

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: MICROBIOLOGIE-IMUNOLOGIE**

**DOCTORAND
VLAD-SABIE ALINA**

**TEZĂ DE DOCTORAT
CERCETĂRI PENTRU DETERMINAREA
CANTITATIVĂ SIMULTANĂ DE BACTERII
PATOGENE DIN UNELE PRODUSE
ALIMENTARE PRIN
PCR ÎN TIMP REAL MULTIPLEX**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. CARP-CĂRARE MIHAI**

IAȘI, 2011

REZUMAT

Teza prezintă un număr de 224 pagini, fiind structurată conform uzanțelor în două părți, iar pentru realizarea acesteia s-a utilizat ca sursă de informare și documentare un număr de 372 titluri bibliografice.

Prima parte, formată din 52 de pagini (31,5%) reflectă stadiul actual al cunoașterii privind tema abordată și este structurată din 3 capitole, 10 subcapitole și ilustrată prin 7 figuri și 2 tabele.

Capitolul I intitulat **Calitatea și igiena cărnii** este alcătuit din 2 subcapitole și cuprinde noțiuni privind calitatea nutritivă și senzorială a cărnii, precum și calitatea igienică a acesteia. Întrucât carnea prin compoziția ei reprezintă un mediu prielnic pentru dezvoltarea microorganismelor autohtone și a celor patogene, este necesară cunoașterea măsurilor de prevenție pentru a evita contaminarea acesteia. Pe lângă măsurile de igienă, impuse prin lege, în multe țări se aplică și o serie de măsuri privind biocontrolul contaminării cărnii cu microorganisme patogene.

Capitolul II intitulat **Microorganisme patogene implicate în contaminarea cărnii**, este structurat în 4 subcapitole, fiecare subcapitol cuprinzând descrierea succintă unei specii bacteriene cu potențial patogen pentru sănătatea omului. S-au descris astfel 4 bacterii cunoscute ca agenți patogeni implicați în toxiinfecțiile alimentare: *Escherichia coli O157:H7*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter spp.*, cu referire îndeosebi la specia *Campylobacter jejuni*. La fiecare specie bacteriană s-a descris sintetic istoricul îmbolnăvirilor de origine alimentară, aspectele morfologice și culturale, factorii de virulență, sursele de contaminare pentru om, precum și metodele și tehnicile utilizate pentru izolarea lor din alimente. Aspectele legate de morfologie și factorii de virulență sunt importante, întrucât pe baza cunoașterii lor, actualmente se sintetizează o serie de fragmente nucleotidice utilizate ulterior în testele de biologie moleculară.

Capitolul III intitulat **Tehnica PCR și real-time PCR și aplicațiile acestora în microbiologia alimentelor** este structurat în 4 subcapitole. Primul subcapitol cuprinde noțiuni legate de reacția PCR clasică. S-au descris astfel, structura și modul de replicare al ADN-ului, tehnici de extracție ale ADN-ului, principiul reacției PCR cu etapele amplificării, instrumentele necesare unei reacții PCR. De asemenea, s-au detaliat componentele unei reacții PCR și importanța condițiilor de reacție. Al doilea subcapitol evidențiază principiul reacției real-time PCR, analiza grafică a datelor experimentale, sistemele de detecție, instrumentele necesare reacției, precum și sistemele de cuantificare prin această tehnică. Subcapitolul al treilea vizează noțiuni despre reacția

PCR multiplex, iar în ultimul subcapitol sunt descrise primele studii în care s-au aplicat aceste tehnici, pentru detecția microorganismelor patogene din alimente.

Partea a doua, însumează 117 de pagini (68,5%) și cuprinde rezultatele cercetărilor proprii privind detecția și cuantificarea simultană de bacterii patogene din alimente prin tehnica real-time PCR. Este structurată din 5 capitole și este ilustrată prin 70 de figuri și 47 de tabele. Fiecare capitol de cercetări cuprinde: materialul și metoda de lucru, rezultatele obținute și discutarea lor și concluziile parțiale.

În capitolul IX sunt sintetizate cele 19 concluzii finale, principalele aspecte desprinse în urma cercetărilor efectuate.

În capitolul IV al părții a II-a sunt descrise scopul și obiectivele cercetărilor.

