

# **CERCETĂRI PRIVIND IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA *LISTERIEI MONOCYTOGENES* DIN UNELE ALIMENTE DE ORIGINE ANIMALĂ**

**C. CARP-CĂRARE<sup>1)</sup>, ALINA VLAD-SABIE<sup>1)</sup>**

## **REZUMAT**

Cercetările s-au efectuat pe parcursul anului 2010, pe un număr de 55 de probe de lapte și produse lactate ( brânză proaspătă de vaci, smântână și caș de oaie) și 22 de probe de carne de porc și oaie recoltate din unități de profil din diferite etape ale fluxului tehnologic, respectiv după eviscerare și după refrigerare.

Probele au fost supuse testelor microbiologice clasice, utilizând metodele de lucru din standardele naționale în vigoare, iar confirmarea s-a realizat cu ajutorul testelor de patogenitate și a galeriilor API-*Listeria*. În paralel s-a realizat și detecția specifică a tulpinilor de *Listeria monocytogenes* din probele de alimente pre-îmbogățite, printr-o metodă real-time PCR, utilizând kitul TaqMan Pathogen Detection Kits ( Applied Biosystems). Metoda utilizează primeri și o sondă specifică pentru *Listeria monocytogenes*, iar detecția se realizează prin analiza curbelor de fluorescență, controlul intern al reacției fiind detectat de un fluorofor diferit. Specificitatea metodei s-a realizat utilizând 10 tulpini non-*Listeria monocytogenes*.

Din totalul probelor analizate, prin metoda microbiologică clasică, s-au identificat și confirmat 7 tulpini de *Listeria monocytogenes* din probele de lapte și produse lactate și 5 tulpini din probele de carne de oaie și porc. Cele 12 tulpini izolate au fost identificate și prin metoda real-time PCR, eficiența testului fiind de 100%, rata fals pozitivă și rata fals negativă fiind de 0%.

Cuvinte cheie: izolarea, identificare, *Listeria monocytogenes*,  
alimente de origine animală

## **RESERCH REGARDING DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* FROM ANIMAL FOOD PRODUCTS**

### **ABSTRACT**

A number of 55 samples of milk and milk products ( traditional cheese and cream ) and 22 samples of swine and sheep meat were analyzed in the 2010 period. The meat samples were collected from slaughterhouses, from different stages, after evisceration and refrigeration.

The samples were analyzed by classical bacteriological methods, and confirm with pathogenicity tests and API –*Listeria* gallery. The specific detection of *Listeria monocytogenes* from pre-enrichment samples was realized with a real-time PCR assay, using TaqMan Pathogen Detection Kits ( Applied Biosystems). The assay use specific primers and a probe for *Listeria monocytogenes* and the detection performed by fluorescence curves analysis. The assay has also, an internal control, detected by a different probe. The specificity of the method was tested with 10 non- *Listeria monocytogenes* samples.

7 strains of *Listeria monocytogenes* were identified from milk and milk products and 5 from swine and sheep meat. The 12 *Listeria monocytogenes* strains were detected by real-time PCR also. The efficiency of the test was 100%, false positive and false negative rate were 0%.

Key words: detection, identification, *Listeria monocytogenes*,  
animal food products

#### 1) Facultatea de Medicină Veterinară Iași

În ultimii ani, *Listeria monocytogenes* s-a dovedit a fi unul din cei mai importanți agenți etiologici ai îmbolnăvirilor de natură alimentară. Rata mare a mortalității a determinat autoritățile din domeniul industriei alimentare să inițieze programe de monitorizare a acestui agent patogen și a bolii. ( O' Connor L., 2003 ).

Din primii ani de descifrare a epizootologiei și epidemiologiei listeriozei ea a fost considerată antropozoonoză și chiar "antropozoonoza viitorului ". Odată cu acumularea de noi cunoștințe și pe baza perfecționării continue a metodelor de izolare a bacteriei din diferite substraturi și materiale patologice, acest punct de vedere a fost reconsiderat. Transmitera bolii de la animale la om nu se poate exclude, deși confirmările în această direcție sunt rare, dar trebuie de subliniat faptul că sursele de infecție pentru om pot fi reprezentate de rezervoare mult mai vaste. Izolarea *L. monocytogenes* din sol, apă, de pe plante, din tubul digestiv al diferitelor specii de animale și al oamenilor clinic sănătoși și mai ales din diferite produse alimentare a demonstrat că omul se infectează prin surse mult mai variate decât cele reprezentate de animale. ( Stănescu, 1998).

