

Sinteza rezultatelor

Programul CNCISIS	RESURSE UMANE
Tipul proiectului	Proiecte de cercetare postdoctorală
Cod proiect	PD_377
Contractul de finanțare	Nr.197/2010
Perioada	2010-2012

Titlul proiectului: „Cercetări bacteriologice și de biologie moleculară privind identificarea unor serotipuri de *Listeria monocytogenes* din alimente de origine animală și non-animală.”

Director de proiect: Șef de lucrări dr. Cătălin Carp-Cărare

1. Obiectiv

Principalul obiectiv al acestei etape este izolarea și identificarea unor tulpini de *Listeria monocytogenes* din alimente de origine animală și non-animală prin testele microbiologice clasice, utilizând metodele de lucru din standardele naționale în vigoare.

2. Material și metodă

Recoltarea probelor de origine animală și non-animală luate în analiză

Probele de origine animală luate în studiu au fost repartizate în 2 loturi:

- 55 de probe lapte nepasteurizat și pasteurizat și produse lactate (brânză proaspătă de vaci, smântână și caș de oaie);
- 40 carne de porc, oaie și melc;

Probele de origine non-animală au fost reprezentate de diferite legume. S-au luat în studiu un număr de 25 de probe.

Tehnica de lucru

Probele de lapte nepasteurizat și de produse lactate au fost recoltate din sectorul particular, iar cele din lapte pasteurizat au fost achiziționate din comerț.

Probele de carne de porc și oaie au fost recoltate din abatoare, din diferite etape ale fluxului tehnologic, iar cele de carne de melc au fost recoltate din crescătorii.

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. Câteva medii de îmbogățire selectivă sunt: bulionul USDA-FSIS numit și LEB-1 (*Listeria enrichment broth*), LEB- 2, bulionul FDA, agarul McBride, agarul LPM. Nici agarul McBride nici LPM nu conțin substanțe chimice care să permită identificarea prezumtivă diferențială a coloniilor de

Listeria prin aspect sau culoare. Aceste medii au culoarea agarului nutritiv simplu, iar coloniile de *Listeria* dezvoltate pe suprafața lor sunt mici și incolore, asemănătoare cu cele ale streptococilor cu care se confundă de obicei.

Agarul PALCAM și OXFORD încearcă să înlăture acest inconvenient prin încorporarea în mediu a unor agenți de diferențiere. Astfel, pe agarul PALCAM coloniile de *Listeria spp.* apar colorate în gri-verzui, cu diametrul de 2 mm și centrul negru și concav și au un halou negru pe fondul roșu-vișiniu al mediului. Pe agarul Oxford coloniile de *Listeria spp.* apar negre, cu diametrul de 1-2 mm după o incubare de 24 de ore, și de 3 mm după o incubare de 48 de ore, înconjurată de un halou negru. La ora actuală există medii cromogene (Ottaviani – Agosti, *Listeria* Cromogenic Agar), care diferențiază foarte ușor *Listeria monocytogenes* de celelalte specii de *Listeria*.

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.

În cazul probelor de carne de melc, 5 g carne s-au îmbogățit în 25 ml mediu 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 însămânțate s-au incubat la 35°C, timp de 24-48 de ore. Suplimentar s-a realizat și o izolare selectivă pe mediul cromogen *Listeria* Cromogenic 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 10 caractere biochimice.

3. Rezultate și discuții

Frecvența speciei *Listeria monocytogenes* a fost următoarea: din probele de lapte și produsele 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%)
Total probe examinate	55	7 (12,73%)	48 (87,27%)

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 40 de probe, s-au izolat 15 (37,5 %) tulpini de *Listeria monocytogenes*: 1 (2,5%) din carnea de porc, 4 (10%) din carnea de oaie și 10 (25 %) din carnea de melci (tabelul nr.2). Atât tulpina de pe carnea de porc, cât și 2 din tulpinile de pe carnea de ovine au fost identificate în carne refrigerată.

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 (2,5%)	11 (27,5%)
Carne oaie	10	4 (10%)	6 (15%)
Carne melc	18	10 (25%)	8 (20%)
Total probe examinate	40	15 (37,5%)	25 (62,5%)

Frecvența mare a probelor de carne de melc contaminate cu *Listeria monocytogenes* se datorează faptului ca germele își are habitatul pe sol, iar crescătoriile de melci practică creșterea la sol a acestora, posibilitățile de contaminare fiind mult mai mari față de alte specii.

