієнтів. Саме через ці фактори перспектив використання набуває імунотерапія.

Китайські вчені пропонують використання лістерії в якості імунотерапевтичного інструменту, котрий виступає в ролі своєрідної вакцини проти різних типів раку, а саме: шийки матки та молочної залози; підшлункової залози; простати; оболонки внутрішніх органів (легень, шлунку) – мезотеліоми; тканин епітелію та слизових оболонок та внутрішніх органів – карциноми; меланоми – розвивається з пігментних клітин (родимки, пігментні плями); підшлункової залози.

Справа в тому, що *Listeria monocytogenes* здатна змінювати мікросередовище пухлинних утворень. Пухлини здатні пригнічувати імунну відповідь організму та залишатися непомітними для механізму імунної системи, що відбувається у більшості випадків. Ці фактори значно ускладнюють процес боротьби організму з пухлинними клітинами. Лістерія допомагає зменшити кількість імуносупресивних клітин і посилює активність Т-лімфоцитів та НК-клітин, що підвищує ефективність протипухлинної відповіді.

Вакцина розроблена на основі атенуйованої (ослабленої) лістерії та антигену HPV-16 E7- ADXS11-, показала задовільні та багатообіцяючі результати у пацієнтів з раком шийки матки. Також досліджували комбіноване застосування *Listeria*-вакцин разом з інгібіторами PD-1 та променевою терапією. В роботі цих китайських вчених значна увага також приділяється безпечності застосування лістерії для створення вакцинного матеріалу. Для зменшення патогенності бактерії використовують генетичні модифікації. Задля створення більшої безпечності препаратів, у бактерій видаляють гени вірулентності (здатність заражати) *actA* та *inlB*. Такі штами мікроорганізмів значно менш небезпечні, але все ще зберігають здатність стимулювати імунну систему. Вчені також пропонують розробку KBMA-вакцин. Дані вакцини містять бактерії, котрі вже не здатні до активного розмноження, але зберігають метаболічну активність та імуногенність [6].

У схожій статті від інших авторів, лікування раку за допомогою лістерії було проведено на мишах. В ній зазначається, що через систему ракових клітин пухлини аденокарциноми підшлункової залози та оточуючих її клітин (імуносупресивність) ракове утворення стає невидимим для імунної системи організму. Через даний фактор імунотерапія часто лишається малоефективною. В даному експерименті дослідники застосовують *Listeria monocytogenes* для перенесення білків правцевого антитоксину прямо в клітини пухлини.

Для організму людини правцевий антитоксин добре відомий, саме тому за допомогою нього ракові клітини мітять і роблять видимими для імунного механізму. Лістерія в даному випадку виступає вектором для переносу мітки в ракові утворення, бо вона володіє хорошою проникністю в клітини [7].

1.2. Біологічні та патогенні властивості *Listeria monocytogenes*

Лістерія є однією з найбільш небезпечних патогенних мікроорганізмів для тварин та людей.

Listeria monocytogenes належить до факультативних анаеробів та є грампозитивною, тобто забарвлюється у фіолетовий колір при фарбуванні за Грамом. Має кокобацилярну форму. Є рухливим мікроорганізмом завдяки наявності перитрихіальних (росташованих симетрично з обох боків відносно тіла бактерії) джгутиків, котрі утворюються за сприятливої температури 20-25 °С (рис. 1) [8, 9].

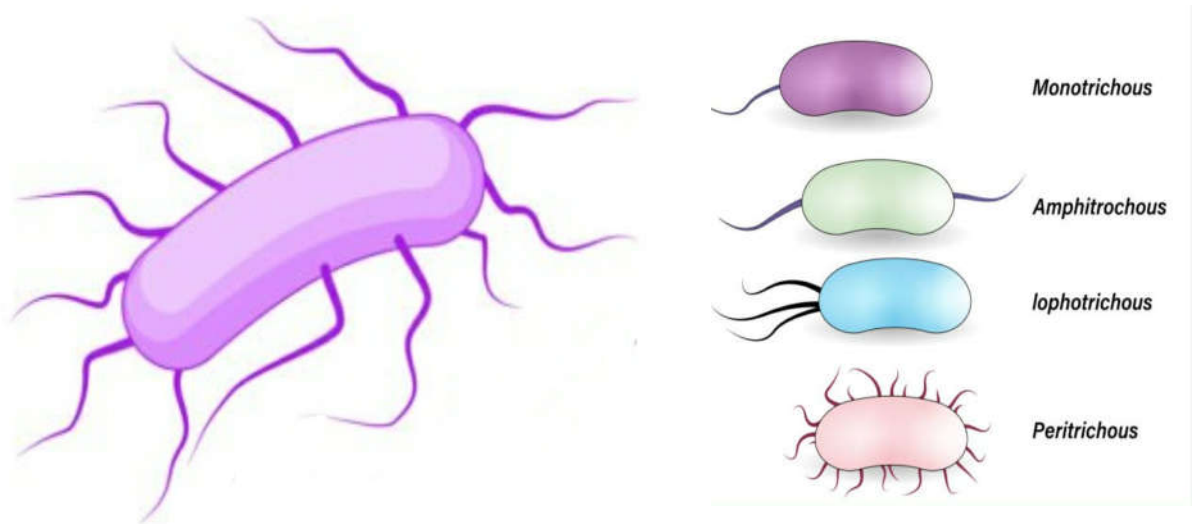


Рис. 1. Форма лістерії, тип її джгутиків та порівняння перитрихіальних джгутиків з іншими їх видами

На поживних середовищах та в мазках лістерії проростають смужками з 3 та більше клітин: молоді культури можуть розташовуватися «Y» або «V» формами; старі культури можуть виглядати кокоподібно [9].

У лістерій не спостерігається утворення слизових оболонок – капсул. Спороутворення також відсутнє [9].

Завдяки особливостям свого метаболізму, дані мікроорганізми здатні ферментувати глюкозу в процесі своєї життєдіяльності, що забезпечує зручність її ідентифікації при дослідженнях [9].

Даний патоген характеризується тим, що здатен утворювати біоплівки. Біоплівки являють собою скупчення мікроорганізмів прикріплених до будь-якої поверхні, котрі покриті зверху захисною оболонкою ЕПМ (Екстрацелюлярним полімерним матриксом). Дані фактори відіграють

важливу роль в стійкості *Listeria monocytogenes* до антибактеріальних засобів. Також, *Listeria monocytogenes* може утворювати біоплівки і з іншими видами мікроорганізмів, що може впливати на точність її ідентифікації та ефективність усунення в зразках та інших об'єктах [10].

Лістерія виживає в сильноокислому середовищі котре перевищує рН 3,5. Ця властивість гарантує патогену виживаність в шлунку людини, бо рН шлункового соку під час перетравлювання становить 1,5 – 3,5 [10].

Також лістерія небезпечна тим, що має здатність виживати та розмножуватися при відносно невисоких температурах, оскільки належить до мезофільних бактерій з психротрофними властивостями. Це створює труднощі в процесах зберігання продуктів харчування в умовах холодильників та транспортування в рефрижераторах. Володіє високою вірулентністю й резистентністю.

Для лістерії властиве спричинення сильного ендоцитозу клітинами хазяїна (поглинання речовин або мікроорганізмів клітиною). Ендоцитоз є одним з найважливіших факторів вірулентності й патогенності. Лістерія при потраплянні в організм починає виділяти токсин лістеріолізін О (LLO) й ферменти фосфоліпази PlcA і PlcB. Завдяки цим факторам в мембранах клітин утворюються пори, через котрі патоген проникає в гіялоплазму клітини. Після цього бактерії активно розвиваються в організмі та пересуваються між клітинами [10].

Даний мікроорганізм викликає небезпечну інфекційну хворобу – лістеріоз. Лістеріоз становить особливу загрозу для людей зі слабим імунітетом, вагітних жінок та плодів котрі знаходяться в утробі [11-13].

Клінічні прояви лістеріозу можуть бути різними: ураження ЦНС; сепсис; менінгіт; енцефаліт; ураження шлунково-кишкового тракту та порушення їх функціонування; аборти плодів; запалення тканин молочних залоз; абсцес мозку тощо [12].

Наслідки лістеріозу повністю не лікуються і можуть призводити до летального кінця.

1.3. Епідеміологічне значення та харчові шляхи передачі

Лістерія є однією з найбільш частих причин смертності людей, що зумовлено вживанням контамінованих нею продуктів. Ці бактерії передаються від людей до тварин, тобто належать до зоонозів. Лістеріоз – зоонозне захворювання [14]. Носіями лістерії можуть виступати як дикі, так і домашні тварини. Найбільш частими переносниками даних мікроорганізмів є сільськогосподарські тварини, собаки та коти. Серед диких тварин носіями нерідко стають миші й пацюки, лисиці. Деякі комахи, такі як блохи й воші також можуть виступати розносниками збудника лістеріозу. Серед птахів активними переносниками лістерії є голуби й дика птиця [12].

Даний мікроорганізм характеризується широкою розповсюдженістю в природних середовищах: вода; ґрунт; повітря; рослини; фекалії тварин; скотомогильники засобів (табл. 1) [15].

Таблиця 1

Середовища розповсюдження, шляхи та причини контамінації
Listeria

Середовище	Об'єкти, що підлягають контамінації	Шляхи та причини контамінації <i>Listeria</i>
Харчова сировина	кормові суміші, силос, зернова сировина, сировина для подальшого виготовлення продуктів харчування	джерело зараження сільськогосподарських тварин та забруднення при виробничих процесах
Вода	стічні води, вода для поливу, виробнича вода	бактерія може тривалий час виживати у водному середовищі
Навколишнє середовище	ґрунт, рослинні залишки, пил	природне джерело (середовище мешкання) <i>Listeria</i>
Харчове виробництво	конвеєри, ножі, столи, холодильні камери, пакувальні лінії	бактерія утворює біоплівки та довго зберігається на поверхнях
Тварини	велика рогата худоба, птиця, гризуни	можуть виступати носіями та проміжними господарями бактерій
Персонал та інвентар	руки працівників, спецодяг, контейнери для зберігання, холодильники, рефрежератори	можливе вторинне перенесення бактерії між об'єктами та зараження на виробничому етапі, зберіганні й транспортуванні

Лістерія спостерігається і на поверхнях виробничого обладнання, в повітрі виробничих приміщень, може бути присутньою на одязі персоналу, в просторі холодильних камер та транспортувальних [14].

Даний мікроорганізм заражає широкий спектр продуктів харчування: молочні та кисломолочні продукти; овочі та фрукти; вироби з м'яса і безпосередньо саме м'ясо; напівфабрикати та готові до споживання продукти; рибу та вироби з неї (табл. 2) [14-18].

Таблиця 2

Продукти харчування, що найчастіше підлягають контамінації *Listeria monocytogenes*

Основна категорії харчових продуктів, котрі підлягають контамінації	Підкатегорії продуктів, що можуть контамінуватися <i>Listeria monocytogenes</i>	Причини та шляхи контамінації даних продуктів лістерією
Молочні продукти	непастеризоване молоко, м'які сири, бринза, сир з пліснявою, морозиво	<i>Listeria</i> добре виживає при охолодженні та у вологому середовищі
М'ясні продукти	ковбаси, сосиски, паштети, шинка, готове м'ясо	можливе забруднення під час переробки та зберігання
Риба та морепродукти	копчена риба, слабосолона риба, морепродукти	бактерія витримує низькі температури та солоне середовище
Овочі та зелень	салат, шпинат, петрушка, кріп, огірки, капуста	зараження відбувається через ґрунт, воду або поверхні обладнання
Фрукти	яблука, дині, ягоди, нарізані фрукти	можливе поверхнєве забруднення під час транспортування
Готові харчові продукти	готові салати, сендвічі, хот-доги, вироби кулінарії, напівфабрикати	тривале зберігання у холодильнику сприяє росту <i>Listeria</i> . Не підлягають миттю та термообробці
Харчова сировина	кормові суміші, силос, зернова сировина	джерело зараження відбувається через тварин, персонал, виробниче обладнання під час переробки

Зараження людей лістерією відбувається харчовим шляхом – аліментарно, під час вживання контамінованих нею продуктів. Контамінація продуктів може відбуватися на різних етапах, починаючи з вирощування сировини і до реалізації та потрапляння продуктів в дім споживачів. Напівфабрикати та готові до вживання продукти харчування становлять особливу загрозу для людей, оскільки вони майже не обробляються термічно або взагалі не підлягають термообробці [17].

Спалахи лістеріозу, пов'язані з вживанням контамінованих продуктів, щороку спостерігаються в різних країнах по всьому світу. В залежності від країн, фактори розповсюдження (харчові продукти) варіюються [18].

Також, в США спалахи лістеріозу були нерідко пов'язаними з вживанням в їжу:

- непастеризованих сирих продуктів з молока, котрі не пройшли термічну обробку;
- м'яких сортів сиру на зразок мексиканських (кесо фреско);
- сирих овочів та фруктів;
- м'ясних делікатесів, сосисок, ковбас;
- риби різних кондицій;
- морозива тощо.

Серед тварин зараження лістеріозом спостерігається через вживання ними сирих кормів [15].

Масштабне дослідження ізолятів лістерії було проведене в Бразилії. У своїй роботі бразильські дослідники вивчали генетичне різноманіття *Listeria monocytogenes*. Потреба в їх дослід була зумовлена тим, що даних по лістерії в Південній Америці бракує і лістеріоз в Бразилії майже не реєструється. Патогени, виділені зі зразків, описуються зазвичай дуже поверхнево.

В своїх експериментах науковці порівнювали ізоляти лістерії, котрі були виділені з різних середовищ: яловичини; зразків з клінічних випадків; виробничих середовищ.

Дослід проводився для того, щоб:

- поповнити епідеміологічні дані в країні;
- перевірити, чи існують місцеві бразильські штами лістерії;
- чи схожі вони на штами з Америки та Європи;
- як поширюється лістерія країнами.

У результаті дослідження було встановлено, що у Бразилії найбільш часто зустрічаються серотипи 1/2a, 1/2b та 4b. Саме ці серотипи зазвичай пов'язані зі спалахами лістеріозу по всьому світу. Це говорить про те, що проблема поширення *Listeria monocytogenes* є актуальною не лише для Європи чи США, але й для країн Латинської Америки.

Автори дійшли висновку, що повногеномне секвенування є одним із найефективніших сучасних методів епідеміологічного моніторингу *L. monocytogenes*. Метод дозволяє ідентифікувати серотипи бактерії та встановлювати спорідненість між штамми, відстежувати джерела зараження та виявляти клони, котрі довго зберігаються. Отримані результати мають велике значення для контролю якості харчових продуктів та профілактики лістеріозу [19, 20].

В матеріалах Міжнародної наукової конференції за 2022 рік, науковці порівнювали дослідження продуктів харчування стосовно контамінації лістерії різних років з 2016 по 2020 на території України. З кожним роком показник контамінації постійно коливався. Найбільше позитивних результатів на наявність лістерії в зразках продуктів було зареєстровано у 2018-му році. В результаті дослідники зробили висновок, що найбільш небезпечними для споживачів є м'ясо та продукти з нього, а також риба. Також у висновку зазначається, що бактеріальне забруднення продуктів харчування *Listeria monocytogenes* спричинене порушенням санітарних та гігієнічних норм при їх виробництві [21].

Спалахи лістеріозу в Україні в більшості випадків пов'язані зі споживанням контамінованого сирого молока та молочних продуктів (41,8 %), виробів з яловичини, свинини, курятини та іншого м'яса (32,2 %), сирих овочів

(10 %), морепродуктів та риби різної кондиції (8 %), курячих, качиних та гусячих яєць (2,1 %) [18].

