

## RAPORT

### Titlul proiectului: „Cercetări pentru determinarea cantitativă simultană a patru bacterii patogene din produse alimentare prin PCR în timp real multiplex”

Director de proiect: Șef de lucrări dr. Viorel FLORIȘTEAN

#### 1. Obiectiv

Principalul obiectiv al acestei etape este punerea la punct a unei metode de detectare rapidă multiplă din alimente a patru bacterii patogene importante pentru siguranța alimentelor (*Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157:H7* și *Campylobacter jejuni*).

#### 2. Material și metodă

##### **Culturi bacteriene, medii de cultură și condițiile de cultivare**

Culturile bacteriene folosite în cadrul acestui studiu au provenit în marea lor majoritate din colecția laboratorului de microbiologie alimentară fiind izolate din alimente de origine animală acestea fiind identificate și confirmate pe baza caracterelor morfologice, culturale și biochimice. Pe lângă tulpinile „autohtone”, pentru confirmarea rezultatelor obținute, au fost folosite mai multe tulpini bacteriene de referință: *Salmonella enterica serovarietatea enteritidis* **ATCC 4391**; *Listeria monocytogenes* - **ATCC 35152**; *Escherichia coli O<sub>157</sub> H<sub>7</sub>* – **ATCC 43895**; *Campylobacter jejuni* – **ATCC 33291** și *Campylobacter coli* – **ATCC 43478**.

Culturile bacteriene pregătite au fost cultivate inițial pe medii selective pentru purificare (Agar MCCD- Preston pentru *Campylobacter spp.*, Agar MacConkey cu sorbitol pentru *E. coli O157:H7*, Agar XLD pentru *Sammonella spp.* respectiv Agar Cromo Listeria pentru *Listeria monocytogenes*). De pe mediile selective, coloniile caracteristice au fost trecute pe mediul TSA (*S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *E. coli O157:H7*). După o incubare de 12 – 18 ore la 37°C, cu o ansă s-a transferat o colonie în mediul lichid (TSB). Culturile au fost incubate la 37°C timp de 24 ore agitându-se recipientele continuu (200 rpm) pentru a se atinge faza staționară a dezvoltării bacteriene. Pentru *Campylobacter jejuni* incubarea s-a efectuat în atmosferă controlată (5% O<sub>2</sub>, 10% Co<sub>2</sub> și 85% N) la 42°C în bulion nutritiv suplimentat cu sânge defibrinat de oaie (5%) și supliment Preston *Campylobacter*..

Substraturile alimentare au fost inoculate cu celule bacteriene aparținând celor patru specii, separat și în combinație, în concentrații variabile. Au fost realizate încărcături bacteriene de la 10 până la 10<sup>6</sup> UFC/g sau ml, prin introducerea unor probe de aliment în volume de 10 ori mai mari de apă peptonată sterilă, însămânțată cu culturi bacteriene pe mediul lichid, în pungă din plastic sterile și omogenizate în stomacher. Nivelul încărcăturii bacteriene a fost stabilit, pentru fiecare specie bacteriană prin însămânțarea diluțiilor seriate pe mediile solide prezentate anterior.

##### **Extracția ADN**

Pentru extracția ADN a fost folosit kitul Prepman Ultra (Applera - Applied Biosystems, Biogen Romania).

În cazul culturilor pe medii solide: Celulele bacteriene, prelevate cu o ansă sterilă din coloniile specifice au fost suspendate în 100 μl reagent PrepMan Ultra. Amestecul a fost vortexat energetic timp de 5 minute după care a fost încălzit la 100°C și păstrat la această temperatură timp de

10 minute. După tratamentul termic amestecul a fost adus la temperatura camerei și centrifugat la 12.000 rpm timp de 2 minute. Un volum de 50  $\mu$ l din supernatantul rezultat în urma centrifugării a fost transferat într-un tub special și păstrat la 4<sup>0</sup>C până la utilizare.

În cazul culturilor pe medii lichide a fost prelevat un volum de 1 ml cultură care a fost centrifugat la 12.000 rpm timp de 2 minute. Supernatantul a fost îndepărtat prin aspirare cu protejarea sedimentului. Peste sedimentul rezultat s-a adăugat 100  $\mu$ l reagent PrepMan Ultra. Amestecul a fost vortexat energetic timp de 5 minute apoi încălzit la 95 - 100<sup>0</sup>C și păstrat la această temperatură timp de 10 minute. După tratamentul termic amestecul a fost adus la temperatura camerei și centrifugat la 12.000 rpm timp de 2 minute. Un volum de 50  $\mu$ l din supernatantul rezultat în urma centrifugării a fost transferat într-un tub special și păstrat la 4<sup>0</sup>C până la utilizare.

