

## REZUMAT

### **Studiul în culturi de celule a virulenței unor tulpini de *Listeria monocytogenes* întâlnite în industria produselor lactate**

Student doctorand,  
Luminița Pricope

Coordonator științific,  
Prof.dr.ing. Anca Nicolau

# CUPRINS

## STUDIUL ÎN CULTURI DE CELULE A VIRULENȚEI UNOR TULPINI DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ÎNTÂLNITE ÎN INDUSTRIA PRODUSELOR LACTATE

### CUPRINS

#### OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE

#### STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

#### CAPITOLUL II - MATERIALE ȘI METODE

##### METODE

##### *2.1. Metode de evaluare a virulenței bacteriene*

#### CAPITOLUL III – STUDIUL PROCESULUI SPECIFIC DE ADEZIUNE, INVAZIE ȘI PROLIFERARE AL *LISTERIEI MONOCYTOGENES IN VITRO*

##### 3.1. REZULTATE ȘI DISCUȚII

##### *3.1.1. Evaluarea influenței concentrației de gentamicină asupra testelor de virulență*

##### *3.1.2. Evaluarea influenței timpului de infecție și de proliferare intracelulară asupra performanțelor testelor de virulență*

##### *3.1.3. Evaluarea influenței multiplicității de infecție asupra performanțelor testelor de virulență*

##### *3.1.4. Evaluarea influenței stadiului de creștere asupra performanțelor testelor de virulență*

##### 3.2. CONCLUZII PRELIMINARE

#### CAPITOLUL IV – INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI SUBLETALE DE DEZINFECTANȚI ASUPRA VIRULENȚEI *LISTERIEI MONOCYTOGENES IN VITRO*

##### 4.1. REZULTATE ȘI DISCUȚII

##### *4.1.1. Estimarea efectului toxic al clorurii de benzalconiu asupra celulelor umane*

##### *4.1.2. Evaluarea efectului diferitelor concentrații de clorură de benzalconiu asupra viabilității *Listeria monocytogenes**

##### *4.1.3. Evaluarea viabilității *Listeria monocytogenes* după 30 minute de termostatare în prezența concentrației subletale de BAC*

##### *4.1.4. Evaluarea virulenței *Listeria monocytogenes in vitro* după termostatare în prezența concentrației subletale de BAC*

##### *4.1.5. Evaluarea persistenței efectului al clorurii de benzalconiu asupra virulenței *Listeria monocytogenes**

##### 4.2. CONCLUZII PRELIMINARE

#### CAPITOLUL V – INFLUENȚA LAPTELUI ASUPRA VIRULENȚEI *LISTERIEI MONOCYTOGENES IN VITRO*

### 5.3. REZULTATE

*5.3.1. Viabilitatea celulelor de Listeria monocytogenes în lapte*

*5.3.2. Evaluarea virulenței tulpinilor de Listeria monocytogenes după incubare în lapte*

*5.3.3. Evaluarea influenței temperaturii de depozitare a laptelui asupra virulenței Listeriei monocytogenes*

*5.3.4. Evaluarea influenței duratei de depozitare a laptelui asupra virulenței Listeriei monocytogenes*

*5.3.5. Evaluarea influenței conținutului de grăsime al laptelui asupra virulenței Listeriei monocytogenes*

*5.3.6. Evaluarea influenței conținutului de lactoză al laptelui asupra potențialului virulent al Listeriei monocytogenes*

*5.3.7. Evaluarea influenței conținutului de cazeină al laptelui asupra potențialului virulent al Listeriei monocytogenes*

*5.3.8. Evaluarea influenței tratamentului de pasteurizare al laptelui asupra potențialului virulent al Listeriei monocytogenes*

*5.3.9. Evaluarea virulenței tulpinilor de Listeria monocytogenes după incubare în lapte crud*

### 5.4. CONCLUZII PRELIMINARE

## **CAPITOLUL VI – EVALUAREA RISCULUI PENTRU COMBINAȚIA LISTERIA MONOCYTOGENEA - LAPTE PASTEURIZAT**

6.1. REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.2. CONCLUZII

### **CONCLUZII GENERALE**

### **DISEMINAREA REZULTATELOR**

### **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

## Obiectivele științifice

**Obiectivul major** al tezei de doctorat este reprezentat de studiul în culturi de celule a virulenței unor tulpini de *Listeria monocytogenes* întâlnite în industria produselor lactate.

Din obiectivul major al studiului derivă o serie de **obiective specifice**:

- Investigarea procesului specific de aderare, invazie și proliferare intracelulară a fenotipurilor virulente de *L. monocytogenes* prin metode de cultivare celulară. Se urmărește optimizarea testele de virulență *in vitro*, cu stabilirea unor valori optime pentru timpul de infecție și de proliferare, pentru multiplicitatea de infecție și concentrația de gentamicină.
- Studierea efectului concentrației subletale de dezinfectanți utilizați în industria produselor lactate asupra capacității de invazie și proliferare a tulpinilor de *L. monocytogenes*.
- Stabilirea influenței condițiilor de creștere din lapte asupra virulenței tulpinilor de *L. monocytogenes* în corelație cu condițiile de depozitare ale laptelui și compoziția laptelui (conținut de grăsime, lactoză, cazeină), dar și cu tratamentul termic aplicat laptelui, în cazul contaminării post-pasteurizare.
- Evaluarea riscului asociat consumului de lapte pasteurizat contaminat cu *L. monocytogenes* în etapele de procesare post-pasteurizare.

## Structura tezei de doctorat

PARTEA DOCUMENTARĂ a tezei este reprezentată de **Capitolul I** ce cuprinde patru subcapitole în care este realizată o prezentare a studiilor din literatura de specialitate cu referire la caracteristicile generale ale speciei *L. monocytogenes* ca patogen de origine alimentară, a caracteristicilor de virulență și a factorilor de virulență implicați în procesul infecțios al bacteriei. Totodată în partea documentară este cuprinsă o prezentare a focarelor de listerioză recente relaționate cu produsele lactate și a modalităților de control ale *L. monocytogenes* în industria laptelui.

**Capitolul II** – prezintă materialele și metodele utilizate pentru realizarea părții experimentale a tezei de doctorat. În secțiunea MATERIALE sunt prezentate tulpinile

bacteriene, mediile de cultură și reactivii utilizați, în timp ce în secțiunea METODE sunt prezentate metodele de cultivare celulară utilizate în cadrul experimentelor realizate, precum și etapele principale ale unui test de virulență cu calcularea indicilor de virulență specifici.

PARTEA EXPERIMENTALĂ este cuprinsă în **Capitolele III – VI** structurate în 4 subcapitole: introducere, metode, rezultate și discuții și concluzii preliminare.

În **Capitolul III** – intitulat „Studiul procesului specific de adeziune, invazie și proliferare al *Listeria monocytogenes in vitro* “ se realizează optimizarea testelor de virulență *in vitro* prin evaluarea influenței diferitelor concentrații de gentamicină, a timpului de infecție și a timpului de proliferare, a influenței multiplicărilor de infecție utilizate dar și a stadiului de creștere al tulpinii bacteriene asupra performanțelor testelor de virulență. Este utilizată drept tulpină de referință tulpina *L. monocytogenes* EGDe iar testele de virulență sunt realizate prin utilizarea celulelor epiteliale Caco-2.

**Capitolul IV** – “Influența concentrației subletale de dezinfectanți asupra virulenței *Listeria monocytogenes in vitro*” prezintă rezultatele obținute privind efectul concentrației subletale de clorură de benzalconiu asupra capacității de invazie și proliferare intracelulară a patru tulpini diferite de *L. monocytogenes* prin utilizarea a trei linii celulare umane implicate în procesul infecțios al bacteriei: celule epiteliale, Caco-2, hepatocite, HepG2 și celule ale sistemului imunitar - macrofagi, THP-1.

**Capitolul V** denumit „Influența laptelui asupra virulenței *Listeria monocytogenes in vitro*” prezintă rezultatele obținute după studierea potențialului virulent a patru tulpini de *L. monocytogenes* după incubare în lapte, în diferite condiții de temperatură și timp, prin evaluarea capacității de adeziune, invazie și proliferare intracelulară a bacteriei utilizând celule epiteliale Caco-2. De asemenea a fost evaluată și influența conținutului de grăsime, de cazeină și lactoză din lapte asupra virulenței *L. monocytogenes* precum și efectul tratamentului de pasteurizare și a intensității acestuia asupra potențialului virulent al bacteriei prezentă în lapte prin contaminare post-pasteurizare.

În **Capitolul VI** „Evaluarea riscului pentru combinația *Listeria monocytogenea* - lapte pasteurizat” a fost utilizat un model de evaluare cantitativă a riscului asociat consumului de lapte pasteurizat contaminat cu *L. monocytogenes* post-pasteurizare fiind prezentat numărul de îmbolnăviri cauzate de acest patogen în patru scenarii diferite din

punct de vedere al populației țintă și a preferințelor de consum. Acest capitolul subliniază importanța utilizării datelor privind potențialul virulent al *L. monocytogenes* în evaluarea corectă și cât mai apropiată de realitate a riscului asociat cu consumul de lapte pasteurizat.

Teza de doctorat se încheie cu un capitol de CONCLUZII GENERALE ce sintetizează concluziile întregii părți experimentale. Sunt prezentate de asemenea contribuțiile originale și impactul asupra dezvoltării cunoașterii în acest domeniu dar și viitoarele perspective de continuare a cercetărilor și diseminarea rezultatelor pe perioada programului de studii doctorale.

Activitățile de cercetare realizate în partea experimentală a tezei de doctorat au fost desfășurate în:

- laboratoarele din cadrul Institutului de Igiena Laptelui, Universitatea de Medicină Veterinară, Viena, Austria;
- laboratorul de analize microbiologice din cadrul centrului de cercetare Biotehnologii în Industria Alimentară și Acvacultură, Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos, Galați, România.

Activitatea de cercetare a fost realizată cu sprijinul acordat de următoarele proiecte:

- SOP HRD – EFICIENT 61445/2009 din cadrul Universității Dunărea de Jos, Galați România.
- Wiener Wirtschaftskammer Preis 2010 din cadrul Institutului de Igiena Laptelui, Universitatea de Medicină Veterinară, Viena, Austria.

## Capitolul II - Materiale și metode

### MATERIALE

Toate materialele utilizate pentru realizarea cercetărilor au fost puse la dispoziție de către Institutul de Igiena Laptelui din Viena.

1. Tulpini bacteriene
2. Lapte
3. Linii celulare
4. Medii de cultură
5. Reactivi

### METODE

1. Metode utilizate în cultivarea liniilor celulare
2. Metode de evaluare a virulenței bacteriene
3. Metode de analiza statistică

### **METODE**

#### **2.1. Metode de evaluare a virulenței bacteriene**

Virulența bacteriană este evaluată *in vitro* prin realizarea de teste de virulență și determinarea capacității bacteriilor de a adera, invada și prolifera în interiorul celulelor umane. Comparativ cu metodele de determinare a patogenității *in vivo* utilizarea testelor de virulență *in vitro* reprezintă o alternativă eficientă pentru analiza virulenței bacteriene. Etapele principale ale unui test de virulență sunt reprezentate în figura 2.4.