Listeriile sunt mai rezistente la acțiunea factorilor de mediu decât alte bacterii nesporulate. Datorită acestor proprietăți ele pot supraviețui timp îndelungat în cele mai variate condiții din afara organismului uman și animal, păstrându-și integral mecanismele de patogenitate. Listeriile rezistă mai mult la acțiunea temperaturilor joase decât la cele ridicate, așa încât în mediul ambiant supraviețuiesc un timp mai îndelungat în anotimpurile reci decât în cele calde. Rezistă la congelări și decongelări repetate și la diferite tratamente la care sunt supuse alimentele în procesul de prelucrare. ( OIE Terrestrial Manual, 2008, Megha Gandhi, 2007 ).

Izolarea *L. monocytogenes* din alimente care conțin microfloră de asociație este mult mai dificilă și necesită îmbogățirea selectivă a probelor înainte de strierea lor pe agarele selective de izolare. La ora actuală, mediile cromogene sunt cele mai utilizate pentru identificarea prezumtivă a *Listeriei monocytogenes*. Deasemeni, testele de biologie moleculară ( tehnica PCR ) sunt frecvent utilizate pentru identificarea acestui patogen din alimente. ( Janzten, 2006, Olsen, 2000).

### MATERIALE ȘI METODE

Probele luate în studiu au fost reprezentate de 55 probe de lapte nepasteurizat și pasteurizat și produse lactate ( brânză proaspătă de vaci, smântână și caș de oaie – prelucrate din lapte nepasteurizat ) și 22 probe de carne de porc și oaie, recoltate din diferite etape ale fluxului tehnologic, respectiv după eviscerare și refrigerare. Probele au fost ambalate în pungi sterile și transportate în condiții corespunzătoare de temperatură, la 3-5°C.

Izolarea și identificarea *Listeriei monocytogenes* prin testele bacteriologice clasice:

Mediile de cultură utilizate: izolarea și identificarea tulpinilor de *Listeria monocytogenes* s-a realizat conform standardului SR ISO 11 290-1/2000. În cadrul protocolului de lucru, pentru preîmbogățire s-au omogenizat 25 g/ml produs în 225 ml bulion demi-Fraser. După o incubare de 24 de ore la 30°C, a urmat o îmbogățire secundară selectivă prin trecerea a 0,1 ml din cultura de preîmbogățire în 10 ml bulion Fraser. După o

altă perioadă de incubare la 37°C, 24 de ore, s-a realizat izolarea selectivă prin strierea a 0,1 ml de cultură pe mediile selective Palcam și Oxford. Plăcile Petri astfel însămnate s-au incubat la 35°C, timp de 24-48 de ore. Suplimentar s-a realizat și o izolare selectivă pe mediul cromogen Compass Listeria Agar. Confirmarea speciei *Listeria monocytogenes* s-a realizat prin efectuarea frotiurilor colorate Gram, reacția catalazei, testul mobilității, producerea hemolizei și testul CAMP, iar confirmarea finală cu ajutorul testelor API-*Listeria*, urmărindu-se principalele caractere biochimice.

Detectia tulpinilor de *Listeria monocytogenes* prin metoda real-time PCR

*Extracția ADN-ului bacterian:* alimentele au fost îmbogățite 24 de ore în bulion demi-Fraser. Din mediul de îmbogățire s-a realizat extracția ADN-ului bacterian, utilizând kit-ul de extracție PrepMan Ultra ( Applied Biosystems ). Din mediul lichid se transferă 100 μl cultură în tuburi Eppendorf sterile, după care se centrifughează 3 minute la 14000 rot/min, se îndepărtează supernatantul și apoi se adaugă 100 μl soluție de liză PrepMan Ultra. Se omogenizează conținutul, după care, tuburile se încălzesc la 100°C, 10 minute pentru distrugerea celulelor bacteriene și eliberarea acidului nucleic în soluție. După această încălzire, tuburile se centrifughează 3 minute la 14000 rot/min, după care, supernatantul ( soluția ADN ) este transferat în alte tuburi.

