

Sinteza rezultatelor

Programul CNCSIS:	IDEI
Tipul proiectului:	Proiecte de cercetare exploratorie
Cod proiect:	ID_666
Contractul de finanțare	nr. 275/2007
Perioada	2007 – 2010

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

Obiective

Principalul obiectiv ale acestui proiect a fost 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*).

Ca obiective secundare în cadrul proiectului s-a urmărit:

- organizarea și dotarea unui laborator de biologie moleculară pentru analiza alimentelor în cadrul Laboratorului de siguranță alimentară al Facultății de Medicină Veterinară din Iași.
- formarea de specialiști necesari pentru buna funcționare a laboratorului, obiectiv realizat prin efectuarea de către tinerii cercetători implicați în proiect a unor stagii de pregătire în Laboratorul de microbiologie a alimentelor al Facultății de Medicină Veterinară din Liege, Belgia

Crearea de metode de detectare și de stabilire a numărului de bacterii patogene prin metode rapide și specifice, constituie un obiectiv permanent valabil, pentru a răspunde nevoilor industriei alimentare și a autorităților de reglementare. Aceste metode sunt esențiale pentru evaluarea inocuității produselor alimentare, a validării practicilor de producție, dar și pentru obținerea datelor necesare pentru evaluarea riscurilor legate de consumul unui anumit aliment.

În microbiologia alimentelor, metodele tradiționale cuprind izolarea și identificarea microorganismului. În funcție de germenul 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 microorganismelor 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.

Metodele care se bazează pe caracterizarea genetică proprie a fiecărui microorganism permit detectarea acestuia în condiții de înaltă specificitate și sensibilitate. 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.

Datorită 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 toxoinfecții 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.

2. Material și metodă

Culturi bacteriene, medii de cultură și condițiile de cultivare

Culturile bacteriene folosite în cadrul studiului 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*₁₅₇ *H*₇ – **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* *O*₁₅₇:*H*₇, 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* *O*₁₅₇:*H*₇). După o incubare de 12 – 18 ore la 37⁰C, cu o ansă s-a transferat o colonie în mediul lichid (TSB). Culturile au fost incubate la 37⁰C 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% O₂, 10% CO₂ și 85% N) la 42⁰C 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 10⁶ UFC/g sau ml, prin introducerea unor probe de aliment în volume de 10 ori mai mari de apă peptonată sterilă, înșămânțată cu culturi bacteriene pe mediul lichid, în pungi din plastic sterile și omogenizate în stomacher. Nivelul încărcăturii bacteriene a fost stabilit, pentru fiecare specie bacteriană prin înșămânțarea 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 100⁰C 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 μl din supernatantul rezultat în urma centrifugării a fost transferat într-un tub special și păstrat la 4⁰C până la utilizare.

În cazul culturilor pe medii lichide a fost prelevat un volum de 1 ml cultură care a fost centrifugat la 12000 rpm timp de 2 minute. Supernatantul a fost îndepărtat prin aspirare cu protejarea sedimentului. Peste sedimentul rezultat s-a adăugat 100 μl reagent PrepMan Ultra. Amestecul a fost vortexat energetic timp de 5 minute apoi încălzit la 95 - 100⁰C și păstrat la această temperatură timp de 10 minute pe un termobloc (Biometra, Germania). După tratamentul termic amestecul a fost adus la temperatura camerei și centrifugat la 12000 rpm timp de 2 minute. Un volum de 50 μl din supernatantul rezultat în urma centrifugării a fost transferat într-un tub special și păstrat la 4⁰C 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 energic timp de 5 minute apoi încălzit la 95 -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 μl din supernatantul rezultat în urma centrifugării a fost transferat într-un tub special și păstrat la 4°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.

