

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN SHEEP

S. Mrenoski¹, Z. Markic², P. Sekulovski², C. Micevski¹

¹ Faculty of Veterinary Medicine Skopje; ² Veterinary Institute Skopje
Lazar Pop-Trajkov 5-7, 91000 Skopje, Macedonia
E-mail: vetinst@unet.com.mk

ИЗОЛАЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА *LISTERIA MONOCYTOGENES* КАЈ ОВЦИ

С. Мреношки¹, З. Маркиќ², П. Секуловски², Ц. Мицевски¹

¹ Ветеринарен факултет Скопје, ² Ветеринарен институт Скопје
Лазар Поп-Трајков 5-7, 91000 Скопје, Македонија

SUMMARY

Genus *Listeria* consists of 7 species and two of them are pathogenic for animals: *L. ivanovii* and *L. monocytogenes*. The last one is considered as the most common agent of listeriosis, disease that can occur in sheep in three different syndromes: as visceral (septicaemic) listeriosis, as neural listeriosis and as abortion. To establish the diagnose, beside epizootiological data, clinical and necropsy findings, it is necessary to perform laboratory investigations, particularly isolation and identification of the causative agent. Many different isolation and identification media and methods are known for detection of *L. monocytogenes* in clinical specimens. In this paper we present the procedure that we use in our laboratory.

Key words: *Listeria monocytogenes*, sheep, isolation, identification, antimicrobial susceptibility testing

INTRODUCTION

Genus *Listeria* is divided into seven species: *L. murrayi*, *L. gray*, *L. seeligeri*, *L. innocua* and *L. welshimeri* (considered to be non-pathogenic), *L. ivanovii* (pathogen for animals) and *L. monocytogenes* (pathogen for humans and animals).^{6,2}

РЕЗИМЕ

Родот *Listeria* се состои од 7 видови од кои два се патогени за животните: *L. ivanovii* и *L. monocytogenes*. Последниот се смета за најчест предизвикувач на листериозата, болест која може кај овците да се појави во три различни форми: како висцерална (септикемична) листериоза, како нервна листериоза и како абортус. За поставување на дијагнозата, покрај епизоотиолошките податоци, клиничкиот и патоанатомскиот наод, потребни се и лабораториски испитувања, пред се изолација и идентификација на причинителот. Познати се различни подлоги и методи за детекција одн. изолација и идентификација на *L. monocytogenes* од клиничките мостри. Во овој труд е презентирана процедурата која се користи во нашата лабораторија.

Клучни зборови: *L. monocytogenes*, овци, изолација, идентификација, антибиограм

ВОВЕД

Родот *Listeria* е поделен во 7 видови: *L. murrayi*, *L. gray*, *L. seeligeri*, *L. innocua* и *L. welshimeri* (за кои се смета дека не се патогени), *L. ivanovii* (патогена за животните) и *L. monocytogenes* (патогена за животните и луѓето).^{6,2}

There are three different forms of listeriosis, caused by *L. monocytogenes*: neural form ('circling disease') that is most common in ruminants; visceral (septicaemic) form, which occurs in young animals of many species, including lambs and calves, and abortions, that occur in sheep, goats and cattle, without the neural manifestations of the disease. Beside this, keratoconjunctivitis and ophthalmitis have been described in cattle and sheep.^{6,2}

Specimens that should be sent for isolation are material from lesions in liver, kidneys or spleen (visceral form), spinal fluid, brain stem, and medulla oblongata (neural form), and placenta (cotyledons), fetal abomasal contents and/or uterine discharge (abortion).⁶