*Reacția real-time PCR* s-a realizat în plăci cu 96 de godeuri, fiecare godeu conținând: 12,5 mix-ul de reacție, 2,5 μl primerii și sondele, 7,5 μl apă ultrapură și 2,5 μl ADN și CI. Programul de amplificare a constat în denaturare la 95°C 10 min., urmată de 40 de cicluri la 95°C 20 sec. și 60°C 1 min. și s-a realizat într-un termocyclor 7500 Applied Biosystems.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Frecvența speciei *Listeria monocytogenes* a fost următoarea: din probele de lapte și produse lactate s-au izolat 7 tulpini (11,67%) : 3 (5%) din lapte nepasteurizat, 1 (1,67%) din smântână, 1 (1,67%) din brânza proaspătă de vaci și 2 (3,33%) din caș de oaie preparat din lapte nepasteurizat (tabelul nr. 1). Din laptele pasteurizat nu s-a izolat nici o tulpină, cunoscându-se de altfel ca *Listeria monocytogenes* este distrusă la 70°C în 0,3-2 minute.

**Tabel nr.1**

**Frecvența speciei *Listeria monocytogenes* în lapte și produse lactate**

Produsul	Nr. probelor examinate	Nr. probe pozitive	Nr. probe negative
Lapte nepasteurizat	18	3 ( 5,4%)	15 (27,27%)
Lapte pasteurizat	10	-	10 ( 18,18%)
Brânză proaspătă de vaci	7	1 (1,8%)	6 (10,91%)
Smântână	10	1 ( 1,8%)	9 ( 16,36%)
Caș de oaie	10	2 (3,6%)	8 ( 14,55%)
<b>Total probe examinate</b>	<b>55</b>	<b>7 ( 12,73%)</b>	<b>48 ( 87,27%)</b>

Incidența acestei bacterii a fost cercetată foarte mult în lapte și produse lactate din cauză că aceste produse au stat la baza unor episoade grave de listerioză. Contaminarea laptelui crud prezintă frecvent o sezonabilitate marcantă, în relație cu tehnicile de creștere. Incidența contaminării laptelui cu *L. monocytogenes* este relativ

redușă: 2,4% în Franța, 2,3% în Canada, 3,2% în Statele Unite ale Americii și 3,6% în Europa. ( **Bondoc I., 2007**).

În ultimii ani, anchetele epidemiologice au permis constatarea unei creșteri în ceea ce privește contaminarea cu *Listeria spp.*, la animalele domestice, în special la cele de interes zootehnic. Aceste animale purtătoare de germeni pot ușor contamina mediul ambiant și chiar carcasele în timpul fluxului tehnologic. Întrucât *Listeria monocytogenes* se multiplică foarte bine la 2-5°C, ea poate fi izolată atât pe carnea proaspătă, cât și pe cea refrigerată.

În cazul probelor reprezentate de carne, din totalul de 22 de probe, s-au izolat 5 (22,72 %) tulpini de *Listeria monocytogenes*: 1 (4,54%) din carnea de porc și 4 (18,18%) din carnea de oaie ( tabelul nr.2). Atât tulpina de pe carnea de porc, cât și cele 4 tulpini provenite de pe carnea de ovine au fost identificate după etapa de refrigerare.

**Tabel nr.2**

**Frecvența speciei *Listeria monocytogenes* în probe de carne**

Produsul	Nr. probelor examinate	Nr. probe pozitive	Nr. probe negative
Carne porc	12	1 (4,54%)	11 (50%)
Carne oaie	10	4 (18,18%)	6 (27,27%)
<b>Total probe examinate</b>	<b>22</b>	<b>5 (22,72%)</b>	<b>17 ( 77,27%)</b>

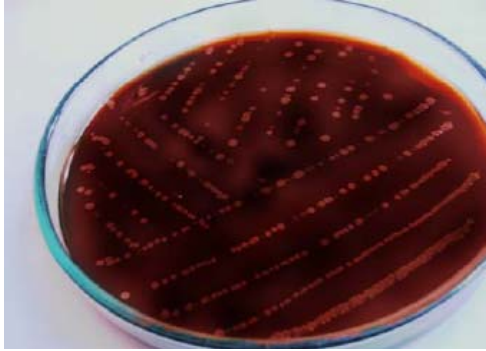
**Lovett ( 1989 )** și alți cercetători au furnizat numeroase date privind incidența *L. monocytogenes* în diverse alimente. Astfel, în carcasele de pui s-a găsit o incidență de 15-53%. Bacteria se multiplică în carnea de miel în funcție de materialul în care este ambalată și de temperatura de păstrare. Multiplicarea are loc la 0°C în ambalaje permeabile la gaze, după o incubare de 20 de zile. La 8°C în 10 zile numărul de celule bacteriene ajunge la  $10^8$ - $10^9$ /g. În aceleași condiții de ambalare și depozitare, bacteria nu se multiplică în carnea de porc.