Numărul de bacterii a fost exprimat ca unități formatoare de colonii (ufc)/ml, fiind calculat după formula 2.1.

$$\text{ufc/ml} = N * d * 10 \quad \text{[Formula 2. 1]}$$

N – numărul de colonii numărat în plăci

d – factor de diluție

Formule de calcul ale indicilor de virulență:

$$\text{ADEZIUNE\%} = \frac{\text{Nr.bacterii} \cdot \text{dupa} \cdot \text{incubare} \cdot \text{si} \cdot \text{liza} \cdot \text{celuleor} \cdot \text{Caco} - 2}{\text{Nr.bacterii} \cdot \text{inoculate}} * 100$$

[Formula 2. 2]

$$\text{INVAZIE\%} = \frac{\text{Nr.bacterii} \cdot \text{dupa} \cdot \text{incubare} \cdot 45 \text{ min} \cdot \text{si} \cdot \text{liza} \cdot \text{celulelor} \cdot \text{Caco} - 2}{\text{Nr.bacterii} \cdot \text{inoculate}} * 100$$

[Formula 2. 3]

$$\text{PROLIFERARE\%} = \frac{\text{Nr.bacterii} \cdot \text{dupa} \cdot \text{proliferare} \cdot \text{si} \cdot \text{liza} \cdot \text{celulelor} \cdot \text{Caco} - 2}{\text{Nr.bacterii} \cdot \text{inoculate}} * 100$$

[Formula 2. 4]

$$\text{MULTIPLICARE} \cdot \text{INTRACELULARA} = \frac{\text{INVAZIE\%}}{\text{PROLIFERARE\%}}$$

[Formula 2. 5]



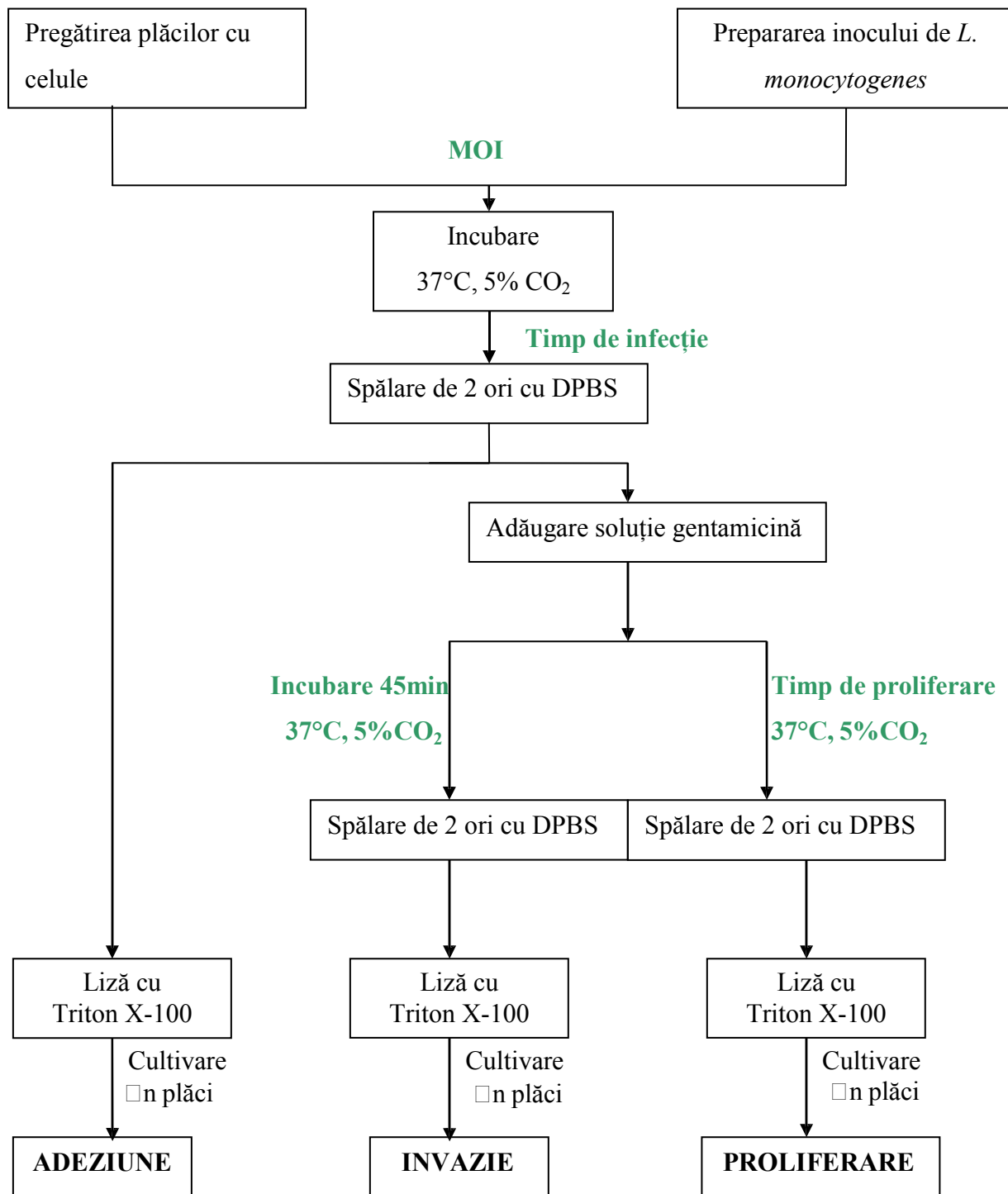


Figura 2. 1 – Etapele principale ale unui test de virulență

\*MOI – multiplicitate de infecție

## **Capitolul III – Studiul procesului specific de adeziune, invazie și proliferare al *Listeriei monocytogenes in vitro***

### **3.1. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

#### **3.1.1. Evaluarea influenței concentrației de gentamicină asupra testelor de virulență**

Utilizarea gentamicinei în testele de virulență are la bază două motive. Pe de o parte, este bine cunoscută eficiența gentamicinei împotriva bacteriilor, inclusiv a *L. monocytogenes*, iar, pe de altă parte, gentamicina nu este toxică pentru celulele Caco-2. Mai mult decât atât, gentamicina nu poate să intre în interiorul celulelor Caco-2 fiind, astfel, eficientă doar împotriva bacteriilor care se găsesc în spațiul extracelular, fără a afecta viabilitatea bacteriilor intracelulare (Francis și Thomas, 1996).

Au fost testate prin metoda cultivării în plăci următoarele concentrații de gentamicină: 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l și 1000 mg/l. În urma rezultatelor obținute concentrația de gentamicină necesară pentru eliminarea celulelor din mediul extracelular de *L. monocytogenes*, ce a fost utilizată în testele de virulență ulterioare, a fost de **100 mg/l**.

#### **3.1.2. Evaluarea influenței timpului de infecție și de proliferare intracelulară asupra performanțelor testelor de virulență**

Timpul de infecție reprezintă timpul necesar *L. monocytogenes* să adere și să invadeze celulele epiteliale umane.

Conform rezultatelor obținute (tabelul 3.2) pentru tulpina EGDe a *L. monocytogenes* este suficient un timp de infecție de 30 minute pentru ca un număr suficient de bacterii să adere și să invadeze celulele Caco-2, însă se observă că pe măsura creșterii timpului de incubare, de la 30 minute la 1 oră și respectiv 2 ore, un număr semnificativ mai mare de *L. monocytogenes* (testul t,  $p < 0,05$ ) au fost recuperate după adeziune și invazie.

Potențialul virulent al *L. monocytogenes* este caracterizat, nu doar de capacitatea acesteia de a adera și invada celulele umane, ci și de capacitatea de a se multiplica în mediul

intracelular și de a se răspândi de la o celulă la alta. Se observă după 4 ore de proliferare indiferent de timpul de infecție utilizat, o creștere de 61% și respectiv 76% pentru indicele de proliferare obținut după 1 oră și respectiv 2 ore de infecție comparativ cu 30 de minute.

În ceea ce privește timpul de proliferare de 24 de ore, valorile obținute sunt mai mici comparativ cu cele obținute după 4 ore de proliferare pentru toți trei timpii de infecție testați. Mai mult pentru timpul de infecție de 2 ore indicele de proliferare obținut după 24 de ore este mai mic decât indicele de invazie

Tabelul 3. 1 - Influența timpului de incubare și proliferare asupra indicilor de virulență

<i>Index</i>	<i>Timp de incubare</i>		
	<b>30 min</b>	<b>1 oră</b>	<b>2 ore</b>
<b>Adeziune %</b>	3,48	6,33	15,48
<b>Invazie %</b>	0,24	0,66	2,58
<b>Proliferare % - 4 ore</b>	0,90	2,31	3,70
<b>Proliferare % - 24 ore</b>	0,27	0,86	0,51

### 3.1.3. Evaluarea influenței multiplicității de infecție asupra performanțelor testelor de virulență

Multiplicitatea de infecție reprezintă un factor foarte important în realizarea de teste de virulență reproductibile. Multiplicitatea de infecție reprezintă raportul dintre numărul de celule de *L. monocytogenes* și numărul de celule Caco-2.

Din valorile indicelui de adeziune obținute pentru cele trei multiplicități de infecție, tabelul 3.3, se confirmă faptul că pentru un MOI 25 valoarea obținută este de aproximativ 2 ori mai mare decât pentru MOI 10.

În cazul indicelui de invazie, au fost obținute valori apropiate pentru MOI 10 și 25 fără diferență statistică între ele. Însă, pentru MOI 100 valoarea acestui indice este redusă semnificativ (testul t,  $p < 0,05$ ). Mai mult valoarea indexului de proliferare este mai mică decât a celui de invazie, ceea ce arată că bacteriile nu numai că nu au proliferat în interiorul

celulelor ci și-au pierdut viabilitatea pentru MOI 100.

Tabelul 3. 2 - Influența multiplicității de infecție asupra indicilor de virulență

<i>Index</i>	<b><i>Multiplicitate de infecție</i></b>		
	<b><i>10</i></b>	<b><i>25</i></b>	<b><i>100</i></b>
<b>Adeziune %</b>	7,65	14,47	10,12
<b>Invazie %</b>	1,53	1,42	0,67
<b>Proliferare %</b>	2,98	1,88	0,43
<b>Creștere intracelulară</b>	1,95	1,33	0,65

#### 3.1.4. Evaluarea influenței stadiului de creștere asupra performanțelor testelor de virulență

Tabelul 3. 3 - Influența fazei de creștere a bacteriei asupra indicilor de virulență

<i>Index</i>	<b>Faza de creștere</b>	
	logaritmică	staționară
	( $DO_{600} \approx 0.4$ )	( $DO_{600} > 1.5$ )
<b>Adeziune %</b>	1,55	1,51
<b>Invazie %</b>	0,60	1,37
<b>Proliferare %</b>	2,48	5,19
<b>Creștere intracelulară</b>	4,13	3,78

Din datele prezentate în tabelul 3.4 se observă că indicele de adeziune are aproximativ aceeași valoare pentru cele două faze de creștere studiate însă indicele de invazie și respectiv proliferarea sunt de peste 2 ori mai mari în fază staționară decât în fază de creștere logaritmică. Deși un număr mai mic de bacterii, aflate în fază logaritmică, reușesc să invadeze celulele epiteliale, în momentul în care ajung în mediul intracelular se multiplică și se

răspândesc de la o celulă la alta la un nivel cu 10% mai ridicat decât celulele în fază de creștere staționară.

### **3.2. CONCLUZII PRELIMINARE**

Rezultatele obținute demonstrează atât importanța timpului de incubare și proliferare precum și a multiplicității de infecție în analiza virulenței *L. monocytogenes* exprimată prin capacitate bacteriei de a adera, invada și prolifera în interiorul celulelor umane. Mai mult potențialul virulent este influențat și de stadiul de creștere al bacteriei în momentul infectării celulelor epiteliale.

Astfel pentru testele de virulență realizate se recomandă a se utiliza:

- timpul de infecție de **1 oră**;
- timpul de proliferare de **4 ore**;
- multiplicitatea de infecție de **25**;

În ceea ce privește stadiul de creștere al bacteriei, pe de o parte, în faza staționară factorii de virulență sunt mai puternic exprimați, astfel că bacteriile sunt mai virulente, dar, pe de altă parte, bacteriile sunt mai ușor de controlat și mai uniforme din punct de vedere al proprietăților morfologice și chimice în fază logaritmică cu o reproductibilitate mai mare a rezultatelor obținute.

## **Capitolul IV – Influența concentrației subletale de dezinfectanți asupra virulenței *Listeriei monocytogenes* in vitro**

### **4.1. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

#### **4.1.1. Estimarea efectului toxic al clorurii de benzalconiu asupra celulelor umane**

Testele de citotoxicitate cuantifică cantitatea de celule ce și-au pierdut viabilitatea, ca urmare a efectului toxic al compușilor de mediu, prin măsurarea cantității de LDH eliberată în mediu datorită pierderii integrității membranei celulare.

A fost observat faptul că BAC nu are efect toxic asupra celulelor Caco-2 deoarece o cantitate relativ redusă de LDH a fost măsurată la toate concentrațiile de dezinfectant utilizate. Așadar, 99% dintre celulele Caco-2 își mențin viabilitatea chiar și după expunere la concentrații de 10 mg/l BAC.