L. monocytogenes grows well on blood agar and chocolate agar as well as on nutrient agars and broths (brain-heart infusion and thioglycolate).⁵ Selective media include blood agar with an antibiotic supplement or blood agar with potassium tellurite. Commercial selective and indicator media are available, such as Listeria Selective agar (Oxoid) and these are designed mainly for the isolation of Listeria from human foodstuffs. The routine medium for inoculation of specimens is ox or sheep blood agar. Specimens from the visceral form and from the abortion cases are inoculated directly onto the laboratory media and incubated aerobically (*Listeria* is facultative anaerobe) at 37°C for 24-48 hours.⁶ But, *L. monocytogenes* is frequently difficult to recover, particularly from the brain, presumably because the organisms are intracellular and present in small numbers.^{2,1} If no growth is obtained initially, ground brain stored at refrigerator temperature ('cold enrichment') should be recultured weekly for as many as 12 weeks before it is discarded as negative. The organism is one of the few pathogens able to grow at refrigerator temperature, thus the value of cold enrichment.^{2,6,1} The length of time required for isolation using this technique, lessens its importance in the clinical settings, because treatment must begin early in the infectious process.⁵

Identification of the isolates is based on the colonial appearance (small, smooth, transparent

Листерииозата, предизвикана од *L. monocytogenes*, може да се манифестира во три форми: нервна форма, која е и најчеста кај преживарите; висцерална (септикемична) форма, која се појавува кај младите животни на многу животински врсти вклучувајќи ги тука и јагнињата и телињата, и абортуси, кои се појавуваат кај овците, козите и кравите, без нервна манифестација на болеста. Покрај ова, кај кравите и овците се опишани и *keratoconjunctivitis* и *ophthalmitis*.^{6,2}

Мостри кои треба да се испратат за изолација се материјал од лезиите на црниот дроб, бубрезите и слезината (висцерална форма), спинална течност, мозочното стебло и *medulla oblongata* (нервна форма) и плацентата (котиледони), содржина од абомазусот на фетусот и/или матичен исцедок (абортуси).⁶

L. monocytogenes расте добро на крвен и чоколаден агар како и на други хранливи агари и бујони (мозочно-срцева инфузија, тиогликолат).⁵ Селективните медиуми вклучуваат крвен агар со додаток на антибиотици или калиев телурит. Достапни се и комерцијални селективни и индикаторски подлоги, како што е Листериа селективниот агар (*Oxoid*) и тие се дизајнирани пред сè за изолација на листериите од храна за луѓе. Рутинска подлога за инокулација на мострите е *ox* или крвниот агар со овнујска крв. Мострите од висцералната форма и од случаите на абортуси се инокулираат директно на подлогите и инкубираат аеробно (листериата е факултативен анаероб) на 37°C 24-48 часа.⁶ Но, *L. monocytogenes* често тешко се изолира, нарочито од мозокот, највероватно поради тоа што овие микроорганизмите се интрацелуларни паразити и се присутни во мал број.^{2,1} Ако не постои иницијален раст, мозочното ткиво се чува на температура од 4°C („ладно збогатување“) и 12 недели, еднаш неделно, се врши рекултивирање. Овој микроорганизам е еден од неколкуте патогени способни за раст на 4°C, и во тоа е вредноста на ладното збогатување.^{2,6,1} Долгото време потребно за изолација со оваа техника ја намалува нејзината важност во клиничката пракса, затоа што со лекување мора да се започне рано во текот на болеста.⁵

Идентификацијата на изолатите е базирана на изгледот на колониите (мали,

colonies with narrow zone of beta-haemolysis on blood agar), *microscopic appearance* (regular, short, Gram-positive, non-spore-forming, encapsulated rods or coccobacilli, occurring singly, in pairs, in palisades or in short chains), *biochemical tests* (esculin hydrolysis, catalase-positive, positive CAMP reaction with *S. aureus*, and commercial biochemical identification systems-API *Listeria*, bioMerieux Vitek), *motility* (*Listeria* is motile by a few, 1-5, peritrichous flagella at room temperature, but not at 35°C, which can be demonstrated by hanging-drop method - 'tumbling motility', or in semisolid motility media - 'umbrella-shaped' growth in the surface) and *antigenic nature and serology* (all *Listeria* spp, except *L. grayii*, variously share 4 flagella antigens-A, B, C and D, of which B is most common). All this properties should be investigate and all this tests is necessarily to be performed, to distinguish the *Listeria* from other related genera (*Streptococcus* spp., enterococci, *Corynebacterium* spp. and *E. rhusiopathie*) and distinguished *L. monocytogenes* from the other *Listeria* species.^{1,2,3,4,5,6,7}

