

## **RAPORT - 2008**

### **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

În microbiologia alimentelor, metodele traditionale cuprind izolarea si identificarea microorganismului. In functie de germenul in cauza, intervalul de raspuns poate fi de cateva zile, chiar de o saptamana. In paralel cu metodele traditionale, in ultimii ani s-au dezvoltat metode alternative, mai rapide, in special metode de biologie moleculara foarte sensibile si deosebit de specifice. Ele ofera astăzi perspective vaste in detectarea micro-organismelor patogene, fiind reprezentate de hibridarea moleculara si de amplificarea genica. Ele pun în evidență un fragment de acid nucleic, ADN sau ARN, ca marker de contaminare a unui produs alimentar.

PCR în timp real este o metodă care permite să satisfacă normele de detecție de o manieră foarte sensibilăși 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.

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:

### **Obiectiv**

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

### **Materiale si metode**

- Aparat pentru dilutie automată (Dilumat-3 – AES Laboratories)
- Aparat pentru însămânțare în spirală în vederea determinării cantitative Led Techno (LAB Equipement)
- Sac pentru soluție, cu filtru; Stomacher
- Hota cu flux laminar și hota chimică prevăzută cu bec de gaz
- Congelator la -18oC și frigider la 4oC.
- Tăvi metalice
- Instrumente ce să permită prelevarea de eșantioane (cutit, foarfece, pensă)
- Aspirator pentru pipete de 1-10 ml
- Pipete de unică folosință cu capacitate de 1 ml și de 10 ml.
- Mănuși de latex de unică folosință.
- Autoclav si memodata Therm 2
- pH-metru (Hanna Instruments)
- dispozitiv pentru stabilirea numarului de unitati formatoare de colonii
- micropipete Ralnin 0,5-10 μL, 10-100 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL
- conuri pentru micropipete 10 μL, 200 μL si 1000 μL
- microvortex (VWR)
- spectrofotometru Gene Quant Pro
- centrifugă Eppendofr Centrifuge 5415D
- AB Applied Biostems 7300 Real Time PCR System
- Eppendorf Mastercycle gradient (VWR International)

**Prelevatul** care se efectuează trebuie să fie cât mai reprezentativ și să reprezinte imaginea globală a eșantionului. Cântărirea probei (25g) se face la DILUMAT 3, dispozitiv calibrat zilnic. **Soluția mamă** se prepară cu același dilumat prin adăugarea de 225 ml mediu de cultură lichid. Pentru fiecare tip de microorganism este necesar un timp de pauză care să permită revivificarea eventualelor microorganisme prezente în eșantion.

Diluțiile zecimale se obțin prin amestecul unui volum determinat dintr-un prelevat cu un volum de nouă ori mai mare de diluant. Această operațiune se repetă până la obținerea unei game de diluții zecimale corespunzătoare protocolului experimental.

Incubarea mediilor de cultură se face în incubatoare prevăzute cu sisteme de înregistrare automată a temperaturii și cu dispozitive de alertă în caz de disfuncționare.

După incubarea prevăzută pentru fiecare microorganism se recuperează 10 ml de mediu de cultură pentru a servi astfel: 1 ml pentru extracția de ADN bacterian și 9 ml pentru congelare –contra-proba). Citirea probelor se efectuează sub hota cu flux laminar sau hota chimică în apropierea becului de gaz, în conul de sterilitate.

#### **Punerea în cultura a unei tulpini bacteriene**

Se scoate din congelator un tub ce contine bile cu tulpina bacteriana. Cu ajutorul unei pense sterile se scoate o astfel de bila care se depune într-un tub conținând un mediu corespunzător speciei bacteriene. În funcție de specia bacteriană se poate ca bila să fie rulată pe suprafața unei plăci Petri.

Se incubează tubul sau geloza în condițiile specifice tulpinii bacteriene. Verificarea tulpinii bacteriene

	Salmonella	Salmonella	Escherichia coli
atmosfera	aerobă	aerobă	aerobă
mediu	BGA	XLD	TBX
incubare	24h la 37oC	24h la 37oC	24h la 37oC
Colonii caracteristice	Colonii roșii strălucitoare, convexe, schimbarea mediului în roșu	Colonii roze cu centrul negru, plate	Colonii bleu-verzi
Confirmarea 1	Repicare pe TSI		fin
incubare	24h 37oC		
Confirmare 2	Panta roșie sediment galben/negru		
Confirmare 3	Galeria API 20E		
Incubare	18-24h la 37oC		
Lectura	Profil Salmonella spp		

### Extracția de ADN bacterian

Se transfera in conditii sterile un ml de cultura bacteriana in mediu lichid intr-un tub conic cu capacitatea de 1,5 sau 2 ml.