#### **4.1.2. Evaluarea efectului diferitelor concentrații de clorură de benzalconiu asupra viabilității *Listeriei monocytogenes***

A fost observat că efectul clorurii de benzalconiu asupra viabilității celulelor de *L. monocytogenes* este diferit în funcție de tulpina bacteriană analizată. Tulpina EGDe a arătat cea mai ridicată susceptibilitate la prezența BAC în mediul de incubare, urmată de tulpina LM 3. Tulpinile LM 1 și LM 2 s-au dovedit a fi mai rezistente la prezența BAC fiind capabile să se multiplie și la concentrații de 2,5 mg/l chiar dacă la un nivel semnificativ redus comparativ cu proba martor.

La o concentrație de 5 mg/l BAC nu a fost observată creștere microbiană pentru niciuna dintre tulpinile analizate.

#### 4.1.3. Evaluarea viabilității *Listeriei monocytogenes* după 30 minute de termostatare în prezența concentrației subletale de BAC

A fost studiat efectul BAC asupra viabilității celulelor de *L. monocytogenes* prin metoda cultivării în plăci. Pentru a simula procesele de dezinfecție incorect realizate în mediul de procesare al alimentelor, ceea ce duce la expunerea patogenilor la concentrații subletale de dezinfectant, cele patru tulpini de *L. monocytogenes* au fost termostatate timp 30 minute cu o concentrație de 1,25 mg/l BAC, după care au fost cultivate în plăci Petri pe mediu TSA+Y și a fost determinat numărul de celule bacteriene viabile conform formulei 2.1.

Tabelul 4. 1 – Viabilitatea *Listeriei monocytogenes* după expunere la BAC

Tulpina	ufc/ml	
	Martor	BAC
EGDe	$(1,39 \pm 0,57) \times 10^8$	$(0,99 \pm 0,03) \times 10^8$
LM 1	$(2,40 \pm 0,72) \times 10^8$	$(1,89 \pm 0,55) \times 10^8$
LM 2	$(1,92 \pm 0,50) \times 10^8$	$(1,62 \pm 0,40) \times 10^8$
LM 3	$(1,57 \pm 0,50) \times 10^8$	$(1,15 \pm 0,55) \times 10^8$

Incubarea pe termen scurt, 30 minute, cu o concentrație subletală de dezinfectant a condus la diminuarea cu mai puțin de o unitate logaritmică a numărului de bacterii pentru toate cele patru tulpini studiate (tabelul 4.2). Tulpina LM 2 s-a dovedit a fi cea mai rezistentă cu o rată de supraviețuire de  $85 \pm 2\%$  fiind urmată de LM 1 cu  $79 \pm 1\%$ . Tulpinile EGDe și LM 3 au arătat rezistență similară la prezența BAC cu o rată de supraviețuire de  $73 \pm 7\%$  și respectiv  $69 \pm 2\%$ .

Studiind viabilitatea tulpinilor de *L. monocytogenes* după incubare cu 1,25 mg/l BAC, a fost observat că tulpinile ce s-au adaptat la prezența dezinfectantului în mediul de incubare, LM 1 și LM 2, s-au dovedit a fi mai rezistente față de BAC.

#### **4.1.4. Evaluarea virulenței *Listeriei monocytogenes in vitro* după termostatare în prezența concentrației subletale de BAC**

După 30 minute și 24 de ore de expunere la stresul creat de 1,25 mg/l BAC a fost evaluat:

- efectul BAC asupra capacității de invazie;
- efectul BAC asupra indicilor de virulență.

Rezultatele obținute au arătat că incubarea *L. monocytogenes* cu o concentrație subletală de BAC pentru timp scurt, a redus abilitatea de invazie a bacteriei, dar a crescut indicele de multiplicare intracelulară pentru toate tulpinile studiate și în toate liniile celulare utilizate. Mai mult, o scădere semnificativă în capacitatea de invazie a bacteriei a fost observată doar pentru tulpinile ce s-au dovedit a fi mai puțin rezistente la prezența clorurii de benzalconiu, în timp ce pentru tulpinile cu rezistență mai mare a fost observată o scădere nesemnificativă. Incubarea timp de 24 de ore cu o concentrație subletală de BAC a dus la scăderea semnificativă a capacității de invazie pentru toate cele patru tulpini de *L. monocytogenes* când au fost utilizate celule epiteliale și hepatocite. Pentru fagocite cele două tulpini ce s-au dovedit a avea o rezistență ridicată la dezinfectanți au avut o capacitate de invazie mai mare după 24 de ore de incubare în prezența BAC.

Totodată efectul pozitiv al BAC asupra indicelui de multiplicare intracelulară a fost mai mare pentru tulpinile de *L. monocytogenes* mai sensibile la prezența BAC. Aceste rezultate subliniază faptul că susceptibilitatea *L. monocytogenes* depinde de tulpina studiată și de concentrația de BAC adăugată.



4.1.4.1. Virulența *Listeriei monocytogenes* după 30 minute de termostatare în prezența cloruri de benzalconiu

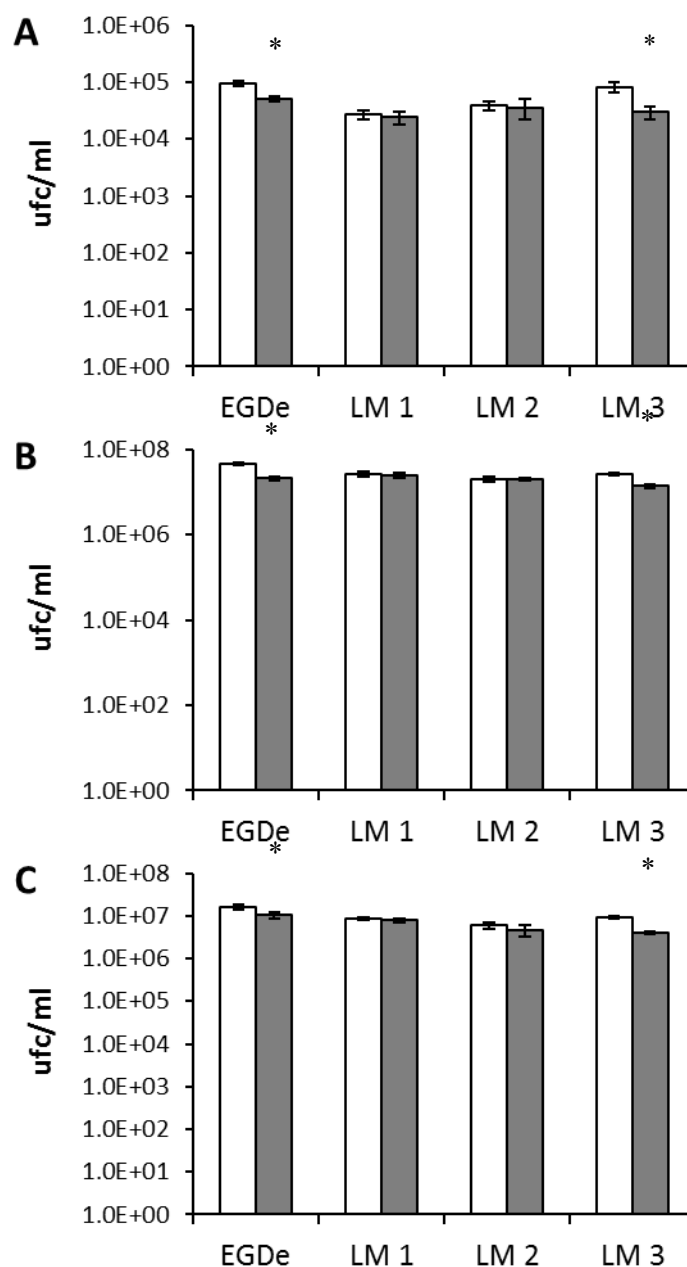


Figura 4. 1 - Efectul BAC asupra capacității de invazie a *Listeriei monocytogenes*

Patru tulpini diferite de *L. monocytogenes* au fost termostatare timp de 30 minute în absența (alb) și prezența a 1,25mg/l BAC (gri) la temperatura de 37°C și apoi utilizate pentru infectarea straturilor conflente de celule Caco-2 (A), HepG2 (B) și THP-1 (C). \*testul t, p<0.05

Tabelul 4. 2 – Efectul BAC asupra indicelui de creștere intracelulară a *Listeriei monocytogenes*

		Linie celulară					
		Caco-2		HepG2		THP-1	
Tulpină	Probă	Martor	BAC	Martor	BAC	Martor	BAC
	EGDe		0,73	1,11	1,04	1,38	1,37
LM 1		1,73	2,23	2,35	3,07	1,40	1,57
LM 2		1,70	2,11	1,91	2,01	1,19	1,44
LM 3		1,71	4,19	2,63	3,07	1,78	2,31

#### 4.1.4.2. Virulența *Listeriei monocytogenes* după 24 de ore de termostatare în prezența clorurii de benzalconi

Tabelul 4. 3 – Efectul BAC asupra indicelui de creștere intracelulară a *Listeriei monocytogenes*

		Linie celulară					
		Caco-2		HepG2		THP-1	
Tulpină	Probă	Martor	BAC	Martor	BAC	Martor	BAC
	EGDe		1,93	0,38	1,52	2,64	1,55
LM 1		4,81	2,51	3,53	6,15	1,97	3,00
LM 2		2,50	1,68	3,37	3,03	0,75	0,80
LM 3		2,61	3,47	2,65	2,38	1,44	2,44

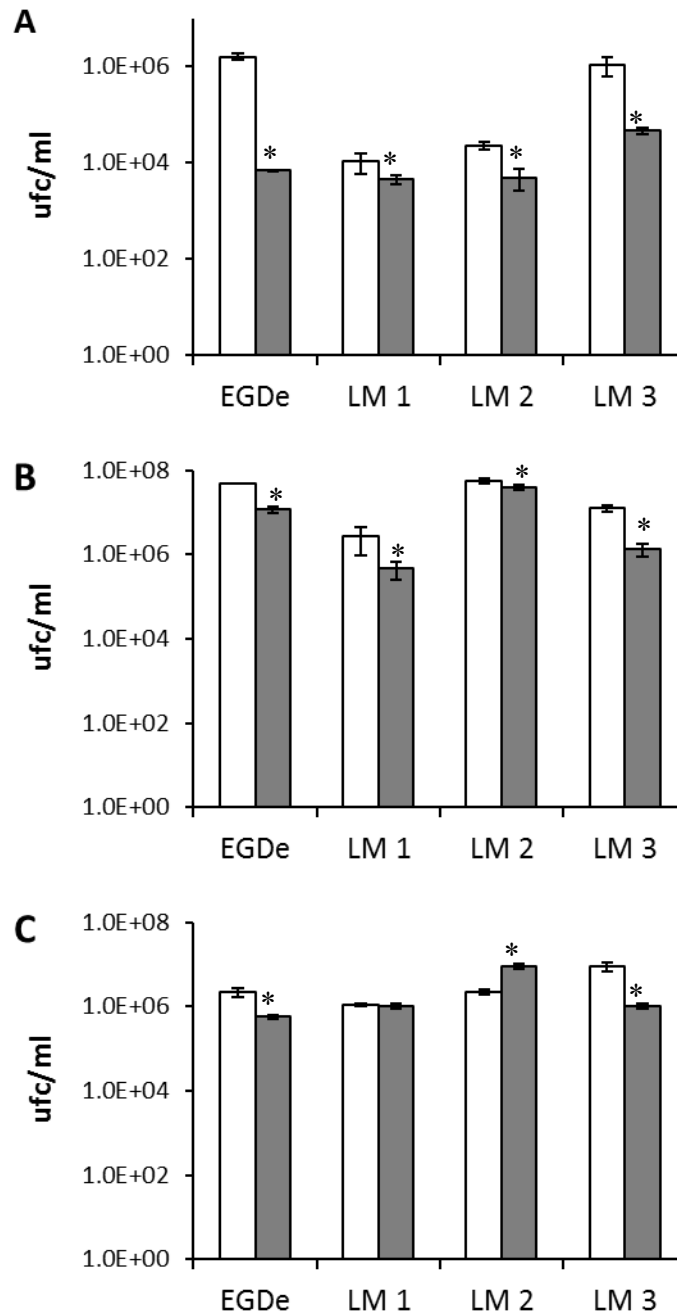


Figura 4. 2 - Efectul BAC asupra capacității de invazie a *Listeriei monocytogenes*