Treatment is usually of little value, particularly in sheep and goats, after neurologic signs are seen. The drug of choice are chloramphenicol and the tetracycline (in sheep and goats), sulfonamides, penicillin and tetracyclines (in cattle).²

MATERIALS AND METHODS

Total of six sheep as field suspect cases on listeriosis (5 of them with neurological signs) were examined. Materials used for isolation were 4 organs: brain, liver, spleen and kidney.

For enrichment and isolation of the pathogen from the specimens, three mediums were used: *Listeria* enrichment broth base-*UVM* formulation, Fraser broth and *Listeria* selective agar base-*Oxford* formulation, all manufactured by Oxoid. Sheep blood agar was used also, in the last step of isolation.

Identification of the isolates was based on the colonial appearance and type of haemolysis, microscopic appearance, motility, CAMP-test with *S.*

мазни и провидни колонии на крвен агар, со тесна зона на бета-хемолиза), *микроскопскиот изглед* (правилни, кратки, Грампозитивни, не-спорогени, неинкапсулирани стапчиња или кокобацили, кои се појавуваат поединечно, во парови, палисади или кратки ланци), *биохемискиите испитувања* (хидролиза на ескулинот, позитивен каталаза тест, позитивна CAMP-реакција со *S. aureus*, и комерцијални биохемиски идентификациони системи, како што е API *Listeria*, bioMerieux), *подвижноста* (*Listeria*-та е подвижна со неколку, 1-5, перитрихи флагели, на собна температура но не и на температура од 35 одн. 37°C што може да се демонстрира со методот на висечка капка како и во полуврсти подлоги за подвижност, во кои што доаѓа до формирање на „фигура во облик на чадор“ под површина на подлогата) и *антигенската природа и серологизацијата* (сите листерии, освен *L. grayii*, различно делат 4 флагеларни антигени -A,B,C и D, од кои B е најчест). Сите овие својства треба да се испитаат и сите овие тестови да се изведат како би се разликувала *Listeria*-та од останатите слични родови (*Streptococcus* spp., enterococci, *Corynebacterium* spp. и *E. rhusiopathie*) како и *L. monocytogenes* од останатите видови, припадници на родот *Listeria*.^{1,2,3,4,5,6,7}

Третманот е обично без голем успех, нарочито кај овците и козите откако ќе се појават нервните симптоми. Лекови на избор се хлорамфениколот и тетрациклините, кај овците и козите, додека сулфонамидите, пеницилинот и тетрациклините кај кравите.²

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Беа испитувани мостри од вкупно 6 овци, како теренски сомнителни случаи на листериоза (5 од нив со нервни симптоми). Материјал за изолација беа 4 органи: мозок, црн дроб, слезина и бубрег.

За збогатување и изолација на патогените од мострите, користевме три подлоги: Листериа бујон за збогатување-*UVM* формулација, Fraser бујон и Листериа селективен агар-*Oxford* формулација (Oxoid). Исто така, во последната фаза на изолација користевме и крвен агар припремен со овнујска крв.

aureus, immunological properties (Clearview Listeria-Oxoid) and biochemical tests (esculin hydrolyzes, catalase test, API Listeria-bioMerieux).

At the end we perform antimicrobial susceptibility test, with 3 recommended drugs for treatment of animal listeriosis.

ENRICHMENT AND ISOLATION

Primary enrichment. Twenty-five grams of tissue of all four organs were cut in to small peaces and added (separately) to 225 ml of Listeria enrichment broth base-*UVM* formulation with added Listeria Primary selective Enrichment Supplement-*UVM I* (in further text L1). Tubes were incubated at 37°C for 24 hours.