Din probele contaminate a fost prelevat câte un ml din partea lichidă rezultată în urma omogenizării care a fost transferat într-un tub steril și a fost supus centrifugării la 16000 rpm timp de 3 minute. Amestecul a fost vortexat energetic timp de 5 minute apoi încălzit la 95 -100<sup>0</sup>C și păstrat la această temperatură timp de 10 minute. După tratamentul termic amestecul a fost adus la temperatura camerei și centrifugat la 12.000 rpm timp de 2 minute. Un volum de 50  $\mu$ l din supernatantul rezultat în urma centrifugării a fost transferat într-un tub special și păstrat la 4<sup>0</sup>C până la utilizare.

Extracția ADN din proba de aliment, înainte de inocularea cu bacterii s-a efectuat după o procedură similară; ADN-ul rezultat, în amestec cu ADN-ul de la tulpinile de referință purificat fiind utilizat pentru depistarea inhibitorilor de reacție.

Concentrația inițială a ADN - ului din probe a fost determinată spectrofotometric determinându-se absorbanta la 260 nm cu ajutorul unui spectrofotometru SmartSpec 3000 – BioRad. Materialul genetic extras a fost diluat cu apă ultrapură (DNase free) obținându-se diluții seriate pentru testarea sensibilității reacției. De asemenea, diluarea a fost efectuată ori de câte ori a existat suspiciunea existenței în extras a unor inhibitori.

Purificarea ADN s-a efectuat atunci când absorbanta determinată a fost mai mare de 1,8 – 2, prin tratarea acestuia după cu fenol, cloroform și izopropanol urmată de centrifugare și precipitarea ADN cu etanol.

#### **Primeri și sonde**

Primerii și sondele utilizate au fost obținuți cu ajutorul programului Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) pornindu-se de la secvențe nucleotidice specifice celor patru bacterii. Pentru *Salmonella* s-a pornit de la gena ttr (GenBank AF282268), pentru *Escherichia coli* a fost luată în considerare gena rfbE (GenBank S83460), pentru *Listeria monocytogenes* a fost analizată gena HlyA (GenBank AF253320) iar pentru *Campylobacter jejuni* a fost luată în studiu gena VS1 (GenBank X71603)

În urma analizei combinate a celor patru gene au fost obținute un număr de 32 de combinații de primeri specifici pentru cele patru bacterii. Dintre acestea au fost alese pentru testare două combinații caracterizate prin parametrii cei mai convenabili pentru punerea la punct a metodei PCR de detectare multiplă rapidă (temperatura de denaturare, raportul G-C și lungimea ampliconului).

Primerii testați sunt formați dintr-un număr de 20 – 24 nucleotide, au o temperatură de denaturare cuprinsă între 58,7 și 59,9<sup>0</sup>C, și delimitează ampliconi cu lungime variabilă, cuprinsă între 207 și 684 perechi de baze.

Pornindu-se de la seturile de primeri au fost obținute sondele caracteristice pentru ampliconii delimitați de primeri. Sondele obținute sunt alcătuite din 20 – 24 nucleotide complementare nucleotidelor de pe una dintre cele două catene ale ampliconului, și au temperatura de denaturare cu 5 până la 7<sup>0</sup>C mai mare decât primerii. La extremitatea 5' a sondelor s-a atașat unul din markerii fluorescenți: VIC, FAM, TET și Texas Red iar la capătul opus un inhibitor de fluorescență (DQ, TAMRA, sau BHQ). Alegerea markerilor fluorescenți a fost făcută ținându-se cont de lungimea de undă la care aceștia emit fluorescența maximă și de filtrele cu care este dotat aparatul cu care s-a efectuat experimentele (Applied Biosystems Real-Time PCR 7300) în așa fel încât să se reducă la maximum posibilitățile de suprapunere a spectrelor de emisie.

Primerii și sondele astfel concepute au fost sintetizate de către Applied BioSystems USA).