Лістеріоз становить особливу загрозу для людей зі слабим імунітетом, вагітних жінок, плодів котрі знаходяться в утробі та немовлят, що може відобразитися на демографічних показниках при виникненні спалаху лістеріозу – зростання смертності населення планети.

Дане захворювання може мати більш легкий перебіг, або тяжкий. При неінвазивному перебігу, коли бактерії знаходяться лише в кишечнику, у хворих може спостерігатися нудота та блювання, діарея, підвищення температури вище 38 °С, больові відчуття у м'язах. Ці симптоми можуть спостерігатися у пацієнтів протягом 1-3 днів. Неінвазивна форма лістеріозу є менш небезпечною і може бути вилікованою. Якщо ж виникає підозра на захворюваність інвазивною формою лістеріозу, то спостерігається обмеження рухливості шиї через затиснутість шийних м'язів (ригідність), нечітка координація рухів та втрата рівноваги, порушення роботи мозку, неясність свідомості, марення, м'язові спазми, сильні головні болі [15].

При вагітності симптоми лістеріозу можуть бути маловираженими, або взагалі не проявлятися до певного моменту [15].

Специфічного лікування (вакцинації) проти лістеріозу на даному етапі не існує. Якщо людина вже хвора, то лікування протікає за допомогою антибіотичних препаратів. Найбільш поширеними серед антибіотичних препаратів проти лістеріозу є ампіцилін та бензилпеніцилін, Якщо у пацієнтів спостерігаються алергічні реакції на вищезгадані препарати, тоді до застосування рекомендовані триметоприм або сульфаметоксазол, меропенем, еритроміцин. Препарати приймаються курсом [22].

Задля уникнення спалахів та розповсюдження лістеріозу проводяться профілактичні, санітарно-гігієнічні та протиепідемічні заходи.

Регулярно повинен проводитися:

- ветеринарний огляд та контроль інфікування сільськогосподарських та домашніх тварин;

- контроль харчових продуктів на виробництвах, в магазинах та на ринках. Держпродспоживслужби відіграють важливу роль в цих процесах;
- гігієнічний та санітарний контроль на виробництвах та господарствах;
- введення карантинних заходів при виявленні хворих на лістеріоз або спалахів;
- проведення просвітних заходів стосовно лістеріозу серед населення;
- розробка специфічного лікування лістеріозу для людей [22].

Задля уникнення захворюваності та розповсюдження лістеріозу серед населення варто також дотримуватися правил зберігання продуктів харчування:

- дотримання товарного (продуктового сусідства). Сирі продукти не можна зберігати разом з готовими до вживання та термічно обробленими виробами;
- після покупки та перед закладанням в холодильник, продукти, котрі підлягають миттю (переважно овочі, фрукти, ягоди) варто промивати чистою кип'яченою водою та висушувати від зайвої вологи;
- продукти потрібно споживати свіжими. Чим довше продукт лежатиме в холодильній камері, тим більший ризик контамінації, навіть якщо продукти все ще свіжі і термін придатності не сплив;
- не варто споживати продукти після виходу терміну придатності. Особливо це стосується їжі, котра не проходить термообробку;
- простір холодильників потрібно регулярно мити та протирати дезінфікуючими засобами, позбавлятися залишків старої їжі та протермінованих товарів;
- температура в холодильнику не повинна перевищувати 4°C, а в морозильних камерах температура повинна становити -18 °C. Чим нижчою буде температура, тим менш життєздатними будуть лістерії;

- всі виробничі поверхні, обладнання, інструменти, посуд та столові прилади потрібно ретельно мити і дезінфікувати призначеними для цього дезінфікуючими засобами [15].

При контакті з їжею та її споживанням обов'язково потрібно мити руки з милом та обробляти антисептиком за необхідності [15].

Ємності для годування тварин потрібно зберігати та мити окремо, щоб уникнути зараження. Для споживання кормів тваринами повинно бути виділене окреме місце, задля уникнення контакту кормів та тваринної слини з продуктами харчування [15].

1.4. Методи ідентифікації *Listeria monocytogenes*

На сучасному етапі існує багато методів ідентифікації лістерії від найперших класичних, до найсучасніших з використанням комп'ютерних технологій та штучного інтелекту.

Закордонні вчені та дослідники постійно вносять свій вагомий вклад в розвиток науки, в тому числі і в питаннях лістерії та лістеріозу. На даному етапі існує багато наукових робіт, присвячених даному питанню, як оглядових (узагальнених), так і оригінальних дослідницьких.

Наприклад, науковці з Шотландії та Британії Дж. Крістофер Лоу і В. Доначі узагальнили дані попередніх досліджень стосовно *Listeria monocytogenes* та лістеріозу.

Акцент був зроблений на тому, що:

- лістерія здатна викликати серйозні хвороби людей та тварин, особливо у жуйних;
- ця бактерія найчастіше проникає в організм з продуктами харчування у вигляді харчової інфекції;
- лістеріоз проявляється по різному і має різні форми такі, як сепсис, аборти, інцефаліт, гастроентерит та інші;

- досягнення у дослідженнях лістерій завдячують розвитку сучасних методів таксономії, бактеріальному типуванню, молекулярній та клітинній біології [23].

Австралійські вчені Ута Гасанов, Дениз Хьюз, Филип М. Хансбро розглядають методи виділення та виявлення *Listeria* spp. і *Listeria monocytogenes*.

В своєму огляді науковці:

- висвітлюють важливість виявлення бактеріальних забруднень продуктів харчування мікроорганізмами, а саме лістерією на ранніх стадіях для запобігання отруєнь споживачів та виникнення спалахів харчових інфекцій та інших хвороб, пов'язаних з даним мікроорганізмом;

- акцентують увагу на тому, що для ідентифікації забруднення продуктів харчування потрібні існувати експрес-тести на основі імуноферментного аналізу для швидкої та точної ідентифікації мікроорганізмів;

- порівнюють методи аналізу харчових продуктів;

- зазначають про те, що наявність непатогенних штамів лістерії в продуктах харчування можуть вказувати на наявність також і *L. Monocytogenes* в зразках;

- приділяють увагу різним серотипам лістерії і їх патогенності;

- вказують, що лише 3 з 13 серотипів лістерії спричиняють отруєння, однак і інші серотипи мають потенціал до спричинення захворювань через те, що мають ідентичні фактори вірулентності;

- описують та порівнюють різні методи ідентифікації лістерії як культуральні, так і молекулярні;

- наводять основні переваги молекулярних методів ідентифікації лістерії перед класичними;

- зазначають, що більшість аналітичних тестів харчових продуктів засновані на антитілах та культуральних методах ідентифікації, однак в харчовій промисловості все більше застосовуються молекулярні методи;

- наводять переваги та недоліки різних методів виявлення [24].

Вчені також приділяють значну увагу зручним та сучасним методам ідентифікації лістерії та мікроорганізмів загалом. Одним з таких методів є *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ELISA – імуноферментний аналіз. Даний метод базується на тому, що антигени бактерій взаємодіють з антитілами.

Цей метод досить часто застосовують для виявлення лістерії в зразках: свіжих овочів; зелені; неконсервованих салатів; рослинних продуктів готових до вживання; фруктів.

Це пов'язано з тим, що рослинні зразки містять клітковину, органічні кислоти та ферменти, пігменти, залишки ґрунту, котрі можуть ускладнювати проведення молекулярних методів та робити їх менш точними.

Для проведення дослідження, антитіла вносять в лунки культурального планшета. Після цього попередньо підготований зразок вносять в лунки. Якщо лістерія наявна в зразках, то її антигени зв'язується з антитілами. Потім в лунку також вносять антитіла разом з ферментами та додають субстрат. При реакції ферментів та субстрату повинно утворитися забарвлення, наприклад, блакитне. Якщо колір присутній, то в такому разі реакція вважається позитивною і бактерії в зразку виявлені. Чим інтенсивнішим є забарвлення, тим більше мікроорганізмів знаходиться у зразку. Інтенсивність кольору вимірюють з використанням спектрофотометра [25-28].

Метод ELISA є швидким, простим у виконанні та підходить для великої кількості зразків. Однак він може програвати за чутливістю фізико-хімічним методам.

Вчені з іспанського університету імені Мігеля Ернандеса провели дослідження по виявленню ізолятів лістерії. Для цього був використаний прагматичний багатолокусовий філогенетичний аналіз. Дослідники зазначають, що ідентифікація ізолятів лістерії, навіть на даний момент при наявності різних технологій, все ще є досить трудомістким та довгим процесом. Через це, у своїй статі вчені пропонують, для виявлення лістерії, метод мультилокусного філогенетичного аналізу (MLPA). MLPA є сучасним

підходом до виявлення бактерій роду *Listeria*. Такий метод ідентифікації базується на секвенуванні декількох “housekeeping”-генів. Тобто вид мікроорганізмів визначається за комбінацією генів.

Переваги MLPA полягають в:

- більш високій специфічності визначення видів за рахунок аналізу сукупності генетичних маркерів;
- в можливості не тільки розрізнити види *Listeria*, але й визначити внутрішньовидові лінії *L. monocytogenes*, що відіграє важливу роль в оцінці вірулентності штамів;
- в більшій доступності і економічній доцільності порівняно з повногеномним секвенуванням.

Таким чином, даний метод є досить перспективним та ефективним способом для контролю якості харчових продуктів.

Однак, слід зазначити, що частковим обмеженням застосування MLPA є те, що даний метод не застосовується безпосередньо для самих зразків харчових продуктів, а направлений на ідентифікацію ізольованих культур мікроорганізмів [29].

Китайські вчені Инь Фэн, Чжанкай Дж. Ченг, Сяньху Вэй та інші зробили свій внесок в дослідження методів пришвидшеного виявлення *Listeria monocytogenes*, базуючись на метаболоміці та використанні штучного інтелекту.

Серед сучасних досліджень для ідентифікації *Listeria monocytogenes* в продуктах харчування та інших об'єктах все частіше використовують процеси метаболоміки. Ці процеси засновані на аналізі продуктів обміну речовин мікроорганізмів – метаболітів.

Завдяки метаболоміці можливо досліджувати комплекси низькомолекулярних сполук (метаболітів), котрі утворюються в клітині під час життєдіяльності. Також можливо сформувати «метаболічний профіль» або «метаболічний відбиток» мікроорганізму.

Усі види мікроорганізмів характеризуються власним специфічним набором метаболітів, котрий визначається особливостями їх обміну речовин. Через цю особливість аналіз метаболітів може використовуватися як зручний та надійний інструмент для класифікації та розділення бактерій, у тому числі патогенних. У розглянутому дослідженні вчені застосували методи мас-спектрометричного аналізу для виявлення метаболітів, характерних для *Listeria monocytogenes*, а також для відділення її від інших мікроорганізмів.

Специфіка цього методу виявлення та новизна полягають в тому, що в ньому аналіз метаболоміки поєднаний з технологіями штучного інтелекту – алгоритмами глибокого навчання. Отримані метаболічні профілі використовуються для навчання нейромережі, котра здатна автоматично розпізнавати ознаки, притаманні патогену.

У результаті цього досліду вчені встановили набір специфічних метаболітів (біомаркерів) та за допомогою них ідентифікувати *Listeria monocytogenes* в зразках з високою точністю.

Запропонований в їх праці підхід має свої вагомі переваги перед традиційними методами ідентифікації:

- дає можливість швидко та достовірно виявляти збудника;
- значно скорочує час проведення дослідів порівняно з традиційними мікробіологічними методами, які потребують процесу культивування бактерій;
- використання алгоритмів штучного інтелекту та машинного навчання підвищує точність і надійність ідентифікації за рахунок автоматизованого аналізу великого обсягу даних, що частково виключає людський фактор та спрощує роботу [30].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, УМОВИ, І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

2.1. Місце та об'єкт дослідження

Експериментальні та аналітичні дослідження, представлені у даній кваліфікаційній роботі, виконувалися на базі Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби. Дана установа є акредитованою державною лабораторією, що здійснює комплексний лабораторний контроль безпеки та якості харчових продуктів, продовольчої сировини, кормів, води, а також об'єктів навколишнього середовища. Діагностичні та мікробіологічні випробування проводяться у суворій відповідності до чинних нормативних документів та міжнародних стандартів.

Матеріально-технічна база та метрологічне забезпечення установи сертифіковані відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025. Усі вимірювальні прилади: ламінарні шафи біологічної безпеки II класу; термостати з автоматичним контролем температурного режиму; автоклавні систем для стерилізації поживних середовищ, лабораторні ваги різного класу точності проходять регулярну перевірку та калібрування, що гарантує високу точність та відтворюваність одержаних результатів.

Основним науково-практичним напрямком роботи лабораторії є моніторинг та індикація патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здатних викликати токсикоінфекції та зоонозні захворювання. У контексті виконання даної роботи особливу увагу було приділено оптимізації біотехнологічних систем виявлення та експрес-ідентифікації бактерій роду *Listeria* у харчовій сировині та готових продуктах харчування.

Під час виконання експериментів було детально опрацьовано організацію біобезпеки, нормативну документацію (ДСТУ EN ISO 11290) та

комплексні технологічні підходи мікробіологічного контролю для виявлення цільового патогену та оцінки його метаболічного профілю.

2.2. Методика виконання роботи

Методологія виявлення та ідентифікації бактерій роду *Listeria* базувалася на класичній чотириетапній процедурі згідно з вимогами ДСТУ EN ISO 11290-1 [32]. Оскільки під час первинного моніторингу відібраних зразків харчових продуктів і сировини цільового патогену виявлено не було, для верифікації аналітичної чутливості та працездатності описаної біотехнологічної системи було здійснено моделювання застосування методу штучного внесення матриксу (Spike-test).

Для цього в серію чистих модельних зразків харчових продуктів масою 25 г (м'який сир Брі, м'ясна в'ялена нарізка, готовий до споживання салат зі свіжих овочів, риба копчена) вноситься фіксована інокуляційна доза штаму *Listeria monocytogenes* (концентрація 10–100 КУО на 25 г зразку, після чого зразки піддавали повному циклу мікробіологічного аналізу.

Для гомогенізації та первинного селективного збагачення, наважка контамінованого харчового продукту (25 г) асептично переноситься у стерильні пакети для гомогенізатора та додавали 225 мл пептонної води, або середовища Half Fraser (саме для *Listeria*). Суміш піддається механічній гомогенізації у лабораторному блендері BagMixer протягом 1–2 хвилин для руйнування матриксу продукту та вивільнення бактеріальних клітин. В подальшому проводилися попереднє збагачення гомогенізованих зразків у *Half Fraser broth* (середовище має жовтий колір). Інкубація проводилася у термостаті за температури 30 °C протягом 24 годин.

Після попереднього збагачення, аліквота одержаної культури об'ємом 0,1 мл переноситься у пробірки з вмістом 10 мл повного селективного середовища *Fraser broth* (містить повну концентрацію акрифлавіну та налідиксової кислоти для пригнічення супутньої мікрофлори). Культивування

здійснюється за температури 37 °С протягом 24 годин до появи вираженого чорного забарвлення внаслідок гідролізу ескуліну.

Із накопичувальних культур *Half Fraser* та *Fraser broth* за допомогою стерильної бактеріологічної петлі виконується висів штрихом для отримання ізольованих колоній на паралельні ряди щільних диференціально-селективних середовищ.

Для підвищення статистичної достовірності результатів експерименту та забезпечення можливості коректного порівняння зразків, усі дослідження проводили у дворазовій повторності шляхом виконання паралельних посівів.

