Ćwiczenie 13

Temat: Mikrobiologiczne kryteria żywności. Kryteria bezpieczeństwa

Zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego konsumenta jest podstawowym wymogiem stawianym producentom żywności. Na bezpieczeństwo produkowanej żywności wpływa wiele czynników podczas całego procesu produkcyjnego. Począwszy od jakości mikrobiologicznej surowca, poprzez przestrzeganie określonych parametrów fizykochemicznych oraz zasad higienicznych produkcji aż do etapu przechowywania żywności. Błędy na każdym z etapów mogą doprowadzić do zanieczyszczenia żywności bakteriami chorobotwórczymi, bądź toksynami.

Kryteria mikrobiologicznej oceny żywności obejmują kryteria bezpieczeństwa żywności i kryteria higieny procesu. Kryteria bezpieczeństwa żywności odnoszą się do mikroorganizmów chorobotwórczych, ich toksyn i metabolitów i określają dopuszczalny poziom zanieczyszczenia produktu podczas całego wyznaczonego okresu trwałości.
Dotyczą one obecności:

- *Listeria monocytogenes* w wielu rodzajach żywności gotowej do spożycia;
- *Salmonella* sp. w preparatach przeznaczonych do początkowego i dalszego żywienia dzieci, produktów pochodzenia roślinnego (warzywa, owoce, soki, kiełki), zwierzęcego (mięso, żelatyna, sery, masło, mleko, lody, jaja, skorupiaki, itp.)
- *Cronobacter sakazakii* (stara nazwa *Enterobacter sakazakii*) w preparatach w proszku do początkowego żywienia niemowląt w wieku do 6 miesięcy;
- enterotoksyn gronkowcowych w niektórych produktach mleczarskich
- histaminy w produktach rybołówstwa z gatunku ryb o podwyższonym poziomie histydyny

1. Listeria monocytogenes

a. Charakterystyka

Są to pałeczki Gram-dodatnie o wymiarach 0,5-2,0 µm. Wykazują zdolność do pleomorfizmu od form pośrednich pomiędzy krótkimi pałeczkami a ziarniakami do form nitkowatych. Posiadają nieliczne rzęski, nie przetrwalnikują i nie tworzą otoczek. Rosną zarówno w tlenowych jak i w beztlenowych warunkach, w szerokim zakresie temperatur od 0 do 45°C oraz pH od 5 do 9, tolerują wysokie stężenia soli (nawet do 30% NaCl). Nie należą do mikroflory ciepłoodpornej, ale potrafią przeżyć w temp 55°C/60min. Są typowymi **psychrotrofami**, długo zachowują żywotność (a nawet namnażają się) w żywności przechowywanej w warunkach chłodniczych.

Rys.1. Pałeczki *Listeria* sp. w obrazie mikroskopowym, zabarwione metodą Grama.

b. Występowanie

Pałeczki *Listeria* sp. występują w środowisku naturalnym: w glebie, wodzie, na gnijącej roślinności, trawach, zwierzętach (krowy, owce, trzoda, króliki, psy, ptaki, owady). Ponadto często izolowane są z mrożonych artykułów spożywczych, mleka surowego, niekiedy z pasteryzowanego, surowych warzyw: kalafior, marchew, brokuły, sałata, kapusta.

Listeria monocytogenes wywołuje chorobę zwaną **listeriozą.** U ludzi choroba ta rozwija się głównie na skutek spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego: serów dojrzewających, kiełbas typu salami, mięsa, drobiu oraz przetworów mięsnych pakowanych próżniowo.

Dawka infekcyjna dla człowieka wynosi od 10^2 do 10^5 żywych komórek na gram zanieczyszczonej żywności. Jest to uzależnione od rodzaju szczepu oraz odporności człowieka na infekcję. Wirulentne szczepy są zdolne namnożyć się w organizmie i później wywołać posocznicę. Szczepy zjadliwe produkują hemolizynę zwaną listeriozyną O, fosfolipazy C, lecytynazy, metaloproteazy. U większości osób zatrucie objawia się lekkim rozstrojem żołądka. Objawy chorobowe mogą wystąpić od 14 do nawet 40 dnia od czasu spożycia posiłku. W grupie podwyższonego ryzyka znajdują się osoby starsze, kobiety w ciąży, dzieci oraz osoby o obniżonej odporności. W ich wypadku listerioza objawia się zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, zapaleniem wsierdzia, węzłów chłonnych, szpiku. U kobiet w ciąży może dojść do obumierania płodów, przedwczesnych porodów czy poronień.

c. Wykrywanie

Określanie obecności *Listeria monocytogenes* w próbkach żywności obejmuje kilka etapów:

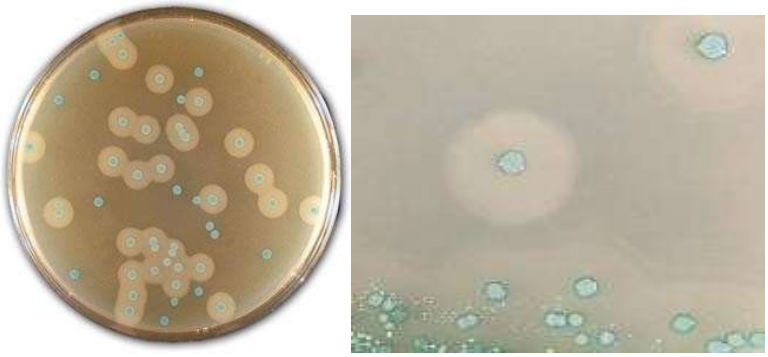
- Wstępne namnażanie na płynnej pożywce „pół-selektywnej”
- Namnażanie wtórne na płynnej pożywce selektywnej
- Różnicowanie na podłożach agarowych
- Identyfikacja w oparciu o testy biochemiczne

