

**Titlul proiectului : « Cercetări pentru determinarea cantitativă simultană a patru bacterii patogene din produse alimentare prin PCR în timp real multiplex »**

director de proiect : Conf.univ.dr. Gheorghe BRĂDĂȚAN

**RAPORT**

***Obiectiv***

Crearea de sisteme de PCR în timp real pentru detectarea, identificarea și, în funcție de caz, stabilirea numărului de bacterii patogene din speciile *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, din diferite substraturi alimentare.

***Avantaje estimate***

Crearea de metode de detectare și de stabilire a numărului de bacterii patogene prin metode rapide și specifice, pentru a răspunde nevoilor industriei alimentare și a organismelor de reglementare. Aceste sisteme sunt esențiale pentru evaluarea inocuității produselor, a validării practicilor de producție și de tratament fără pericole pentru sănătatea consumatorilor, dar și pentru stabilirea datelor necesare pentru evaluarea riscurilor legate de consumul unui anumit aliment, ținând cont de durata de depozitare.

Alegerea metodei de testare este determinată în principal de norme reglementare și de analiza costurilor față de beneficii. Metodele care se bazează pe caracterizarea genetică proprie a fiecărui micro-organism permite detectarea acestuia în condiții economice și fiabile a patogenilor care pot fi prezenți în alimente. PCR în timp real este o metodă care permite să satisfacă normele de detecție de o manieră foarte sensibilă și într-un interval foarte rapid. Metodele de PCR în timp real au început să fie utilizate în industria alimentară dar există dificultăți legate de situațiile în care reacția este inhibată.

***Rezumat al studiului bibliografic***

Ambianța epidemiologică actuală implică un aspect de urgență legat de gravitatea bolii sau de accesibilitatea dificilă pentru a preîntâmpina boala. Orice întârziere de comunicare a rezultatelor investigației favorizează propagarea maladiei. Diagnosticul trebuie să fie rapid iar analiza riscurilor să fie operativă pentru ca gestiunea riscurilor să fie eficientă. Uneori, această depistare poate fi urmată de identificări de bacteriologie clasică ce impun interpretări destul de laborioase. Metodele rapide cele mai folosite la ora actuală sunt reacțiile imunologice de aglutinare și reacția de amplificare genică în lanț (PCR).

Datorita dezvoltării spectaculoase a tehnologiei PCR în timp real, se remarcă un interes deosebit pentru punerea la punct a unor protocoale de diagnostic a germenilor responsabili de producerea de toxiiinfecții alimentare. În ultimii douăzeci de ani s-a dezvoltat amplificarea ADN in vitro prin PCR, care este un instrument foarte important pentru diagnosticul microbiologic. A doua generație de metodologii bazate pe PCR permite atât amplificarea unor fragmente specifice de acid nucleic cât și determinarea imediată a nivelului de amplificare.

În plus, pentru a demonstra buna derulare a reacției de amplificare și pentru a evita rezultatele fals negative este necesară folosirea constantă a unui control intern. Reacțiile de amplificare prin PCR pot fi inhibitate de numeroase condiții și de o gamă foarte diversă de substanțe. În prezent, puține astfel de condiții sunt clar evidențiate în testele de diagnostic

În microbiologia alimentelor, metodele tradiționale cuprind izolarea și identificarea microorganismului. În funcție de germele în cauză, intervalul de răspuns poate fi de câteva zile, chiar de o săptămână. În paralel cu metodele tradiționale, în ultimii ani s-au dezvoltat metode alternative, mai rapide, în special metode de biologie moleculară foarte sensibile și deosebit de specifice. Ele oferă astăzi perspective vaste în detectarea micro-organismelor patogene, fiind reprezentate de hibridarea moleculară și de amplificarea genică. Ele pun în evidență un fragment de acid nucleic, ADN sau ARN, ca marker de contaminare a unui produs alimentar.

După datele bibliografice existente, tehnica cea mai frecvent utilizată până în prezent este tehnologia sondelor de hidroliză (Taqman) a căror popularitate este susținută și de activitatea comercială. Această tehnologie s-a dovedit mai eficientă decât agenții intercalari mai ales din punctul de vedere al specificității și folosirii multiplex. Tehnica va permite o dezvoltare a aplicațiilor de nivel industrial.

Specificitatea reacției este mărită și prin utilizarea chimiei sondelor. Disponibilitatea din ce în ce mai mare a bazelor de date asupra secvențelor de ADN permit stabilirea de secvențe de amorse și de sonde fluorescente foarte specifice. Analiza datelor în cursul amplificării reduce timpul de obținere a rezultatelor și facilitează analiza unui număr foarte mare de eșantioane. Riscurile de contaminare sunt reduse deoarece produsele amplificate rămân în tub închis. Reacțiile multiplex permit realizarea simultană de analize ceea ce implică o economie de reactivi. Introducerea în reacție a unui control intern permite demonstrarea fals negativilor.