Patru tulpini diferite de *L. monocytogenes* au fost termostatate timp de 24 ore în absența (alb) sau prezența a 1,25mg/l BAC (gri) la temperatura de 37°C și apoi utilizate pentru infectarea straturilor conflente de celule Caco-2 (A), HepG2 (B) și THP-1 (C). Valorile, prezentate ca valoarea medie a ufc/ml  $\pm$  SD (deviația standard) a 4 determinări independente, reprezintă numărul de bacterii intracelulare după invazie. \* testul t,  $p < 0.05$

#### 4.1.5. Evaluarea persistenței efectului al clorurii de benzalconiu asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

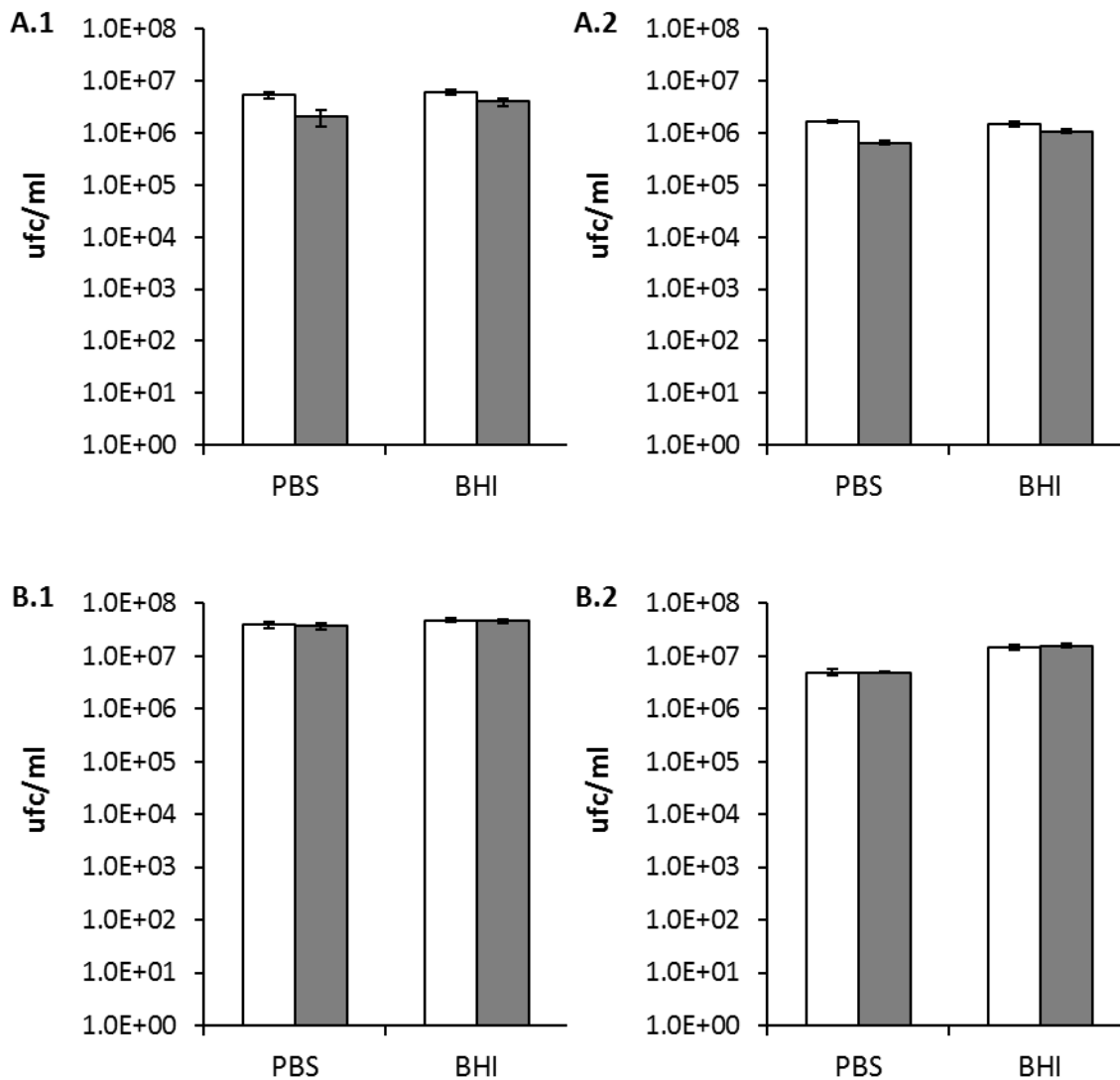


Figura 4. 3 - Efectul BAC asupra virulenței *Listeriei monocytogenes in vitro*, după 24 de ore

Două tulpini de *L.monocytogenes*: EGDe (1) și LM 3 (2), au fost termostatate cu (gri) sau fără (alb) 1,25mg/l BAC timp de 30 min la temperatura de 37°C. Apoi bacteriile au fost inoculate în DPBS și BHI și termostatate pentru 24 ore la temperatura de 4°C și au fost realizate teste de virulență *in vitro* virulente utilizând celule Caco-2. Valorile reprezentate ca ufc/ml reprezintă bacteriile intracelulare după 1 oră de infecție (panel A) și după 4 ore de proliferare intracelulară (panel B), reprezentând valoarea medie ± SD (deviația standard) a 4 determinări independente

Pentru a simula cazurile de recontaminare a produselor alimentare cu celulele de *L. monocytogenes*, care au supraviețuit în urma unor procese de dezinfecție incorect realizate, tulpinile EGDe și LM 3 au fost termostatate cu 1,25 mg/l BAC timp de 30 minute, și apoi, termostatate pentru 24 de ore la temperatura de 4°C în BHI, un mediu nutritiv, și în DPBS o soluție salină tampon și a fost comparat potențialul virulent cu cel al bacteriilor nestresate (martor) utilizând celule Caco-2.

Efectul clorurii de benzalconiu, de stimulare a capacității de a se multiplica la nivel intracelular a celor două tulpini de *L. monocytogenes* studiate a fost menținut și după termostatare în condiții de refrigerare timp de 24 de ore, atât în BHI cât și în DPBS (figura 4.7).

## 4.2. CONCLUZII PRELIMINARE

Celule de *L. monocytogenes* ce supraviețuiesc unui proces de dezinfecție neconform reprezintă o sursă de recontaminare a produselor alimentare fiind principala sursă a focarelor de listerioză. Realizarea necorespunzătoare a proceselor de dezinfecție are drept consecință expunerea bacteriilor la concentrații subletale de dezinfectanți cu efect direct asupra virulenței patogenilor ce ajung prin intermediul alimentelor în organismul uman.

Rezultatele obținute demonstrează că:

- pentru *L. monocytogenes* concentrația minimă inhibitorie de clorură de benzalconiu depinde de tulpina supusă analizei, ajungând la valori de 5 mg/l BAC;
- expunerea pe termen scurt, timp de 30 minute, la o concentrație subletală de BAC reduce abilitatea *L. monocytogenes* de a invada în interiorul celulelor umane dar crește indicele de multiplicare intracelulară;
- efectul pozitiv asupra indicelui de proliferare intracelulară produs de incubarea pe termen scurt a *L. monocytogenes* cu o concentrație subletală de BAC este menținut și după 24 de ore de termostatare în condiții de refrigerare în medii ce simulează matricea alimentară;
- prezența, timp de 24 de ore, în mediul de incubare al bacteriei anterior infecției a unei concentrații subletale de BAC influențează capacitatea *L. monocytogenes* de a invada celulele umane precum și indicele de multiplicare intracelulară, în mod diferit în funcție de tulpina analizată și de tipul de celulele umane utilizat.

Pe baza rezultatelor obținute poate fi formulată ipoteza conform căreia mediul de incubare al bacteriei înainte de a veni în contact cu celula gazdă „antrenează” bacteriile pentru

mediul intracelular pentru a supraviețui mecanismelor de apărare ale gazdei și a se multiplica la un nivel ridicat. Toate aceste rezultate subliniază rolul proceselor de curățire și dezinfectie realizate în industria alimentară în limitarea numărului de îmbolnăviri cauzate de patogenul de origine alimentară *L. monocytogenes*.

Pentru a limita numărul de cazuri de listerioză datorate consumului de alimente contaminate cu *L. monocytogenes* din mediile de procesare, se recomandă pentru procesele de igienizare, în industria produselor lactate, unde se folosește drept dezinfectant clorura de benzalconiuri următoarele:

- respectarea cu rigurozitate a tuturor etapelor incluse în procesul de igienizare;
- curățarea corespunzătoare a suprafețelor înainte de aplicarea dezinfectantului pentru a înlătura toate resturile organice ce ar putea inhiba clorura de benzalconiuri;
- uscarea suprafețelor curățate pentru a nu dilua concentrația de dezinfectant;
- folosirea clorurii de benzalconiuri în concentrațiile recomandate de producător, însă nu mai mici de 2,5 mg/l.

## Capitolul V – Influența laptelui asupra virulenței *Listeriei monocytogenes in vitro*

### 5.3.REZULTATE

#### 5.3.1. Viabilitatea celulelor de *Listeria monocytogenes* în lapte

Tabelul 5. 1 - Viabilitatea *Listeriei monocytogenes* în DPBS și lapte

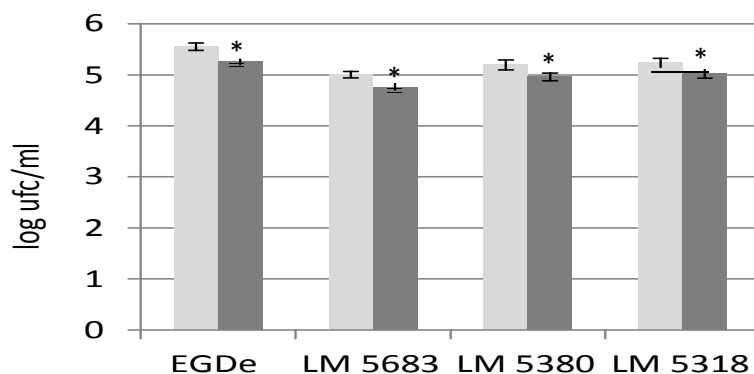
Tulpina	Timp	<i>Listeria monocytogenes</i> log (ufc/ml) ± SD		
		DPBS	Lapte	
			Crud	Pasteurizat
EGDe	0 ore	4,61 ± 0,03	4,78 ± 0,04	4,78 ± 0,01
	1 zi	4,55 ± 0,10	4,63 ± 0,09	4,70 ± 0,12
	3săptămâni	3,77 ± 0,0*	6,80 ± 0,14*	7,18 ± 0,00*
Lm 5683	0 ore	4,96 ± 0,08	4,90 ± 0,07	5,00 ± 0,01
	1 zi	4,81 ± 0,01	4,63 ± 0,20	5,03 ± 0,08
	3săptămâni	4,13 ± 0,02*	5,04 ± 0,04*	5,17 ± 0,07*
Lm 5380	0 ore	5,07 ± 0,03	5,07 ± 0,06	5,15 ± 0,10
	1 zi	5,00 ± 0,09	5,10 ± 0,04	5,07 ± 0,06
	3săptămâni	4,24 ± 0,14*	5,44 ± 0,11*	7,18 ± 0,00*
Lm 5318	0 ore	5,02 ± 0,03	5,11 ± 0,02	5,19 ± 0,13
	1 zi	4,99 ± 0,03	5,10 ± 0,03	5,17 ± 0,08
	3săptămâni	4,45 ± 0,10*	6,65 ± 0,07*	6,89 ± 0,16*

(\*) - reprezintă diferența statistică (testul t, p<0.05) raportat la valorile obținute după inoculare (0 ore)

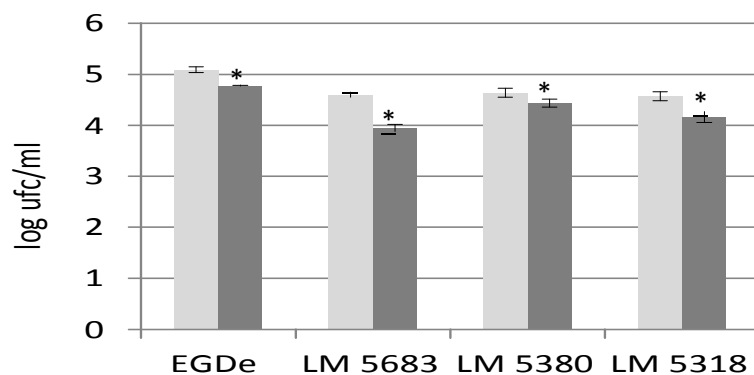
Rezultatele obținute au arătat că laptele este un mediu în care celulele bacteriene își mențin viabilitatea și sunt capabile să se multiplieze în timpul perioadei de păstrare chiar și în condiții de refrigerare, comparativ cu DPBS unde s-a observat o reducere a numărului de celule de *L. monocytogenes* viabile. Așadar compoziția mediului de incubare utilizat a influențat semnificativ viabilitatea celor patru tulpini bacteriene analizate cu modificări semnificative după trei săptămâni de păstrare în condiții de refrigerare.