Secondary enrichment. Ten ml of Fraser Broth (consist esculin) with added Fraser Supplement (in further text L2), were inoculated with 0.1 ml of the L1 and incubated at 37°C for 24 hours. Next day each inoculate tube was compare with an-inoculated control and tubes that were darken or black, were recorded as positive (esculin hydrolysis).

Isolation. Listeria Selective medium plates-*Oxford* formulation (which consist esculin too), with added Listeria selective supplement-*Oxford* formulation (in further text L3), were inoculated with 0.1 ml of positive L2 mediums and incubated at 37°C for 24 hours; in parallel, sheep blood agar plates were inoculated and incubated on the same way.

IDENTIFICATION

Colonial appearance and type of haemolysis. On the L3, small colonies surrounded by dark zone (esculin hydrolysis), and on the sheep blood agar small, smooth, transparent colonies with narrow zones of beta-haemolysis, were presumptively identified as colonies of *L. monocytogenes*.

Microscopic appearance. In GRAM stained smears from the suspect colonies, as positive finding was compared Gram-positive, regular, short, non-spore-forming, encapsulated rods or coccobacilli.

Идентификацијата на изолатите беше базирана на морфолошкиот изглед на колонииите и типот на хемолиза, микроскопскиот изглед, подвижноста, *SAMP*-тестот со *S. aureus*, имунолошките карактеристики (*Clearview Listeria-Oxoid*) и биохемиски тестови (хидролиза на ескулинот, каталаза тестот и *API Listeria-bioMerieux*).

Со изолатите беа изведени и тестови за одредување на осетливоста на антибиотици со 3 препорачани лекови за лекување на анималната листериоза.

ЗБОГАТУВАЊЕ И ИЗОЛАЦИЈА

Примарно збогатување. Дваесетипет грама ткиво од сите четири органи, беше иситнето во мали парчиња кои беа ставани (поединечно) во 225 ml од Листериа бујонот за збогатување-*UVM* формулација со додаден селективен додаток за збогатување-*UVM I* (во понатамошниот текст оваа подлога ќе биде именувана со *L1*). Инкубацијата на засадените подлоги беше на 37°C, 24 часа.

Секундарно збогатување. Десет ml од *Fraser* бујонот (кој содржи ескулин) со додаден *Fraser* додаток (во понатамошниот текст оваа подлога ќе биде именувана со *L2*) беше инокулиран со 0.1 ml на *L1* и инкубиран на температура од 37°C 24 часа. Следниот ден ги компариравме инокулираните епрувети со не-инокулирана контролна епрувета и оние кои беа потемни или црни (хидролиза на ескулинот), беа забележувани како позитивни.

Изолација. Плочи на Листериа селективниот агар-*Oxford* формулација (кој исто така содржи ескулин) со додаден Листериа селективен додаток-*Oxford* формулација (во понатамошниот текст оваа подлога ќе биде именувана со *L3*), беа инокулирани со 0.1 ml на позитивни *L2* медиуми и инкубирани на 37°C 24 часа; исто така, беа инокулирани и плочи со крвен агар на истиот начин и инкубирани под истите услови.

ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Изглед на колонииите и типот на хемолиза. Како сомнителни колонии беа идентифи-

Catalasa test. Catalasa test (with 3% Hydrogen Peroxide) on a microscope slide, were performed with all isolates which were presumptively identified as *L. monocytogenes* isolates. The positive isolates on this test, were taken in the further identification.

Motility. The test for motility was performed in tubes with semisolid nutritient agar in two different concentrations – 0.5% and 1%. Two tubes of both mediums, were inoculated by a straight stab with the same isolate, and incubate for 24 hours - one tube with 0.5% and one with 1% agar at room temperature and one tube with 0.5% and one with 1% agar at 37°C. The motility in the tubes, which were incubated at room temperature, and absence of motility in the tubes, which were incubated at 37°C, was recorded as positive.