Pe plan tehnic și tehnologic, biologia moleculară este în evoluție constantă.

Bacteriile sau microorganismele procariote sunt remarcabile pentru heterogenitatea caracteristicilor lor, mai ales în termeni de formă (coci, bacili, ...), de mediu de viață (sol, apă, gazde vii, ...) structura învelișului celular (prezența sau absența unui perete sau chiar a unei membrane externe), regim saprofit, comensal sau parazit. În domeniul științelor medicale este

foarte important să se dispună de proceduri și de mijloace de identificare optimă a bacteriilor patogene.

Pentru *Campylobacter jejuni* au fost dezvoltate teste fenotipice de laborator începând cu anii 1980. Prin PCR urmat de electroforeză se pot detecta tulpini specifice de *C. jejuni* și *C. coli*. Aceste examene permit confirmarea sistematică a sușelor de *Campylobacter* identificate. În prezent, a fost creată o metodă de secvențializare bazată pe ARN ribozomal 16S. Tipajul biochimic permite clasificarea sușelor în patru tipuri. Metoda standardizată de membrii rețelei europene Campynet este bazată pe detectarea genei *fla* din genomul bacteriei amintite. Cercetările actuale sunt orientate spre dezvoltarea unei metode de PCR în timp real pentru a identifica bacteria pe baza unei diferențe a temperaturii de fuziune a ampliconilor, utilizând sonde specifice. În fața unei tendințe de creștere a incidenței infecției cu *Campylobacter* la om și a faptului că sunt necesare structuri de supraveghere epidemiologică în Europa, se impune o standardizare a datelor ce vor fi culese, atât pentru detectare cât și pentru stabilirea rezistenței la antibiotice.

*Listeria monocytogenes* este o bacterie patogenă pentru om la care produce o boală gravă numită listerioza mai ales la persoanele fragilizate. Deoarece bacteria se poate dezvolta la temperaturi reduse, a devenit o problemă mai ales pentru industria alimentară unde produsele pot fi păstrate în frigider.

Pentru detectarea *Salmonella* există mai multe metode de detectare genetică prin PCR în timp real, dintre care cea care utilizează principiul „*molecular beacon*” pare de viitor. Sonda nucleotidică este marcată cu un fluorofor care emite fluorescența doar când are loc hibridarea cu ampliconii. Această fluorescență este măsurată direct cu modulul optic al termociclorului. Programul informatic calculează automat relația optică dintre intensitatea fluorescenței și ciclul de amplificare. Sunt necesare controale martor pozitiv și negativ pentru demonstra buna derulare a PCR.

Pentru detectarea *Escherichia coli O:157* există proceduri bazate pe folosirea PCR în timp real prin amplificarea unei secvențe specifice de ADN. Sistemul utilizează amorse de oligonucleotide specifice. În funcție de un anumit nivel stabilit de utilizator, se poate determina nivelul de contaminare a eșantioanelor analizate.

PCR în timp real are avantaje incontestabile față de PCR clasic urmat de electroforeză. Totuși, în ciuda progreselor realizate pentru mărirea specificității și sensibilității acestei tehnici există o serie de limite care persistă:

- nu se poate evidenția caracterul infecțios al microorganismului ,
- nu se poate caracteriza fenotipic microorganismul;

- costurile examenelor rămâne ridicat, deși valoarea echipamentelor scade mereu. Doar aplicațiile industriale permit investiții consistente.
- kiturile disponibile sunt limitate. Este necesară o continuare a cercetărilor pentru a lărgi gama de kituri.

Noi tehnologii par a fi revoluționare în afara PCR în timp real.

Biosenzorii sunt construcții care cuplează un sistem de detectare biologică (celulă, micro-organism, enzimă, anticorp) care emite un semnal atunci când interacționează cu un marker specific pentru a fi detectat, și un senzor care convertit, amplifică și tratează semnalul. Acești markeri pot fi concepuți pentru analize continue, mai ales pentru detectarea agenților bacterieni ce pot fi antrenați în bioterorism.

Biopuce de ADN răspund nevoilor de a detecta rapid o cantitate mare de markeri. Principiul metodei s-ar baza pe un depozit foarte mare de fragmente de ADN sau de sonde pe o suprafața de câțiva centimetri. După hibridarea cu eșantioanele de testat, semnalele sunt tratate și analizate cu un program informatic. Deocamdată nu există suficient de multe baze de date disponibile care să permită extinderea procedurii.

Indiferent de performanțele viitoarelor metode de detectare rapidă specifică și cantitativă a microorganismelor, nu trebuie pierdut din vedere rolul deosebit de important pe care îl are evaluarea riscurilor în procesul de analiză și apoi de gestiune a acestora.

Iași, 12 decembrie 2007

Conf. univ. Dr. Gheorghe Brădățan