În probele de origine non-animală nu s-a detectat nici o tulpină de *Listeria monocytogenes*, acestea fiind achiziționate din comerț.

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, înconjurate de un halou negru, datorită hidrolizei esculinei (fig.1, 2). Pe mediul cromogen *Listeria* Cromogenic agar, coloniile de *Listeria monocytogenes* au culoare turcoaz, înconjurate de un halou verzui (fig. 3).

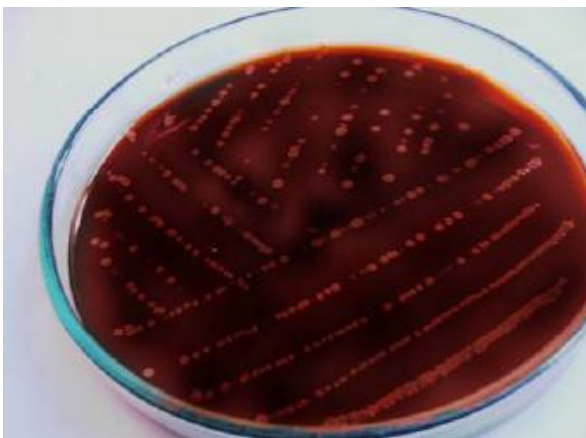


Fig. nr. 1 Aspectul coloniilor de *Listeria monocytogenes* pe mediul Palcam

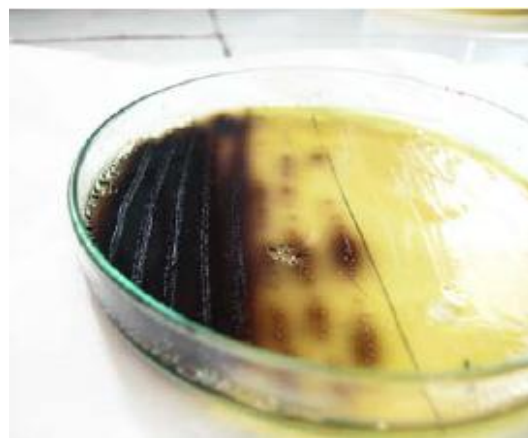


Fig. nr. 2 Aspectul coloniilor de *Listeria monocytogenes* pe mediul Oxford

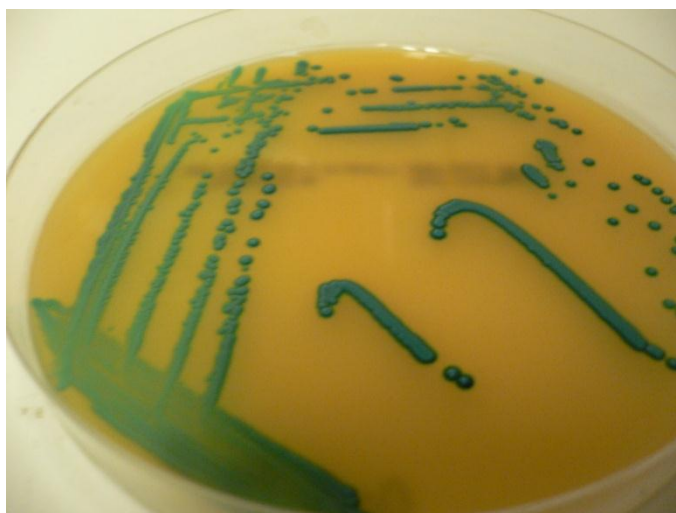


Fig. nr. 3 Aspectul coloniilor de *Listeria monocytogenes* pe mediul *Listeria* Cromogenic agar

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)

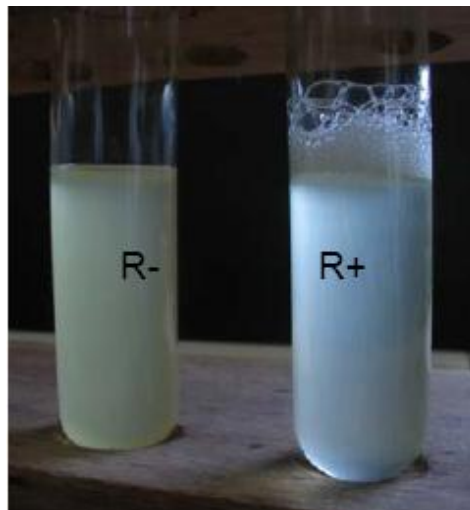


Fig. nr. 5 Testul catalazei

Pentru confirmarea și identificarea speciei *Listeria monocytogenes*, tulpinile care au reacționat caracteristic la testele de mai sus (colorația Gram, testul catalazei și mobilitatea la 25°C), s-au supus testelor de hemoliză și CAMP, confirmarea definitivă făcându-se cu ajutorul testelor biochimice API.