### 5.3.2. Evaluarea virulenței tulpinilor de *Listeria monocytogenes* după incubare în lapte

A.



B.



C.

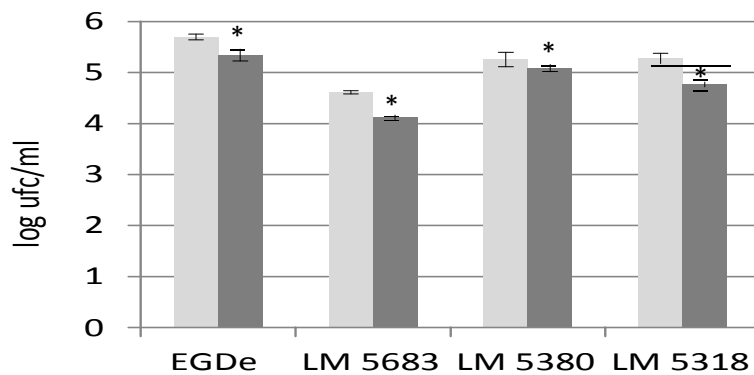


Figura 5. 1 – Virulența tulpinilor de *Listeria monocytogenes*

Patru tulpini de *L. monocytogenes* au fost inoculate în DPBS (gri) și lapte (negru) și incubate la 4°C timp de 2 h. Barele verticale reprezintă log(ufc/ml) de *L. monocytogenes* după cultivare în plăci după Adeziune (A), Invazie (B) și Proliferare (C) ± SD (deviația stși ard); (\*) reprezintă diferența statistică (ttes, p<0.05) între valorile obținute pentru celule de *L. monocytogenes* incubate în lapte respectiv DPBS;



Pentru a studia efectul laptelui asupra virulenței *L. monocytogenes*, patru tulpini diferite au fost inoculate în lapte și menținute la temperatura de 4°C timp de 2 ore, după care au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. Celule de *L. monocytogenes* inoculate în DPBS și menținute în aceleași condiții au fost utilizate drept probe martor.

Tulpinile de *L. monocytogenes* și-au menținut virulența la un nivel ridicat și după incubare în lapte, chiar dacă s-a constatat o reducere comparativ cu DPBS-ul.

Conform rezultatelor obținute, *L. monocytogenes* se dovedește a fi foarte virulentă după incubare în lapte, chiar în condiții de refrigerare. Oricum, pentru toate tulpinile de *L. monocytogenes* utilizate în acest studiu diferențe de mai puțin de o unitate logaritmică au fost observate în numărul de ufc recuperat după adeziune, invazie și proliferare după incubarea bacteriei în lapte comparativ cu DPBS.

### 5.3.3. Evaluarea influenței temperaturii de depozitare a laptelui asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

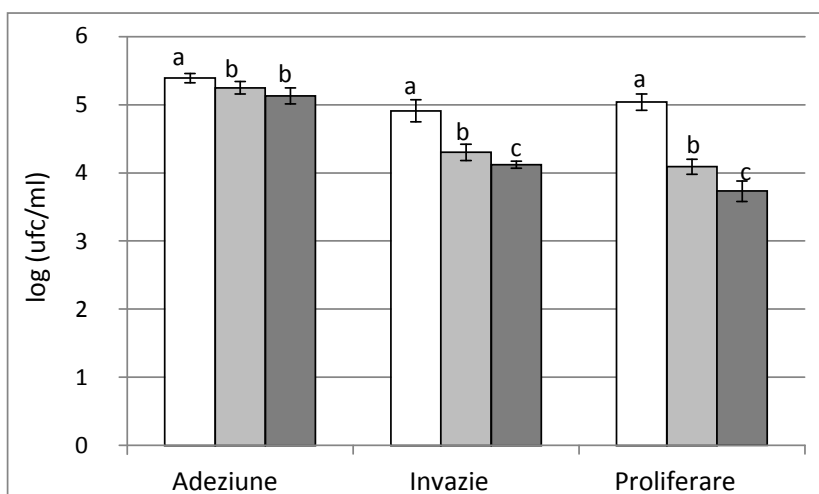


Figura 5. 2 - Influența temperaturii de depozitare asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

*L. monocytogenes* EGDe a fost inoculată în lapte și menținută la temperaturile de 4°C (alb), 25°C (gri deschis), și 30°C (gri închis). După 2 ore teste de virulență au fost realizate utilizând celule Caco-2. Barele verticale reprezintă log (ufc) de *L. monocytogenes* cultivate în plăci după Adeziune, Invazie și Proliferare ± SD (deviația standard). Coloanele cu litere diferite reprezintă diferența statistică (testul t,  $p < 0,05$ ) între valorile obținute pentru diferitele temperaturi de păstrare pentru aceleași indice

Pentru a determina influența condițiilor de păstrare a laptelui asupra virulenței *L. monocytogenes*, a fost studiată capacitatea de adeziune, invazie și proliferare a *L.*

*monocytogenes* EGDe după inoculare în lapte și păstrare timp de 2 ore la trei temperaturi diferite: 4°C, 25°C și 30°C. După 2 ore de incubare, la temperaturile menționate, au fost realizate teste de virulență.

Temperatura de păstrare a laptelui contaminat cu celule de *L. monocytogenes* a influențat semnificativ capacitatea bacteriilor de a invada și prolifera în interiorul celulelor epiteliale, subliniind caracterul virulent al *L. monocytogenes* atunci când se respectă lanțul frigorific recomandat pentru lapte și produse lactate.

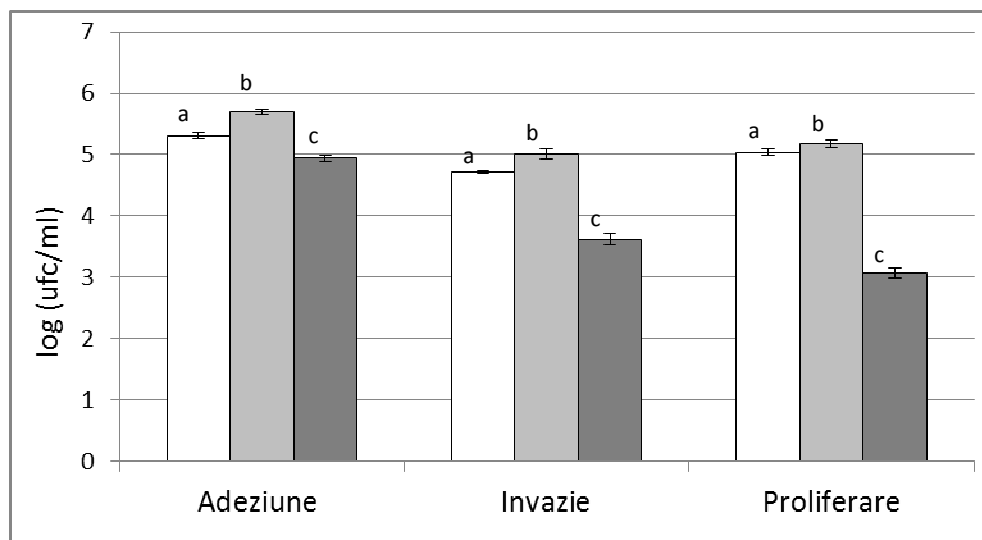


Figura 5.3 - Influența duratei de depozitare a laptelui asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*.

*L. monocytogenes* EGDe a fost inoculată în lapte și menținută la temperatura de 4°C. După 2 ore (alb), 1 zi (gri deschis) și 3 săptămâni (gri închis) au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. Barele verticale reprezintă logaritmul din ufc de *L. monocytogenes* dezvoltate în plăci după Adeziune, Invazie și Proliferare ± SD (deviația standard). ~Coloanele cu litere diferite reprezintă diferența statistică (testul t,  $p < 0,05$ ) între valorile obținute pentru diferitele perioade de depozitare pentru același indice

#### 5.3.4. Evaluarea influenței duratei de depozitare a laptelui asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

Pentru a studia influența duratei de depozitare a laptelui asupra potențialului virulent al *L. monocytogenes*, a fost comparată capacitatea de adeziune, invazie și proliferare a bacteriei după păstrarea probelor de lapte și DPBS la temperatura de 4°C timp de 2 ore, 1 zi și respectiv 3 săptămâni.

Așa cum se observă din datele prezentate în figura 5.3, după o zi de incubare în lapte a *L. monocytogenes* a fost observată o creștere semnificativă (1,4 – 2,5 ori) în potențialul

virulent comparativ cu 2 ore de incubare. Interesant este faptul că *L. monocytogenes* este capabilă să adere, să invadeze și să prolifereze în interiorul celulelor umane epiteliale chiar și după 3 săptămâni de incubare în lapte deși o scădere semnificativă (testul t,  $p < 0,05$ ) a fost detectată.

### 5.3.5. Evaluarea influenței conținutului de grăsime al laptelui asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

Pentru a determina efectul conținutului de grăsime al laptelui, *L. monocytogenes* EGDe a fost inoculată în lapte cu 0,9% grăsime, 1,6% grăsime și, respectiv, 3,6% grăsime și termostată la temperatura de 4°C. După două ore au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. *L. monocytogenes* EGDe incubată în DPBS a fost utilizată drept probă martor.

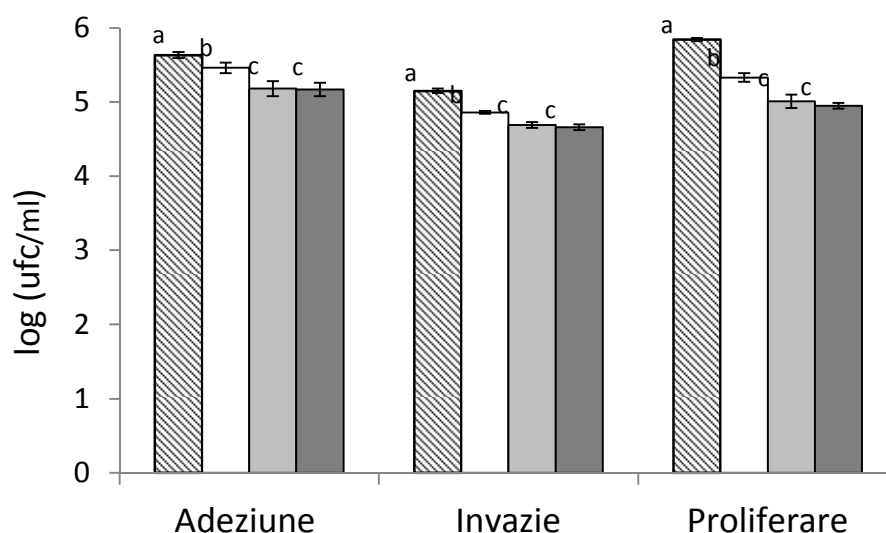


Figura 5. 4 – Influența conținutului de grăsime asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

*L.monocytogenes* EGDe a fost inoculată în DPBS (hașurat) și lapte cu 0,9% grăsime (alb), 1,6% grăsime (gri deschis) și 3,6% grăsime (gri închis) și incubată la temperatura de 4°C. După două ore au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. Barele verticale reprezintă logaritmul din numărul de colonii de *L. monocytogenes* cultivate în plăci după Adeziune, Invazie și Proliferare ± SD (deviația standard); ~ Coloanele cu litere diferite, în grafic, reprezintă diferența statistică (testul t,  $p < 0,05$ ) pentru valorile obținute pentru capacitatea bacteriilor de a adiona, invada și respectiv prolifera în interiorul celulelor Caco-2 între cele patru probe diferite în care a fost incubată *L. monocytogenes*

Virulența *L. monocytogenes* a scăzut pe măsura creșterii conținutului de grăsime din lapte. Cu toate acestea, se observă că diferența este semnificativă în ceea ce privește numărul

de colonii recuperate după adeziune, invazie și proliferare între probele de lapte cu 0,9% grăsime, pe de o parte, și cele cu 1,6% și respectiv 3,6% pe de altă parte. Așadar, conținutul de grăsime influențează semnificativ virulența *L. monocytogenes* după un anumit prag.