Specificitatea primerilor și a sondelor obținute a fost testată „in silico” cu ajutorul programului Primer Express 2.0 și prin utilizarea bazei de date BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aparținând Centrului National pentru Informare Biotehnică (NCBI) care poate fi accesată on line la adresa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> și ulterior prin „in vitro” folosindu-se ADN extras din culturile pure ale tulpinilor de referință și ale tulpinilor bacteriene din colecția laboratoarelor de microbiologie și igienă ale Facultății de Medicină Veterinară din Iași (11 tulpini de *Salmonella spp.*, 9 tulpini de *Listeria monocytogenes*, 2 tulpini de *Escherichia coli O157:H7* și 8 tulpini de *Campylobacter jejuni*).

#### **Real time PCR**

Amplificarea genică s-a efectuat cu ajutorul unui aparat Real-Time PCR 7300 (Applied Biosystems USA) Experimentul a fost efectuat pe fiecare tulpină bacteriană în parte, pe grupuri de câte două, trei și, în final, patru bacterii. Au fost efectuate teste atât pe culturi bacteriene cât și pe substraturi alimentare contaminate artificial. Reacțiile au fost efectuate în triplicat.

Prin tatonare și în concordanță cu structura și dimensiunile primerilor și a sondelor s-a stabilit un protocol de lucru similar pentru toate cele patru bacterii analizate. Pentru optimizarea condițiilor de reacție au fost folosite concentrații variabile de primeri (între 100 și 400 nM) și sonde (între 50 și 200 nM). Amplificarea s-a făcut în microplăci, în godeurile acestora introducându-se câte TakMan Environmental PCR Master Mix (Applied Biosystems) și amestec primeri și sonde de la speciile bacteriene. (Volumele folosite au variat între în funcție de numărul speciilor bacteriene testate simultan). După agitarea lentă a acestora, în godeuri a fost introdus și ADN-ul extras anterior și adus la o concentrație stabilită anterior. Godeurile au fost acoperite cu folia adezivă pentru a se preveni contaminarea și introduse în sistemul de amplificare. Amestecul a fost supus unei temperaturi de 50°C timp de 5 minute, apoi la 95°C pentru 10 minute, pentru activarea enzimei AmpliTaq Gold și la 40 de cicluri de formate din două etape: denaturare la 95°C timp de 15 s și aliniere – elongare 60 – 63°C timp de 1 minut (temperatura optimă de legare a primerilor/sondelor a fost stabilită după mai multe încercări pentru a se obține un randament maxim).

Rezultatul reacției a fost vizualizat în timp real cu ajutorul software-ului ce însoțește sistemul de amplificare prin monitorizarea evoluției fluorescenței după fiecare ciclu de amplificare.

#### **Sensibilitatea reacției**

Pentru stabilirea limitelor de detecție a reacției PCR de detectare multiplă (multiplex) au fost testate diluții zecimale ale materialului genetic ( $10^{-1}$  –  $10^{-4}$ ) și sau comparat rezultatele cu cele obținute în urma reacțiilor PCR efectuate pentru fiecare bacterie separat (uniplex) la diluții similare.

Sensibilitatea reacțiilor PCR (uniplex și multiplex) a fost analizată și în urma inoculării artificiale cărnii de pasăre cu cele patru specii bacteriene.

### **3. Rezultate și discuții**

În urma experimentelor efectuate, pornindu-se de la secvențe nucleotidice a căror specificitate pentru cele patru specii bacteriene, s-au obținut mai multe seturi de primeri pentru fiecare dintre cele patru specii de bacterii. Primerii și sondele obținute au secvențe nucleotidice diferite de cele descrise în literatura de specialitate.

#### **Testarea specificității primerilor și a sondelor**

Cele patru perechi de secvențe nucleotidice concepute pentru a fi complementare cu gene caracterizate prin specificitate ridicată pentru *Salmonella spp.*, *E. coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* și *Campylobacter jejuni*, în urma testărilor „in silico” și „in vitro” pe culturile bacteriene selecționate au demonstrat că sunt specifice pentru fiecare specie bacteriană, producând ampliconi cu dimensiunea prognozată. Specificitatea relativă a fost demonstrată pe un număr total de 34 de tulpini bacteriene dintre care 4 tulpini de referință ATCC.