W pierwszym etapie, w celu regeneracji komórek potencjalnie uszkodzonych prowadzi się hodowlę na podłożu bulionowym pół-Frasera z dodatkiem ½ dawki suplementu selektywnego w temperaturze 30°C przez 24±3godz. Z hodowli pobiera się 0,1cm^3 i posiewa do 10cm^3

bulionu Frasera. **Bulion pół-Frasera i Frasera** to podłoża, które oprócz składników odżywczych (peptony, ekstrakty) zawierają eskulinę i chlorek litu. Do podłoża po sterylizacji wprowadzany jest roztwór cytrynianu amonowo-żelazowego i dodatek selektywny w postaci roztworu antybiotyków: akryflawiny i kwasu nalidyksowego (w bulionie pół-Frasera jest go połowę mniej). Antybiotyki i chlorek litu silnie hamują wzrost bakterii Gram-ujemnych i większość Gram-dodatnich. Dodatkowo chlorek litu jest czynnikiem wybiórczym, ze względu na tolerancję wyższych stężeń tej soli przez *Listeria monocytogenes*. Szczepy *Listeria monocytogenes* hydrolizują eskulinę do eskuletiny i glukozy. Eskuletina tworzy czarny kompleks z żelazem (III) pochodzącym z cytrynianu. Hodowla na tym podłożu po namnożeniu pałeczek *Listeria* sp. przybiera czarnoszarą lub czarną barwę.

Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 48±3godz. namnożoną hodowlę posiewa się izolacyjnie na pożywki selektywne. Pierwszą z nich jest pożywka wg Ottaviani i Agosti (ALOA). Druga pozostaje do wyboru przez laboratorium i może to być Oxford lub PALCAM agar.

Pożywka ALOA zawiera składniki wybiórcze (kwas nalidyksowy, polimyksynę B, cykloheksymidynę), który jest rozkładany przez enzymy pałeczek *Listeria* sp., a także substrat chromogenny. Wyrosłe kolonie mają barwę zielononiebieską i otoczone są nieprzezroczystą strefą podłoża (rozkład fosfatydyloinozytolu przez fosfolipazę C).



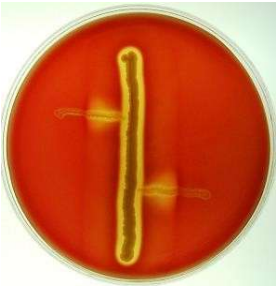
Rys. Kolonie *Listeria monocytogenes* na podłożu ALOA.

Pożywka Oxford-agar to pożywka selektywno-różnicująca zawierająca w swoim składzie mieszaninę antybiotyków, skrobię, eskulinę, chlorek litu i cytrynian amonowożelazowy(III). Kolonie pałeczek *Listeria* sp. mają na tym podłożu barwę ciemnoszarą z zielonkawym odcieniem i są otoczone strefą czarnego podłoża. Zabarwienie to jest wynikiem rozkładu eskuliny i wytrącenia powstałego w reakcji z żelazem kompleksu o barwie czarnej.