### 5.3.6. Evaluarea influenței conținutului de lactoză al laptelui asupra potențialului virulent al *Listeriei monocytogenes*

Pentru a stabili efectul conținutului de lactoză din lapte asupra virulenței *L. monocytogenes*, tulpina EGDe a fost inoculată în DPBS, DPBS cu 5% lactoză și lapte și menținută la temperatura de 4°C. După 2 ore, au fost realizate teste de virulență, conform protocolului descris anterior.

Prin adaugarea a 5% lactoză în DPBS, s-a observat o diminuare ușoară a capacității *L. monocytogenes* de a adeziona și invada celulele epiteliale dar o scădere semnificativă, (testul t,  $p < 0,05$ ) în abilitatea *L. monocytogenes* de a prolifera în mediul intracelular.

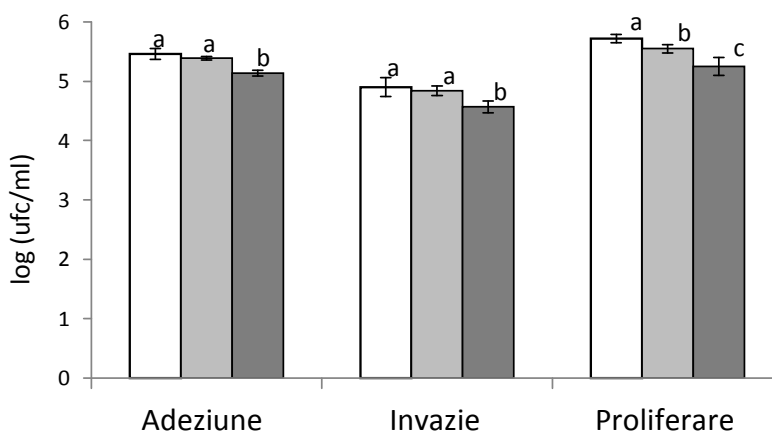


Figura 5. 5 – Influența lactozei asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

*L. monocytogenes* EGDe a fost inoculată în DPBS (alb), DPBS cu 5% lactoză (gri deschis) și lapte (gri închis) și incubată la temperatura de 4°C. După două ore au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. Barele verticale reprezintă logaritmul din numărul de colonii de *L. monocytogenes* cultivate în plăci după Adeziune, Invazie și Proliferare  $\pm$  SD (deviația standard); ~Coloanele cu litere diferite, în grafic, reprezintă diferența statistică (testul t,  $p < 0,05$ ) pentru valorile obținute pentru capacitatea bacteriilor de a adeziona, invada și respectiv prolifera în interiorul celulelor Caco-2 între cele trei probe diferite în care a fost incubată *L. monocytogenes*

### 5.3.7. Evaluarea influenței conținutului de cazeină al laptelui asupra potențialului virulent al *Listeriei monocytogenes*

Pentru a determina influența cazeinei asupra virulenței *L. monocytogenes*, tulpina EGDe a fost incubată timp de 2 ore în condiții de refrigerare în lapte și în zer. Au fost realizate apoi teste de virulență, iar *L. monocytogenes* incubată în DPBS a fost utilizată drept probă martor.

Când cazeina a fost precipitată și îndepărtată din lapte nu a fost observată nicio deosebire semnificativă în virulență *L. monocytogenes* incubate în zer comparativ cu bacteriile incubate în laptele folosit la obținerea zerului. Astfel, în mod clar un alt compus al laptelui, care trece în zer în procesul de îndepărtare al cazeinei reduce potențialul virulent al bacteriei.

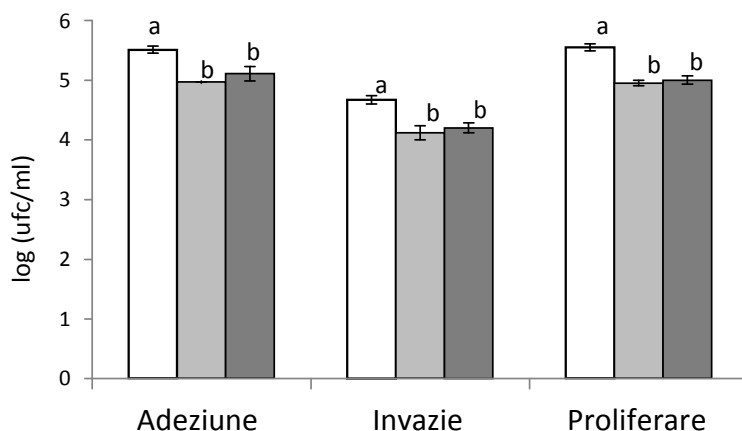


Figura 5. 6 – Influența cazeinei asupra virulenței *Listeriei monocytogenes*

*L. monocytogenes* EGDe a fost inoculată în DPBS (alb), zer (gri deschis) și lapte (gri închis) și incubată la temperatura de 4°C. După două ore au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. Barele verticale reprezintă logaritmul din numărul de colonii de *L. monocytogenes* cultivate în plăci după Adeziune, Invazie și Proliferare  $\pm$  SD (deviația standard); ~Culoanele cu litere diferite, în grafic, reprezintă diferența statistică (testul t,  $p < 0,05$ ) pentru valorile obținute pentru capacitatea bacteriilor de a adiona, invada și respectiv prolifera în interiorul celulelor Caco-2 între cele trei probe diferite în care a fost incubată *L. monocytogenes*

### 5.3.8. Evaluarea influenței tratamentului de pasteurizare al laptelui asupra potențialului virulent al *Listeria monocytogenes*

În cadrul tezei de doctorat a fost, de asemenea studiată și influența regimului de pasteurizare utilizat, asupra virulenței *L. monocytogenes*.

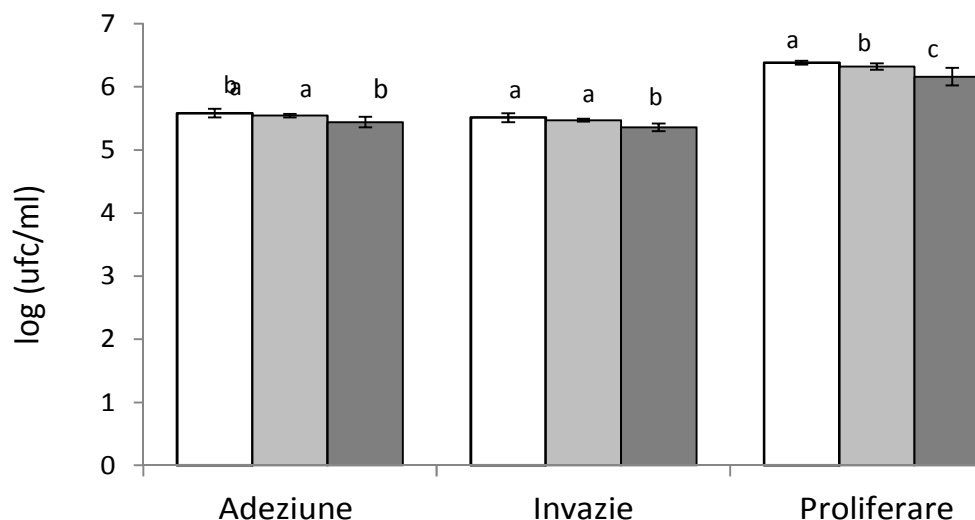


Figura 5. 1 – Influența procesului de pasteurizare asupra virulenței *Listeria monocytogenes*

*L.monocytogenes* EGDe a fost inoculată în DPBS (alb), lapte pasteurizat HTST (gri deschis) și în lapte pasteurizat (gri închis) incubată la temperatura de 4°C. După două ore au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. Barele verticale reprezintă logaritmul din numărul de colonii de *L. monocytogenes* dezvoltate în plăci după Adeziune, Invazie și Proliferare  $\pm$  SD (deviația standard); ~Culoanele cu litere diferite, în grafic, reprezintă diferența statistică (testul t,  $p<0,05$ ) pentru valorile obținute pentru capacitatea bacteriilor de a adheziona, invada și respectiv prolifera în interiorul celulelor Caco-2 între celulele de *L. monocytogenes* incubate în DPBS și lapte

Regimul de pasteurizare utilizat în procesarea laptelui, influențează semnificativ (testul t,  $p<0,05$ ) virulența *L. monocytogenes* în cazul în care laptele este contaminat post-pasteurizare. Prin aplicarea unui regim de pasteurizare standard comparativ cu pasteurizarea HTST, se observă o diminuare a capacității de adeziune și invazie a *L. monocytogenes* la celulele epiteliale cu 30%. Pentru capacitatea bacteriilor de a prolifera intracelular, condițiile de pasteurizare utilizate produc o diminuare doar de 8% pentru acest indice, chiar dacă numărul de colonii recuperate după proliferare este semnificativ redus, (testul t,  $p<0,05$ ).

### 5.3.9. Evaluarea virulenței tulpinilor de *Listeria monocytogenes* după incubare în lapte crud

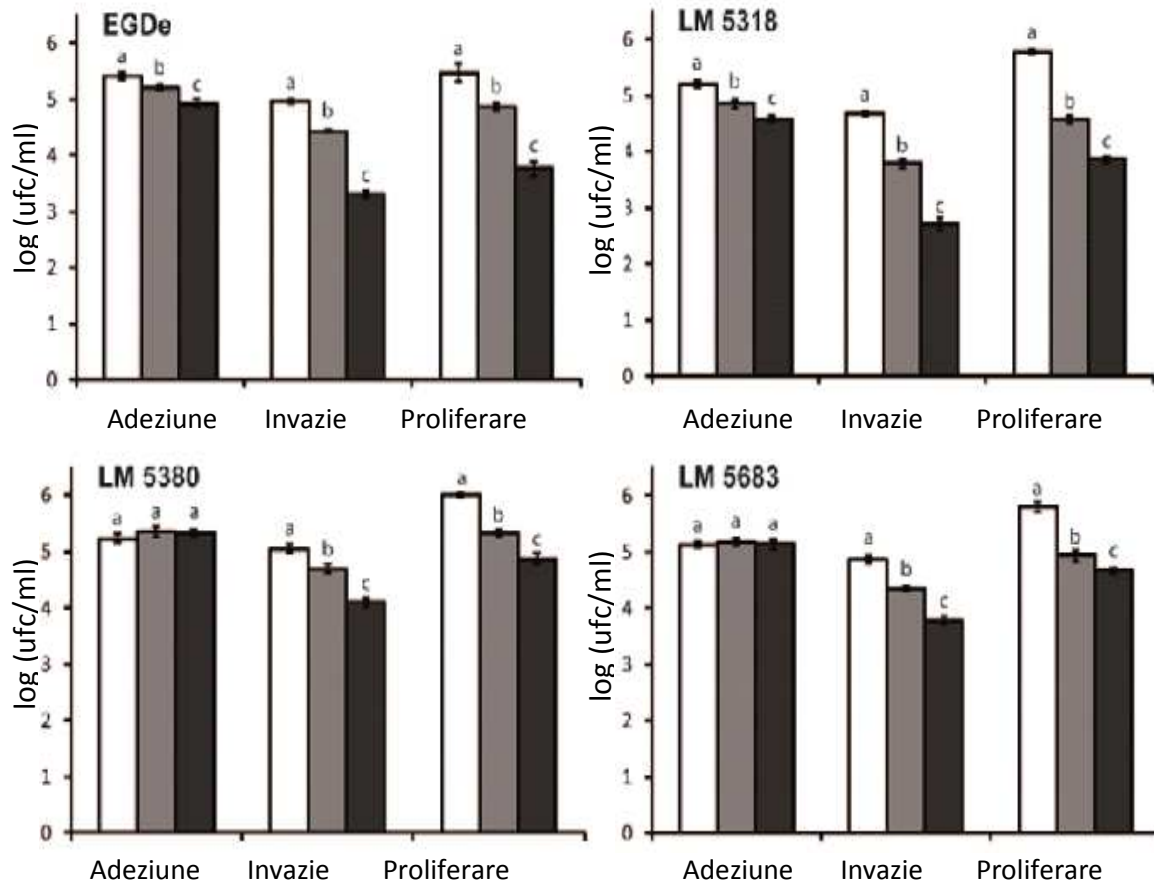


Figura 5.8 - Virulența *Listeriei monocytogenes* după incubare în lapte

Patru tulpini de *L.monocytogenes* (EGDe, LM 5318, LM 5380, LM 5683) au fost inoculată în DPBS (alb), lapte pasteurizat (gri deschis) și în lapte pasteurizat (gri inchis) incubată la temperatura de 4°C. După 24 ore au fost realizate teste de virulență utilizând celule Caco-2. Barele verticale reprezintă logaritmul din numărul de colonii de *L. monocytogenes* dezvoltate în plăci după Adeziune, Invazie și Proliferare ± SD (deviația standard); ~Coloanele cu litere diferite în grafic reprezintă diferența statistică (testul t, p<0,05)