#### **Testarea sensibilității metodei**

Sensibilitatea unei reacții PCR poate fi stabilită prin identificarea numărului minim de secvențe nucleotidice țintă ce poate fi detectat în condiții de specificitate ridicată și cu obținerea de rezultate reproductibile.

Testarea sensibilității reacției a necesitat un protocol complex care a constat în efectuarea de determinări pe ADN-ul celor patru bacterii separat și după gruparea acestora, extras atât din culturile obținute pe medii specifice cât și din carnea de pasăre după inocularea experimentală a acesteia. ADN-ul obținut a fost diluat, obținându-se diluții cu conținut de ADN bine determinat.

*Sensibilitatea testului Real-Time PCR uniplex*

În cazul testelor PCR, efectuate pentru fiecare baterie în parte, în condițiile studiului, s-a reușit detectarea unor cantități de ADN corespunzătoare unei încărcături bacteriene pornind de la 1 UFC/ml pentru toate cele 4 specii bacteriene testate (Tabel nr.1).

Tabel 1 – Amplificarea ADN-ului bacterian obținut prin extracție din culturile bacteriene, în concentrații diferite, prin RT-PCR

<i>Inocul log UFC/ml (genom echivalent)</i>	<i>PCR uniplex</i>			
	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
0	+	+	+	+
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+

Repetarea testelor, în condiții similare, pe ADN extras consecutiv inoculării experimentale a cărnii de pasăre a furnizat rezultate concludente însă limita de detecție a fost de 10 UFC/ml pentru trei din cele patru specii bacteriene (*Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*). (Tabel 2).

Tabel 2 – Amplificarea ADN-ului bacterian obținut prin extracție din carne, în concentrații diferite, prin RT-PCR

<i>Inocul (log UFC/ml) genom echivalent</i>	<i>PCR uniplex</i>			
	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
0	-	-	+	-
1	+	-	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+

Reducerea limitei de detecție a fost consecința prezenței în mediul de reacție a unor inhibitori. Identificarea inhibitorilor de reacție este foarte dificilă. Aceștia pot acționa prin reducerea activității enzimelor necesare amplificării, degradarea materialului genetic sau prin reducerea eficienței extracției materialului genetic. Literatura de specialitate citează numeroși factori care pot avea acțiune inhibitoare cu origine în carne dar mecanismul intim de acțiune al acestora nu este pe deplin cunoscut. Cele mai des citate sunt unele molecule organice din carne și sânge, cum sunt glicogenul, unii compuși fenolici și imunoglobulinele. Principalele metode prin care se reduce efectul inhibitorilor de reacție utilizate în prezent constau în alegerea unor metode de pregătire a probelor preponderent fizice cum este flotația care concentrează materialul genetic la partea superioară a tuburilor de centrifugare sau prin adăugarea unor stimulatori de amplificare în amestecul de reacție (albumină serică de bovine), care acționează prin legarea inhibitorilor sau prin atenuarea efectului proteazelor ce pot afecta ADN polimeraza. În cazul nostru, deoarece astfel de substanțe au fost prezente în mixul de reacție fiind introduse de către producător cauza principală a

reducerii limitei de detecție pare a fi legată de metoda utilizată la pregătirea probelor. În etapa ulterioară de optimizare a reacției va trebui să modificăm metoda de extracție a ADN – ului pentru a reduce astfel de fenomene.

Evaluarea curbelor standard de amplificare obținute prin regresia lineară a valorilor CT (Cycle Threshold = punctul în care fluorescența dezvoltată prin amplificare depășește limita de detecție, stabilită manual sau automat de către aparatul de amplificare) obținute prin amplificarea diluțiilor seriate ale ADN-ului extras din culturile bacteriene și din carnea de pasăre a demonstrat eficiența procesului de amplificare (valoarea  $R^2$  apropiată de 1).

Compararea acestor curbe arată, de asemenea, o eficiență a amplificării mai mică în cazul ADN – ului obținut în urma inoculării cărnii de pasăre. Valorile  $R^2$  sunt, de regulă mai mari în cazul ADN – ului din culturile bacteriene. Valorile CT mai mari de 39 au fost interpretate ca lipsă de amplificare deoarece, după specificațiile producătorului sistemului de amplificare, acestea depășesc sensibilitatea acestuia (Fig. 1 2,3,4).