**Mocuța și Herman ( 1997 )**, au examinat pentru detectarea *L. monocytogenes* 79 de probe de alimente diverse, prin metoda bacteriologică convențională și prin PCR. Probele au fost reprezentate de lapte crud, carne, brânzeturi. 34 ( 46,5 % ), din cele 79 de probe au fost găsite contaminate cu *Listeria spp.*, din care 8 ( 10,95 % ) cu *L. monocytogenes*. Frecvența cea mai mare de contaminare s-a înregistrat la probele de carne ( 54,14 % ) și cele de lapte crud ( 48,83 % ).

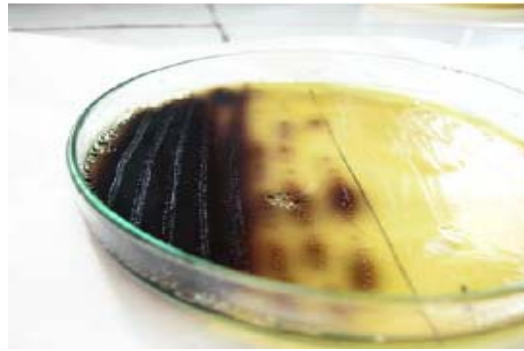
**Veloso, Reis și Trigo ( 2003 )**, într-un studiu realizat pe carcasele de bovine, privind contaminarea superficială a acestora, a stabilit că 19 ( 31,7%) din cele 60 de probe examinate erau contaminate cu *L. monocytogenes*.

Un studiu efectuat în Franța în 1985 privind incidența listeriilor în unele delicatose crude și în carnea de vită în bucăți și tocată a stabilit că 30 ( 17% ) din 175 probe examinate conțineau *Listeria spp.*, din care 14 erau *L. monocytogenes*. Bacteria s-a izolat de asemenea din 6 ( 33% ) din 18 probe de cârnați uscați sau carnea pentru cârnați, iar 4 din izolate reprezentau *L. monocytogenes*.

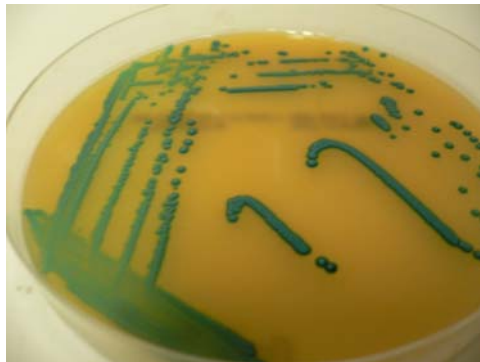
Mediile Palcam și Oxford s-au dovedit a fi intens selective. Pe aceste medii, după 24 de ore de incubare, *Listeria monocytogenes* a format colonii de culoare închisă, înconjurată de un halou negru, datorită hidrolizei esculinei ( fig.1, 2). Pe mediul cromogen *Listeria Cromogenic agar*, coloniile de *Listeria monocytogenes* au culoare turcoaz, înconjurată de un halou verzui ( fig. 3).



**Fig. nr. 1 Aspectul coloniilor de *Listeria monocytogenes* pe mediul Palcam**

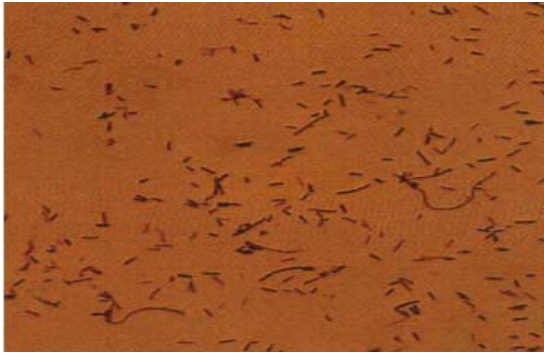


**Fig. nr. 2 Aspectul coloniilor de *Listeria monocytogenes* pe mediul Oxford**

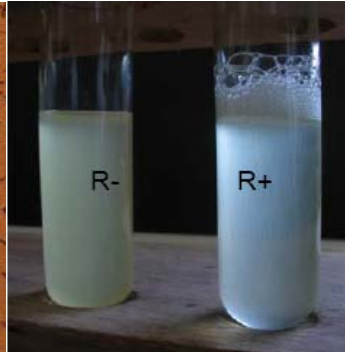


**Fig. nr. 3 Aspectul coloniilor de *Listeria monocytogenes* pe mediul *Listeria Cromogenic***

La examinarea frotiurilor efectuate din culturi și colorate Gram, s-a constatat prezența unor bacili scurți Gram-pozitivi, fără a avea o aranjare caracteristică, însă ocazional se pot observa grupări "V", "Y" sau în palisadă ( fig. nr. 4). Testul catalazei s-a efectuat prin introducerea unei anse de cultură într-o picătură de peroxid de hidrogen 3%. Toate tulpinile cercetate au reacționat pozitiv, aspect dovedit prin apariția bulelor de gaz ( fig. nr. 5).