Se centrifughează la 14000 turații pe minut timp de 2 minute iar supernatantul se îndepărtează cu atenție pentru ca sedimentul bacterian sa rămână atașat la pereții tubului.

Se adaugă 600 µL de soluție de liză nucleică și se amestecă foarte atent pentru a dizolva complet sedimentul bacterian. Se incubează la 80oC timp de 5 minute și apoi se răcește la temperatura ambiantă.

Se adaugă 200 µL de soluție pentru precipitarea proteinelor și se incubează pe gheață timp de 5 minute.

După o centrifugare la 14000 turații pe minut timp de 3 minute, se transferă supernatantul într-un alt tub de reacție ce conține 600 µL izopropanol. Se amesteca foarte bine, se centrifugheaza si se indeparteaza supernatantul.

Se adauga 600 µL de alcool etilic 70%, se amesteca, e centrifugheaza si se indeparteaza supernatantul. Timp de 15 minute se lasa tubul deschis pentru ca urmele de alcool sa poata fi evaporate.

Se hidrateaza sedimentul cu 100 µL solutie rehidratanta si eventual cu 3-4 µL RNaza. Rehidratarea se poate realiza timp de o ora la 65oC sau peste 12 ore la 4oC.

ADN-ul se pastreaza la 4oC daca va fi utilizat imediat sau stocat la -20oC

Pentru bacteriile Gram pozitive inainte de a urma acest protocol se incubeaza sedimentul bacterian cu 120 µL de solutie de lizozim care va actiona asupra peretelui bacterian timp de 60 minute la 37oC.

### Reactivi pentru PCR in timp real

Enzima si nucleotide: iTaq Supermix with ROX (BioRAD)

Enzima si nucleotide: iTaq SYBR Green with ROX (BioRAD)

Secvente de nucleotide pentru

- gena **rfbE** sau **stx** pentru Escherichia coli O:157
- gena **ttr** Salmonella
- gena **50s** Campylobacter jejuni si Campylobacter coli
- gena **VS1** doar pentru Campylobacter jejuni

### Validarea metodelor de analiză

Exactitudine (justețea): diferența dintre valoarea acceptată convențional ca fiind adevărată sau valoarea de referință și valoarea găsită prin aplicarea repetată a procedurii de analiză.

Fidelitatea este diferența dintre rezultatele de analiză independente obținute în condițiile prevăzute.

Repetabilitatea este fidelitatea obținută în condițiile următoare: rezultatele analizelor sunt obținute prin aceeași metodă în același laborator, de același operator, utilizând aceleași echipamente, într-un interval scurt de timp.

Reproductibilitatea este fidelitatea obținută în condițiile următoare: rezultatele sunt obținute prin aceeași metodă de analiză pe același tip de eșantioane în același laborator de către operatori diferiți ce folosesc echipamente diferite în intervale de timp diferite.

Limita de detecție este cea mai mică cantitate care poate fi detectată în condițiile definite de laborator, prin metoda testată.

Proba albă permite evaluarea sterilității condițiilor de lucru de-a lungul întregului lanț analitic. Probele albe de cercetare (exemplu pentru Salmonella) : se realizează întreaga metodă de analiză în paralel cu analiza în curs dar se folosește apa sterilă în loc de eșantion. Proba albă de numărare. Cel puțin două plăci Petri cu geloza PCA sunt însămânțate în paralel cu analiza folosind apa sterilă. Dacă aparatul de însămânțare în spiral se folosește toată ziua se fac teste de sterilitate de trei ori pe zi.

Proba albă de local permite verificarea contaminării localului în care se efectuează analizele precum și contaminarea aerului ambiant. Ea constă din analiza unui eșantion de apă sterilă lăsată în aer liber în local. Cu ocazia fiecărei analize cantitative blanchul de local este analizat în același timp cu eșantioanele și trebuie să reacționeze ca un eșantion negativ, respectiv ca un eșantion care nu conține secvența ADN cercetată. În caz contrar localul trebuie să fie decontaminat iar analizele refăcute.

Proba albă de extracție permite să se verifice dacă reactivii analitici nu sunt contaminați. Este vorba de un eșantion de apă sterilă la care se efectuează întregul proces analitic. Cu ocazia fiecărei analize cantitative proba albă de extracție este analizată în același timp cu eșantioanele și trebuie să reacționeze ca un eșantion negativ, respectiv un eșantion care să nu conțină secvența de ADN cercetată

Controlul pozitiv. Este vorba de probe martor pozitive care conțin secvența de ADN cercetată.