Conform datelor prezentate în figura 5.8, cele patru tulpini bacteriene analizate au fost capabile să adere, invadeze și prolifereze intracelular după incubare în lapte crud după 24 de ore de menținere în condiții de refrigerare deși au arătat potențiale virulente diferite. Surprinzător, incubarea *L. monocytogenes* în laptele crud a redus virulența bacteriei semnificativ (testul t, p<0,05), atât față de bacteriile menținute în DPBS cât și față de cele menținute în laptele pasteurizat. Comparativ cu celulele de *L. monocytogenes* incubate în laptele crud, celulele

bacteriene incubate în lapte pasteurizat au arătat o creștere semnificativă (testul t,  $p < 0,05$ ) a capacității de invazie și proliferare intracelulară pentru toate cele patru tulpini studiate. De asemenea, celulele bacteriene incubate în DPBS au arătat nivelul cel mai crescut de virulență.

#### 5.4. CONCLUZII PRELIMINARE

Virulența *L. monocytogenes* a fost intensiv studiată, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, și a fost sugerat faptul că potențialul virulent al bacteriei este influențat de mediul de incubare înainte de a iniția infecția, deoarece preadaptarea *L. monocytogenes* la condițiile de mediu modifică potențialul virulent.

Laptele și produsele lactate sunt relaționate cu multe focare de listerioză sugerând că aceste produse alimentare nu reprimă potențialul virulent al *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* își menține virulența la un nivel foarte ridicat după incubare în lapte chiar în condiții de refrigerare și chiar după 3 săptămâni de incubare. Întrădevăr comparativ cu DPBS, laptele reduce virulența *L. monocytogenes in vitro*, însă pentru toate tulpinile studiate o reducere de mai puțin de o unitate logaritmică a fost observată în numărul de ufc recuperat după adeziune, invazie și proliferare în interiorul celulelor epiteliale. Astfel, gradul de contaminare al alimentelor înainte de consum este foarte important pentru a iniția infecția. *L. monocytogenes* își menține viabilitatea în lapte pentru timp îndelungat, chiar dacă este respectat lanțul frigorific, fără ca virulența bacteriei să fie reprimată. Astfel, se poate explica numărul mare de focare de listerioză relaționate cu consumul de lapte și produse lactate.

Laptele este o matrice alimentară foarte complexă ce reduce virulența *L. monocytogenes in vitro* iar capacitatea bacteriei de a adera, invada și prolifera în interiorul celulelor umane este invers proporțională cu conținutul de grăsime al laptelui. Mai mult, rezultatele obținute arată că lactoza reduce doar capacitatea bacteriilor de a prolifera intracelular, în timp ce cazeina nu influențează potențialul virulent al *L. monocytogenes*.

În cazul laptelui contaminat cu *L. monocytogenes* post - pasteurizare, intensitatea tratamentului termic aplicat este un factor important care influențează potențialul virulent al bacteriei.

Toate aceste observații sugerează că pentru *L. monocytogenes* compoziția complexă a laptelui și modificările ce se produc în timpul tratamentului termic pot fi un semnal de a 'porni' sau 'inchide' expresia factorilor de virulență, ceea ce atrage și o modificare a expresiei



genelor de virulență.

Cu toate acestea, nu este încă studiat mecanismul prin care, în condiții normale de depozitare, *L. monocytogenes* își conservă virulența după incubare în lapte, un produs alimentar foarte complex din punct de vedere al compoziției. Așadar, cercetări ulterioare sunt necesare pentru a stabili influența compoziției laptelui asupra capacității bacteriilor de a adera invada și prolifera în celulele umane, dar și a stabili mecanismele implicate în virulență, pe de o parte, și metabolismul bacteriei, pe de altă parte, pentru a înțelege, astfel, efectul acestui aliment asupra virulenței *L.monocytogenes*.

## Capitolul VI – Evaluarea riscului pentru combinația *Listeria monocytogenea* - lapte pasteurizat

### 6.1. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Au fost supuse analizei următoarele scenarii:

- Scenariul I – persoane cu vârsta de 1– 14 ani ce consumă lapte integral.
- Scenariul II – persoane cu vârsta de 15 – 59 ani ce consumă lapte integral.
- Scenariul III - persoane cu vârsta de 15 – 59 ani ce consumă lapte degresat.
- Scenariul IV - persoane cu vârsta de > 65 ani ce consumă lapte integral.

Tabelul 6. 1 – Evaluarea riscului pentru combinația *Listeria monocytogenes* – lapte pasteurizat

RISCU RELATIV	Scenariul I	Scenariul II	Scenariul III	Scenariul IV
Porții consumate	6,2E+07	2,4E+08	1,2E+08	8.6E+07
Porții contaminate (la desfacere) consumate	3,1E+04	1,2E+05	6,2E+04	4.3E+04
Numărul total de ufc înainte de bucătărie	4,3E+12	1,6E+13	8,5E+12	5.9E+12
Număr total de ufc după bucătărie	3,2E+12	1,2E+13	6,4E+12	4.4E+12
Număr de persoane bolnave	1,9E+03	3,2E+04	1,7E+04	1.2E+04

Conform datelor prezentate în tabelul 6.4 se observă că numărul de persoane bolnave este diferit pentru cele patru scenarii studiate. Un prim factor ce influențează numărul de îmbolnăviri produse prin consumul de lapte contaminat cu *L. monocytogenes* este reprezentat de numărul de porții consumate. Conform formulei de calcul pentru numărul de porții consumate (formula 6.1) atât numărul de persoane cât și cantitatea de lapte consumată au o influență egală. Astfel numărul cel mai mare de persoane bolnave a fost observat pentru scenariul II deoarece populația cu vârstă intermediară (15 – 59 ani) reprezintă aproximativ 65% din populația inclusă în această simulare, în timp ce pentru populația 0 – 15 ani a fost obținut cel mai mic număr de persoane bolnave deoarece această categorie de vârstă reprezintă doar 15% din totalul populației analizate.

Prin compararea scenariilor I și IV se observă că la cantități egale de lapte consumate diferența în ceea ce privește numărul de îmbolnăviri este dată de susceptibilitatea grupei de indivizi analizată. Conform rapoartului EFSA (2012) numărul cel mai mare de persoane bolnave de listerioză au fost înregistrate pentru grupa de vârstă de peste 65 de ani cu un

procent de 60,3% din cazuri. Numeroase studii au analizat efectul vârstei asupra susceptibilității ridicate față de *L. monocytogenes* și au concluzionat că: operațiile majore suportate de individ slăbesc sistemul imunitar prin reducerea proliferării celulelor T (Hensler et al., 1997), o dietă deficitară în vitamine și minerale reduc numărul de celule T ale sistemului imunitar (Pike și Chandra, 1995), utilizarea antibioticelor distruge microflora intestinală normală permitând *L. monocytogenes* să supraviețuiască în tractul gastro intestinal (Klontz et al., 1997). De asemenea lipsa exercițiilor fizice, dieta dar și starea de sănătate sunt factori ce afectează buna funcționare a sistemului imunitar la persoanele cu vârsta peste 65 ani (Doyle, 2001).

Un alt factor ce influențează numărul de îmbolnăviri cauzate de consumul de lapte pasteurizat contaminat cu *L. monocytogenes* îl reprezintă preferințele de consum ale populației. Pornind de la presupunerea că din categoria de vârstă intermediară un număr de persoane de 2 ori mai mare consumă lapte integral decât lapte degresat expunerea la risc conduce la un număr de îmbolnăviri de 1,88 ori mai mare pentru persoanele ce consumă lapte integral. Însă conform datelor prezentate în capitolul privind influența laptelui asupra virulenței tulpinilor de *L. monocytogenes*, incubarea bacteriei în lapte reduce virulența acesteia proporțional cu creșterea conținutului de grăsime al laptelui. Pentru țara noastră nu au fost găsite informații privind preferințele consumatorilor referitor la conținutul de grăsime al laptelui, însă se cunoaște faptul că din ce în ce mai multe persoane preferă, din motive de sănătate sau gust, să consume lapte degresat ceea ce conduce la un risc crescut de listerioză. Așadar în modelele de evaluare a riscului este recomandat să se considere și aspectele legate de virulența tulpinilor bacteriene ce reprezintă riscul studiat.

Proprietățile matematice ale modelului doză – răspuns în cazul *L. monocytogenes* consideră că numărul mediu de bacterii per porție este o consecință a faptului că cea mai mare concentrație de bacterii în produsul studiat are o influență considerabilă asupra numărului estimat al cazurilor de listerioză în acest context (Pouillot și Lubran, 2011). Astfel în modelul utilizat a fost considerat că numărul de bacterii per porție la desfacere este de  $10^5 - 10^6$  ufc/g, cu o probabilitate ca 0,05% să conțină aceasta cantitate de bacterii. Doza infecțioasă minimă pentru *L. monocytogenes* la oameni este necunoscută (Norrung, 2000), dar o analiză a cazurilor de listerioză contractate prin consumul de lapte neprelucrat sau pasteurizat au arătat că mai puțin de  $10^3$  celule pot produce îmbolnăvirea. În această situație, în raportul

FAO/WHO menționat pentru o concentrație de  $10^3$  ufc probabilitatea de contaminare a laptelui pasteurizat este mult mai mare, de 0,74%, ceea ce conduce la un număr mai mare de îmbolnăviri, de aproximativ 14 ori mai mare atât pentru copii cât și pentru persoanele vârstnice (tabelul 6.5).

Tabelul 6. 2 – Influența gradului de contaminare a produsului în evaluarea riscului pentru combinația *Listeria monocytogenes* – lapte pasteurizat

RISCVL RELATIV	Scenariul I		Scenariul IV	
	$10^6$	$10^3$	$10^6$	$10^3$
Grad de contaminare				
Porții consumate	6,2E+07	6,2E+07	8,6E+07	8,6E+07
Porții contaminate (la desfacere) consumate	3,1E+04	4,6E+05	4,3E+04	6,3E+05
Numărul total de ufc înainte de bucătărie	4,3E+12	5,8E+10	5,9E+12	8,0E+10
Număr total de ufc după bucătărie	3,2E+12	4,3E+10	4,4E+12	6,0E+10
Număr de persoane bolnave	1,9E+03	2,6E+04	1,2E+04	1,7E+05

Mai mult însă la focarul de literioză ce a avut drept cauză brânza “Quargel” produsă în Austria o analiză a probelor de brânză consumate de persoanele bolnave a arătat că din 20 de probe pozitive pentru *L. monocytogenes*, 11 conțineau mai puțin de 100 ufc/g ceea ce sugerează că și la concentrații foarte reduse de microorganisme se poate produce îmbolnăvirea (Fretz et al., 2010). Pe de altă parte pe baza informațiilor epidemiologice se consideră pentru anumite țări că o concentrație de *L. monocytogenes* ce nu depășește 100 ufc/g de aliment la momentul consumului nu reprezintă risc pentru consumator. Pentru a stabili însă asemenea niveluri de contaminare sunt necesare informații privind termenul de valabilitate al produsului și comportamentul *L. monocytogenes* de-a lungul acestei perioade de valabilitate (Norrung, 2000), precum și condițiile de depozitare și posibilitatea ca produsul respectiv să reprezinte un mediu favorabil pentru multiplicarea bacteriei. Mai mult, este cunoscut faptul că doza infecțioasă variază în funcție de patogenitatea și virulența tulpinii de *L. monocytogenes* implicată în infecție (Vazquez-Boland et al., 2001). Așadar modele de evaluare a riscului pentru *L. monocytogenes* ar trebui realizate pentru fiecare tulpină bacteriană în parte deoarece s-a observat (vezi capitolul V al prezentei teze), că tulpinile de *L. monocytogenes* analizate, după incubare în lapte, diferă din punct de vedere al potențialului virulent.