**Fig. nr. 4** *Listeria monocytogenes* –frotiu  
din cultură ( 5X90)



**Fig. nr. 5** Testul catalazei

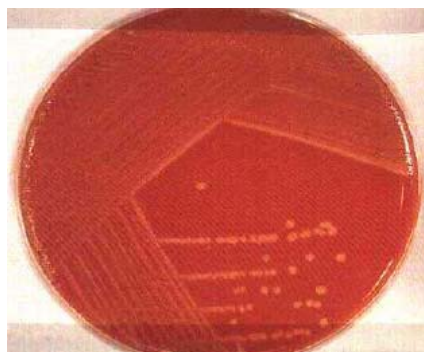
O reacție importantă pentru definirea speciilor este producerea de hemolizine, pe agarul cu sânge de oaie ( agar Columbia), știindu-se faptul că speciile din cadrul genului *Listeria* produc diferite tipuri de hemoliză.

Astfel, tulpinile de *Listeria monocytogenes* au produs colonii mici, înconjurate de o zonă clară, dar mică de hemoliză ( fig. nr.6).

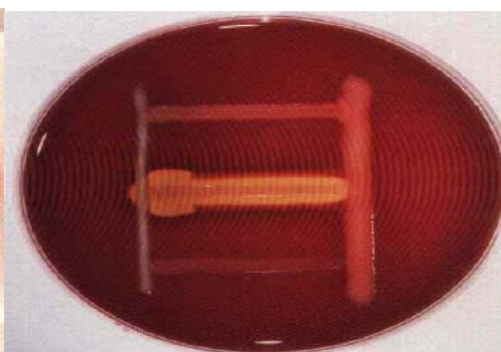
O reacție mai slabă sau mai accentuată de beta-hemoliză poate fi pusă în evidență și cu ajutorul testului CAMP. În cadrul acestui test efectuat pe agar cu sânge de oaie s-a urmărit accentuarea zonei de hemoliză a tulpinilor cercetate în prezența unor tulpini proaspete de *Staphylococcus aureus* și *Rhodococcus equi*.

Tulpinile de *Listeria monocytogenes* au manifestat o accentuare a zonei de beta-hemoliză în apropierea speciei *Staphylococcus aureus* ( fig. nr. 7).

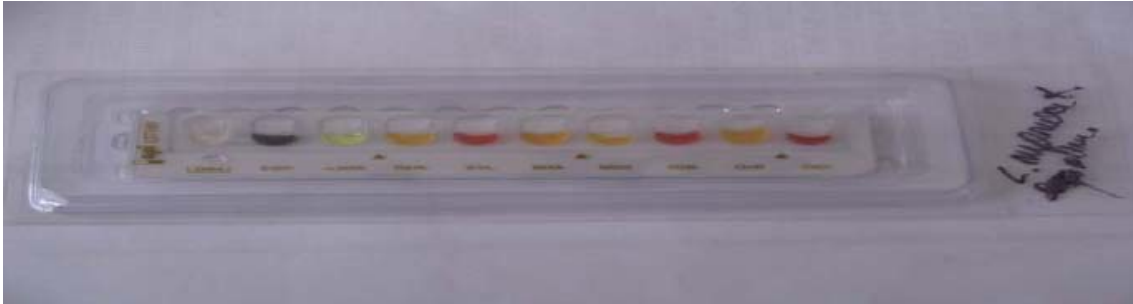
Confirmarea definitivă s-a realizat cu ajutorul testelor *Api-Listeria*, care conțin substraturi sub formă deshidratată, ce permit realizarea testelor enzimactice sau de fermentație a zaharurilor. Reacțiile produse în timpul perioadei de incubație s-au tradus prin schimbări spontane de colorație sau schimbări relevante la adăugarea reactivului ( fig. nr. 8 ). După o incubație de 24 ore la 37°C, citirea reacțiilor s-a realizat vizual cu ajutorul unui tabel de citire și identificare. Astfel, pentru glucide, *Listeria monocytogenes*: D-xiloză negativă, D-manitol negativă, L-ramnoză pozitivă, glucoză pozitivă, xiloză, inozitol, manitol, lactoza negativă, hidrolizează esulina, nu produce indol, hidrogen sulfurat, urează negativă.