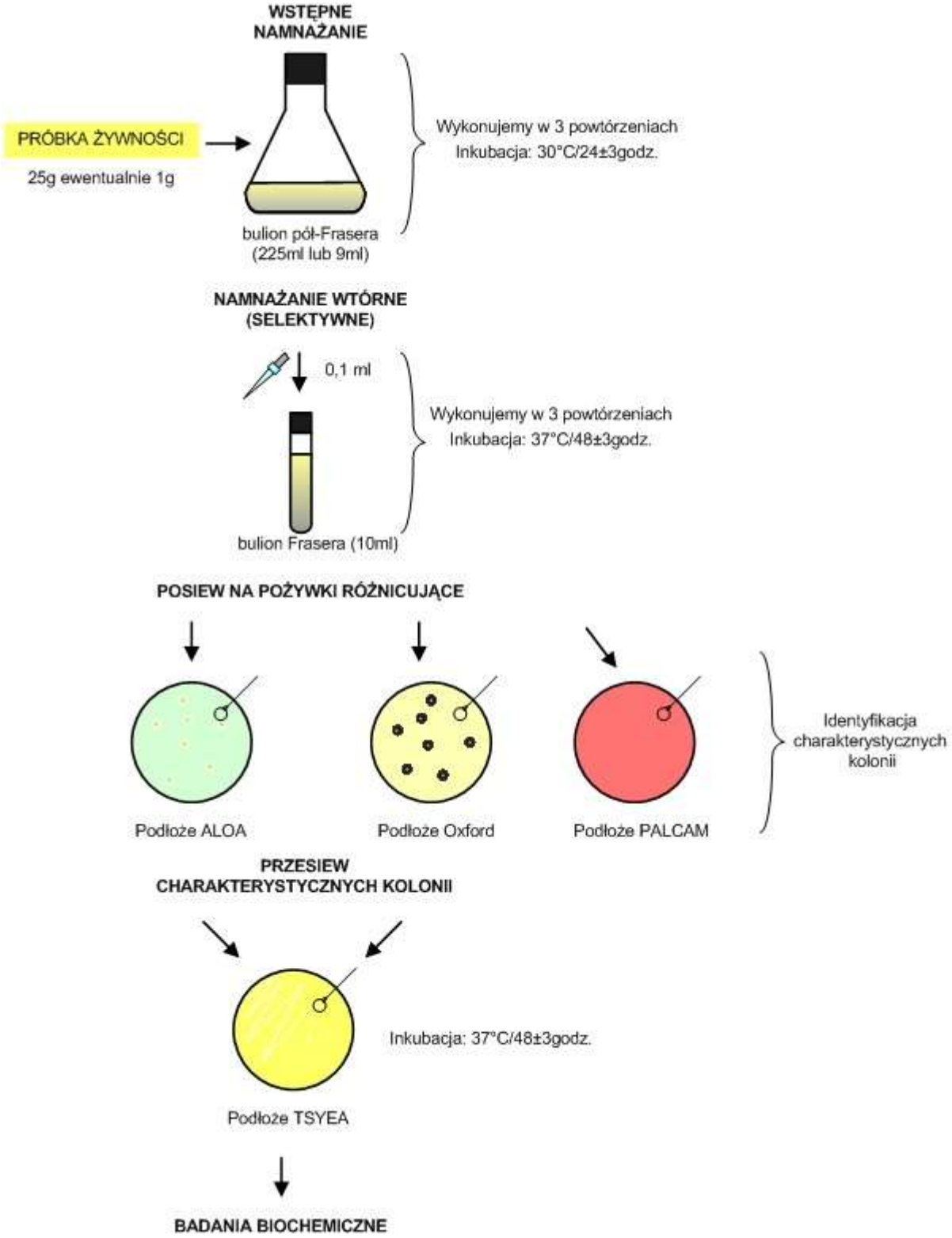
Rys. Kolonie *Listeria monocytogenes* na podłożu Oxford.

Pożywka PALCAM-agar- pożywka wybiórczo-rożnicująca. Zawiera w swoim składzie mannitol, czerwień fenolową, glukozę, eskulinę, chlorek litu, cytrynian amonowożelazowy(III), a także zestaw antybiotyków: siarczan polimyksyny, ceftacydynę i akryflawinę. Podłoże po wylaniu na płytki ma barwę czerwoną i jest klarowne. Pałeczki *Listeria* sp. wyrastają na tym podłożu w postaci szarych kolonii z zielonym odcieniem i otoczone są strefą czarnego podłoża.

Po 48godz. inkubacji w 37°C dokonuje się wstępnej identyfikacji na podstawie wyglądu kolonii wyrosłych na podłożach selektywnych. Z każdej płytki wybiera się 5 charakterystycznych kolonii i przesiewa izolacyjnie na podłoże agarowe z soją i ekstraktem drożdżowym (TSYEA) celem wykonania testów biochemicznych. Zastosowanie podłoża TSYEA eliminuje ewentualne interakcje między składnikami podłóż selektywnych a reagentami testów biochemicznych. Wykonuje się również test CAMP celem określenia zdolności do hemolizy. Wykonuje się posiew paskowy na podłoże agar z krwią.



Rys. Ilustracja testu CAMP, widoczna strefa hemolizy.



Rys. Schemat postępowania podczas wykrywania *Listeria monocytogenes*

Badania biochemiczne obejmują:

- **test na hemolizę (test CAMP)** - polegający na posiewie testowych szczepów: *Staphylococcus aureus* i *Rhodococcus equi* oraz szczepu badanego na podłoże agarowe z krwią. Szczep badany posiewa się na powierzchni podłoża w postaci wąskiej linii prostopadle do szczepów testowych. Jeżeli po inkubacji wystąpiło wzmocnienie strefy hemolizy w miejscu linii posiewu *Staphylococcus aureus*, a nie odnotowano takiej reakcji w pobliżu szczepu *Rhodococcus equi* świadczy to o obecności *Listeria monocytogenes.* - **test na katalazę** – katalaza jest enzymem, który rozkłada toksyczny dla komórki H_2O_2 do H_2O i tlenu. Na szkiełko podstawowe należy nanieść kroplę 3% roztworu H_2O_2 i zawiesić w niej pobraną kolonię, pęcherzyki gazu wskazują na obecność katalazy. *Listeria monocytogenes* ma zdolność do wytwarzania katalazy.
- **wytwarzanie kwasów z cukrów** - posiew do pożywek z ramnozą, ksyloza i purpurą bromokrezolową. Wynik dodatni to zmiana barwy wskaźnika z purpurowej na żółtą, świadczący o zdolności do rozkładu danego cukru. *Listeria monocytogenes* nie fermentuje ksylozy, fermentuje ramnozę.
- **barwienie metodą Grama** - w obrazie mikroskopowym powinny być widoczne cienkie Gram-dodatnie pałeczki.