Враховуючи, що загальна кількість досліджуваних зразків харчових продуктів становила 4 одиниці, висів кожного зразка здійснювали одночасно на два селективні ескулінові середовища. З одного зразка посів виконували у дві чашки Петрі для кожного середовища. Таким чином, загальна кількість засіяних чашок Петрі на етапі щільних селективних ескулінових середовищ становила 16 штук. Для цієї мети застосовували *Oxford agar* та *PALCAM agar*, котрі забезпечують диференціацію бактерій роду *Listeria* від інших мікроорганізмів. *Oxford agar* має жовтувате напівпрозоре забарвлення; у випадку позитивного результату колонії лістерій мають чорне забарвлення з чорним оточенням навколо. *PALCAM agar* за стандартом випускається червоного напівпрозорого відтінку, на якому колонії лістерій також формуються чорними з темним оточенням. На даних середовищах мікроорганізми інкубують за температури 37 °С протягом 24–48 годин. Ідентифікація виконується за формуванням дрібних чорно-коричневих колоній із чорним ореолом гідролізу.

Паралельно, з метою диференціації патогенних та непатогенних видів лістерій, застосовували хромогенні агари. На дані середовища мікроорганізми висівали паралельно з ескуліновими. Під кожен зразок було підібране окреме хромогенне середовище з урахуванням компонентів та особливостей складу продукту харчування. Посів також здійснювався паралельно по дві чашки

Петрі з однаковим хромогенним середовищем до відповідного зразка продукту.

Для диференціації використовували різні типи хромогенних середовищ, підібраних окремо під кожен зразок продукту: м'який сир Бри – *ALOA agar*; м'ясна в'ялена нарізка – *CHROMagar™*; готовий до споживання салат зі свіжих овочів – *RAPID'L. mono, риба копчена - Chromogenic Plating Medium R&F®*. Зокрема, *ALOA agar* є класичним європейським хромогенним середовищем, на котрому непатогенні штами проростають бірюзовим кольором та не мають ореолів навколо. Натомість середовище *Chromogenic Plating Medium R&F®* – це сучасне американське середовище, що має особливості, які роблять його зручним для диференціації. Воно є непрозорим і має біле забарвлення, на якому колонії проглядаються дуже чітко. Також *Chromogenic Plating Medium* містить у своєму складі специфічні компоненти, завдяки котрим непатогенні види лістерій та супутня мікрофлора проростають рожевим кольором без оточення, а патогенні – більш крупними синьо-фіолетовими колоніями з невеликим блакитнуватим ореолом.

Таким чином, усього в експерименті на стадії щільних середовищ було задіяно 24 досліджувані чашки (16 чашок Петрі з селективними ескуліновими агарамі та 8 чашок з диференційно-діагностичними хромогенними агарамі).

Типові підозрілі колонії, виділені з щільних середовищ, відбираються з чашок Петрі і підлягають обов'язковій процедурі остаточного підтвердження за комплексом метаболічних та антигенних ознак.

Першим етапом підтверджувальної ідентифікації є латекс-аглютинація. Експрес-тест виконується із використанням комерційних сироваток для швидкої серологічної ідентифікації антигенів роду *Listeria*. Реакція здійснюється в спеціальних лабораторних планшетах або на пластинках. Позитивною реакцією є візуалізація чітких пластівців аглютинату протягом 2 хвилин.

Далі проводиться тест на β -гемоліз. Пересів культури виконується уколом на колумбійський кров'яний агар із додаванням 5% дефібринованої

крові барана. Інкубація за 37 °С протягом 24 годин. *L. monocytogenes* утворює вузькі, чіткі зони просвітління (гемолізу) навколо місця росту.

Завершальним етапом в ідентифікації лістерії є CAMP-тест (Christie-Atkins-Munch-Peterson). Тест полягає у постановці перехресного штрих-посіву досліджуваної культури лістерій із референтними штамами *Staphylococcus aureus* та *Rhodococcus equi* на кров'яному агарі. Позитивна реакція для *L. monocytogenes* виявлялася у формі синергічного посилення зони гемолізу (у вигляді наконечника стріли) суворо у зоні розмежування з штрихом *S. Aureus* [33].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Таксономічний статус та морфолого-культуральні властивості лістерії

Listeria monocytogenes є патогенним мікроорганізмом, що належить до роду *Listeria* родини *Listeriaceae*. Належить до домену *Bacteria*, типу *Firmicutes (Bacillota)*, класу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, родини *Listeriaceae*, роду *Listeria* та виду *Listeria monocytogenes* (табл. 3).

Таблиця 3

Таксономічний статус лістерії

Таксономічна категорія	Назва
Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Firmicutes (Bacillota)</i>
Клас	<i>Bacilli</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Listeriaceae</i>
Рід	<i>Listeria</i>
Вид	<i>Listeria monocytogenes</i>

Представники роду *Listeria* широко поширені у навколишньому середовищі, однак саме *Listeria monocytogenes* є найбільш патогенним видом для людини та тварин.

Класична класифікація роду лістерії за Зеелігером неодноразово переглядалася та доповнювалася новими видами.

Стосовно сучасних даних, рід *Listeria* включає понад 20 видів, серед них найбільш патогенними для людини та тварин є *Listeria ivanovii* та *Listeria monocytogenes*, котра є основним збудником лістеріозу у людей та тварин.

Серед серотипів *Listeria monocytogenes* найбільш поширеними є 1/2a, 1/2b та 4b. Серотип 4b найчастіше пов'язаний зі спалахами харчового лістеріозу серед населення.

Listeria monocytogenes належить до факультативних анаеробів і здатна рости як у присутності кисню, так і за його відсутності. Оптимальною температурою для росту та культивування лістерії на поживних середовищах є 30–37 °С, але дані бактерії володіють властивостями розмноження і при більш низьких температурах +4 °С. Загалом лістерія може виживати за температури від 0 аж до 45 °С.

Бактерії роду *Listeria* мають товсту та пористу пептидогліканову клітинну стінку. При нанесенні пігменту на дані мікроорганізми, колір затримується в чисельних порах клітин і не вимивається спиртом. Тому лістерії за Грамом фарбуються у фіолетовий колір, що свідчить про їх грампозитивність. Завдяки визначенню грампозитивності, визначаються додаткові особливості лістерії. На основі фарбування: підбираються антибіотики для лікування хвороб спричинених лістерією; визначається наскільки вона сприятлива до висушування; скорочується переліку підозрюваних бактерій при ідентифікації.

Лістерія здатна зброджувати глюкозу та гідролізувати ескулін, але не здатна зброджувати манітол. Ці особливості використовуються при культивуванні даних мікроорганізмів на поживних середовищах, котрі містять ці компоненти, що забезпечує зручну ідентифікацію представників роду лістерії серед інших бактерій.

Лістерії всіх видів, як патогенних, так і непатогенних, містять фермент В-глюкозидазу. Даний фермент взаємодіє з хромогеном і утворює характерне забарвлення, завдяки якому колонії даних мікроорганізмів видно на хромогенних поживних середовищах.

Патогенні види лістерії *Listeria ivanovii* та *Listeria monocytogenes* містять особливий фермент фосфоліпазу-С, завдяки якому ті проникають в клітини хазяїна. Фосфоліпаза взаємодіє з лецитином і на поживному

середовищі, навколо пророслих кольорових колоній лістерії утворюється білий ореол. Дана особливість дає можливість диференціювати патогенні та непатогенні види лістерій на спеціальних поживних середовищах.

Лістерія здатна зброджувати глюкозу. Культивуються протягом 24 – 48 годин. Як і більшість бактерій, лістерії належать до хемоорганогетеротрофів. Вони здатні рости як на звичайних поживних середовищах, так і на середовищах спеціально розроблених конкретно для лістерії. Серед звичайних можна виділити кров'яний агар, м'ясо-пептонний агар та м'ясо-пептонний бульйон. Однак, на даних середовищах активно проростає і супутня мікрофлора, тому для більшої специфічності та точності диференціації перевагу надають спеціально розробленим для лістерії середовищам.

Для культивування *Listeria monocytogenes* використовують збагачувальні, селективні та диференційно-діагностичні поживні середовища.

Для первинного збагачення при культивуванні найчастіше застосовують Half Fraser broth. Для подальшого селективного збагачення використовують Fraser broth. Серед селективних та диференційно-діагностичних середовищ для лістерії виділяють Esculin agars та Chromogenic agars.

Завдяки різним компонентам поживних середовищ підібраних спеціально для лістерії, їх колонії мають характерний вигляд: колір, діаметр, розташування, взаємодія з самим середовищем.

Таким чином, знання таксономічного статусу та морфолого-культуральних властивостей лістерій має важливе значення для вибору оптимальних методів культивування, виділення та подальшої ідентифікації *Listeria* у харчовій сировині та продуктах харчування. Базуючись на отриманих ідентифікаційних даних у ході досліджень можна зробити висновок про якість та безпечність харчових продуктів, а також їхній санітарно-епідеміологічний стан. Визначення морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних та патогенних властивостей дозволяє своєчасно

виявляти потенційно небезпечні для людини та тварин штами й запобігти поширенню лістеріозу серед населення.

3.2. Виділення видів *Listeria monocytogenes* та *Listeria ivanovii* методом мікробіологічного скринінгу

Мікробіологічний скринінг – це комплекс методів, котрі спрямовані на виявлення, виділення та ідентифікацію мікроорганізмів шляхом культивування на поживних середовищах, оцінки морфології колоній, мікроскопії та біохімічних тестів.

У зв'язку з тим, що під час практичного моніторингу реальних харчових продуктів живих клітин, бактерій роду *Listeria* виявлено не було (що підтверджує належний санітарний стан виробництва та високу якість сировини), для наочності методів виділення й ідентифікації бактерій роду *Listeria*, аналізу їхніх метаболітів у зразках різного походження, застосовується метод теоретично-методологічного моделювання matrix spike (Spike-тест). Цей підхід передбачає навмисне внесення відомої кількості клітин патогену у чисті зразки продуктів харчування з подальшою оцінкою їхнього росту на різних поживних середовищах. Це дозволяє: перевірити надійність усієї біотехнологічної системи; оцінити, як специфічний матрикс (компоненти) продукту впливає на життєздатність клітин та їхнє подальше проростання. Також, даний метод підтверджує ефективність етапу попереднього збагачення й повністю виключає ризик отримання хибнонегативних результатів під час аналізу.

З метою виявлення та ідентифікації представників роду *Listeria* в продуктах харчування у даному дослідженні був проведений мікробіологічний скринінг зразків різного походження: м'який сир Бри; м'ясна нарізка у вакуумній упаковці; копчена риба; готовий до споживання свіжий овочевий салат. До кожного зразка харчових продуктів були підібрані

відповідні хромогенні поживні середовища, які забезпечували подальшу диференціацію патогенних та непатогенних видів лістерії (табл. 4).

Таблиця 4

Обґрунтування вибору хромогенних поживних середовищ під відповідні зразки продуктів харчування

Тип зразку	Хромогенні поживні середовища	Обґрунтування вибору середовища
М'який сир Бри	<i>Ottaviani and Agosti agar</i>	Вибір даного середовища для висіву зразка сиру обґрунтовується тим, що м'які сири містять супутню мікрофлору: молочнокислі бактерії та плісняву. В склад зазначеного агару входить комплекс антибіотиків, який пригнічує ріст небажаних для дослідження мікроорганізмів.
М'ясна в'ялена нарізка у вакуумній упаковці	CHROMagar™ <i>Listeria</i>	В'ялене м'ясо містить високу концентрацію солей та консервуючих агентів, що пригнічує ріст мікрофлори та впливає на чутливість методу. Вакуумна упаковка сприяє росту супутньої анаеробної мікрофлори. Компоненти даного середовища перешкоджають зростанню сторонніх мікроорганізмів та підтримують ріст ослаблених клітин лістерії.
Готовий до споживання салат зі свіжих овочів	Rapid' <i>L.Mono Agar</i>	Овочі ростуть у ґрунті, тому на них завжди присутня велика кількість мікрофлори з навколишнього середовища, в тому числі і представників грамнегативних бактерій <i>Pseudomonas</i> та <i>Enterobacteriaceae</i> , які активно розмножуються та пригнічують лістерію. Дане середовище створене спеціально для дослідження зразків рослинного походження.
Копчена риба	Chromogenic Plating Medium	Страви з риби містять високу концентрацію солей та жирів, завдяки чому на них розвивається галофільна та ліпофільна мікрофлора. Компоненти даного поживного середовища забезпечують чітку візуальну диференціацію лістерії від сторонньої мікрофлори.

В ході дослідження було встановлено вплив складу поживних середовищ та компонентів продуктів харчування на точність ідентифікації, диференціації мікроорганізмів та чутливість селективних методів виявлення.

У випадку досліджень продуктів харчування на вміст мікроорганізмів, попереднє збагачення необхідне не лише для підтримання росту клітин бактерій в зразках, але і для зручності подальшої ідентифікації й диференціації. Склад продуктів може напряму впливати на вигляд пророслих колоній мікроорганізмів. Колонії, через компоненти та хімічні складники в продуктах, можуть змінювати свій колір під час проростання. На поверхні агару може утворюватися каламутна плівка. Тому попереднє збагачення невілює вплив факторів продуктів харчування (жирність, пігменти, рН, консерванти та інше) на подальший ріст мікроорганізмів, завдяки компонентам збагачувальних середовищ та розведенню концентрації речовин.

В результаті попереднього збагачення зразків продуктів харчування у збагачувальних бульйонах Half Fraser та Fraser broth бульйон потемнів, що вже свідчило про наявність бактерій у досліджуваних зразках (рис. 2).

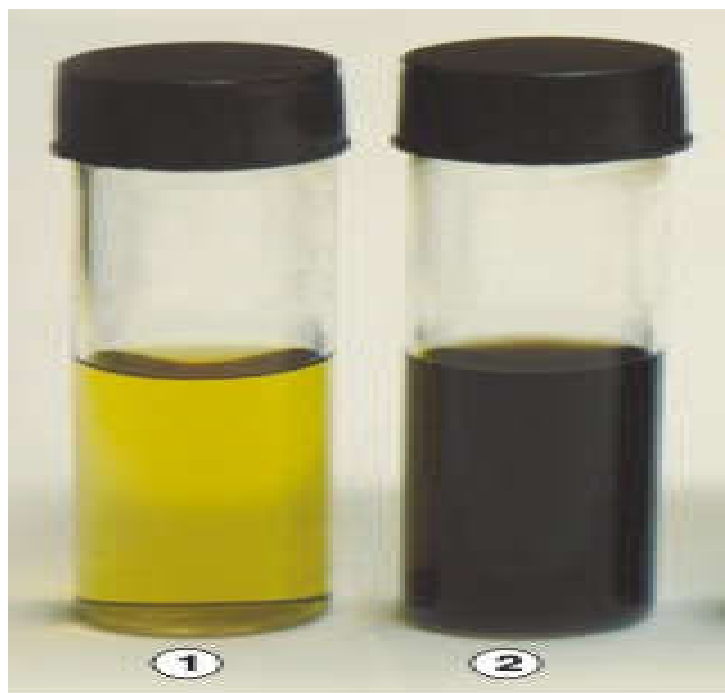


Рис. 2. Зміна окраски селективного середовища Fraser broth після збагачення зразків на наявність бактерій роду *Liste*

Після проведення етапів первинного збагачення у середовищі Half Fraser broth та вторинного збагачення у Fraser broth у частині дослідних зразків спостерігали зміну кольору поживного середовища від світло-жовтого до темно-коричневого або майже чорного. Така реакція обумовлена здатністю бактерій роду *Listeria* гідролізувати ескулін із утворенням ескулетину, який взаємодіє з іонами заліза, присутніми у середовищі, утворюючи темний комплекс. Як видно з рисунка, контрольний зразок (1) зберіг початкове світле забарвлення, тоді як дослідний зразок (2) характеризувався інтенсивним потемнінням, що є типовою ознакою можливого росту бактерій роду *Listeria* та свідчить про необхідність подальшого підтверджувального дослідження на селективних агаризованих середовищах і біохімічними методами.