Obiectivele cercetării au fost următoarele:

- Izolarea și identificarea a 4 bacterii patogene din diferite tipuri de eșantioane, implicate frecvent în toxiinfecții alimentare: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter jejuni*, prin tehnicile microbiologice clasice, utilizând standardele naționale în vigoare;
- Detecția calitativă și cantitativă a tulpinilor izolate, prin tehnica TaqMan real-time PCR, utilizând kiturile TaqMan Pathogen Detection kit (Applied Biosystems) și compararea rezultatelor obținute în urma amplificărilor ADN-ului din culturi pure și din eșantioanele inoculate artificial;
- Detecția calitativă și cantitativă a tulpinilor bacteriene izolate prin tehnici TaqMan real-time PCR consacrate, cu perechi de primeri și sonde omologate și compararea rezultatelor obținute prin amplificarea ADN-ului din culturile pure și din eșantioanele inoculate artificial;
- Studiul specificității, sensibilității (limitei de detecție) și repetabilității metodelor TaqMan real-time PCR omologate;
- Detecția calitativă și cantitativă a unor tulpini de *Salmonella spp.*, *E. coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter jejuni* prin tehnici TaqMan real-time PCR cu primeri și sonde neomologate obținute în programul PrimerExpres;

În capitolul V intitulat **Cercetări privind izolarea și identificarea speciilor de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157:H7* și *Campylobacter jejuni* din alimente prin testele microbiologice clasice** investigațiile au urmărit izolarea și identificarea celor 4 specii bacteriene prin testele clasice, conform standardelor legale. Pentru izolarea tulpinilor de *Salmonella* au fost testate un număr de 135 de probe de carne (carne de pasăre, porc, oaie și bovine), pentru *Listeria monocytogenes* s-au testat 129 de probe (carne de oaie,

porc, melc și bovine), pentru *E. coli O157:H7* s-au testat 40 de probe de carne de vită și tocată, iar pentru izolarea speciei *Campylobacter jejuni* s-au testat 69 de probe de carne de pasăre și porc. Cercetările s-au efectuat în cadrul laboratorului de Microbiologie al Facultății de Medicină Veterinară Iași, utilizându-se standardele SREN ISO 6579/AC/2006 pentru identificarea tulpinilor de *Salmonella*, SREN ISO. 11290-1-A₁-2004 pentru *Listeria monocytogenes*, EN ISO 16654/2001 pentru *E. coli O157:H7* și SREN ISO 10272/2007 pentru *Campylobacter jejuni*. Tehnicile de lucru au inclus o etapă de preîmbogățire sau îmbogățire, o etapă de izolare selectivă și o etapă de confirmare biochimică și/sau serologică.

În urma testelor, s-au izolat 7 tulpini de *Salmonella spp.* din carnea de pasăre și porc, 11 tulpini de *Listeria monocytogenes* din carnea de oaie, porc și melc și 9 tulpini de *Campylobacter jejuni* din carnea de pasăre. Probele testate pentru izolarea speciei *E. coli O157:H7* au fost negative, iar caracterele biochimice și testele moleculare s-au realizat pe 3 tulpini tipizate.

În capitolul VI intitulat **Cercetări privind detecția calitativă și cantitativă a speciilor de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157:H7* și *Campylobacter jejuni* din culturi și alimente prin TaqMan real-time PCR (TaqMan Pathogen Detection Kit)** s-a urmărit detecția și cuantificarea ADN-ului bacterian din culturi pure și din eșantioane de carne inoculată artificial cu ajutorul a 4 kituri, după un program de amplificare comun. Inocularea cărnii s-a realizat cu 1 ml diluție, utilizându-se 5 diluții (10^{-1} - 10^{-5}), iar cuantificarea ADN-ului s-a realizat cu ajutorul unei scări standard alcătuită din 5 puncte de calibrare ale unei tulpini ATCC cu concentrația stoc cunoscută. S-au realizat câte 2 experimente pe câte 2 tulpini (pe ADN extras din cultură pură și ADN extras din carnea inoculată artificial) pentru fiecare specie în parte. Rezultatele obținute au variat pentru fiecare specie în parte: pentru tulpinile de *Salmonella*, din culturile pure, cantitatea de ADN a variat de la 36,13 și 57,7 ng/μl la cele mai mari diluții până la 0,09-0,06 ng/μl la cele mai mici diluții. Conform conversiei din ng/μl în UFC/reacție, s-au obținut următoarele valori: $3,6 \times 10^6$ și $5,5 \times 10^6$ UFC/reacție la cele mai mari diluții și 9×10^3 și 1×10^2 UFC/reacție la cele mai mici diluții. Pentru carnea inoculată artificial, cantitatea de ADN a variat de la 170 și 31,6 ng/μl la cele mai mari diluții la 0,01-0,001 ng/μl la cele mai mici diluții. Încărcătura bacteriană s-a stabilit la valori cuprinse între $1,7 \times 10^7$ și $3,1 \times 10^6$ UFC/reacție la cele mai mari diluții și 1×10^3 și 1×10^2 UFC/reacție pentru diluțiile mici.