Immunological properties. The Clearview *Listeria* test is based on the detection of the B flagella antigen with specific monoclonal antibodies. The second enrichment media (L2) is heated at 80°C for 20 minutes to extract the flagella antigen. The extracted antigen is added onto a pad in the Sample window and in few minutes positive extract results in a blue line in the Result window. The appearance of a blue line in a third, Control window shows that the test has been carried out correctly.

CAMP-test. *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* (strain ATCC 33862) is streaked across the center of sheep blood agar and a streak of the suspect colonies is made at right angles to, and taken to within 1 to 1.5 mm of the staphylococcal streak. The plates were incubated at 37°C for 18-24 hours. As a positive test were considered enrichment of the effect of the staphylococcal beta-haemolysin.

API *Listeria*. This strip is used for identification of the species of *Listeria* and is based on the biochemical properties of the organisms. It consists of 10 microtubes containing dehydrated substrates which enable the performance of enzymatic tests or sugar fermentation. The reactions produced during the incubation period are revealed through colored reactions. Bacterial suspensions were made with a few well-isolated colonies from the strains

кувани на L3 малите колонии окружени со темна зона (хидролиза на ескулинот), и на крвниот агар малите, мазни и транспарентни колонии со тесна зона на бета-хемолиза.

Микроскопски изглед. Во препарати обоени по ГРАМ, како позитивен наод беа прогласувани ГРАМ-позитивните, правилни, кратки, аспорогени и неинкапсулирани стапчиња или кокобацили.

Каталаза тест. Овој тест изведен со 3% водороден пероксид на микроскопско стакленце, беше применуван на сите изолати кои по претходно испитаните карактеристики беа окарактеризирани како можни изолати на *L. monocytogenes*. Позитивните изолати и со овој тест, беа земени во понатамошна идентификација.

Подвижност. Тестот за испитување на подвижноста беше изведуван во епрувети со получврст хранлив агар со две различни концентрации - 0.5 и 1 %. По две епрувети од двата медиуми, беа инокулирани (со убој) со ист изолат и инкубирани 24 часа, и тоа една епрувета со 0.5% и една со 1% агар на собна температура, и една епрувета со 0.5% и една со 1% агар на 37°C. Како позитивен наод беше забележувана подвижноста во епруветите инкубирани на собна температура и отсуството на подвижност во епруветите инкубирани на 37°C.

Имунолошки својства. Clearview *Listeria* тестот е базиран на детекцијата на B-флагеларниот антиген со специфични моноклонски антитела. Втората подлога за збогатување (L2) се загреваше на 80°C 20 минути како би се екстрахирал флагеларниот антиген. Екстрахираниот антиген беше потоа додаван во „прозорчето за мостра“ и во рок од неколку минути, позитивниот екстракт резултираше со појава на плава линија во „прозорчето за резултат“. Појавата на плава линија во третото, „контролно прозорче“, покажуваше дека тестот е изведен правилно.

CAMP-тест. *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* (сој ATCC 33862) беше нанесуван по средината на крвниот агар и под прав агол на него, на растојание од 1 - 1.5 mm, беа нанесувани сомнителните изолати. Плочите беа инокулирани на температура од 37°C 24 часа, а како позитивен тест беше забележувано зголемувањето на ефектот на стафилококниот бета-хемолизин.

positive on *Listeria spp.* with the all performed tests earlier, and distributed into each cupule of the strip. After 18-24 hours of incubation at 37°C, strips were visually read and recorded whether the reactions are positive or negative (+/-) on the result sheet. By adding the numbers corresponding to positive reactions, a 4-digit numerical profile is obtained. Identification is obtained by searching for the numerical profile in the Profile List of the Instruction Manual.