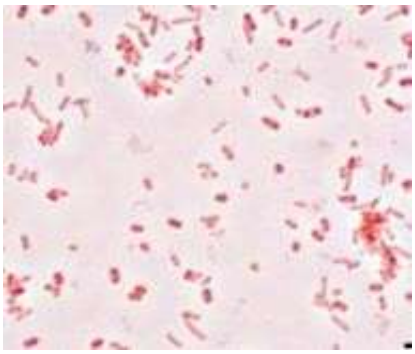
d. Oznaczanie liczby

Należy wykonać posiew powierzchniowy po 0,1 cm^3 badanego materiału lub jego rozcieńczenia na podłoże ALOA. Po inkubacji w temp. 37°C przez 24h±3godz. liczy się charakterystyczne, zielononiebieskie kolonie otoczone nieprzezroczystą strefą.

2. *Salmonella* sp.

a. Charakterystyka

Są to ruchliwe Gram-ujemne pałeczki o wymiarach ok. 0,6-3µm należące do rodziny *Enterobacteraceae.* Dobrze rosną w warunkach tlenowych i beztlenowych. Nie tworzą przetrwalników. Temperatury rozwojowe mieszczą się w granicach 5- 45°C. Są wrażliwe na wysoką temperaturę ale wykazują dużą wytrzymałość na wysuszanie. Wykazują wrażliwość na wysokie stężenia NaCl (do 9%) oraz niskie pH. Fermentują glukozę, natomiast nie fermentują laktozy i sacharozy, co jest ważną cecha podczas ich identyfikacji. Są zdolne do dekarboksylacji lizyny, ornityny i argininy. Redukują azotany, wytwarzają siarkowodór. Nie upłynniają żelatyny i nie rozkładają mocznika.



Rys. Pałeczki *Salmonella* sp. w obrazie mikroskopowym, zabarwione metodą Grama.

Rodzaj *Salmonella* obejmuje dwa gatunki: *S. enterica* i *S. bongori*. *Salmonella enterica* podzielona została na 6 podgatunków, a każdy z nich, ze względu na różnice w budowie antygenów, na typy serologiczne. Do głównych serotypów należą:

- *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Virchow, *S.* Hadar – odpowiedzialne za zapalenie jelita cienkiego i grubego
- *S.* Typhi - wywołujące dur brzuszny
- *S.* Paratyphi – wywołujące dury rzekome.

b. Występowanie

Pałeczki *Salmonella* sp. najczęściej zasiedlają przewód pokarmowy zwierząt domowych i dzikich, drobiu, ptaków i owadów a także gryzoni. Dużą rolę w przenoszeniu pałeczek *Salmonella* sp. odgrywają produkty roślinne szczególnie z terenów nawożonych fekaliami. Źródłem zanieczyszczenia żywności mogą być także ludzie chorzy i nosiciele tych bakterii. Z racji dużej oporności na wysuszanie pałeczki te mogą przeżywać przez długi czas w kurzu, paszach, suszonej żywności. Bardzo dobrze radzą sobie także w produktach płynnych i mrożonych, w których przeżywają przez długi czas w stanie anabiozy. Najczęściej są izolowane z jaj oraz zawierających je produktów (lody, ciastka, kremy, czekolada).

Dawka infekcyjna dla człowieka to ok. 10^5 kom/g zanieczyszczonej żywności. Dla osób starszych i niemowląt już 10^2 kom/g może się okazać wystarczające do wywołania choroby. Po przedostaniu się do przewodu pokarmowego pałeczki *Salmonella* sp. zdolne są do namnażania się w jelicie cienkim, kolonizacji i penetracji w głąb ściany jelita.

Po uwolnieniu endotoksyn zawartych w komórkach widoczne są objawy salmonellozy: gorączka, bóle brzucha, wymioty. Objawy widoczne są po 12-48godz.

W przypadku **duru brzusznego** okres wylęgania choroby wynosi od tygodnia do czterech. Typowym objawom zatrucia towarzyszy różowa wysypka zwana różyczką durową, powiększenie śledziony i wątroby. **Dur rzekomy** ma podobne objawy, ale łagodniejszy przebieg

c. Wykrywanie

Oznaczanie obecności pałeczek *Salmonella* sp. w próbkach żywności obejmuje kilka etapów:

- Przednamnżanie na wodzie peptonowej
- Namnażanie selektywne na płynnych pożywkach selektywnych
- Różnicowanie na podłożach agarowych
- Identyfikacja w oparciu o testy biochemiczne i serologiczne

W pierwszym etapie, w celu namnożenia i regeneracji komórek uszkodzonych prowadzi się hodowlę na płynnej wodzie peptonowej w temperaturze 37°C przez 18±2godz. **Zbuforowana woda peptonowa** stosowana jest w celu nieselektywnego namnażania pałeczek *Salmonella* sp. Dla takich produktów jak kakao czy wyroby z czekolady stosuje się wodę peptonową z dodatkiem kazeiny lub odtłuszczonego mleka oraz zieleni brylantowej w celu zahamowania wzrostu bakterii Gram-dodatnich.