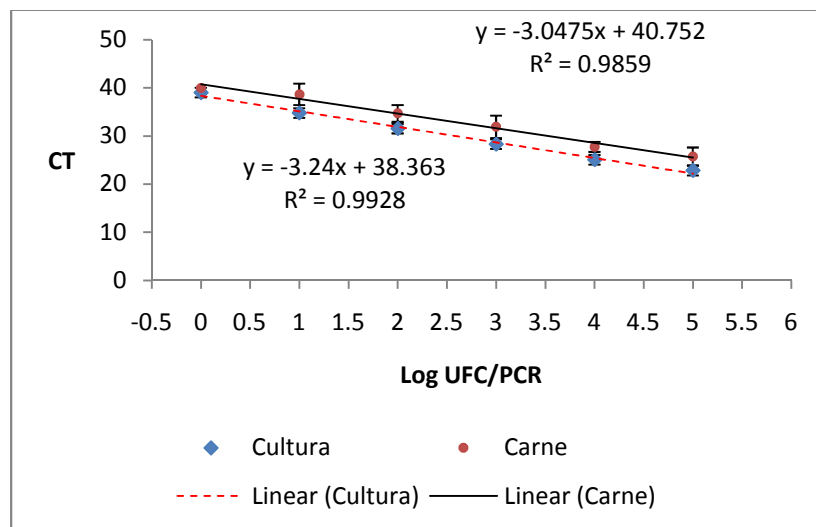


Fig.1a Curba standard de amplificare la *Salmonella spp.* în funcție de concentrația ADN și de modalitatea de extracție

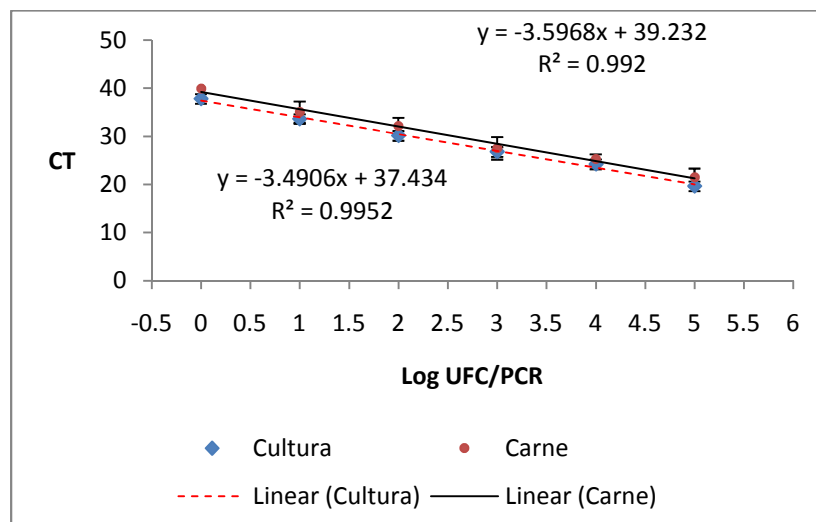


Fig.2 Curba standard de amplificare la *E.coli O157:H7* în funcție de concentrația ADN și de modalitatea de extracție

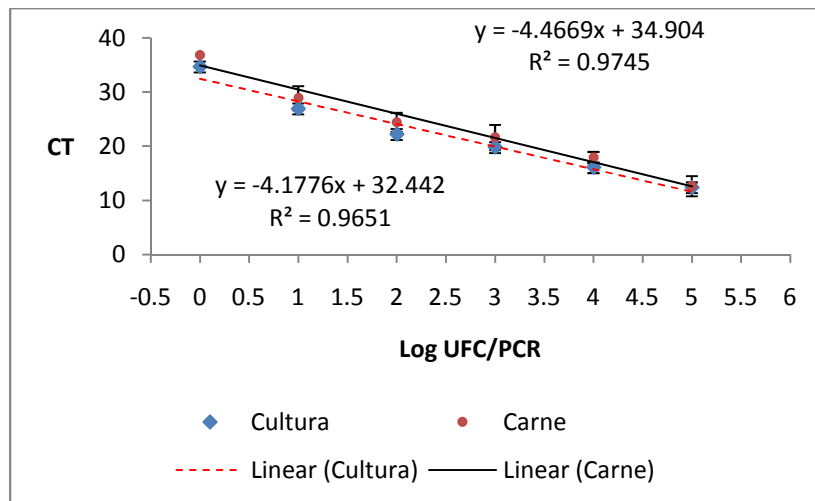


Fig.3 Curba standard de amplificare la *Listeria monocytogenes* în funcție de concentrația ADN și de modalitatea de extracție