## 6.2. CONCLUZII

Evaluarea riscului microbiologic este esențială pentru a realiza o bună evaluare a riscului și a estima în mod corespunzător impactul combinației *L. monocytogenes* – lapte pasteurizat asupra sănătății publice.

Modelul utilizat a realizat o evaluare a riscului produs de consumul de lapte pasteurizat contaminat cu *L. monocytogenes* considerând trei grupe de populație diferite cu susceptibilități diferite față de *L. monocytogenes* dar și cu preferințe de consum diferite în raport cu conținutul de grăsime al laptelui.

Rezultatele obținute au demonstrat că riscul de îmbolăvire este mare când:

- numărul de persoane ce consumă probele de lapte contaminate este mare- numărul de îmbolnăviri fiind proporțional cu numărul de persoane din grupul țintă iar laptele reprezintă un aliment consumat de majoritatea populației;
- susceptibilitatea grupului țintă ce consumă alimentul este ridicată – în special la persoanele din grupa de vârstă de peste 65 de ani din cauza sistemului imunitar slăbit;
- gradul de contaminare al laptelui în momentul consumului depășește 100 ufc/g – deși un număr considerabil de persoane sunt supuse riscului și la concentrații de *L. monocytogenes* mai mici de 100 ufc/g;

Cu toate acestea se recomandă ca pentru o corectă evaluare a riscului produs de *L. monocytogenes* în laptele pasteurizat să se considere și caracteristicile de virulență ale tulpinilor implicate în focarul de infecție. Rezultatele obținute și în capitolul anterior al tezei de doctorat sugerează că atât conținutul de grăsime al laptelui cât și condițiile de depozitare ale laptelui pasteurizat trebuie introduse în modelele Doză – Răspuns pentru combinația *L. monocytogenes* – lapte pasteurizat ca factori ce afectează virulența tulpinilor bacteriene și implicit numărul de îmbolnăviri alimentare.

## Concluzii generale

Activitățile de cercetare realizate în partea experimentală a tezei de doctorat au vizat optimizarea testelor de virulență *in vitro* pentru studiul capacității de adeziune, invazie și proliferare a *L. monocytogenes* utilizând celule umane epiteliale. Au fost stabilite concentrația de gentamicină, timpul de infecție și proliferare, multiplicitatea de infecție pentru a fi utilizate în testele de virulență.

Astfel se recomandă în realizarea testelor de virulență cu următorii parametri:

- timp de infecție de o oră combinat cu un timp de proliferare intracelulară de patru ore pentru ca un număr suficient de celule de *L. monocytogenes* să adere, invadeze și prolifereze la nivel intracelular;
- o concentrație de 100 mg/l gentamicină este suficientă pentru a elimina bacteriile din mediul extracelular, concentrația de gentamicină fiind foarte importantă pentru reproductibilitatea rezultatelor obținute;
- multiplicităților de infecție reduse, de 25, pentru a nu produce liza celulelor umane;

În urma analizei rezultatelor obținute în partea experimentală a tezei de doctorat ce a vizat studiul efectului concentrațiilor subletale de dezinfectanți asupra capacității de invazie și proliferare a tulpinilor de *L. monocytogenes* utilizând trei linii celulare umane diferite implicate în procesul infecțios al bacteriei. Se pot formula următoarele concluzii:

- Tulpinile de *L. monocytogenes* prezintă susceptibilitate diferită la clorura de benzalconiu, concentrația minimă inhibitorie având valori de 2,5 mg/l BAC.
- Procedurile de dezinfecție realizate în industrie fără a respecta concentrațiile de dezinfectant duc la expunerea patogenilor timp de 30 minute la concentrații subletale de clorură de benzalconiu ceea ce reduce invazia tulpinilor de *L. monocytogenes in vitro*, dar crește indicele de multiplicare la nivel intracelular indiferent de linia celulară umană folosită și pentru toate tulpinile bacteriene studiate.
- Efectul produs după termostatare timp de 30 minute cu BAC asupra invaziei și capacității de proliferare intracelulară nu a depins de tipul de celule utilizat, deși pentru invazia în celule epiteliale sau hepatocite sunt necesari factori de virulență diferiți.

- În cazul în care după dezinfecție patofgenii supraviețuiesc și contaminează produsele

alimentare, efectul produs de incubarea pe termen scurt a *L. monocytogenes* cu o concentrație subletală de dezinfectant este menținut și după 24 de ore de incubare în medii ce simulează matricea alimentară.

➤ Incubarea timp de 24 de ore cu o concentrație subletală de BAC a dus la scăderea semnificativă a capacității de invazie și proliferare pentru toate cele patru tulpini de *L. monocytogenes* când au fost utilizate celule epiteliale și hepatocite. Pentru fagocite cele două tulpini ce s-au dovedit a avea o rezistență ridicată la dezinfectanți au avut o capacitate de invazie și proliferare mai mare după 24 de ore de incubare în prezența BAC.

Prin studierea influenței laptelui, un aliment relaționat cu multe focare de listerioză, asupra virulenței *L. monocytogenes* s-au constatat următoarele:

➤ *L. monocytogenes* își menține potențialul virulent la un nivel foarte ridicat după incubare în lapte și chiar după 3 săptămâni de păstrare în condiții de refrigerare.

➤ Compoziția mediului de incubare a *L. monocytogenes* înainte de contactul cu celula gazdă, lapte sau DPBS, a influențat semnificativ viabilitatea celor patru tulpini bacteriene analizate cu modificări semnificative după trei săptămâni de păstrare în condiții de refrigerare.

➤ Capacitatea *L. monocytogenes* de adeziune, invazie și proliferare intracelulară după termostatare în lapte în condiții de refrigerare diferă în funcție de tulpina supusă analizei.

➤ Temperatura de păstrare a laptelui a influențat semnificativ capacitatea bacteriilor de a invada și prolifera în interiorul celulelor umane, astfel că menținerea lanțului frigorific de la fabrică și până la consumator nu alterează potențialul virulent al bacteriei, ci, dimpotrivă, contribuie la menținerea virulenței la un nivel foarte ridicat.

➤ Virulența bacteriei este diminuată proporțional cu conținutul de grăsime al laptelui, astfel că celulele de *L. monocytogenes* termostatate în lapte degresat prezintă potențial virulent mai ridicat decât celulele bacteriene termostatate în lapte integral.

➤ Lactoza influențează virulența *L. monocytogenes* doar prin reducerea capacității de proliferare la nivel intracelular a bacteriei în celule epiteliale.

➤ Prin îndepărtarea cazeinei din lapte nu a fost observată nicio deosebire semnificativă în virulența *L. monocytogenes* incubate în zer comparativ cu bacteriile incubate în laptele

folosit la obținerea zerului. Astfel, în mod clar un alt compus al laptelui, care trece în zer în procesul de îndepărtare al caseinei reduce potențialul virulent al bacteriei.

➤ Laptele crud reduce potențialul virulent al *L. monocytogenes* la celule umane epiteliale.

➤ Regimul de pasteurizare utilizat în procesarea laptelui, influențează semnificativ virulența *L. monocytogenes* în cazul în care laptele este contaminat post pasteurizare. Prin aplicarea unui regim de pasteurizare standard comparativ cu pasteurizarea HTST, se observă o diminuare a capacității de adeziune și invazie a *L. monocytogenes* la celulele epiteliale cu 30%.

➤ Mai mult prin evaluarea riscului pentru combinația *L. monocytogenes* - lapte pasteurizat a fost subliniată importanța introducerii datelor privind potențialul virulent al bacteriei în modelele matematice utilizate.



## Diseminarea rezultatelor

### Lucrări comunicate la conferințe internaționale:

- **Pricope L.**, Rychli K., Nicolau A., Wagner M., The effect of milk environment on the virulence of *Listeria monocytogenes*/ **International Symposium EuroAliment** / Galati, Romania/ 6-7 octombrie 2011
- **Pricope L.**, Nicolau A., Wagner M., Rychli K., Sublethal concentration of benzalkonium chloride increases the intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes in vitro*/ **Annual Conference of the Association for General și Applied Microbiology (VAAM)**, / Tübingen, Germania/ 18-21 Martie 2012
- **Pricope L.**, Nicolau A., Wagner M., Rychli K., The influence of milk environment on the virulence of *listeria monocytogenes*/ **Annual meeting of the Austrian Society for Hygiene, Microbiology și Preventive Medicine (OGHMP)**/ Salzburg, Austria/ 21-24 Mai 2012

### Articole științifice

- **Pricope L.**, Nicolau A., Wagner M., Rychli K., The effect of sublethal concentrations of benzalkonium chloride on the virulence of *Listeria monocytogenes* – **a doua revizie la Food Control**, (factor de impact 2.656)
- **Pricope L.**, Rychli K., Nicolau A., Wagner M., The effect of milk environment on the virulence of *Listeria monocytogenes* – **in lucru**

## Bibliografie selectivă

- Allerberger, F., Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* **16**, 16-23.
- Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A., Mastronicolis, S. K. (2011). Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Lett Appl Microbiol*. **52(3)**:275-280
- Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol* **145**, 1-8.
- Duodu, S., Holst-Jensen, A., Skjerdal, T., Cappelier, J. M., Pilet, M. F., Loncarevic, S. (2010). Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. *Food Microbiol* **27**, 795-801.
- Evers, E. G., Chardon, J. E. (2010). A swift Quantitative Microbiological Risk Assessment (sQMRA) tool. *Food Control* **21**, 319-330.
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V., Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* **312**, 404-407.
- Garner, M. R., James, K. E., Callahan, M. C., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2006). Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5384-5395.
- Kastbjerg, V. G., Larsen, M. H., Gram, L., Ingmer, H. (2010). Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 303-309.
- Liu, Y., Ream, A. (2008). Gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* strain F2365 during growth in ultrahigh-temperature-processed skim milk. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6859-6866.
- Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., Audurier, A. (2000). Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5083-5086.
- Midelet-Bourdin, G., Leleu, G., Copin, S., Roche, S. M., Velge, P., Malle, P. (2006). Modification of a virulence-associated phenotype after growth of *Listeria monocytogenes* on food. *J Appl Microbiol* **101**, 300-308.
- Mullapudi, S., Siletzky, R. M., Kathariou, S. (2008). Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of turkey-processing plants. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1464-1468.
- Nadon, C. A., Bowen, B. M., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2002). Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **70**, 3948-3952.

- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis* **2**, 115-129.
- Pan, Y., Breidt, F., Jr., Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7711-7717.
- Reij, M. W., Den Aantrekker, E. D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int J Food Microbiol* **91**, 1-11
- Schoder, D., Melzner, D., Schmalwieser, A., Zangana, A., Winter, P., Wagner, M. (2011). Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *J Food Prot* **74**, 919-924.
- To, M. S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5258-5264.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**, 584-640.
- Webb, S. A., Kahler, C. M. (2008). Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences. *Crit Care* **12**, 234-242.
- Wilson, B. A., Salyers, A. A., Whitt, D. D., Winkler M. E. (2011). Antimicrobial Coumpounds. in B. A. Wilson, A. A. Salyers, D. D. Whitt, M. E. Winkler (Eds), *Bacterial pathogenesis a molecular approach*, third edition, ASM Press, Washington, DC
- Xayarath, B., Marquis, H., Port, G. C., Freitag, N. E. (2009). *Listeria monocytogenes* CtaP is a multifunctional cysteine transport-associated protein required for bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* **74**, 956-973.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Chakraborty, T., Sasakawa, C. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA is a key player in evading autophagic recognition. *Autophagy* **5**, 1220-1221.