Після подальшого висівання на селективно-диференційні ескулінові середовища: *Oxford agar*; *PALCAM agar*; модифікований *LPM* (Lithium chloride-Phenylethanol-Moxalactam) agar з додаванням ескуліну, які забезпечують диференціацію представників роду *Listeria* від інших мікроорганізмів, колонії лістерії проросли діаметром по 1 мм кожна. Забарвлення типових колоній лістерії на даному середовищі варіювалося від сірого до чорного. Навколо колоній на середовищах було сформоване чорне оточення – гало. Після інкубації протягом 48 годин, колонії розрослися до 2-3 мм. Забарвлення стало чорним, утворився западаючий центр (рис. 3).

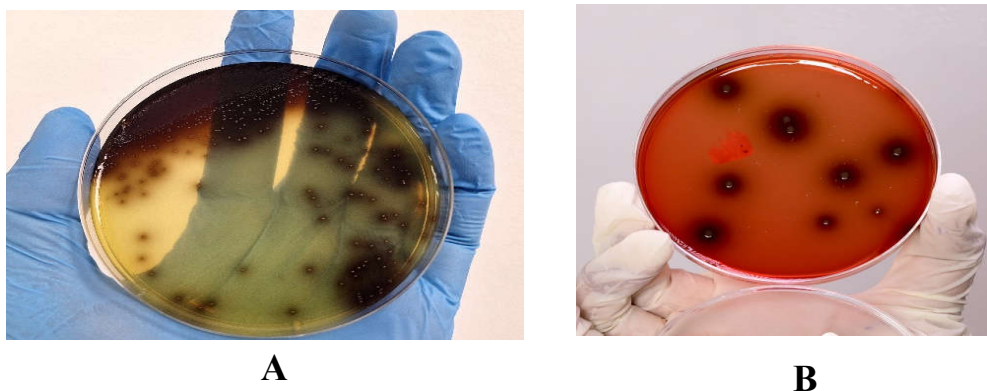


Рис. 3. Морфологічні ознаки колоній бактерій роду *Listeria* на селективно-диференційних поживних середовищах *Oxford agar* та *PALCAM agar*

Як показано на рисунку, на середовищі Oxford agar (A) сформувалися типові дрібні сіро-зелені колонії, оточені темно-коричневими або чорними зонами, що пов'язано з гідролізом ескуліну та утворенням комплексу ескулетину з солями заліза. На середовищі PALCAM agar (B) колонії *Listeria* мали характерний сіро-зелений вигляд із чорним центром або чорним ореолом на тлі червоно-коричневого середовища внаслідок аналогічної реакції гідролізу ескуліну.

Отримані морфологічні ознаки є характерними для бактерій роду *Listeria* та свідчать про наявність у досліджуваних зразках типових культур, які надалі підлягали мікроскопічній, біохімічній та молекулярній ідентифікації.

В результаті висіву на хромогенне середовище *Ottaviani and Agosti agar* проросли типові колонії представників роду *Listeria*. На даному середовищі колонії лістерій набувають характерного забарвлення внаслідок специфічних ферментативних реакцій, що дозволяє проводити попередню ідентифікацію та диференціацію видів (рис. 4).

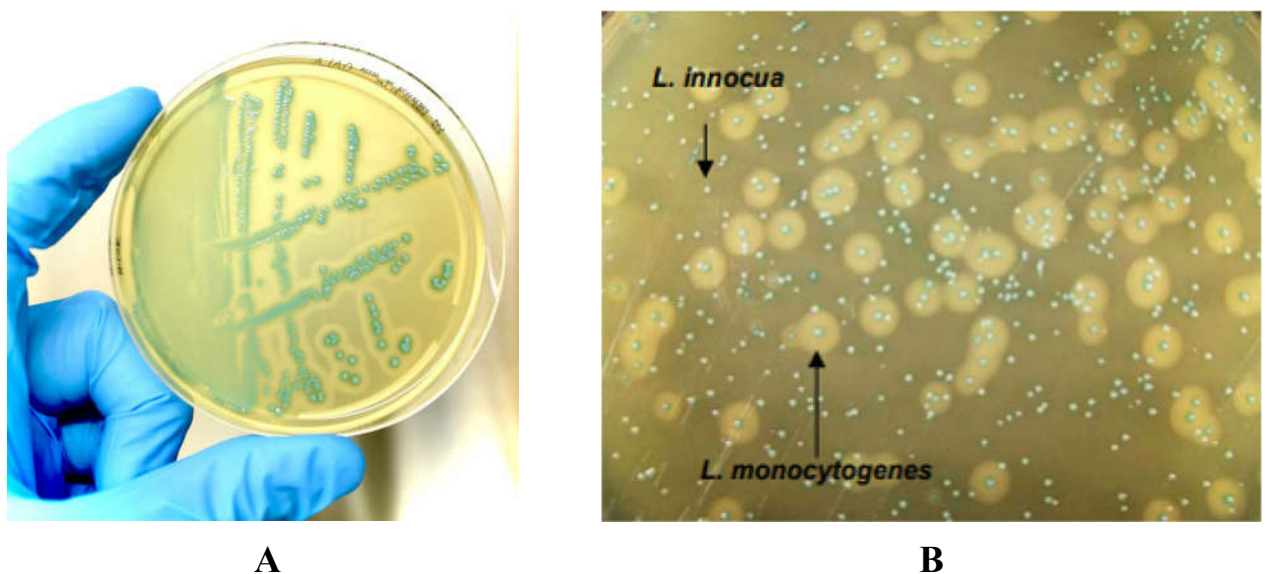


Рис. 4. Морфологічна характеристика колоній бактерій роду *Listeria* на хромогенному середовищі *Ottaviani and Agosti* (ALO)

Як показано на рисунку А, типові колонії *Listeria* spp. мали синьо-зелене забарвлення, що зумовлене гідролізом хромогенного субстрату β -

глюкозидазою. На рисунку В наведено диференціацію між непатогенним видом *Listeria innocua* та патогенним видом *Listeria monocytogenes*. Колонії *L. innocua* характеризуються синьо-зеленим забарвленням без додаткового ореолу, тоді як колонії *L. monocytogenes* оточені непрозорою білуватою зоною (ореолом), що пов'язано з активністю фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази С (PI-PLC), яка є одним із факторів патогенності даного виду.

Отримані морфологічні ознаки на середовищі Ottaviani and Agosti дозволяють ефективно відрізнити патогенні штами *L. monocytogenes* від інших представників роду *Listeria* та є важливим етапом лабораторної ідентифікації збудника.

Колонії лістерії на білому або прозорому фоні середовища (CHROMagar™) мали ідентичний до Ottaviani and Agosti вигляд: непатогенні колонії зелено-блакитні без ореола; патогенні колонії – такі самі, але з білим оточенням (рис. 5).



Рис. 5. Диференціація колоній бактерій роду *Listeria* на хромогенному середовищі CHROMagar™

На чашці Петрі спостерігаються типові колонії *Listeria monocytogenes*, оточені білуватими непрозорими зонами (ореолами), які утворюються внаслідок активності фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази С (PI-PLC) – одного з факторів патогенності цього виду.

Таким чином, використання середовища CHROMagar™ забезпечує ефективну диференціацію патогенних штамів *L. monocytogenes* від

непатогенних представників роду *Listeria*, що є важливим етапом лабораторної діагностики лістеріозу та контролю безпечності харчових продуктів.

На середовищі RAPID'L.mono™ колонії *L. Monocytogenes* та *L. Ivanovii* проросли темно-зеленим кольором, який був яскраво вираженим на червоному фоні самого агару. Діаметр колоній становив 1-3 мм. Інші непатогенні види лістерій проросли переважно по 1-2 мм та мали біле гладке забарвлення (рис. 6).

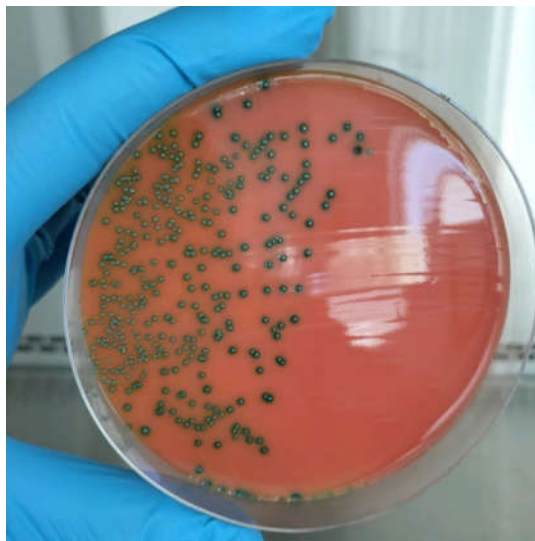


Рис. 6. Морфологія та культурні властивості колоній *Listeria monocytogenes* на селективно-хромогенному щільному поживному середовищі RAPID'L.mono™

Візуальний аналіз чашки Петрі свідчить про виражений ріст ізольованих колоній специфічного синьо-зеленого (бірюзового) забарвлення, що є результатом ферментативного розщеплення хромогенного субстрату середовища під дією специфічного ферменту (пі-ПЛР – фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази С), притаманного патогенним представникам роду *Listeria*. Наявність чіткого забарвлення за відсутності маніт-позитивного фону підтверджує високу селективність і діагностичну точність використаної тест-системи, що дозволяє проводити пряму ідентифікацію патогена та диференціювати *L. monocytogenes* від супутньої мікрофлори безпосередньо на етапі первинного посіву.

На середовищі Chromogenic Plating Medium (R&F®) колонії *L. Monocytogenes* та *L. Ivanovii* проросли по 1-3 мм діаметром та мали синьо-фіолетове забарвлення з невеликим блакитнуватим ореолом. Інші види лістерії та супутня мікрофлора проросли більш дрібними колоніями рожевого кольору, ореол у них був відсутній (рис. 7).



Рис. 7. Диференціація патогенного виду *Listeria monocytogenes* на Chromogenic Plating Medium (R&F®)

На представленому малюнку продемонстровано фенотипову диференціацію та культуральні відмінності між різними видами лістерій на щільному хромогенному середовищі. Хромогенна субстанція (5-бромо-4-хлоро-3-індоліл-beta-D-глюкопіранозид) під дією ферменту beta-глюкозидази, спільного для всього роду *Listeria*, забарвлює колонії як патогенних, так і непатогенних видів у характерний синьо-зелений колір.

Основним критерієм диференціації патогенного виду *Listeria monocytogenes* є наявність чітко вираженого непрозорого білого ореолу (преципітату) навколо синьо-зелених колоній, що зумовлено специфічною ферментативною активністю фосфатиділінозитол-специфічної фосфоліпази С (PI-PLC) та ліпази патогена, які розщеплюють лецитин у складі середовища. На відміну від них, колонії супутніх непатогенних видів (*Listeria spp.*) візуалізуються виключно у вигляді дрібніших синьо-зелених або рожеватих

колоній без зон просвітлення чи ореолу, що підтверджує високу роздільну здатність методу хромогенного платування для експрес-ідентифікації патогена.

Проведені бактеріологічні дослідження із застосуванням селективних середовищ Half Fraser broth, Fraser broth, Oxford agar, PALCAM agar, Ottaviani and Agosti (ALOA), RAPID'L.mono™ та Chromogenic Plating Medium (R&F®) підтвердили їх високу ефективність для виділення. На етапах збагачення у середовищах Half Fraser та Fraser broth спостерігалось характерне потемніння середовища, що свідчило про можливе наявність лістерій. Далі культивування на селективно-диференційних середовищах дозволило отримати типові культуральні ознаки досліджуваних мікроорганізмів, зокрема утворення характерних колоній із зонами потемніння внаслідок гідролізу ескуліну на Oxford agar та PALCAM agar.

Використання хромогенних середовищ Ottaviani and Agosti (ALOA), RAPID'L.mono™ та Chromogenic Plating Medium (R&F®) забезпечило надійну диференціацію патогенних видів *Listeria monocytogenes* та *Listeria ivanovii* від непатогенних представників роду завдяки виявленню специфічної фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази С (PI-PLC). Отримані результати підтверджують доцільність комплексного використання селективних та хромогенних питних середовищ для швидкої, чутливої та достовірної лабораторної ідентифікації бактерій роду *Listeria* у харчовій сировині та продуктах харчування.

3.3. Біохімічна та імунологічна ідентифікація бактерій роду *Listeria*

Отримання типових колоній на селективних та диференційно-діагностичних поживних середовищах не є достатнім для остаточного підтвердження видової належності мікроорганізмів. У зв'язку з цим наступним етапом дослідження є проведення комплексу методів, спрямованих на ідентифікацію виділених культур.

В якості додаткових підтверджувальних методів ідентифікації видів лістерій застосовують біохімічні тести, гемоліз тощо. Найбільш ефективними методами підтвердження родової та видової приналежності *Listeria* є: імунологічний тест латекс-аглотинація; гемолітична активність бактерій та САМР-тест.

В ході проведеної латекс-аглотинації встановлено, що в модельних зразках згідно matrix spike спостерігалася швидке утворення чітко сформованих білих пластівців (аглотинату) протягом 40–60 секунд, яке супроводжувалося одночасним посвітлінням рідини в оточенні аглотинату на темному фоні тест-картки. Це свідчило про специфічну імунологічну взаємодію моноклональних антитіл, імобілізованих на латексних частинках, із соматичними антигенами клітинної стінки бактерій і наявність представників роду *Listeria* в зразках продуктів харчування, що були штучно контаміновані в межах методологічного моделювання. У лунці негативного контролю (NC) суспензія залишалася гомогенною (однорідною), що підтверджує специфічність реакції та відсутність автоаглотинації (хибнопозитивного результату) реагенту».

При візуалізації отриманого результату серологічної ідентифікації методом латекс-аглотинації на предметних скельцях спостерігаються чітко відмінні ознаки (рис. 8). Так, у контрольному зразку з негативним результатом (скельце А – NC) – суспензія зберігала повну оптичну гомогенність, тобто однорідність та мала молочно-білий колір без будь-яких ознак утворення конгломератів, випадання осаду чи агрегації частинок. Це свідчить про стабільність реагенту та відсутність явища автоаглотинації тобто хибного позитивного результату.

В контрольному зразку з позитивним результатом (скельце В – PC) спостерігалася чітка зміна дисперсності системи з переходом у гетерогенний неоднорідний стан. Візуалізувалася дрібнопластівцева зерниста аглотинація, що свідчить про успішне проходження специфічної реакції між референтним антигеном та імобілізованими антитілами. У дослідному зразку (скельце С)

зафіксовано виражену крупнопластівцеву аглютинацію. Реакція супроводжувалася повним розпадом суспензії на чітко сформовані великі білі конгломерати у вигляді пластівців та повним просвітленням і навколишньої рідини.