**Fig. nr. 6** Aspectul coloniilor de *Listeria*  
*monocytogenes* pe agar Columbia



**Fig. nr. 7** Testul CAMP



**Fig. nr. 8 Identificarea *Listeria monocytogenes* cu ajutorul galeriilor manuale**

#### **API-Listeria**

Pentru reacția real-time PCR, s-a realizat îmbogățirea alimentelor în mediu demi-Fraser, pentru 24 de ore. Testul a dovedit o eficiență de 100%, neînregistrându-se nici o reacție de cross-amplificare în cazul celor 10 tulpini non-*Listeria monocytogenes*. Media CT ( ciclul prag de amplificare) a fost de 32,8 iar SD ( deviația standard ) de 1,1. Rata fals pozitivă și fals negativă au fost de 0%. ( tabelul nr. 3).

**Tabel nr. 3**

#### **Rezultate privind specificitatea metodei pentru *Listeria monocytogenes***

<i>Listeria monocytogenes</i>	Nr. tulpini	Rezultat	Microorganism non- <i>Listeria monocytogenes</i>	Nr. tulpini	Rezultat
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	+	<i>Aeromonas spp.</i>	1	-
			<i>Staphylococcus spp.</i>	1	-
			<i>E. coli</i>	2	-
			<i>Streptococcus spp.</i>	1	-
			<i>Pseudomonas spp.</i>	1	-
			<i>Enterobacter spp.</i>	2	-
			<i>Klebsiella spp.</i>	1	-
			<i>Listeria seeligeri</i>	1	-

#### **CONCLUZII**

1. Din rezultatele obținute se poate concluziona ca *Listeria monocytogenes* este prezentă în alimente de origine animală, în special în cele netratate termic.
2. Incidența mai mare a a tulpinilor de *Listeria monocytogenes* s-a constatat în probele de lapte nepasteurizat și produsele lactate decât în cele din carne de porc și oaie.
3. Utilizarea metodei real-time PCR în detecția speciei *Listeria monocytogenes* reduce foarte mult timpul de lucru, de la 7-9 zile , la 1-2 zile și poate fi o metodă alternativă foarte bună de a verifica prezența sau absența acestei specii bacteriene în alimente.

#### **BIBLIOGRAFIE**

1. **Bondoc I., 2007 – Tehnologia și controlul calității laptelui și produselor lactate, Vol. I, Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iași.**
2. **Carp – Cărare C., 2006 – Cercetări bacteriologice privind *Listeria monocytogenes* și implicațiile sale epidemiologice, Teză de doctorat, FMV Iași.**
3. **Gandhi M., Chikidas M., 2007- *Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive*, International Journal of food Microbiology, Vol. 113, pg. 1-15.**
4. **Janzten M., Navas J., Corujo A., Moreno R., Lopez V., Martinez-Suarez J., V., 2006 – Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods:from chromogenic media to real-time PCR, Spanish Journal of Agricultural Research, 4(3), pg.235-247.**
5. **Lovett J., 1989 – *Listeria monocytogenes*. In "Foodborne bacterial pathogens", Ed. M. Dekker Inc. New York, pg. 283-310.**
6. **Mocuța N., Herman L., 1997 – Cercetarea prevalenței contaminării cu *Listeria spp.* a unor alimente prin metoda standard și prin tehnica PCR, Lucrările Congresului al VII- lea de Medicină Veterinară, 21-24 oct., Voineasa.**
7. **O' Conuor L., 2003 – Detection of *Listeria monocytogenes* using a PCR / DNA probe assay, Methods in Molecular Biology.**
8. **Olsen S., E., 2000 – DNA based methods for detection of food – borne bacterial pathogens, Food Research International, Vol. 33, pg. 257-266.**
9. **OIE Terrestrial Manual, 2008 – *Listeria monocytogenes*, Chapter 2.9.7. pg. 1238-1254.**
10. **Stănescu V., 1998 – Igiena și controlul alimentelor, Ed. Fundației România de mâine, București.**
11. **Veloso M., G., Reis C., Trigo M., 2003 – Microbiological contamination of beef carcass during slaughter.Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 32, pg. 26-32.**