Pentru tulpinile de *Listeria monocytogenes* din culturile pure, cantitatea de ADN a variat de la 28,6 și 709,2 ng/μl la cele mai mari diluții până la 0,02 și 0,1 ng/μl la diluția 10^{-3} . Conform conversiei din ng/μl în UFC/reacție, încărcătura bacteriană a variat de la $2,8 \times 10^6$ și 7×10^7 UFC/reacție la cele mai mari diluții la 2×10^3 și 1×10^4 UFC/reacție la diluția 10^{-3} . Pentru ADN-ul extras din carnea inoculată artificial, valorile au variat de la 66,2 și 14,5 ng/μl la diluțiile mari la 0,6 și 0,1 ng/μl la diluția 10^{-3} , iar încărcătura bacteriană s-a stabilit între $6,6 \times 10^6$ și $1,4 \times 10^6$ UFC/reacție la diluțiile mari

și 6×10^4 și 1×10^4 UFC/reacție la diluția 10^{-3} . Ultimele 2 diluții nu s-au putut cuantifica la ambele tipuri de ADN.

La tulpinile de *E. coli O157:H7* cantitatea de ADN din culturile pure a prezentat valori de 100 și 400 ng/μl la diluțiile cele mai mari și de 1,2 și 0,4 ng/μl la diluția 10^{-3} . Încărcătura bacteriană a variat de la 1×10^7 și 4×10^7 UFC/reacție la diluțiile cele mai mari și $1,2 \times 10^5$ și 4×10^4 la diluția 10^{-3} . Ca și în cazul *Listeria monocytogenes*, ultimele diluții nu au putut fi cuantificate. ADN-ul extras din carnea inoculată artificial a prezentat valori de la 0,1 și 0,2 ng/μl la diluțiile mari la 0,00001 și 0,0002 ng/μl la ultimele diluții, iar în urma conversiei s-au obținut încărcături bacteriene de la 1×10^4 și 2×10^4 UFC/reacție la diluțiile cele mai mari la 10 și 2×10^1 UFC/reacție la ultimele diluții.

Pentru specia *Campylobacter jejuni*, s-au testat 3 tulpini în culturi pure, cantitatea de ADN variind de la 49,4, 73,9 și 21,06 ng/μl la prima diluție la 0,004, 0,007 și 0,02 ng/μl la ultimele diluții. Cantitatea de bacterii a variat de la $4,9 \times 10^6$, $7,3 \times 10^6$ și $2,1 \times 10^6$ UFC/reacție la primele diluții la 4×10^2 , 7×10^2 și 2×10^3 UFC/reacție la diluțiile cele mai mici. Valorile obținute din carnea inoculată artificial au variat de la 531 și 786 ng/μl la primele diluții și 0,0005 și 0,0007 ng/μl la ultimele diluții. Conversia cantitativă a relevat cantități bacteriene cuprinse între $5,3 \times 10^7$ și $7,8 \times 10^7$ UFC/reacție la primele diluții și 5×10^1 și 7×10^1 UFC/reacție la ultimele diluții.