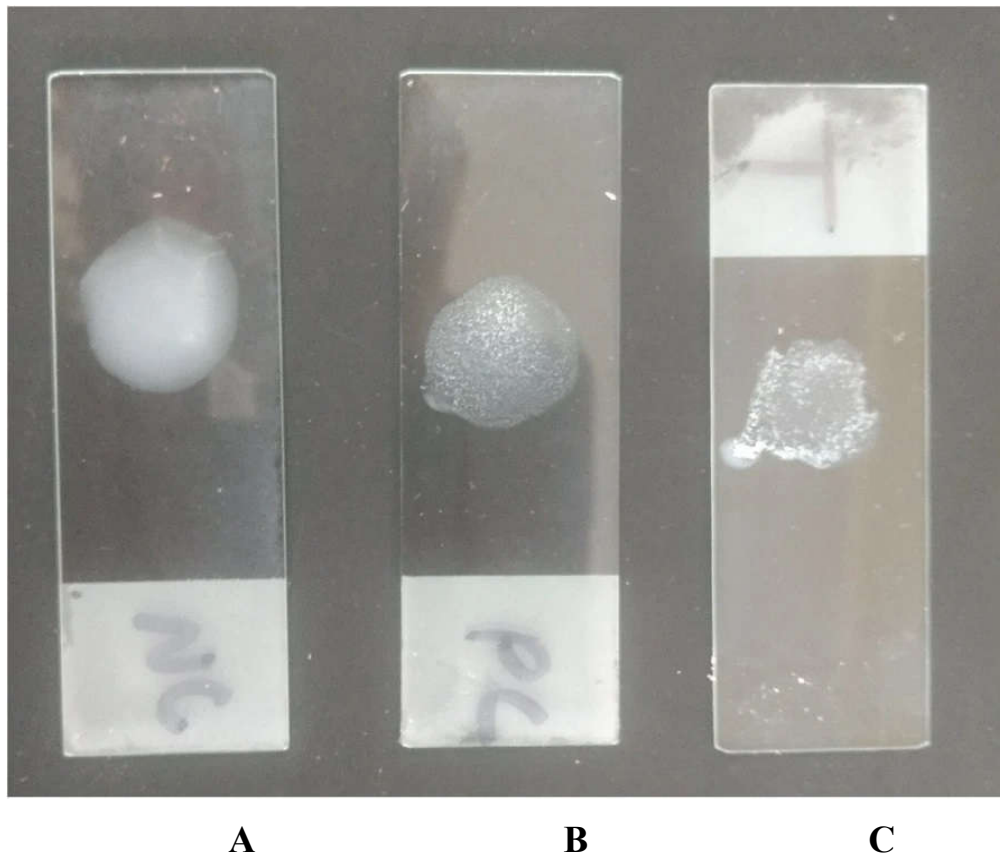


Рис. 8. Імунологічний тест латекс-аглютинація

Через механічне погойдування скельця пластівці змістилися до периферії краплі, утворюючи щільний контур, що є стандартною ознакою абсолютно позитивної реакції і свідчить про високий ступінь аглютинації або триплюсової аглютинації.

Таким чином, проведення реакції латекс-аглютинації дозволило підтвердити наявність бактерій роду *Listeria* у дослідних зразках. Утворення чітких пластівців аглютинату та просвітлення суспензії свідчили про специфічну взаємодію антигенів бактерій з антитілами латексного реагенту. Відсутність аглютинації у негативному контролі підтвердила специфічність і достовірність отриманих результатів.

Наступним етапом ідентифікації виділених ізолятів було дослідження їхньої гемолітичної активності, яка є основною фенотиповою або візуальною ознакою патогенних представників роду *Listeria*. Метод полягає у взаємодії специфічного та притаманного саме *L. monocytogenes* ферменту лістеріолізину О з холестерином у мембранах еритроцитів крові. Культивування здійснювали шляхом штрихового посіву на Columbia агар (панкреатичний гідролізат казеїну, пептичний гідролізат тваринних тканин – білок м'яса, ензиматичний гідролізат серця свині) з додаванням 5% дефібринованої крові барана. Крім того, визначення здатності бактерій викликати β -гемоліз еритроцитів є важливим діагностичним критерієм, що дозволяє відрізнити патогенні види, зокрема *L. monocytogenes*, від непатогенних представників роду (табл. 5).

Таблиця 5

Гемолітична здатність різних видів *Listeria*

Вид <i>Listeria</i>	Гемолітична активність бактерій (β -гемоліз)
<i>L. monocytogenes</i>	+
<i>L. ivanovii</i>	+
<i>L. innocua</i>	-
Інші види <i>Listeria</i>	-

Так, дані таблиці свідчать про наявність суттєвих відмінностей у гемолітичній активності між різними видами бактерій роду *Listeria*. Встановлено, що *L. monocytogenes* та *L. ivanovii* проявляють β -гемолітичну активність, що характеризується повним руйнуванням еритроцитів навколо колоній на кров'яному агарі. Така властивість пов'язана з продукцією гемолізинів і є однією з ознак патогенності цих видів.

Натомість *L. innocua* та інші представники роду *Listeria* не виявляли гемолітичної активності, про що свідчила відсутність зон гемолізу навколо колоній. Отримані результати підтверджують доцільність використання тесту

на β -гемоліз як додаткового критерію для диференціації патогенних та непатогенних видів лістерій і підтвердження видової належності ізольованих культур.

При візуальному аналізі чашок Петрі (рис. 9) встановлено, що бактерії виду *L. monocytogenes* утворювали дрібні гладкі колонії діаметром 1,0–1,5 мм, мали правильну округлу форму та сірувато-біле забарвлення з рівними краями.



*Рис. 9. β -гемоліз *L. monocytogenes* на кров'яному агарі*

Навколо зон активного росту та окремих колоній були помічені вузькі але чіткі зони повного прозорого β -гемолізу (тотального руйнування клітин крові), що свідчить про взаємодію молекул лістеріолізину О з холестерином крові, розривом еритроцитів та наявністю патогенного представника роду *Listeria* – *L. monocytogenes* в зразку. Отримані результати свідчать про те, що виділена культура належить до патогенного виду *Listeria monocytogenes*. Утворення дрібних сірувато-білих колоній із характерними вузькими зонами β -гемолізу навколо них є важливою діагностичною ознакою цього виду.

Для додаткового підтвердження видової належності ізольованих культур *Listeria* було проведено САМР-тест, який ґрунтується на оцінці синергічної гемолітичної взаємодії лістерій із тест-штамами *Staphylococcus aureus* та *Rhodococcus equi*. Метод дозволяє диференціювати окремі види роду *Listeria* за характером посилення гемолізу та є важливим етапом фенотипової

ідентифікації бактерій. Під час аналізу отриманих експериментальних даних постановки САМР-тесту, в ході дослідження було виявлено чіткий розподіл між тестованими штамми за характером їхньої спільної взаємодії з об'єднаними культурами за фенотиповим профілем.

Так, при візуальній оцінці зони перетину штрихів було виявлено, що дослідний ізолят *L. monocytogenes* (позначений на склі чаші Петрі як "Probe") формує виражену локальну зону повного лізису еритроцитів виключно у місці проникнення зовнішніх метаболітів *Staphylococcus aureus* – А. Утворення цього специфічного світлого прозорого ореолу, що має характерну топографічну форму "наконечника стріли" (*arrowhead*), свідчить про наявність вираженого синергізму між β -лізином стафілокока та позаклітинним лістеріолізином О, який секретується досліджуваною культурою – А₁ (рис. 10).

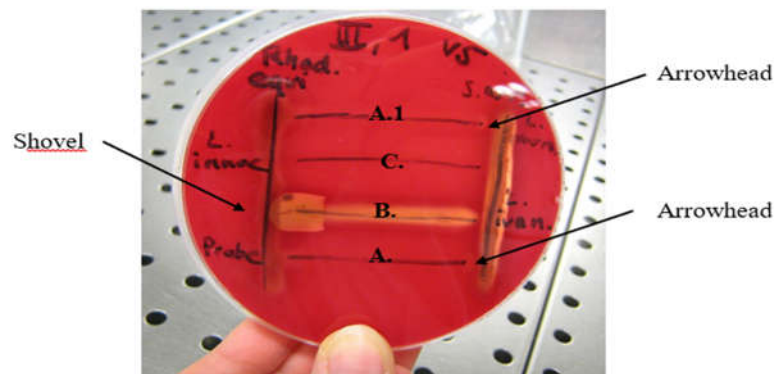


Рис. 10. Порівняння взаємодії різних видів лістерії зі *Staphylococcus aureus* та *Rhodococcus equi*

Водночас було виявлено, що у зоні паралельного росту ізоляту "Probe" із *Rhodococcus equi* будь-які ознаки посилення гемолітичної активності повністю відсутні, а лінія посіву залишається незмінною. Оскільки, відповідно до ідентифікаційних критеріїв, здатність до синергічного гемолізу виключно зі стафілококом на тлі повної САМР-негативності з родококом є чітко детермінованою видовою ознакою, це свідчить про належність аналізованого зразка до патогенного виду *Listeria monocytogenes*.

Додатковим підтвердженням достовірності проведеного експерименту є характер росту контрольних штамів. У ході аналізу було виявлено, що

референтна культура *L. ivanovii* очікувано проявила гіперпродукцію гемолізинів у формі розлогої зони лізису «shovel» (ефект "лопати") саме на межі з *R. Equi* – В, тоді як штам *L. innocua* залишився повністю інертним – С.

Диференційно-діагностичні критерії видової ідентифікації лістерій за характером синергічного гемолізу показали, що лише *L. monocytogenes* проявляє характерний синергізм із *Staphylococcus aureus*, утворюючи зону посиленого гемолізу у формі «наконечника стріли» (Arrowhead), що є типовою діагностичною ознакою даного виду (табл. 6).

Таблиця 6

Диференційно-діагностичні критерії видової ідентифікації лістерій за характером синергічного гемолізу (САМР-тест).

Синергія мікроорганізмів	Результат взаємодії
<i>L. innocua</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	Не взаємодіють – результат тесту негативний
<i>L. ivanovii</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	Не взаємодіють – результат тесту негативний
<i>L. monocytogenes</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	Гемоліз проявляється у вигляді «Наконечника стріли» (Arrowhead)
<i>L. innocua</i> + <i>Rhodococcus equi</i>	Не взаємодіють – результат тесту негативний
<i>L. ivanovii</i> + <i>Rhodococcus equi</i>	Гемоліз проявляється у вигляді «Лопати» (Shovel)
<i>L. monocytogenes</i> + <i>Rhodococcus equi</i>	Не взаємодіють – результат тесту негативний

Водночас *L. ivanovii* не взаємодіє зі *Staphylococcus aureus*, проте демонструє виражений синергізм із *Rhodococcus equi*, який проявляється у вигляді характерної зони гемолізу форми «лопати» (Shovel). Для *L. innocua* синергічна гемолітична активність з обома тест-штамами відсутня, що підтверджує її непатогенний характер. Отримані результати свідчать про високу діагностичну цінність САМР-тесту та його придатність для швидкої ідентифікації та диференціації найбільш поширених видів лістерій.

Таким чином, результати CAMP-тесту підтвердили високу діагностичну цінність методу для видової диференціації бактерій роду *Listeria*. Виявлення характерної зони посиленого гемолізу у формі «наконечника стріли» при взаємодії досліджуваного ізоляту зі *Staphylococcus aureus* та відсутність синергізму з *Rhodococcus equi* дозволили ідентифікувати культуру як *Listeria monocytogenes*. Отримані дані в поєднанні з результатами культуральних, серологічних та гемолітичних досліджень забезпечили надійне підтвердження видової належності ізоляту та завершили етап його фенотипової ідентифікації.

3.4. Технологічна частина та розрахунок матеріалів для процесу виділення

Технологічний процес лабораторного виділення, диференціації та остаточної верифікації бактерій роду *Listeria* (зокрема патогенного виду *Listeria monocytogenes*) є чітко регламентованою послідовністю етапів, що базується на принципах вибіркового біохімічного тиску на супутню мікрофлору харчових матриксів. З огляду на специфіку дослідження, оцінка аналітичної надійності представленої біотехнологічної системи ідентифікації виконувалася на прикладі 4 модельних зразків харчової продукції різного походження з паралельним порівняльним аналізом чотирьох хромогенних щільних середовищ.

3.4.1. Організація технологічного процесу та підготовка систем

Оскільки робота проводиться з патогенним мікроорганізмом *Listeria monocytogenes* (III–IV групи патогенності), біотехнологічний процес ідентифікації вимагає суворого дотримання режиму ізоляції та стерильності на рівні лабораторій BSL-2.

При підготовці лабораторних приміщень, перед початком кожної робочої зміни, проводиться вологе прибирання поверхонь із використанням

сучасних дезінфектантів (наприклад, розчинів на основі четвертинних амонієвих сполук або хлорактивних речовин, що мають бактерицидну дію щодо лістерій, порушуючи їх біоплівки). Робочі столи ламінарних шаф обробляються 70% розчином етилового спирту. Після обробки хімічними засобами проводиться ультрафіолетове опромінення камери протягом 45 хвилин для забезпечення асептичних умов інокуляції. Раз на тиждень здійснюється повна генеральна дезінфекція боксів біобезпеки.

Підготовка повітряного середовища виконується для запобігання контамінації навколишнього середовища та захисту персоналу. Повітря в зоні маніпуляцій з живими культурами проходить триступеневу підготовку. Стерилізація повітряного потоку в ламінар-боксах забезпечується пропусканням через НЕРА-фільтри класу Н14 (ефективність затримання часток і клітин бактерій становить 99,995%). Додатково після завершення прибирання та в нічний час у приміщеннях вмикаються екрановані та відкриті бактерицидні ультрафіолетові опромінювачі (УФ-лампи) з розрахунку 1,5–2,5 Вт на 1 м³ об'єму приміщення, час експозиції – 45–60 хвилин. Підготовка інструментів та обладнання включає наступні етапи:

- перед початком робіт скляний посуд (колби, пробірки) та металевий інструментарій піддаються миттю, висушуванню та стерилізації сухою парою у повітряній стерилізаційній шафі (сухожарі) за температури 180° С протягом 60 хвилин. Металеві інструменти загортаються в спеціальні паперові пакети з термоіндикатором, котрий змінює колір при нагріванні;
- термічна стерилізація. Поживні середовища, хімічний посуд та металеві інструменти проходять автоклавування у парових стерилізаторах (автоклавах) при температурі 121 °С (тиск 0,11 МПа) протягом 15–20 хвилин;
- лабораторні багаторазові петлі та голки стерилізують безпосередньо перед маніпуляцією шляхом прожарювання у полум'ї пальника;
- для перевірки якості обробки та підготовки інструментарію, посуду та робочих поверхонь можна проводити азопірамову пробу за допомогою реактиву «Азопірам» в поєднанні з розчином перекису водню 3%.

Розчин наноситься на ватний диск, котрим протирається поверхня (робочі поверхні, поверхні інструментів, посуду, обладнання). Утворення фіолетового кольору розчині при протиранні свідчить про наявність на поверхні сліди крові, червоного або бурого – іржі, рожевого – поверхнево-активних речовин та залишків мийних засобів. Відсутність утворення забарвлення на спонжі свідчить про чистоту поверхонь та їх якісну обробку. При утворенні забарвлень і позитивному результаті проби, посуд, інструменти, робочі поверхні підлягають повторній обробці, миттю та ополіскуванню;

- дробна стерилізація проводиться для речовин нестійких до нагрівання. Термолабільні компоненти (наприклад, селективні добавки антибіотиків чи хромогенні субстрати) стерилізують методом мембранної фільтрації через шприцеві фільтри з діаметром пор 0,22 мкм.

- до роботи допускаються особи, які пройшли інструктаж із правил техніки безпеки в мікробіологічних лабораторіях. Персонал забезпечується засобами індивідуального захисту (ЗІЗ): хірургічними халатами, шапочками, захисними окулярами або щитками та одноразовими нітриловими рукавичками. Усі маніпуляції з відкритими культурами лістерій (піпетування, посів, струшування) виконуються виключно всередині боксів біологічної безпеки II класу (ламінари бокси), що унеможлиблює утворення шкідливих аерозолів. Персонал лабораторії також проходить етап спеціальної обробки рук антисептиком перед виконанням дослідження та по його завершення. Під час виконання маніпуляцій з мікроорганізмами на робочих столах поруч з персоналом запалюються спиртові лампи (спиртівки).

3.4.2. Технологічна блок-схема процесу селективного виділення та біохімічної ідентифікації *Listeria monocytogenes* у продуктах харчування

Для забезпечення високої точності аналізу та контролю метаболітів цільового патогену, біотехнологічний процес ідентифікації побудовано за чіткою стадійною схемою, яка включає підготовчі операції, етапи

селективного накопичення біомаси та фінальну фізіолого-біохімічну диференціацію (додаток А).