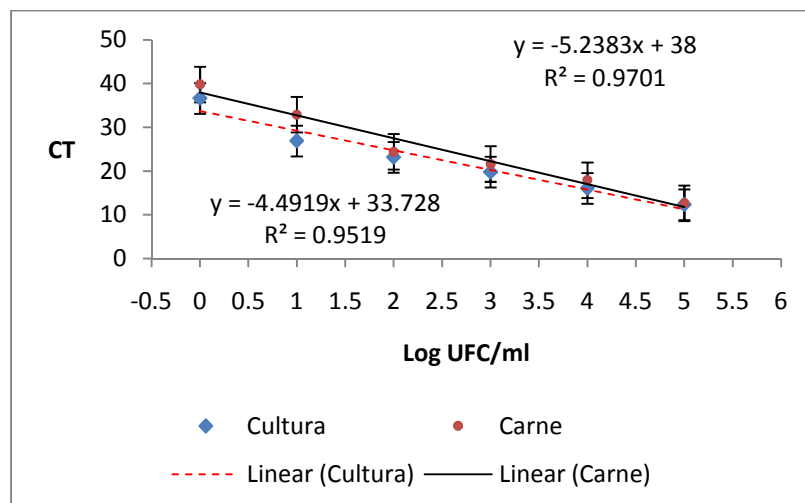


Fig.1 Curba standard de amplificare la *Campylobacter jejuni* în funcție de concentrația ADN și de modalitatea de extracție

#### Evaluarea sensibilității Real-Time PCR multiplex

#### Sensibilitatea testului Real-Time PCR aplicat pe ADN purificat extras din culturi bacteriene

Pentru evaluarea sensibilității testului multiplex s-au preparat amestecuri din ADN – ul purificat al celor patru bacterii extras din culturi de referință, în proporții variabile ( $1 - 10^5$  genom echivalent/reactie).

La concentrații ale ADN echivalente cu 1 UFC/ml a fost observată amplificarea la *L. monocytogenes* dar nu și în cazul celorlalte specii. Începând de la concentrații de 10 UFC/ml (genom echivalent) au fost obținute rezultate pozitive la trei din cele patru bacterii (*Salmonella*, *L. monocytogenes* și *E. coli O157:H7*). În cazul speciei *Campylobacter jejuni* nu s-a produs amplificarea peste limita de detecție în niciuna din situațiile analizate. (Tabelul 3).

Prin compararea valorilor CT obținute în cazul testelor efectuate pe ADN – ul purificat de la cele patru bacterii separat (uniplex) și amestec (multiplex) la concentrații variabile, se observă valori ușor mai mari ale CT în cazul testelor multiplex. Acest fapt arată că sensibilitatea testelor uniplex în condițiile experimentului efectuat este mai mare decât a celui multiplex. O explicație poate fi dată de necesarul mai mare de reagenți din mixul de amplificare în cazul testului multiplex și existența unei competiții, ceea ce duce la reducerea vitezei de desfășurare a proceselor și consecutiv la reducerea sensibilității testului.

Tabel 3 – Co-amplificarea ADN-ului celor patru specii bacteriene, obținut prin extracție din culturile bacteriene, în concentrații diferite, prin Real-Time PCR

Inocul (log UFC/ml) genom echivalent				RT-PCR multiplex			
<i>Salmonella</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
0	0	0	0	-	-	+	-
1	1	1	1	+	+	+	-
2	2	2	2	+	+	+	-
3	3	3	3	+	+	+	-
4	4	4	4	+	+	+	-
5	5	5	5	+	+	+	-

La valori ale concentrației ADN mai mici de 10 genom echivalent/reacție majoritatea rezultatelor obținute au fost neconcludente atât în cazul testelor uniplex cât și în cazul testului multiplex (Tabel 4)

Tabel 4 - Comparația valorilor CT (Cycle Threshold) obținute prin Real-Time PCR (uniplex și multiplex) în cazul utilizării ADN-ului purificat extras din culturile bacteriene \*