În capitolul VII intitulat **Cercetări privind detecția și cuantificarea speciilor de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157:H7* și *Campylobacter jejuni* din alimente prin metode TaqMan real-time PCR omologate** s-a urmărit specificitatea, sensibilitatea (limita de detecție) și repetabilitatea unor tehnici TaqMan real-time PCR omologate, pentru cele 4 specii bacteriene izolate din carne. Cele 4 tehnici au vizat genele *ttr* (*Salmonella* spp.), *hlyA* (*L. monocytogenes*), *STX1*, *STX2* și *rfbE* (*E. coli O157:H7*) și *VSI* (*C. jejuni*), iar programele de amplificare s-au desfășurat în 2 sau 3 etape. Specificitatea celor 4 tehnici, a fost de 100% pentru cele 4 specii bacteriene, neînregistrându-se reacții fals pozitive la tulpinile non-spp. utilizate sau fals negative la tulpinile confirmate sau la cele standardizate. Limita de detecție s-a testat comparativ, la ADN-ul din culturi pure și la cel extras din eșantioane de carne inoculată artificial. S-au urmărit 5 încărcături bacteriene cunoscute (10^5 - 10^1 UFC/ml), pe câte 3 sau 2 tulpini bacteriene. Limita de detecție (cea mai mică cantitate decelabilă de către metodă) a variat la cele 4 specii bacteriene, astfel: la tulpinile de *Salmonella* între 10-100 UFC/ml la ADN-ul cultural și între 100-1000 UFC/ml la ADN-ul extras din carne; la cele de *Listeria monocytogenes* între 10-1000 UFC/ml pentru ADN-ul cultural și între 100-1000 UFC/ml la cel extras din carne; la tulpinile de *E. coli O157:H7* cantitatea minimă decelabilă a fost de 10 UFC/ml la ADN-ul cultural și 100 UFC/ml la ADN-ul extras din carne iar la tulpinile de *Campylobacter jejuni* valorile au variat de la 10-100 UFC/ml la ADN-ul cultural și 100-1000 UFC/ml la cel extras din carne. Din rezultatele obținute se observă că limita de detecție este mai

bună în cazul culturilor pure decât în cazul cărnii inoculate artificial. Repetabilitatea s-a realizat în 3 teste consecutive, pe diluția 10^{-3} pe câte o tulpină ATCC pentru fiecare specie bacteriană, iar valorile deviației standard relative au variat de la 0,33-0,93% la *Salmonella spp.*, 0,64-1,46% pentru *L.monocytogenes*, 1,11-2,38% pentru *E. coli O157:H7* și 0,24-0,73% pentru *C. jejuni*, ceea ce indică precizia ridicată a metodelor.

În capitolul VIII intitulat **Cercetări privind detecția și cuantificarea speciilor de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157:H7* și *Campylobacter jejuni* din alimente prin metode TaqMan real-time PCR neomologate** s-a urmărit specificitatea unor perechi de primeri și sonde TaqMan obținute „în silico”, în programul PrimerExpres pentru 4 fragmente genice: *ttr* (*Salmonella spp.*), *hlyA* (*L. monocytogenes*), *rfbE* (*E. coli O157:H7*) și *VS1* (*C. jejuni*). Atât perechile de primeri cât și sondele nucleotidice au T_m (temperaturile de topire) la valori apropiate, pentru realizarea unui program comun de amplificare: denaturare inițială 10 minute la 95°C, urmată de 45 de cicluri 15 sec. la 95°C și 1 min. la 60°C. Din cele 4 perechi de primeri și sonde TaqMan, numai 3 au furnizat rezultate concludente, specificitatea fiind de 100%. Perechea de primeri și sonda TaqMan pentru fragmentul genic *hlyA* nu a furnizat rezultate concludente, lipsa semnalului de amplificare demonstrând acest aspect. Cuantificarea prin aceste metode s-a realizat pe câte 2 tulpini pentru fiecare specie în parte, în triplicat, pe ADN din cultură pură. Încărcătura bacteriană a variat astfel: 10^3 UFC/reacție pentru tulpina de *Salmonella* izolată din carnea de găscă și 10^4 - 10^5 UFC/reacție pentru tulpina izolată din ou; între 10^6 și 10^7 UFC/reacție la prima tulpină de *E. coli O157:H7* și 10^7 UFC/reacție pentru tulpina a doua; valori mai mari s-au înregistrat la tulpinile de *C. jejuni*: între 10^7 și 10^8 UFC/reacție la prima tulpină izolată din carne de pasăre și între 10^6 și 10^7 CFU/reacție la tulpina a doua.

Din datele obținute, putem afirma că alimentele reprezintă o sursă importantă de bacterii patogene pentru om, iar testele rapide de detecție la nivel de specie sau chiar serotip sunt absolut necesare.

Reacția PCR real-time poate fi folosită cu ușurință în detectarea calitativă și cantitativă a acestor bacterii după o prealabilă îmbogățire sau chiar direct din matricea alimentară, atâta timp cât cantitatea de bacterii este decelabilă de către instrumentul folosit, însă costurile reactivilor și a instrumentelor necesare sunt destul de mari. Metodele moleculare sunt specifice, sensibile și reproductibile, ușurând astfel munca specialiștilor în laboratoare.