Представлений алгоритм верифікації та ідентифікації *Listeria monocytogenes* описано відповідно до вимог ДСТУ EN ISO 11290 та реалізовано у чотири послідовні стадії:

Стадія 1 (Підготовка та гомогенізація): відбір аналітичної наважки зразка (25 г), об'єднання з рідким середовищем *Half-Fraser* (225 мл) та механічна дезінтеграція у приладі *BagMixer* протягом 1–2 хвилин.

Стадія 2 (Селективне збагачення): двоетапне накопичення цільової мікрофлори, що включає первинне інкубування у бульйоні *Half-Fraser* (30–35 °С, 24 год.) та вторинне селективне збагачення шляхом пересіву 0,1 мл культури в бульйон *Fraser* (35–37 °С, 24 год.).

Стадія 3 (Селективно-диференційне виділення): паралельний посів штрихом на щільні класичні (*Oxford, PALCAM*) та хромогенних агарі (*R&F®*, *ALOA, CHROMagar™*) з інкубацією за 37 °С протягом 24–48 годин для візуального скринінгу специфічних метаболітів (розщеплення ескуліну та експресії фосфоліпази).

Стадія 4 (Остаточна ідентифікація): комплексне підтвердження приналежності ізолятів до виду *L. monocytogenes* за допомогою експрес-тесту латекс-аглютинації, оцінки спроможності до β -гемолізу на кров'яному агарі та постановки диференційного CAMP-тесту із визначенням синергічного ефекту у вигляді "стріли" поруч із *S. Aureus*.

3.4.3. Специфікація та рецептурний склад поживних середовищ

Для забезпечення життєдіяльності та накопичення біомаси цільового мікроорганізму на кожному етапі технологічного ланцюга готували специфічні рідкі та щільні середовища відповідно до вимог регламенту ДСТУ EN ISO 11290-1:

- селективний бульйон Half Fraser (напівконцентрований). Використовується для первинного відновлення сублетально ушкоджених клітин лістерій. Склад (г/л дистильованої води): ферментативний гідролізат м'ясного білка – 5,0; гідролізат казеїну – 5,0; дріжджовий екстракт – 5,0; хлорид натрію – 20,0; гідрофосфат натрію – 12,0; дигідрофосфат калію – 1,35; ескулін – 1,0; хлорид літію – 3,0. Після автоклавування асептично додавали селективні добавки: акрифлавін (0,0125 г/л), налідиксову кислоту (0,01 г/л) та цитрат заліза-амонію (0,5 г/л);

- селективний бульйон Fraser (повний). Застосовується для вторинного селективного накопичення. Має ідентичну базову основу, проте концентрація селективного агента акрифлавіну збільшена вдвічі (0,025 г/л), налідиксової кислоти – до 0,02 г/л для жорсткого пригнічення ентерококів та стафілококів;

- селективні диференційні агари (*Oxford* та *PALCAM*). Щільні ескулінові середовища. Гідроліз ескуліну під дією ферменту β -глюкозидази лістерій призводить до утворення 6,7-дигідроксикумарину, який реагує з іонами заліза (Fe^{3+}), забарвлюючи колонії та ореол навколо них у чорно-коричневий колір;

- хромогенні діагностичні платформи. Використовували 4 комерційні бренди для диференціації *L. monocytogenes* за рахунок виявлення маркерних ферментів (визначення активності специфічної фосфоліпази C, що руйнує фосфатиділінозитол середовища з утворенням зони преципітації / гало-ефекту навколо колоній): *Ottaviani and Agosti agar (ALOA)*; *CHROMagar™ Listeria*; *Rapid'L.Mono Agar*; *Chromogenic Plating Medium (CPM)*.

3.4.4. Розрахунок матеріальних витрат та балансу середовищ на аналітичну серію досліджень

Експериментальна частина моделювалася на основі дослідження 4 комплексних зразків (матриксів) харчової сировини. Кожен зразок масою 25 г піддавався індивідуальному циклу аналізу з використанням паралельних тест-систем підтвердження (додаток Б).

Розрахунок потреби у сухих речовинах, дистильованій воді та одноразовому лабораторному пластику виконано у суворій відповідності до офіційних інструкцій та специфікацій провідних світових виробників дегідратованих поживних середовищ (HiMedia Laboratories, Merck KGaA та Oxoid), що регламентують точну масу сухого залишку на один літр дистильованої води для кожної конкретної марки середовища

Матеріальний баланс процесу прораховано з урахуванням нормативного коефіцієнта технологічних втрат (при зважуванні, випаровуванні під час автоклавування та залишках на стінках лабораторного посуду при розливі) $K = 1,05$ (5% похибки).

Базовою інженерною формулою для визначення необхідної маси сухої речовини поживного середовища є рівняння матеріального балансу:

$$M_{\text{сух}} = V_{\text{заг}} \times C_{\text{конц}} \times k_{\text{втрат}} \quad (1)$$

де $M_{\text{сух}}$ – необхідна маса сухого порошку поживного середовища або добавки, г;

$V_{\text{заг}}$ – загальний робочий об'єм готового рідкого або щільного середовища, дм^3 ;

$C_{\text{конц}}$ – концентрація сухої речовини для приготування 1 дм^3 середовища згідно з інструкцією виробника, $\text{г}/\text{дм}^3$;

$K_{\text{втрат}}$ – коефіцієнт технологічних втрат (приймається рівним 1,05, що враховує 5% незворотних втрат при стерилізації та розливі).

Загальний об'єм середовища ($V_{\text{заг}}$, дм^3) розраховували за формулою:

$$V_{\text{заг}} = N_{\text{проб}} \times v_{\text{норм}} \times n_{\text{повтор}} \quad (2)$$

де $N_{\text{проб}}$ – кількість досліджуваних зразків у серії;

$v_{\text{норм}}$ – норма витрати готового середовища на одну пробу (або одну чашку Петрі), дм^3 ;

$n_{\text{повтор}}$ – кількість повторностей (дублікатів) для одного зразка.

Розрахунок для середовищ первинного та вторинного селективного збагачення (бульйони)

Бульйон *Half-Fraser* (Стадія первинного збагачення, v норм = 0,225 дм³, n повтор = 1):

Загальний об'єм рідкого середовища:

$$V_{\text{заг}} = 4 \times 0,225 \times 1 = 0,90 \text{ дм}^3$$

При заводській концентрації порошку 57,5 г/дм³, маса сухої речовини становить:

$$M_{\text{сух}} = 0,90 \times 57,5 \times 1,05 = 54,34 \text{ г}$$

Бульйон Fraser (Стадія вторинного збагачення, v норм = 0,010 дм³ (10 мл у пробірку), n повтор = 1):

Загальний об'єм середовища:

$$V_{\text{заг}} = 4 \times 0,010 \times 1 = 0,04 \text{ дм}^3$$

При концентрації порошку 54,0 г/дм³, маса сухої речовини становить:

$$M_{\text{сух}} = 0,04 \times 54,0 \times 1,05 = 2,27 \text{ г}$$

Розрахунок для класичних селективних щільних середовищ (агари)

Для забезпечення вірогідності аналізу висів на щільні середовища проводиться у двох повторностях (дублікатах, n повтор = 2), норма розливу в одну чашку Петрі становить 20 мл (0,020 дм³). Таким чином, загальний об'єм для кожного виду агару становить:

$$V_{\text{заг}} = 4 \times 0,020 \times 2 = 0,16 \text{ дм}^3$$

Oxford Agar (С конц = 55,5 г/дм³):

$$M_{\text{сух}} = 0,16 \times 55,5 \times 1,05 = 9,32 \text{ г}$$

PALCAM Agar (С конц = 69,0 г/дм³):

$$M_{\text{сух}} = 0,16 \times 69,0 \times 1,05 = 11,59 \text{ г}$$

Розрахунок для сучасних хромогенних диференційно-діагностичних середовищ

Параметри розливу аналогічні класичним агарам (V заг = 0,16 дм³).

ALOA Agar (С конц = 70,5 г/дм³):

$$M_{\text{сух}} = 0,16 \times 70,5 \times 1,05 = 11,84 \text{ г}$$

CHROMagar™ Listeria (С конц = 68,2 г/дм³):

$$M_{\text{сух}} = 0,16 \times 68,2 \times 1,05 = 11,46 \text{ г}$$

*RAPID'L.mono*TM (С конц = 72,0 г/дм³):

$$M_{\text{сух}} = 0,16 \times 72,0 \times 1,05 = 12,10 \text{ г}$$

Chromogenic Plating Medium (R&F®) (С конц = 70,0 г/дм³):

$$M_{\text{сух}} = 0,16 \times 70,0 \times 1,05 = 11,76 \text{ г}$$

Розрахунок для діагностичного кров'яного агару (САМР-тест)

Для проведення САМР-тесту та визначення гемолітичних властивостей 4 ізолятів використовують 4 чашки Петрі

$$V_{\text{заг}} = 4 \times 0,020 = 0,08 \text{ дм}^3$$

Поживний агар (основа, С конц = 40,0 г/дм³):

$$M_{\text{сух}} = 0,08 \times 40,0 \times 1,05 = 3,36 \text{ г}$$

Стерильна дефібринована кров барана (додається у кількості 5% від об'єму основи):

$$V_{\text{крові}} = V_{\text{заг}} \times 0,05 \times k_{\text{втрат}} \quad (3)$$

$$V_{\text{крові}} = 0,08 \times 0,05 \times 1,05 = 0,0042 \text{ дм}^3 = 4,2 \text{ мл}$$

Режим стерилізації. Приготовані розчини та базові бульйони розливали у флакони та піддавали температурній деконтамінації в автоматичному паровому автоклаві за температури 121 °С та тиску 1,1 атм протягом 15 хвилин.

Асептичне введення термолабільних компонентів: Селективні добавки (антибіотики, індикатори) та специфічні субстрати (включаючи дефібриновану кров для тесту на β-гемоліз та добавки для хромогенів) вносили у стерильні основи після їх примусового охолодження на водяній бані до температури 47 °С. Це запобігало термічній деструкції біологічно активних речовин.

Технологія розливу та зберігання. Готові розплавлені агари дозовано (по 20 мл) розподіляли у стерильні пластикові чашки Петрі в зоні ламінарного потоку повітря. Після застигання та підсушування чашки маркували, герметично пакували та переносили у рефрижератор для зберігання за температури 4 °С. Термін зберігання готових систем до моменту постановки Spike-тесту не перевищував 10 діб.

Таким чином, сформований розрахунок потреби в поживних середовищах та їхніх компонентах дозволяє суттєво оптимізувати та спростити етап попередньої лабораторної підготовки. Висока точність підбору дозування кожної речовини та розрахунок аналітичних наважок забезпечують суворе дотримання умов культивування на кожному етапі дослідження. Це, у свою чергу, мінімізує ризик виникнення похибок та гарантує високу точність, відтворюваність і достовірність фінальних результатів ідентифікації *Listeria monocytogenes*. Отримані матричні розрахунки слугують надійною базою для виконання експериментальної частини роботи, покроково описаної в попередніх підрозділах.

3.4.5. Технологічний регламент приготування та контролю якості середовищ

Гідратація та термічна обробка. Наважки сухих порошоків середовищ *Half Fraser*, *Fraser*, *Oxford* та *PALCAM* суспензують у вимірних об'ємах дистильованої води кімнатної температури. Суміш ретельно перемішують на магнітній мішалці та підігрівають до кипіння для повного розплавлення агарового гелю.

Режим стерилізації. Приготовані розчини та базові бульйони розливають у флакони та піддають температурній деконтамінації в автоматичному паровому автоклаві за температури 121 °C та тиску 1,1 атм протягом 15 хвилин.

Асептичне введення термолабільних компонентів. Селективні добавки (антибіотики, індикатори) та специфічні субстрати (включаючи дефібриновану кров для тесту на β -гемоліз та добавки для хромогенів) вносять у стерильні основи після їх примусового охолодження на водяній бані до температури 47 °C. Це запобігає термічній деструкції біологічно активних речовин.

Технологія розливу та зберігання. Готові розплавлені агари дозовано (по 20 мл) розподіляються у стерильні пластикові чашки Петрі в зоні ламінарного

поток повітря. Після застигання та підсушування чашки маркують, герметично пакують та переносять у рефрижератор для зберігання за температури 4 °С. Термін зберігання готових систем до моменту постановки Spike-тесту не перевищував 10 діб.

Узагальнюючи, даний регламент приготування та контролю якості поживних середовищ забезпечує суворе дотримання умов асептики та збереження біологічної активності їхніх компонентів. Стандартизація процесів гідратації, автоклавування та регламентованого введення термолабільних селективних добавок при 47 °С гарантує високу мікробіологічну стабільність і цільову чутливість готових систем. Представлений покроковий алгоритм є критично важливим для мінімізації ризиків контамінації сторонньою мікрофлорою та забезпечує максимальну відтворюваність результатів під час подальшого проведення Spike-тестів та верифікації аналітичних методів.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці грає важливу роль в процесі людської трудової діяльності. Ця система направлена на запобігання та профілактику шкідливого впливу, травм, аварій та нещасних випадків в процесі виробництва, а також створення безпечних та комфортних умов на місцях роботи. Дотримання системи охорони праці забезпечує оптимальний та ефективний процес праці, що призводить до отримання максимально достовірного результату досліджень. Дана система включає:

- навчання робітників та стажування;
- інструктажі з техніки безпеки (вступний, первинний, повторний, позаплановий, цільовий);
- проходження інструктажів стосовно послідовності дій при виникненні аварійних ситуацій (наприклад, при розливі суспензії патогену);
- ознайомлення працівників з новітніми технологіями, тенденціями та специфікою відповідно до конкретного місця роботи;
- страхування та відшкодування травм та нещасних випадків;
- регулярне проходження медичних оглядів та діагностики професійних захворювань.

Система охорони праці в лабораторії регламентована Законом України «Про охорону праці» [34] та ДСТУ EN ISO 7010:2019 [35]. Закон України «Про охорону праці» регламентує вимоги стосовно нешкідливої та безпечної трудової діяльності, запобіжні заходи проти травматизму і професійних захворювань, окреслює права та обов'язки роботодавця й працівника. Стандарт ДСТУ EN ISO 7010:2019 встановлює вимоги до графічних позначень та відповідних кольорів безпеки, котрі призначені для того, щоб попереджати працівників про небезпеку, перешкоди, обов'язкові дії та евакуаційні шляхи.

В будь-якому закладі чи установі є своя специфіка відносно охорони праці та правил безпеки. Мікробіологічні лабораторії не є виключенням.

Лабораторії поділяються на різні типи за рівнем біологічної безпеки від BSL-1 до BSL-4. Об'єкт нашого аналітичного дослідження – *Listeria monocytogenes* – згідно з українськими санітарними правилами належить до II групи патогенності (за міжнародною класифікацією – рівень біобезпеки BSL-2). Це вимагає суворого дотримання режиму роботи з мікроорганізмами II-IV груп патогенності.

До стандартних правил поведінки в лабораторії BSL-2 належать:

- дотримання правил безпеки та внутрішнього розпорядку, прописаних в конкретній лабораторії;
- обов'язкове використання засобів індивідуального захисту (ЗІЗ): медичні халати, одноразові рукавички, захисні окуляри та маски/респіратори (останні є обов'язковими при зважуванні сухих порошків селективних агарів Oxford та PALCAM для запобігання інгаляційного впливу сухого пилу середовищ на носоглотку оператора);
- дотримання дрес-коду. Перед роботою одягати змінний одяг (медичний халат та спеціальне закрите взуття на зразок кроксів). Довге волосся має бути зібраним в пучок та схованим під шапочку. Нігті повинні бути чистими та коротко підстриженими, без гострих країв, щоб уникнути проколу захисних рукавичок. Наявність кілець, браслетів та годинників під час маніпуляцій з культурами заборонена;
- вживання їжі та напоїв лише в спеціально відведеній кімнаті (кухні). Категорично заборонено тримати харчові продукти в робочих зонах або в холодильниках для зберігання зразків та референс-штамів;
- суворе дотримання затверджених ДСТУ та ISO методик, контроль справності обладнання (автоклавів, термостатів, ламінарних шаф) перед експлуатацією.