Controlul negativ. Este vorba de eșantioane negative care nu conțin secvența de ADN cercetată.

Curba de etalonare. Furnizează o relație dintre măsurile obținute pentru eșantioane și cele pentru materiale de referință

Stabilirea protocoalelor experimentale a pornit de la lucrari stiintifice precum:

Sails A.D., Fox A., Bolton F., Wareing D., Greenway D. A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Campylobacter jejuni* in Foods after Enrichment Culture App. Environ Microbiol. 2003 March; 69(3): 1383–1390.

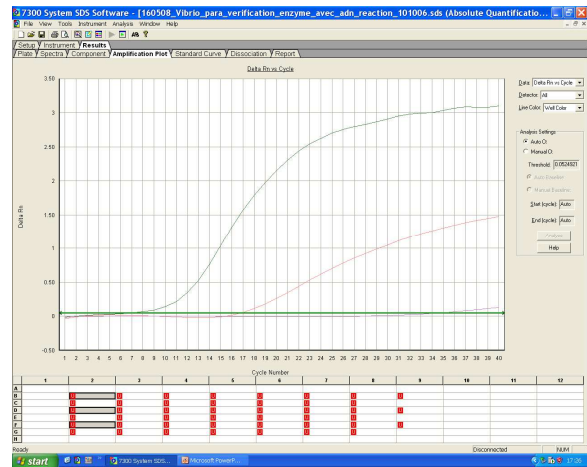
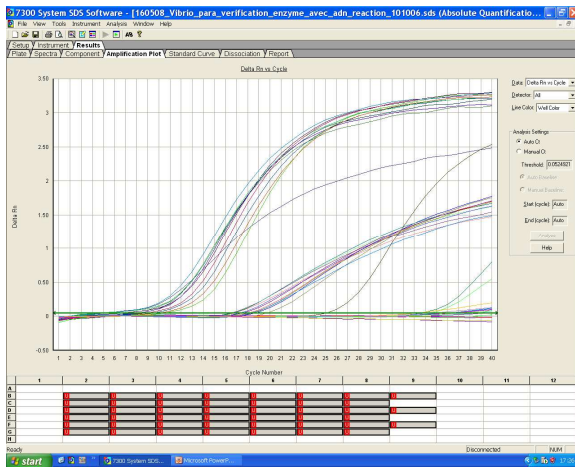
Bassler HA, Flood SJ, Livak KJ, Marmaro J, Knorr R, Batt CA. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 1995 Oct;61(10):3724-8.

Lund M., Nordentoft S., Pedersen K., Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-Time PCR Journal of Clinical Microbiology, 2004, Vol. 42, No. 11, p. 5125-5132,

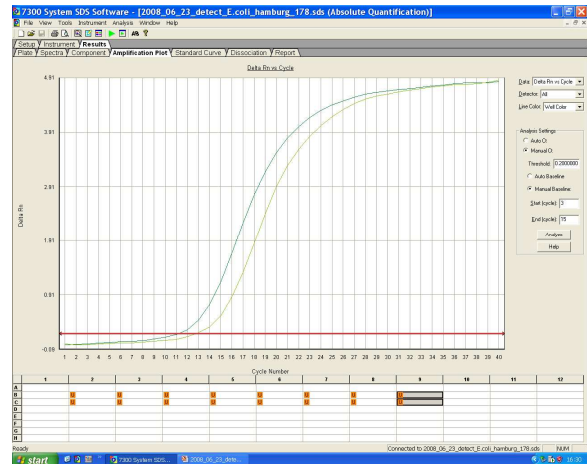
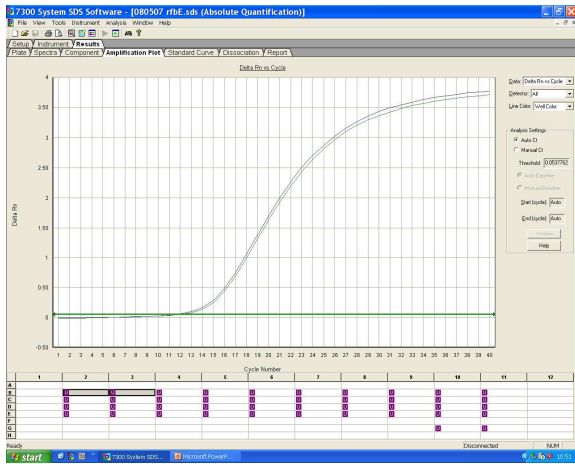
Poitras E. Houde A. La PCR en temps reel: principes et applications. Rev Biol. Biotechn. 2002, 2 (2): 2-11.