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).

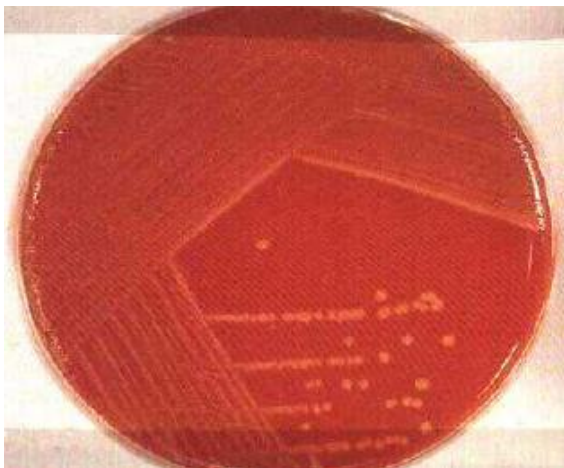


Fig. nr. 6 Aspectul coloniilor de *Listeria monocytogenes* pe agar Columbia

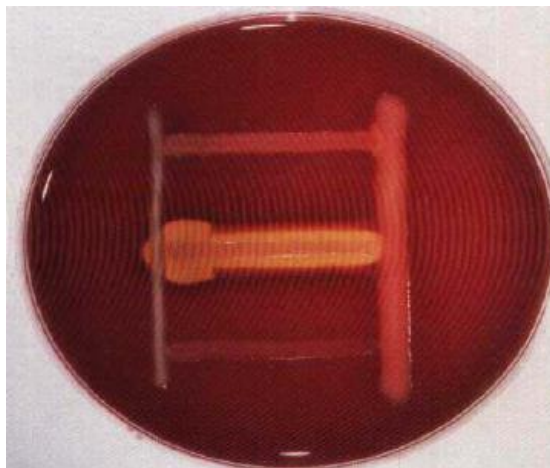


Fig. nr. 7 Testul CAMP

Confirmarea definitivă s-a realizat cu ajutorul testelor *Api-Listeria*, care conțin substraturi sub formă deshidratată, ce permit realizarea testelor enzimatică 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 esculina, nu produce indol, hidrogen sulfurat, urează negativă.

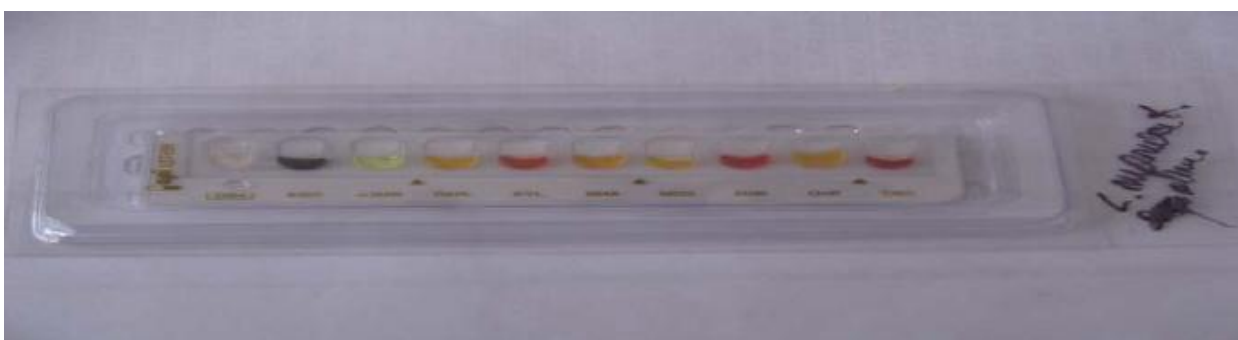


Fig. nr. 8 Identificarea *Listeria monocytogenes* cu ajutorul galeriilor manuale

API-Listeria

Din rezultatele obținute se poate concluziona ca *Listeria monocytogenes* este prezentă în alimente de origine animală, în special în cele netratate termic.

Ulterior, tulpinile izolate vor fi serotipizate și detectate prin tehnicile de biologie moleculară PCR și PCR real-time.

Director proiect,

Șef lucrări dr. Cătălin Carp-Cărare