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING

Antimicrobial susceptibility test (Kirby-Bauer disk diffusion method) was performed on Mueller-Hinton medium (Oxoid) with the procedure proposed by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1990, MA-A4). Three drugs of choice for listeriosis in sheep, goats and cattle, were used with following results:

Case No	Chloramphenicol	Tetracycline	Trimetoprim-Sulphamethoxazole
01	13 (I,+)	17 (I,+)	19 (S,+++)
02	14 (I,+)	16 (I,+)	18 (S,+++)
03	12 (R,)	17 (I,+)	19 (S,+++)
04	14 (I,+)	16 (I,+)	19 (S,+++)
05	13 (I,+)	17 (I,+)	18 (S,+++)

Броевите ја прикажуваат зоната на инхибиција во mm. Буквите и плусевите ја прикажуваат осетливоста на изолатот према лекот (R-резистентно, I,+ = интермедијарно и S,+++ = осетливо).

The numbers shows the diameter of zone of inhibition in mm. The letter and pluses shows the susceptibility of bacteria on the antimicrobial agent (R-resistant; I,+=Intermediate and S,+++ = Susceptible)

RESULTS AND DISCUSSION

In all 5 cases with neurological signs, enrichment and isolation was successful, with typical *Listeria* colonies on both, L3 and sheep blood agar. The isolates were obtained from all four organs.

Esculin hydrolysis, colonial appearance and type of haemolysis, microscopic appearance, positive Clearview *Listeria* test, positive catalasa test and

API Listeria. Овој стрип се користи за идентификацијата на видот на Листериа и е базиран на биохемиските особености на микроорганизмот. Се состои од 10 микро-епруветки кои содржат дехидрирани супстрати кои овозможуваат изведба на ензимски тестови или ферментација на шеќери. Насанатите реакции во текот на инкубациониот период се откриваат преку обоени реакции. Од изолатите, претходно позитивни на сите тестовите карактеристични за *Listeria spp.*, беа приготвувани суспензии кои се дистрибуираа во секоја микро-епруветка на стрипот. После инкубација од 18-24 часа на температура од 37°C, реакциите беа читани визуелно и резултатите забележувани како позитивни или негативни (+ или -) на формуларот за резултати. Со додавање на броеви кореспондентни на позитивните реакции, се добиваше нумерички профил од 4 броја. Идентификацијата на основ на овој профил беше вршена со негово пронаоѓање во листата на профили, која се наоѓа во упатството за употреба на овој стрип.

ИСПИТУВАЊЕ НА ОСЕТЛИВОСТА НА АНТИБИОТИЦИ (АНТИБИОГРАМ)

Тестот за испитување на осетливоста на антибиотици (*Kirby-Bayer*-овиот диск дифузион метод) беше изведен на *Mueller-Hinton*-ов агар (*Oxoid*) со процедура предложена од Националниот комитет за клинички лабораториски стандарди (NCCLS, 1990). Беа употребени три лекови на избор за лекување

demonstrated motility at room temperature, confirm that the isolates belongs to genus *Listeria*.

Positive CAMP-test, together with API *Listeria*, confirmed that the isolates belonged to *L. monocytogenes* species.

Isolates were susceptible on the Trimetoprim-Sulphamethoxazole and intermediate on the Tetracycline (with the value of zone of inhibition close to the moderate susceptible) and Chloramphenicol (with the value of zone of inhibition close to the resistant).

The time need for performing of complete procedure was 5 days. First results (esculin hydrolysis and Clearview *Listeria* test) were obtain in the 3rd day; the 4th day, the presumptive identification was completed with the results of colonial appearance, esculin hydrolysis, type of haemolysis, morphological characteristics and catalase test. And finally, the 5th day identification was finished with results of motility testing, CAMP test and API *Listeria*; also, we have the results of antibiogram susceptibility testing.

CONCLUSIONS

The procedure that we use in our laboratory, enable us to reduce the time for isolation of *L. monocytogenes* in sheep with neural listeriosis on three days, instead of much longer time of 'cold enrichment' which require 12 weeks maximum.

Identification of the isolates with the tests described above, is easy to perform, reliable and gave the results in 24-48 hours.