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°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°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 unic DQ. 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 7500) în așa fel încât să se reducă la maximum posibilitățile de suprapunere a spectrelor de emisie. În ceea ce privește inhibitorul de fluorescență s-a apelat la un inhibitor unic care nu emite fluorescență deoarece instrumentul folosit are numai cinci filtre disponibile. Sondele de tip MGB (Minor Groove Binding) folosite se deosebesc de alte sonde prin aceea că au o temperatură de topire mai mare decât a sondelor cu marker fluorescent

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 Biotehnologică (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.

Optimizarea reacției PCR

Orice metodă PCR, înainte de a fi introdusă în practica de laborator trebuie să fie optimizată, adaptată unor reagenți bine caracterizați și stabilirea cu exactitate a procedurilor de lucru.

Procesul de optimizare se referă la stabilirea cu exactitate a temperaturii și timpului de legare a primerilor și sondelor, stabilirea concentrației optime de primeri, sonde și nucleotide pentru ca amplificarea să se desfășoare cu eficiență apropiată de 100%.

Pentru optimizarea reacției puse la punct în laborator s-au folosit unor concentrații ce au variat între 40 și 200 μM pentru nucleotide (dNTPs). Concentrația prea mare a nucleotidelor în mixul de reacție poate constitui un factor de inhibare a reacției în timp ce concentrația prea mică împiedică amplificarea prin aportul insuficient de nucleotide.

În ceea ce privește concentrațiile primerilor și a sondelor au fost testate mai multe combinații începând cu concentrațiile standard recomandate de producătorul primerilor și sondelor (Applied Biosystems) respectiv 10 μM pentru sonde și 50 μM pentru primeri.

Un alt aspect avut în vedere pentru optimizarea reacției PCR a fost asigurarea purității ADN-ului extras, prin diluare, în vederea îndepărtării eventualelor inhibitori proveniți din matricea alimentară.

Purificarea ADN s-a efectuat atunci când absorbanta determinată prin spectrometrie 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.

De asemenea, tot referitor la ADN a fost necesară aflarea cantității optime de ADN ce trebuie introdusă în reacție pentru a se obține valori optime ale amplificării. O cantitate prea mare de ADN va inhiba reacția prin favorizarea consumului unor cantități exagerate de nucleotide încă din primele cicluri ale amplificării. Pe de altă parte o cantitate prea mică de ADN va conduce la obținerea de amplificări nespecifice.

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

Cantitatea optimă de ADN a fost stabilită prin tatonare prin diluarea acesteia înainte de testare.

Validarea reacției PCR

Una dintre etapele cele mai dificile și mai costisitoare din procesul de impunere a unei metode de laborator este validarea acesteia.

Validarea metodei PCR inițiată în laboratorul nostru a constat în efectuarea de teste multiple și repetate pe un număr mare de tulpini pentru a se evidenția sensibilitatea și specificitatea metodei.

Pentru stabilirea limitelor de detecție a reacției PCR de detectare multiplă (multiplex) au fost testate diluții zecimale ale materialului genetic (10–10⁴) 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.

Specificitatea metodei a fost testată pe un grup de 9 tulpini bacteriene din colecția proprie, din specii mai mult sau mai puțin înrudite cu cele testate (*S. gallinarum*, *Enterobacter spp.*, *S. typhimurium*, *S. arizonae*, *Klebsiella spp.*, *S. enteritidis*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella multocida*).

Controlul contaminării

Prevenirea contaminării probelor a fost obținută prin separarea fizică a spațiilor: în care a fost extras ADN-ul; s-au introdus primerii, sondele și master mixul, și s-a realizat amplificarea-citirea.

Tot pentru prevenirea efectelor nedorite ale contaminării a fost utilizat Universal MasterMix cu UNG Amperase, care previne amplificarea ADN-ului contaminant.

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 bacterie 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 1).

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

Inocul log UFC/ml (genom echivalent)	PCR uniplex			
	<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 acțiuni 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.