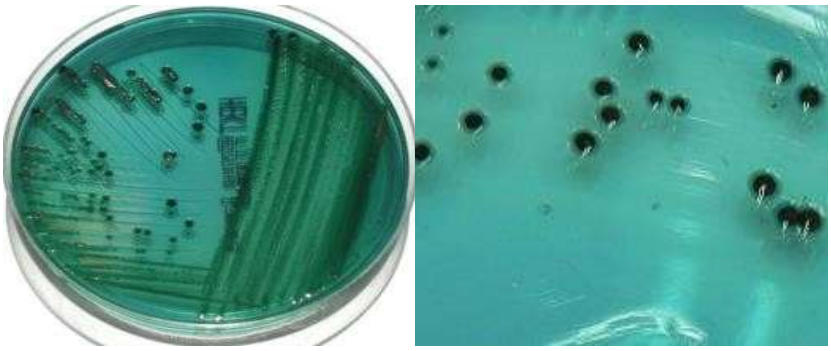
Z hodowli pobiera się 0,1cm^3 i posiewa do 10cm^3 pożywki selektywnej RapaportVassiliadis z soją oraz do pożywki MKTTn w ilości 1cm^3. **Pożywka Rappaport-Vassiliadis (RVS)** jest płynna, silnie selektywna, zawiera w swoim składzie zieleń malachitową i chlorek sodu (hamujące wzrost mikroflory towarzyszącej). Pepton sojowy, pH 5,2 i podwyższona temperatura inkubacji (41,5°C) sprzyjają wzrostowi szczepów *Salmonella*. sp Podłoże ma barwę ciemnoniebieską i jest klarowne. Szczepy *Salmonella* sp. rosną na tym podłożu w postaci mlecznego osadu, barwa samego podłoża nie ulega zmianie. Druga pożywka selektywna: **Müllera-Kauffmana (KKTTn)**, zawiera w swoim składzie tiosiarczan sodu i jodek potasu, które reagując tworzą związek o nazwie tetrationian sodu hamujący wzrost pałeczek grupy coli. Pałeczki *Salmonella* sp. mają zdolność do redukcji tego związku. W podłożu znajduje się także zieleń brylantowa, która z kolei hamuje wzrost bakterii Gramdodatnich.

Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 48±3godz. hodowle posiewa się izolacyjnie na dwie pożywki selektywne. Pierwszą z nich jest pożywka XLD. Druga pozostaje do wyboru przez laboratorium i może to być podłoże BGA lub Hektoen. **Pożywka XLD** zawiera laktozę, ksylozę, sacharozę, L-lizynę, tiosiarczan sodu, deoksycholan sodu, cytrynian amonowożelazowy (III), czerwień fenolową. Pozwala określić zdolność do fermentacji cukrów, dekarboksylacji lizyny i wytwarzania siarkowodoru. Typowe kolonie pałeczek *Salmonella* sp. są lekko przezroczyste z czerwonym brzegiem i czarnym centrum.

Pożywka BGA - z zielenią brylantową, czerwienią fenolową, laktozą, sacharozą. Pałeczki *Salmonella* nie fermentują sacharozy i laktozy, następuje alkalizacja. Charakterystyczne kolonie są koloru podłoża (różowe) i otoczone jasno-czerwoną strefą. Pozostałe kolonie są białe.

Rys. Kolonie *Salmonella* Typhimurium na podłożu BGA.

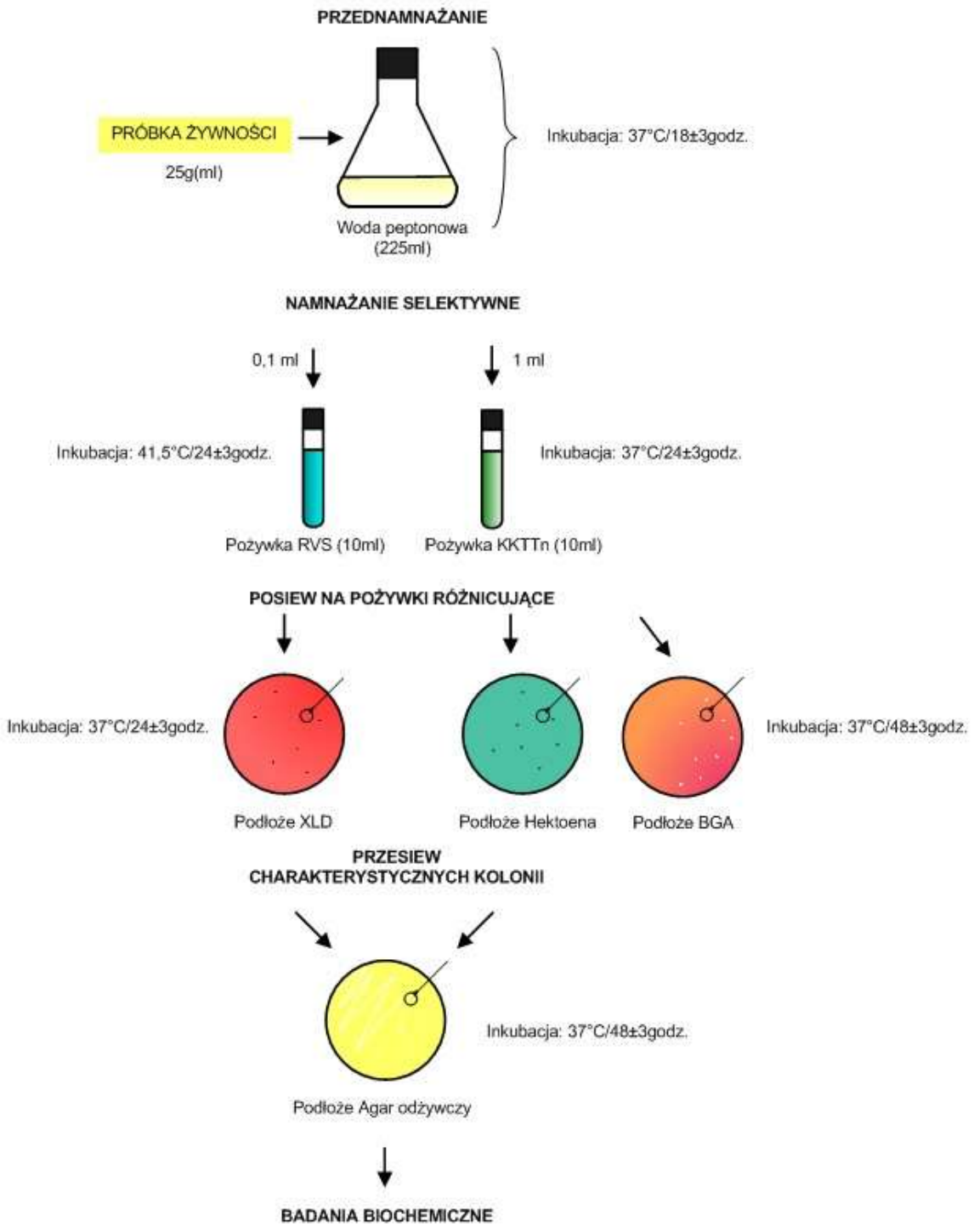
Pożywka Hektoen'a - zawiera laktozę, sacharozę, salicynę, sole żółciowe, tiosiarczan sodu, cytrynian amonowo-żelazowy (III) i kwaśną fuksynę. Tiosiarczan sodu jest substratem do produkcji H_2S, który tworzy wspólnie z żelazem czarny precypitat. Typowe kolonie pałeczek *Salmonella* sp. są barwy zielonej z lub bez czarnego środka.