## Rezultate obtinute

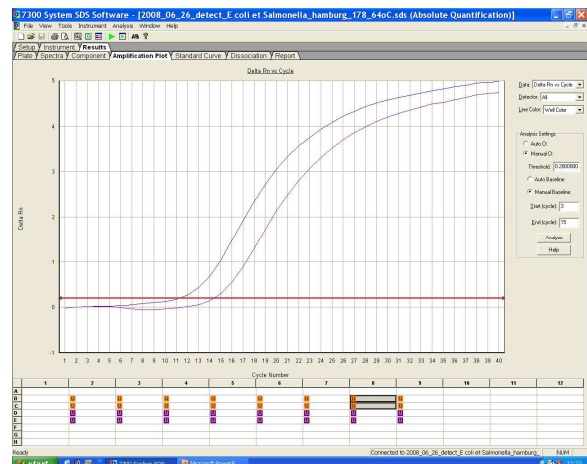
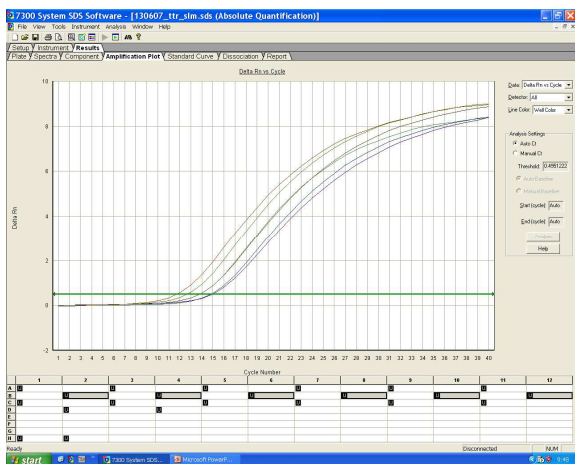
### Compararea reactivilor (enzima TaqMan si nucleotide) de la Biorad si Sigma-Genosys



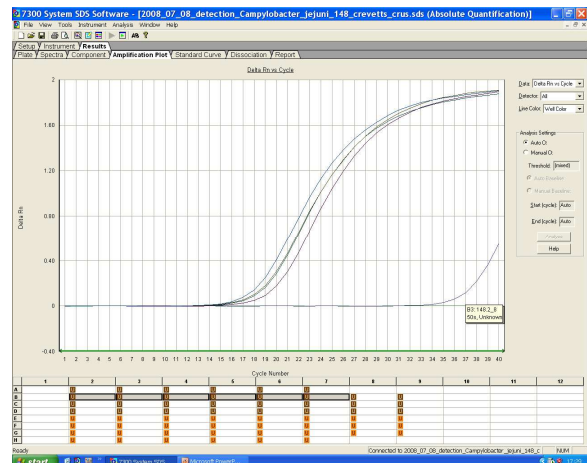
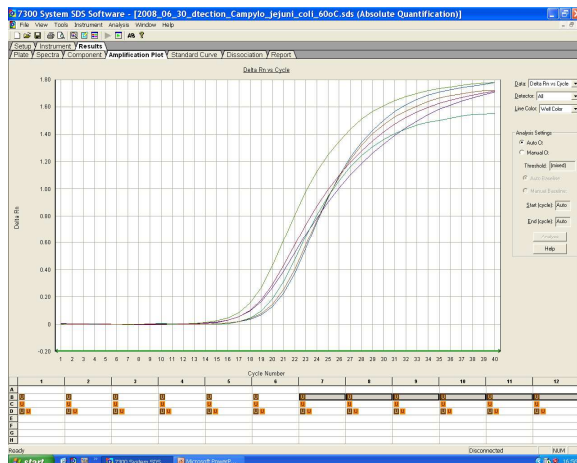
### Detectare de *Escherichia coli* O:157



### Detectare de *Salmonella*



## Detectare de *Campylobacter (coli si jejuni)*



### Concluzii

Secvențele nucleotidice alese permit detectarea rapidă prin PCR în timp real a celor patru bacterii studiate. Validarea metodelor a dat rezultate încurajatoare din punct de vedere al specificității și sensibilității.

Cercetările trebuie continuate pentru a stabili condiții de detectare simultană a bacteriilor. Precizarea unor posibili inhibitori și conceperea unui control intern ar dezvolta metode spre aplicabilitatea practică.

12 decembrie 2008

Conf. univ. Dr. Gheorghe Brădățan

*Bradatan*