The time used for complete procedure of isolation and identification of the isolates is within 5 days, which is important in the clinical settings, because treatment must being early in the infectious process.

In the cases of listeriosis with neurological signs, there is possibility to obtain the isolates, not from the brain only, but also from the liver, kidneys or spleen.

From the suggested drugs for listeriosis in sheep and goats (Tetracycline and Chloramphenicol), our recommendation for clinical use is Tetracycline.

на листериоза кај кози, овци и говеда, со резултати кои се прикажани во табелата.

РЕЗУЛТАТИ И ДИКУСИЈА

Во сите 5 случаи со нервни симптоми, збогатувањето и изолацијата беа успешни, со појава на типични колонии за *Listeria* и на двете чврсти подлоги - L3 и крвниот агар. Изолатите беа добиени од сите 4 органи.

Хидролизата на ескулинот, морфолошкиот изглед на колониите и типот на хемолиза, микроскопскиот изглед, позитивниот Clearview *Listeria* тест, позитивниот каталаза тест и демонстрираната подвижност на собна температура, ни потврдија дека се работи за изолати кои припаѓаат на родот *Listeria*.

Позитивниот CAMP-тест, заедно со API *Listeria* тестот, ни потврдија дека изолатите припаѓаат на видот *L. monocytogenes*.

Изолатите беа осетливи на Trimetoprim-Sulphamethoxazole а интермедијарни на Tetracycline (со вредности на зоната на инхибиција блиски до вредностите за модерирана осетливост) и Chloramphenicol (со вредности на зоната на инхибиција блиски до вредностите за резистентност).

Времето потребно за изведба на комплетната процедура беше 5 дена. Првите резултати (хидролиза на ескулинот и Clearview *Listeria* тестот) беа добиени 3-от ден; првичната идентификација беше докомплетирана 4-иот ден на основ на колонијалниот изглед, хидролизата на ескулинот, типот на хемолиза, микроскопскиот изглед и каталаза тестот. Петтиот ден беше добиена конечната идентификацијата со резултатите од тестирањето на подвижноста, CAMP-тестот и API *Listeria* тестот; исто така, беа добиени и резултатите од антибиограмот.

ЗАКЛУЧОЦИ

Процедурата која ја употребуваме во нашата лабораторија, овозможува да се скрати времето за изолација на *L. monocytogenes* кај овци со нервен облик на листериоза на три дена, за разлика од многу подолгата процедура со „ладно збогатување“ која може да трае и до 12 недели.

REFERENCES

1. **Baron E.J.** et al.: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, Mosby-Year Book, Inc., 1994
2. **Carter G.R.** et al.: *Essentials of Veterinary Microbiology*, Williams & Willkins, 1995
3. **Holt G.** et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (ninth edition)*, Williams & Willkins, 1994
4. **Howard B.J.** et al.: *Clinical and Pathogenic Microbiology*, Mosby-Year Book, Inc., 1994
5. **Mahon C.R.** and Manuselis G.Jr.: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, W. B. Saunders Company, 1995
6. **Quinn P.J.** et al.: *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby-Year Book Europe Limited, 1994
7. **The Oxoid Manual (7th Edition)**, compiled by Bridson E.Y., published by Unipath Limited, 1995

Идентификацијата на изолатите со изведените тестови е брза, сигурна, лесна за изведба и резултатите ги добиваме во период од 24-48 часа.

Времето потребно за комплетната процедура на изолација и идентификација на изолатите е 5 дена, што е значајно од клинички аспект, бидејќи терапијата во заболелите стада треба да почне да се применува што побрзо.

Во случаи на листериоза со нервни симптоми, можна е изолација на *L. monocytogenes*, не само од мозокот, туку и од црниот дроб, слезината и бубрегот.

Од наведените лекови на избор за лекување на листериозата кај овците и козите (*Tetracyclin* и *Chloramphenicol*), наша препорака е предност да му се даде на *Tetracyclin*.