Rys. Kolonie *Salmonella* Typhimurium na podłożu Hektoen'a.

Po 48godz. inkubacji w 37°C dokonuje się wstępnej identyfikacji na podstawie wyglądu kolonii wyrosłych na podłożach selektywnych. Z każdej płytki wybiera się

5 charakterystycznych kolonii i posiewa izolacyjnie na podłoże agar odżywczy, a następnie wykonuje się badania biochemiczne.



Rys. Schemat postępowania podczas wykrywania obecności *Salmonella* sp.

Badania biochemiczne obejmują:

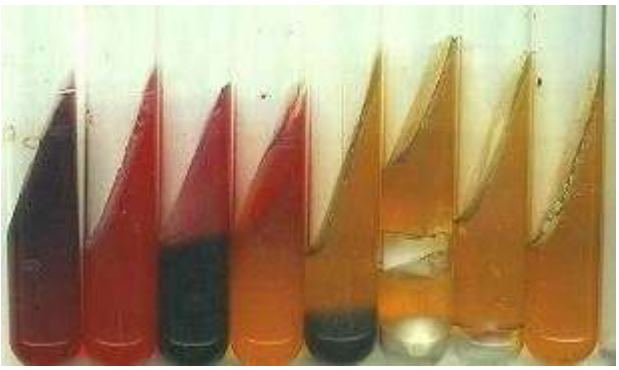
- **zdolność do fermentacji cukrów** (glukoza, laktoza, sacharoza) i tworzenia H_2S na agarze trójcukrowym TSI. **Agar trójcukrowy TSI** ma postać słupkoskosów, posiewy wykonuje się w dwojaki sposób: na powierzchni skosu i wgłębnie. Po inkubacji dokonujemy obserwacji fermentacji glukozy (barwa słupka), laktozy (barwa skosu), wytwarzania gazu (pęcherzyki gazu, porozrywany agar), oraz wytwarzanie H_2S (barwa czarna). Interpretacja wyników:

- **słupek**

barwa żółta - fermentacja glukozy
barwa czerwona lub niezmieniona - brak fermentacji glukozy barwa
czarna - wytworzenie siarkowodoru pęcherzyki gazu lub rozerwany
słupek – wytworzenie gazu z glukozy

- **skos**

barwa żółta - fermentacja laktozy i/lub sacharozy
barwa czerwona lub niezmieniona – brak fermentacji laktozy i sacharozy



Rys. Możliwe reakcje zachodzące w podłożu TSI.

- **wytwarzanie ureazy** na pożywce Christensena – podłoże zawiera ekstrakt drożdżowy, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, mocznik, czerwień fenolową. Jeżeli po 24godz. hodowli nastąpiła zmiana barwy na amarantowy świadczy to o rozkładzie mocznika (obecność NH_4OH)
- **dekarboksylacja lizyny** na pożywce z lizyną, ekstraktem drożdżowym, glukozą i purpurą bromokrezolową. Po zaszczepieniu podłoża, posiew należy zalać parafiną, po czym wstawić do inkubacji. Zawsze wykonujemy próbę kontrolną. Drobnoustroje podczas wzrostu zużywają glukozę, zakwaszając podłoże (zmiana barwy na żółtą), następnie zachodzi rozkład aminokwasów powodujący wtórną alkalizację i powrót do barwy fioletowej, podczas gdy próba kontrolna jest barwy żółtej.
- **wykrywanie ß-galaktozydazy** – służy do tego test krążkowy nasączony ONPG, który w obecnośći ß-galaktozydazy ulega rozszczepieniu do związku o barwie żółtej. Test wykonuje się w probówce zawierającej 0,1 cm^3 sterylnej wody, którą zaszczepia się odrobiną hodowli, a następnie umieszcza się tam krążek testowy i poddaje inkubacji. ß-galaktozydaza jest enzymem odpowiedzialnym za rozkład laktozy do glukozy i galaktozy.
- **reakcja Vogues-Proskauera (VP)** - po hodowli na pożywce Clarka dodaje się 2 krople KOH i roztworu keratyny oraz 3 krople roztworu 1-naftolu. Wytworzenie różowego zabarwienia świadczy o obecności acetoiny.
- **wytwarzanie indolu** na pożywce z tryptofanem - po zaszczepieniu i inkubacji należy zbadać obecność indolu za pomocą odczynnika Kovacsa. Powstanie czerwonej obrączki świadczy o obecności indolu.