Microorganism	RT-PCR	Log UFC/PCR					
		0	1	2	3	4	5
<b>Salmonella spp.</b>	Uniplex	39,03	34,79	31,55	28,31	25,07	22,83
	Multiplex	< 40	36,66	34,692	31,92	27,746	25,773
<b>Escherichia coli O157:H7</b>	Uniplex	39,62	36,98	31,34	26,7	22,06	18,42
	Multiplex	< 40	39,351	36,721	34,091	31,461	28,831
<b>Listeria monocytogenes</b>	Uniplex	36,33	33,39	30,45	27,51	24,57	21,63
	Multiplex	37,04	34,45	31,86	29,27	26,68	24,09
<b>Campylobacter jejuni</b>	Uniplex	39,73	37,19	34,65	32,11	29,57	21,03
	Multiplex	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40

\* media a trei determinări efectuate în fiecare caz în parte

Sensibilitatea testului Real-Time PCR aplicat pe carne de pasăre inoculată artificial

Probele din carne de pasăre au fost inoculate cu diluții ale celor patru bacterii obținute în urma cultivării acestora pe medii lichide (102 – 107 UFC/ml). Inocularea s-a efectuat prin introducerea probelor de carne (25g) în pungi din plastic sterile; omogenizare la stomacher, după care s-a adăugat în pungă diluția (225 ml). Încărcătura bacteriană a fost stabilită prin teste microbiologice clasice.

O probă de carne care s-a prelucrat similar fără a fi inoculată a fost folosită ca martor negativ.

Limita de detecție a testului s-a stabilit în funcție de cea mai mare diluție folosită pentru inoculare de la care au fost obținute rezultate pozitive. Cu excepția bacteriei *Campylobacter jejuni* au fost obținute rezultate pozitive în cazul tuturor testelor efectuate ceea ce demonstrează o limită de detecție de cel puțin 10 UFC/ml sau g (Tabel 5).

Tabel 5 – Rezultatele testului Real-Time PCR obținute pe carnea de pasăre inoculată cu cele patru bacterii în concentrații diferite, prin Real-Time PCR

Inocul log UFC/PCR				RT-PCR multiplex			
<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> <i>O157:H7</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> <i>O157:H7</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>
2	2	2	2	+	+	+	-
3	3	3	3	+	+	+	-
4	4	4	4	+	+	+	-
5	5	5	5	+	+	+	-
6	6	6	6	+	+	+	-
7	7	7	7	+	+	+	-

#### 4. Concluzii

- În condițiile experimentelor efectuate, secvențele nucleotidice (primeri și sonde) identificate pentru detecția și cuantificarea celor patru bacterii patogene din alimente au dovedit specificitate ridicată;
- Metoda pusă la punct în acest experiment a dovedit sensibilitate pentru detecția și cuantificarea speciilor de bacterii patogene vizate;
- Dintre cele patru specii bacteriene luate în studiu, în urma experimentelor efectuate au fost obținute rezultate concludente pentru trei (*Salmonella*, *E. coli O157:H7* și *L. monocytogenes*), în cazul speciei *Campylobacter jejuni* rezultatele fiind concludente doar pentru testele de tip uniplex.
- Sensibilitatea metodei a fost mai mare în cazul testelor uniplex decât în cazul testelor multiplex.
- Sensibilitatea metodei s-a diminuat atunci când experimentele au fost efectuate pe alimente inoculate artificial;
- În cazul testelor uniplex, limita de detecție stabilită în condițiile studiului efectuat a variat de la 1 UFC/ml pentru *L. monocytogenes* la 10 UFC/ml pentru *Salmonella*, *E. coli O157:H7* și *Campylobacter jejuni*.
- În cazul testelor multiplex, limita de detecție a variat 1 UFC/ml pentru *L. monocytogenes* la 10 UFC/ml pentru *Salmonella*, *E. coli O157:H7*, pentru specia *Campylobacter jejuni* rezultatele nepermițând încă stabilirea limitei de detecție.
- Rezultatele obținute sunt încurajatoare dar cercetările trebuie continuate pentru a se stabili condițiile optime de detectare simultană a celor patru bacterii, identificarea posibilităților inhibitori și conceperea unui control intern, condiții imperativ necesare pentru definitivarea metodei și aplicarea ei în practică.

Director proiect,  
Șef de lucrări dr. Viorel FLORIȘTEAN