Миколаївська регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби, в котрій проводилися дослідження, суворо дотримується системи охорони праці та правил біобезпеки. Оскільки установа проводить моніторинг харчової продукції на наявність збудників небезпечних

інфекцій (включаючи лістеріоз), її відділи організовані за принципом поділу на «чисту» та «заразну» зони, що повністю відповідає вимогам до лабораторій BSL-2.

Запобіжні заходи при роботі з лістеріями в умовах лабораторії включають:

- робота в ламінарних боксах. Усі маніпуляції, пов'язані з ризиком утворення аерозолів (перенесення культури з бульйону Half-Fraser у Fraser, висів штрихом на чашки Петрі з агаром Oxford, PALCAM та хромогенними середовищами), проводяться виключно в боксах біологічної безпеки II класу. Це захищає персонал від випадкового вдихання збудника;

- асептична техніка. При роботі з мікроорганізмами посіви виконують поруч із полум'ям пальника (газового або спиртового) для створення стерильної зони. Мікробіологічні петлі прожарюють до червоного розжарення і обов'язково охолоджують перед контактом із рідкою культурою, щоб уникнути розбризкування матеріалу;

- хімічна безпека. Етапи мікроскопічного підтвердження лістерій (фарбування за Грамом) із використанням фіксаторів, спирту та розчину Люголя проводяться у витяжній шафі. Руки після зняття рукавичок обов'язково миють та обробляють шкірними антисептиками;

- контроль здоров'я. Особи з ознаками інфекційних захворювань або з відкритими ранами на руках до роботи з патогенами II групи не допускаються;

- особливі вимоги до охорони праці жінок. Враховуючи високу тропність (спорідненість) *Listeria monocytogenes* до плацентарної тканини та її виражену небезпеку для репродуктивного здоров'я, до роботи з живими культурами збудника або підозрілими зразками категорично не допускаються вагітні жінки та жінки, які годують груддю. Персонал жіночої статі зобов'язаний негайно інформувати керівництво лабораторії про стан вагітності для своєчасного переведення на ділянки роботи, які не пов'язані з контактом

із біологічними агентами II групи патогенності (наприклад, у відділ реєстрації зразків або оформлення документації).

Приміщення лабораторії облаштовані відповідно до суворих санітарно-гігієнічних вимог. Стіни та підлоги викладені кахлями, а стільниці робочих поверхонь зроблені з гладких, вологостійких, непористих матеріалів, стійких до дії агресивних дезінфектантів. Це запобігає сорбції мікрочасток у порах меблів та виключає утворення сторонньої мікрофлори (плісняви). Приміщення оснащені ефективною припливно-витяжною вентиляцією з фільтрами очищення повітря.

Утилізація відходів є критичним елементом біобезпеки при роботі з *L. monocytogenes*. Лабораторія керується Законом України «Про управління відходами». Усі біологічні відходи поділяються на категорії:

- автоклавування (основний метод знезараження патогенів). Усі використані чашки Петрі з посівами лістерій, пробірки з бульйонами Fraser та наконечники автоматичних дозаторів перед остаточною утилізацією чи миттям підлягають обов'язковому знезараженню в автоклаві при 121°C протягом 30-40 хвилин. Тільки після повного руйнування біомаси відходи вважаються безпечними;
- спалювання в інсинераторі. Відпрацьований щільний біологічний матеріал, залишки харчових продуктів, у яких виявлено патоген, а також трупний тваринний матеріал після автоклавування спалюють у спеціальній кремаційній печі-інсинераторі лабораторії;
- побутовий спосіб. Застосовується виключно для утилізації тари, пакувальних матеріалів та зразків продуктів, у яких за результатами аналізу не було виявлено лістерій, інших патогенів чи токсичних речовин.

Обов'язковим є ведення «Журналу обліку та утилізації відходів (відпрацьованого матеріалу)». Ця процедура забезпечує жорсткий внутрішньолабораторний контроль, дозволяє простежити шлях небезпечного матеріалу від моменту його надходження до повного знищення, виключає ризик повторного використання посуду без стерилізації, а також є юридичним

та економічним обґрунтуванням витрат установи на дезінфікуючі засоби та послуги з хімічного чи термічного знешкодження.

З метою забезпечення надійної біологічної безпеки персоналу, запобігання контамінації навколишнього середовища та захисту досліджуваних модельних матриксів від зовнішнього забруднення, всі теоретичні етапи висіву, ідентифікації та культивування мікроорганізмів, які ми моделювали в межах даного дослідження, базуються на застосуванні боксу *біологічної безпеки II класу (тип A2)* (Додаток В) [36].

Наведене креслення загального виду та схема повітряних потоків наочно демонструють, що захисна дія даного обладнання ґрунтується на принципах створення повітряного бар'єру (завіси) та багатоступеневої HEPA-фільтрації:

- захист оператора (Front Grill/Air Inflow). На кресленні чітко видно, що крізь передню перфоровану решітку вхідне повітря з приміщення лабораторії всмоктується всередину системи, утворюючи повітряний бар'єр. Це технічно унеможливорює вихід потенційних аерозолів патогену з робочої зони назовні, до дихальних шляхів мікробіолога;

- захист продукту (Нисхідний ламінарний потік). Очищене через приточні HEPA-фільтри повітря опускається вертикальним ламінарним потоком на робочу поверхню, створюючи стерильне середовище для маніпуляцій з чашками Петрі та флаконами.

- рециркуляція та витяг (Система HEPA-фільтрації): Повітряний потік із робочої зони розділяється: 70% повітря рециркулює всередині боксу через внутрішні HEPA-фільтри для підтримання ламінарності та стерильності, а 30% забрудненого повітря проходить крізь витяжний HEPA-фільтр (система Bag-In/Bag-Out, як зазначено на схемі) і викидається у загальнозаводську витяжну вентиляцію приміщення повністю очищеним від мікроструктур і бактеріальних клітин.

Герметичний одноелементний корпус боксу виключає витік повітря через стики панелей, а електронна система контролю постійно моніторить

швидкість повітряних потоків, що гарантує надійність захисних бар'єрів та запобігає аварійним ситуаціям під час роботи».

Отже, дотримання правил техніки безпеки при роботі з електрообладнанням, стерилізаційним устаткуванням (автоклавами) та хімічними реактивами дозволило мінімізувати ризики виникнення виробничого травматизму та аварійних ситуацій в лабораторії та на виробництві. Також можна сказати, що забезпечення біологічної безпеки при роботі з потенційно інфікованими матеріалами досягається шляхом використання боксу біологічної безпеки (БББ) II класу типу А2. Конструкція боксу та режим його роботи забезпечують ефективний захист оператора (завдяки вертикальному ламінарному потоку повітря), захист досліджуваного зразка від контамінації зовнішнім середовищем та фільтрацію вихідного повітря через HEPA-фільтри, що гарантує високий рівень стерильності та відповідність вимогам біобезпеки при роботі з біологічними агентами.

ВИСНОВКИ

У дипломній роботі на основі проведеного аналізу продуктів харчування аналітично-методичного дослідження представлено біотехнологічну систему ідентифікації *Listeria monocytogenes* та аналізу її метаболітів у продуктах харчування. За результатами роботи можна зробити такі висновки:

1. Встановлено, що біологічні властивості *Listeria monocytogenes* (психротрофність, галотолерантність та стійкість до змін рН) зумовлюють її високу виживаність у технологічних лініях переробки харчової сировини. Забезпечення належного санітарно-епідеміологічного стану продуктів харчування вимагає обов'язкового мікробіологічного скринінгу на наявність цього патогену для запобігання спалахам лістеріозу.

2. Доведено, що складні харчові матриці (food matrix) чинять інгібувальний вплив на виявлення цільового мікроорганізму через високий вміст білків, жирів та наявність супутньої сапрофітної мікрофлори. У зв'язку з цим етап попереднього селективного збагачення є критично необхідним для метаболічного відновлення сублетально пошкоджених клітин бактерій та підвищення їх концентрації до детектованого рівня.

3. Внаслідок проведення мікробіологічного моніторингу реальних зразків продуктів харчування, досліджуваних в бактеріологічному відділі Держпродспоживслужби, життєздатних клітин *Listeria monocytogenes* виявлено не було. Отримані дані свідчать про високу якість досліджуваної продукції та її задовільний санітарно-мікробіологічний стан, що відповідає чинним нормативним вимогам безпеки.

4. З метою демонстрації принципу роботи біотехнологічної системи ідентифікації лістерії та її аналітичної валідації було застосовано теоретично-методологічний метод штучного зараження зразків продуктів харчування (Spike-тест). Результати моделювання мали підтвердити високу аналітичну чутливість, специфічність та ліміт детекції LoD (Limit of Detection - мінімальна

кількість бактерій, яку метод здатний виявити в аналізі.) схеми дослідження в умовах реального харчового матриксу.

5. Результати штучного зараження зразків (Spike-тестів) підтвердили високу аналітичну чутливість, специфічність та ліміт детекції (LoD) запропонованої біотехнологічної схеми. Метод контрольованого внесення еталонних штамів *L. monocytogenes* дозволяє провести повну валідацію аналітичної системи в умовах реальних харчових матриць.

6. Встановлено, що використання хромогенних та селективних поживних середовищ (із додаванням літію хлориду, ескуліну та антибіотиків) забезпечує експрес-диференціацію *L. monocytogenes*. Аналіз специфічних метаболітів лістерій, зокрема ферментативне розщеплення хромогенних субстратів за участю beta-глюкозидази або фосфоліпаз, дозволяє чітко ідентифікувати патоген за характерним забарвленням колоній та скоротити час аналізу.

7. Обґрунтовано та запропоновано комплекс фінальних підтверджувальних тестів для повної ідентифікації культури:

- тест латекс-аглютинації забезпечує швидку серологічну рекласифікацію (повторну класифікацію) за специфічними імунологічними реакціями антиген-антитіло;

- визначення beta-гемолізу на кров'яному агарі виступає первинним маркером патогенності через специфічну взаємодію ферментів патогенних лістерій з еритроцитами дефібринової баранячої крові;

- CAMP-тест у взаємодії зі *Staphylococcus aureus* дозволяє безпомилково диференціювати *L. monocytogenes* від родинного виду *L. innocua* за синергічним посиленням зони гемолізу.

ПРОПОЗИЦІЇ

Для покращення практичної діяльності мікробіологічного сектора Миколаївської регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби пропонуємо:

1. Замінити класичні щільні середовища на селективно-хромогенні агари типу ALOA та RAPID'L.mono, що покращить ефективність виявлення патогена на ранніх стадіях до 22–25%, що в свою чергу буде мінімізувати ризики випуску контамінованої продукції.

2. На основі розрахованого матеріального балансу пропонуємо впровадити в практику планування лабораторії "Картку поблокової потреби матеріалів" із розрахунку на серію з 100 зразків (включаючи фіксовані об'єми середовищ: 22,5 л буферної пептонної води, по 1,0 л селективних бульйонів та по 300 чашок Петрі відповідних хромогенних агарів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hof H. History and epidemiology of listeriosis // FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2003. Vol. 35, Issue 3. P. 199–202. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00471-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00471-6) (дата звернення: 20.04.2026).
2. Etymologia: *Listeria* // Emerging Infectious Diseases. 2016. Vol. 22, No. 4. DOI: 10.3201/eid2204.ET2204. – URL: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/4/et-2204_article (дата звернення: 20.04.2026).
3. Pirie J. H. Harvey. *Listeria*: Change of Name for a Genus of Bacteria // Nature. 1940. Vol. 145. P. 264. – URL: <https://scispace.com/pdf/listeria-change-of-name-for-a-genus-bacteria-3dyxisrpl1.pdf> (дата звернення: 20.04.2026).
4. Hof H. History and epidemiology of listeriosis // FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2003. Vol. 35, Issue 3. P. 199–202. DOI: 10.1016/S0928-8244(02)00471-6. – URL: https://www.researchgate.net/publication/10845462_History_and_epidemiology_of_listeriosis (дата звернення: 20.04.2026).
5. Haase J. K., Murphy R. A., Choudhury K. R., Achtman M. Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection' // Environmental Microbiology. 2011. Vol. 13, Issue 12. P. 3163–3171. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02610.x. –URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22003999/> (дата звернення: 20.04.2026).
6. *Listeria monocytogenes*: a promising vector for tumor immunotherapy / Ding Y.-D., Shu L.-Z., He R.-S., Chen K.-Y., Deng Y.-J., Zhou Z.-B., Xiong Y., Deng H. // Frontiers in Immunology. 2023. Vol. 14. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1278011. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10587691/?utm> (дата звернення: 21.04.2026).
7. Selvanesan B. C., Chandra D., Quispe-Tintaya W. et al. *Listeria* delivers tetanus toxoid protein to pancreatic tumors and induces cancer cell death in

mice // Science Translational Medicine. 2022. Vol. 14, Issue 637. DOI: 10.1126/scitranslmed.abc1600. – URL:

<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scitranslmed.abc1600> (дата звернення: 21.04.2026).

8. Gross V., Totten A. H., Garrett E. M. *Listeria monocytogenes* // PathologyOutlines.com. – 2023. – URL: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/microbiology/monocytogenes.html> (дата звернення: 23.04.2026).

9. Вовк Л. М. Лістеріоз (огляд літератури) // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2009. № 2. – URL: <https://kiai.com.ua/ua/archive/2009/2/article-299/listerioz-oglyad-literaturi-> (дата звернення: 24.04.2026).

10. Крупей К. С. Біологічні та екологічні властивості *Listeria monocytogenes*: сучасний огляд // Перспективи та інновації науки (Серія «Медицина»). – 2025. – № 7(53). – С. 2036–2046. – DOI: 10.52058/2786-4952-2025-7(53)-2036-2046. – URL: <https://perspectives.pp.ua/index.php/pis/article/view/26737/26711> (дата звернення: 24.04.2026).

11. Виноград Н. О., Стибель В. В., Василюшин З. П., Козак Л. П. Лістеріоз як проблема в розрізі концепції «Єдине здоров'я» // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Медицина». – 2026. – Т. 34, № 1(58). – DOI: 10.26565/2313-6693-2026-58-10. – URL: <https://ukrmedsci.com/index.php/visnyk/article/view/392> (дата звернення: 25.04.2026).

12. Лістеріоз // Центр громадського здоров'я МОЗ України. – URL: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/listerioz> (дата звернення 26.04.2026).

13. Шостакович-Корецька Л. Р., Будаєва І. В., Ніколайчук М. А. Лістеріоз: огляд проблеми, презентація клінічного випадку лістеріозного сепсису у 4-місячної дитини // Актуальна інфектологія. – 2021. – Т. 9, № 4. –

С. 39–42. – ISSN 2312-4148. – URL: <https://repo.dma.dp.ua/8020/> (дата звернення: 27.04.2026).

14. Quereda J. J., Morón-García A., Palacios-Gorba C. et al. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology // *Virulence*. – 2021. – Vol. 12, Issue 1. – P. 2509–2545. – DOI: 10.1080/21505594.2021.1975526. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8496543/> (дата звернення: 28.04.2026).

15. *Listeria (Listeriosis)* // U.S. Food and Drug Administration. 2025. – URL: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/listeria-listeriosis> (дата звернення: 29.04.2026).