Interpretacja wyników:

Test	Szczepy *Salmonella* sp.				
	Salmonella Typhi	*Salmonella* Parathyphi A	*Salmonella* Parathyphi B	*Salmonella* Parathyphi C	Inne szczepy
TSI glukoza (tworzenie kwasu)	+	+	+	+	+
TSI glukoza (tworzenie gazu)	-	+	+	+	+
TSI laktoza (tworzenie kwasu)	-	-	-	-	-
TSI sacharoza (tworzenie kwasu)	-	-	-	-	-
TSI siarkowodór	+	-	+	+	+
Rozkład mocznika	-	-	-	-	-
Dekarboksylacja lizyny	+	-	+	+	+
Wytwarzanie ß-galaktozydazy	-	-	-	-	-
Reakcja VP	-	-	-	-	-
Wytwarzanie indolu	-	-	-	-	-

3. Cronobacter sakazakii (Enterobacter sakazakii)

a. Charakterystyka

Cronobacter sakazakii jest Gram-ujemną pałeczką należącą do bakterii z rodziny *Enterobacteraceae*. Dobrze rozwija się w temp. 37-41°C, jest względnym beztlenowcem. Jest uważana za patogen wieku noworodkowego, może powodować ciężkie zakażenia, takie jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych noworodków lub martwicze zapalenie jelit.

b. Występowanie

Najczęściej izolowane z produktów żywnościowych przeznaczonych dla niemowląt, takich jak mleko w proszku i żywność dietetyczna w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczona dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy Występują także w glebie, wodzie oraz warzywach. W żywności obecność *C. sakazakii* stwierdzono w serach, tofu, herbacie, wędzonym mięsie, mielonej wołowinie.

Dawka infekcyjna. Przyjmuje się, że dawka infekcyjna wynosi około 10^3 komórek na gram.

c. Wykrywanie

Oznaczanie obecności w żywności *Cronobacter sakazakii* obejmuje kilka etapów przedstawionych na schemacie:

PRZEDNAMNAŻANIE
Próbka (10g ewentualnie 1g)+zbuforowana woda peptonowa (225cm^3 ewentualnie 9cm^3)
Inkubacja: 37°C/18±2h

↓

NAMNAŻANIE SELEKTYWNE
Posiew z każdej hodowli po etapie przednamnażania
0,1 cm^3 do pożywki Most z wankomycyną
Inkubacja: 44°C/24±2godz.

↓

PRZESIEW NA POŻYWKI RÓZNICUJĄCE
Chromogenna pożywka agarowa
Inkubacja: 44°C/24±2godz.

↓

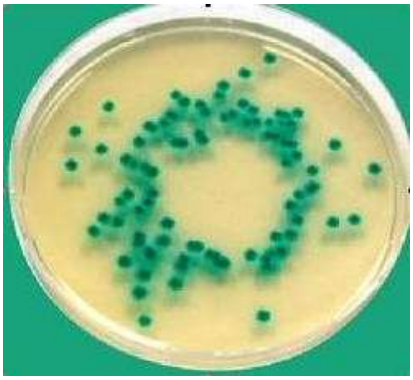
POTWIERDZANIE
Wytwarzanie żółtego pigmentu, wybór 5 typowych kolonii Posiew na płytki z pożywką TSA
Inkubacja: 24°C/48±4godz.

↓

IDENTYFIKACJA
Selekcja charakterystycznych kolonii z każdej płytki

↓

BADANIA BIOCHEMICZNE



Rys. Kolonie *Cronobacter sakazakii* na podłożu chromogennym.

d. Badania biochemiczne obejmują:

- **test na wytwarzanie oksydazy** - pobrać ezą część charakterystycznej kolonii, rozetrzeć na bibule filtracyjnej nasączonej odczynnikiem do wykrywania oksydazy, wynik jest dodatni, jeżeli w ciągu 10s barwa bibuły zmieni się na fioletową;

- **test na wytwarzanie dekarboksylazy L-lizyny** - zawiesić kolonię w pożywce do wykrywania dekarboksylacji L-lizyny, barwa fioletowa po inkubacji to wynik dodatni, żółta- ujemny;
- **test na wytwarzanie dekarboksylazy L-ornityny** - zawiesić kolonię w pożywce do wykrywania dekarboksylacji L-ornityny, barwa fioletowa po inkubacji to wynik dodatni, żółta- ujemny;
- **test do wykrywania hydrolazy L-argininy** - zawiesić kolonię w pożywce do wykrywania hydrolizy L-argininy, barwa fioletowa po inkubacji to wynik dodatni, żółta- ujemny;
- **fermentacja różnych cukrów**
- **wykorzystanie cytrynianu na pożywce Simmonsa** - podłoże to służy do różnicowania bakterii wg ich zdolności do asymilowania cytrynianu jako jedynego źródła węgla. Podłoże ma postać skosów, wykonuje się posiew rysowy. Wzrost oraz zmiana barwy podłoża z zielonej na niebieską wskazuje na wynik dodatni.

Interpretacja wyników:

Test potwierdzający	Wynik	Procent szczepów *Cronobacter sakazakii* wykazujących reakcję
Wytwarzanie żółtego pigmentu	+	>99
Oksydaza	-	>99
Dekarboksylaza L-lizyny	-	>99
Dekarboksylaza L-ornityny	+	±90
Hydrolaza L-ornityny	+	>99
Zakwaszenie w wyniku:		
fermentacji D-sorbitolu	-	±95
fermentacji L-ramnozy	+	>99
fermenacja D-sacharozy	+	>99
fermentacja amygdaliny	+	>99
hydrolizy D-meliobiozy	+	>99
hydrolizy cytrynianu	+	>95

4. Enterotoksyny gronkowcowe

a. Charakterystyka

Za produkcję enterotoksyn najczęściej odpowiedzialne są szczepy *Staphylococcus aureus*. Enterotoksyny gronkowcowe są ciepłostabilne, dobrze rozpuszczalne w wodzie i roztworach soli, nie rozkładają się podczas gotowania. Jak dotąd zidentyfikowano 7 enterotoksyn o różnych typach serologicznych i określono je za pomocą symboli A, B, $C_{1,2,3}$,D, E.

b. Występowanie

Według obecnie obowiązujących norm zaleca się badanie obecności enterotoksyny gronkowcowej w serach, mleku w proszku, serwatce w proszku. Do produktów podejrzanych o obecność toksyn gronkowca należą także: mięso, drób, puszkowane pieczarki, makarony, produkty piekarskie, jaja i majonez.

c. Wykrywanie

Wykrywanie toksyn obejmuje techniki serologiczne jak i genetyczne, np. wykrywanie enterotoksyny A za pomocą bioluminescencyjnego testu immunologicznego. Do metod serologicznych należy test ELISA oraz testy lateksowe (RPLA). Ostatnio proponowane są także analizy z użyciem biosensorów i powierzchniowego rezonansu plazmowego. Wprowadzane są również metody molekularne z zastosowanie elektroforezy SDS-PAGE.

5. Alternatywne metody wykrywania wskaźników bezpieczeństwa żywności

W ostatnich latach dokonano znacznego postępu w zakresie metod wykrywania *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. i enterotoksyn gronkowcowych w żywności. Obecnie oprócz tradycyjnych metod hodowlanych występują szybkie metody alternatywne pozwalające wyraźnie skrócić czas analizy:

- Tecra Unique Salmonella, Tecra Unique Listeria, Tecra Unique Staphylococcal Enterotoxin – testy służą do szybkiego wykrywania patogenów *in vitro*. Test zawiera zestawy probówek z odczynnikami, które są gotowe do użycia. Zasada testu opiera się na reakcji immunoenzymatycznej. Jednoznaczny pozytywny lub negatywny wynik uzyskuje się po 22godz.
- API Listeria, API 20E (do wykrywania pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, m.in. *Salmonella* sp.) - biochemiczny szereg identyfikacyjny, na który składają się mikroprobówki zawierające odwodnione substraty. Do każdej mikroprobówki wprowadza się zawiesinę bakteryjną, która rozpuszcza substrat. Reakcje biochemiczne zachodzące w czasie inkubacji powodują zmiany zabarwienia, powstałe samoistnie lub po dodaniu odczynnika wskaźnikowego. Odczytu wyników dokonuje się w oparciu o program komputerowy Api Web Plus.

- mini Vidas/Vidas – testy Vidas służą do wykrywania antygenów na zasadzie immunoenzymatycznej z ostatecznym odczytem fluorescencyjnym (ELFA), przeprowadzonym przy użyciu immunoanalizatora VIDAS. Wszystkie etapy reakcji przebiegają automatycznie w immunoanalizatorze mini Vidas. Po zakończeniu analizy wyniki podlegają automatycznej analizie przez komputer, wyliczana jest wartość testu i drukowany jest wynik dla każdej próbki. Test pozwala na wykrywanie w żywności *Listeria monocytogenes* (LMO), *Salmonella* sp. (SLM), enterotoksyn gronkowcowych (SET).
- PCR – technika PCR polega na selektywnym powielaniu (amplifikacji) fragmentów DNA w warunkach *in vitro*. Testy PCR są bardzo czułe i pozwalają na wykrywanie nawet śladowych ilości DNA. Wysoka czułość, szybkość oraz możliwość zastosowania reakcji PCR do wykrywania i identyfikacji patogenów bez konieczności wcześniejszej ich izolacji z badanego materiału

Część praktyczna

1. Wykonać posiewy potwierdzające z ćwiczenia nr 12
2. Oznaczanie obecności *Salmonella* sp. w żywności, posiewy demonstracyjne
3. Oznaczanie obecności *Listeria monocytogenes*. w żywności, posiewy demonstracyjne