16. Sharma S., Gandhi A., Sah S., Singh M. P., Sharma G. D., Verma A. *Listeria* infections: The unexpected risks in everyday foods // *Clinical Infection in Practice*. – 2025. – Vol. 26. – 100489. – DOI: 10.1016/j.clinpr.2025.100489. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590170225000822> (дата звернення: 30.04.2026).

17. Боровик І. В., Зажарська Н. М. Виявлення *Listeria monocytogenes* у готових харчових продуктах // Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (м. Одеса, 14–15 вересня 2023 р.). – 2023. – С. 358–360. – URL: <https://dspace.dsau.dp.ua/server/api/core/bitstreams/9a1b64d8-4aa1-46d7-8b02-dfb8d130cfd1/content> (дата звернення: 30.04.2026).

18. Рандюк Ю.О., Москалюк В.Д., Сокол А.М., Сидорчук А.С. Лістеріоз — маловідома опортуністична інфекція // *Буковинський медичний вісник*. – 2013. – Т. 17, № 2 (66). – С. 162.

19. Haubert L., Kremer F. S., da Silva W. P. Whole-genome sequencing identification of a multidrug-resistant *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a isolated from fresh mixed sausage in southern Brazil // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2018. – Vol. 65. – P. 127–130. – DOI: 10.1016/j.meegid.2018.07.028. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30053641/>
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30053641/> (дата звернення: 01.05.2026)

20. Camargo A. C., Moura A., Avillan J. et al. Whole-genome sequencing reveals *Listeria monocytogenes* diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil // *Environmental Microbiology*. – 2019. – Vol. 21, Issue 12. – P. 4478–4487. – DOI: 10.1111/1462-2920.14726. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7644123/?utm> (дата звернення: 02.05.2026).

21. Чечет О. М., Андріяшук В. О., Мусієць І. В., Горбатюк О. І., Гайдей О. С., Ординська Д. О. Результати бактеріологічних досліджень харчових продуктів тваринного походження щодо *Listeria monocytogenes* на території України за період 2016–2020 рр. // «Єдине здоров'я – 2022»: матеріали Міжнародної наукової конференції (м. Київ, 22–24 вересня 2022 р.). – 2022. – С. 217–218. – URL: <https://dglib.nubip.edu.ua/server/api/core/bitstreams/128ef203-8df6-41fe-8f91-c4a4c7bc2c45/content> (дата звернення: 03.05.2026).

22. Лістеріоз // Компендіум: онлайн-довідник лікарських засобів. – URL: <https://compendium.com.ua/uk/handbooks-uk/nozologia-dovidnyk/listerioz-2/> (дата звернення: 04.05.2026)

23. Low J. C., Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis // *The Veterinary Journal*. – 1997. – Vol. 153, Issue 1. – P. 9–29. – DOI: 10.1016/S1090-0233(97)80005-6. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023397800056?utm> (дата звернення: 05.05.2026).

24. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2005. – Vol. 29, Issue 5. – P. 851–875. – DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.002. – URL: <https://academic.oup.com/femsre/article/29/5/851/547236> (дата звернення: 06.05.2026).

25. Cavaiuolo M., Paramithiotis S., Drosinos E. H., Ferrante A. Development and optimization of an ELISA based method to detect *Listeria*

monocytogenes and *Escherichia coli* O157 in fresh vegetables // Analytical Methods. – 2013. – Issue 18. – DOI: 10.1039/C3AY40580F. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/ay/c3ay40893k> (дата звернення: 07.05.2026).

26. Solus *Listeria* ELISA – NF SOL 37/02 – 06/13 / Australian Government Department of Agriculture and Water Resources. – 2013. – URL: <https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/export/solus-listeria.pdf> (дата звернення: 08.05.2026).

27. NF Validation. Validation of alternative analytical methods. Application in food microbiology: summary report. Validation study according to the EN ISO 16140-2:2016 for Solus *Listeria* ELISA (Certificate number: SOL 37/02 – 06/13) / ADRIA Food Expertise. – 2016. – URL: https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/03/Synt-SOL-37-02-06-13_en.pdf (дата звернення: 09.05.2026).

28. Hadjilouka A., Mantzourani K.-S., Katsarou A., Cavaiuolo M., Ferrante A., Paramithiotis S., Mataragas M., Drosinos E. H. Estimation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence and Levels in Naturally Contaminated Rocket and Cucumber Samples by Deterministic and Stochastic Approaches // Journal of Food Protection. – 2015. – Vol. 78, Issue 2. – P. 311–323. – DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-261. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X23056028> (дата звернення: 10.05.2026).

29. Martínez-Murcia A., Navarro A., Miró-Pina C. Identification of *Listeria* isolates by Using a Pragmatic Multilocus Phylogenetic Analysis // Microbiology Research. – 2024. – Vol. 15, Issue 4. – P. 2114–2128. – DOI: 10.3390/microbiolres15040142. – URL: <https://www.mdpi.com/2036-7481/15/4/142?utm> (дата звернення 11.05.2026).

30. Feng Y., Cheng Z. J., Wei X., Chen M., Zhang J., Zhang Y., Xue L., Chen M., Li F., Shang Y., Liang T., Ding Y., Wu Q. Novel method for rapid identification of *Listeria monocytogenes* based on metabolomics and deep learning

// Food Control. – 2022. – Vol. 139. – 109042. – DOI:
10.1016/j.foodcont.2022.109042. – URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713522002353?utm>

(дата звернення: 12.05.2026)

31. ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (EN ISO/IEC 17025:2017, IDT; ISO/IEC 17025:2017, IDT). – [Дата чинності 2021-01-01]. – Київ : ДП «УкрНДНЦ», 2021.

32. ДСТУ EN ISO 11290-1:2022. Мікробіологія харчового ланцюга. Горизонтальний метод виявлення та підрахунку *Listeria monocytogenes* і *Listeria* spp. Частина 1. Метод виявлення (EN ISO 11290-1:2017, IDT; ISO 11290-1:2017, IDT). – [Дата чинності 2023-12-31]. – Київ : ДП «УкрНДНЦ», 2023.

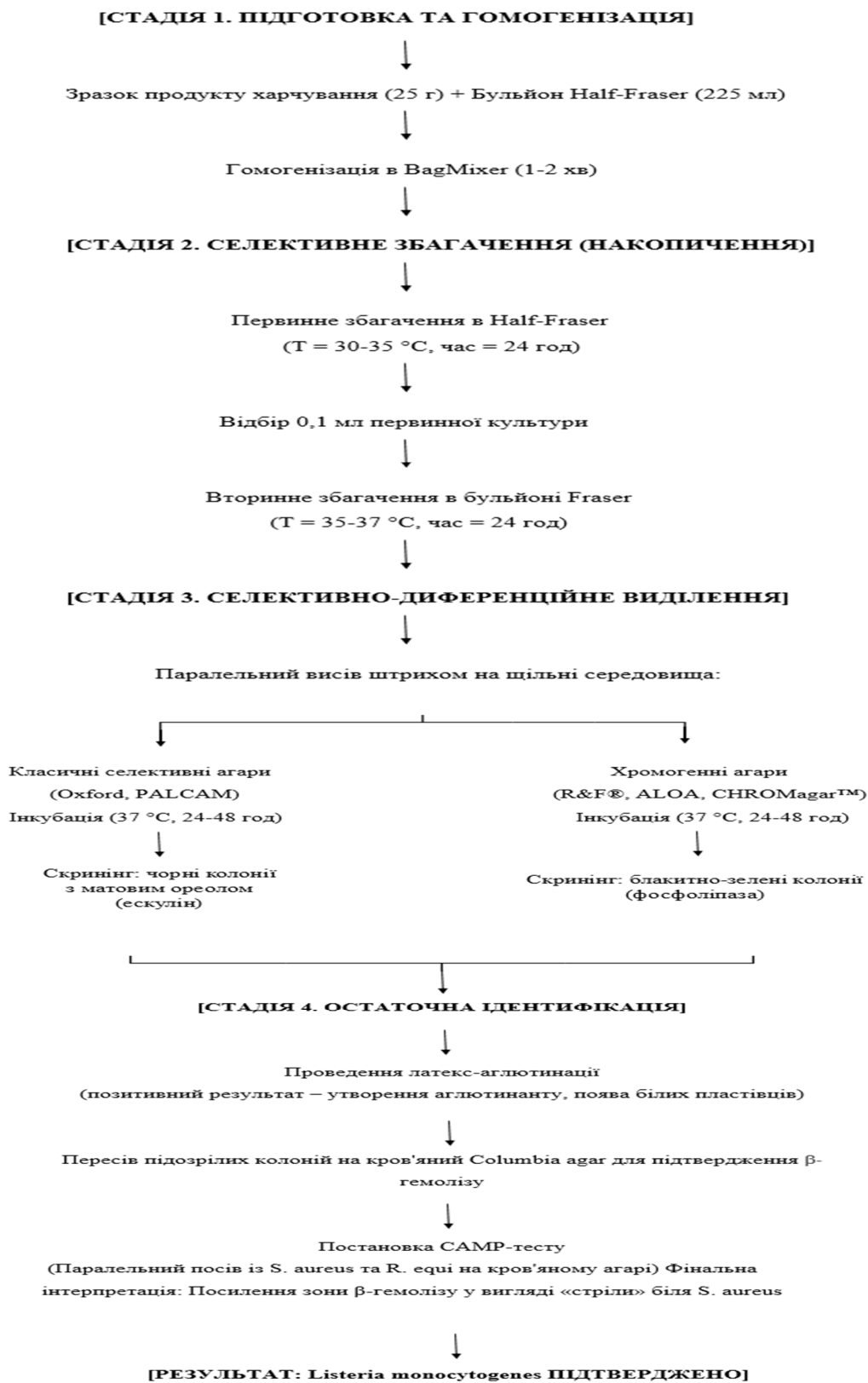
33. Hitchins A. D., Jinneman K., Chen Y. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. – U.S. Food & Drug Administration, 2022. – URL: <https://www.fda.gov/media/157717/download?attachment> (дата звернення 14.05.2026).

34. Про охорону праці : Закон України від 14.10.1992 № 2694-XII // Відомості Верховної Ради України. – 1992. – № 49. – Ст. 668. – [Дата чинності 2025-09-12]. – Редакція від 2025-09-12.

35. ДСТУ EN ISO 7010:2019. Графічні символи. Кольори та знаки безпеки. Зареєстровані знаки безпеки (EN ISO 7010:2012; A1:2014; A2:2014; A3:2014; A4:2014; A5:2015; A6:2016; A7:2017, IDT; ISO 7010:2011; Amd 1:2012, Amd 2:2012, Amd 3:2012, Amd 4:2013, Amd 5:2014, Amd 6:2014, Amd 7:2016, IDT). – [Дата чинності 2020-07-01]. – Київ : ДП «УкрНДНЦ», 2020.

36. Class II, Type B2 Biosafety Cabinet Airflow Schematic [Електронний ресурс] // NuAire. – URL: <https://www.nuaire.com> (дата звернення: 16.05.2026).

ДОДАТОК А



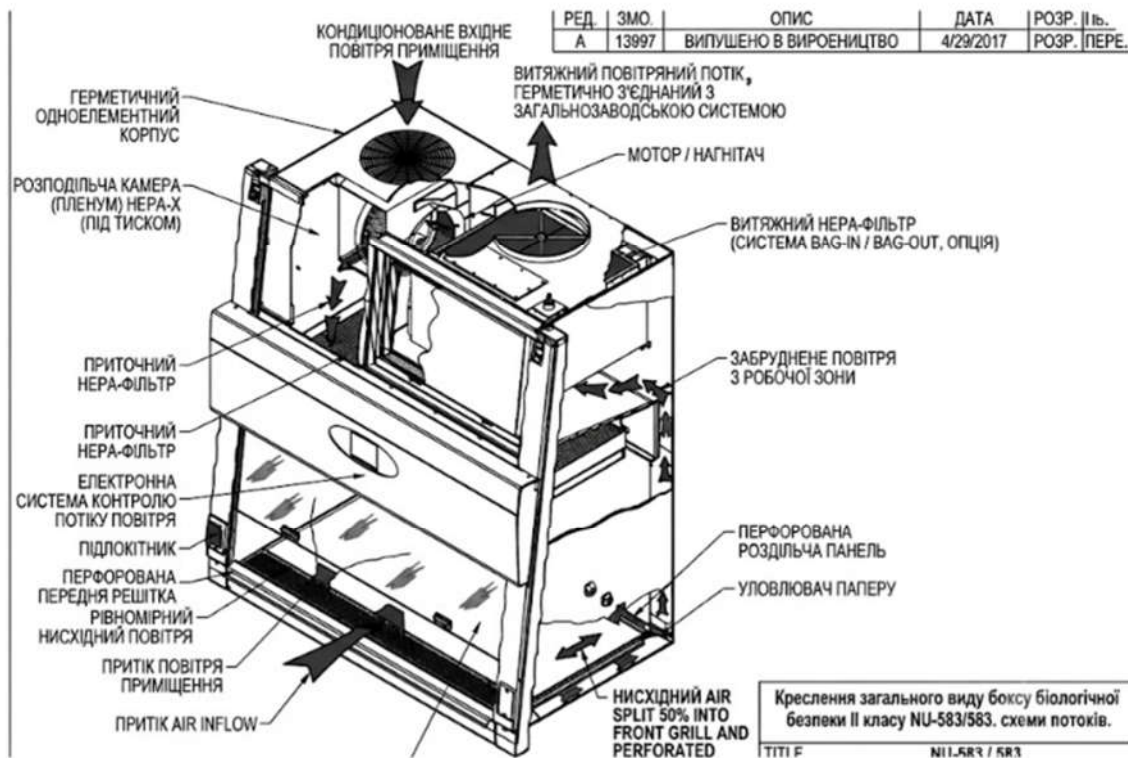
Технологічна схема біотехнологічної системи ідентифікації *Listeria monocytogenes*

ДОДАТОК Б

Розрахунок потреби в поживних середовищах та компонентах на аналітичну серію досліджень (4 зразки)

Найменування компонента / поживного середовища	Норма витрати на 1 аналіз	Чиста потреба на серію (4 аналізи)	Загальний об'єм з урахуванням втрат ($K=1,05$)	Концентрація сухої речовини (дозування), г/дм ³	Необхідна маса сухої речовини (наважка), г
Рідке середовище Half-Fraser (первинне збагачення)	225 мл	900 мл	945 мл (0,90 дм ³)	57,5	54,34
Рідке середовище Fraser (вторинне збагачення)	10 мл	40 мл	42 мл (0,04 дм ³)	54,0	2,27
Щільний агар Oxford (селективний облік)	20 мл (1 чашка)	80 мл	84 мл (0,16 дм ³)	55,5	9,32
Щільний агар PALCAM (селективний облік)	20 мл (1 чашка)	80 мл	84 мл (0,16 дм ³)	69,0	11,59
Хромогенний агар ALOA (диференціація)	20 мл (1 чашка)	80 мл	84 мл (0,16 дм ³)	70,5	11,84
Хромогенний агар CHROMagar™ Listeria	20 мл (1 чашка)	80 мл	84 мл (0,16 дм ³)	68,2	11,46
Хромогенний агар RAPID'L.mono™	20 мл (1 чашка)	80 мл	84 мл (0,16 дм ³)	72,0	12,10
Chromogenic Plating Medium (R&F®)	20 мл (1 чашка)	80 мл	84 мл (0,16 дм ³)	70,0	11,76
Поживний агар (основа кров'яного агару)	20 мл (тест на гемоліз)	40 мл	42 мл (0,08 дм ³)	40,0	3,36
Дефібринована кров барана (добавка 5%)	—	—	4,2 мл	—	4,2 мл (рідка)

ДОДАТОК В



Креслення загального виду та схема повітряних потоків боксу біологічної безпеки II класу (тип A2)