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

Optimizarea metodei

În urma optimizării, prin ajustarea cantităților de reactivi și controlul temperaturii de desfășurare a reacției s-a reușit obținerea de unor eficiențe ale procesului de amplificare cuprinse între 62,85 și 98,12. Eficiența procesului de amplificare a fost mai mare în cazul reacțiilor de tip multiplex. Cele mai mici valori ale eficienței amplificării au fost obținute în cazul reacțiilor multiplex în care au fost testate tulpinile de *Campylobacter jejuni*, situații în care nu s-a reușit obținerea unei eficiențe a procesului de amplificare satisfăcătoare prin modificarea cantităților de reactivi utilizați sau a temperaturii de desfășurare a reacțiilor (Tabel 3).

Tabel 3. Rezultatele procesului de optimizare al reacțiilor PCR

Metoda	Specia Bacteriana	ADN	Primeri		Sonde		MasterMix	Temperatura		Eficiența reacției
		Vol.	Vol.	Conc.	Vol.	Conc.	Vol.	I	II	
Uniplex	<i>Salmonella spp.</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	92,63
	<i>E. coli O157H7</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	86,55
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	93,35
	<i>Campylobacter jejuni</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	92,63
Duplex	<i>Salmonella spp.</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	93,35
	<i>Campylobacter jejuni</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			68,86
	<i>Salmonella spp.</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	89,19
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			92,63
	<i>Salmonella spp.</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	96,71
	<i>E. coli O157H7</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			74,22
	<i>Campylobacter jejuni</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	63,57
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			89,24
	<i>Campylobacter jejuni</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	64,21
	<i>E. coli O157H7</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			89,25
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	98,12
	<i>E. coli O157H7</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			76,97
Triplex	<i>Salmonella spp.</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	84,66
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			91,35
	<i>E. coli O157H7</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			82,54
	<i>Salmonella spp.</i>	2,2 µl	0,8 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl	90	60	91,53
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			83,35
	<i>Campylobacter jejuni</i>	2,8 µl	1,2 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			62,85
	<i>Campylobacter jejuni</i>	2,8 µl	1,2 µl	50µM	0,6	10µM	12,5 µl	90	60	67,63
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 µl	1 µl	50µM	0,5	10µM	12,5 µl			89,35
<i>E. coli O157H7</i>	2,2 µl	0,9 µl	50µM	0,4	10µM	12,5 µl	89,63			

Eficiența redusă a procesului de amplificare, constatată în reacțiile de tip multiplex poate fi pusă pe seama unor ”incompatibilități” între primerii și sondele alese fapt care, în principiu, ar putea fi corectat prin tatonări și testarea unor combinații variate între acestea și cantitatea de ADN de la bacteriile analizate.

Din păcate lipsa fondurilor nu a permis achiziționarea în timp util a tuturor reactivilor necesari și efectuarea unei optimizări/validări după toate regulile artei.

Concluzii

1. Metodele ce au la bază biologia moleculară la modul general și în special cele bazate pe Real Time PCR reprezintă tehnici versatile de detecție și caracterizare a microorganismelor din alimente;
2. Aceste metode extrem de sensibile trebuie efectuate în laboratoare de specialitate, dotate corespunzător, cu personal bine instruit și cu respectarea riguroasă a protocoalelor de lucru prin care se poate asigura obținerea de rezultate relevante științific și cu aplicabilitate în practică;
3. În condițiile experimentelor efectuate, secvențele nucleotidice (primeri și sonde) identificate pentru detecția și cuantificarea celor patru bacterii patogene din alimente au dovedit specificitate ridicată;
4. Metoda pusă la punct în acest experiment a dovedit sensibilitate pentru detecția și cuantificarea speciilor de bacterii patogene vizate;
5. 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.
6. Sensibilitatea metodei a fost mai mare în cazul testelor uniplex decât în cazul testelor multiplex.
7. Sensibilitatea metodei s-a diminuat atunci când experimentele au fost efectuate pe alimente inoculate artificial;
8. 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*.
9. 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;
10. Procesul de optimizare a metodelor PCR este unul anevoios și costisitor fapt care a făcut imposibilă efectuarea a unui număr suficient de determinări, necesare pentru a se îmbunătăți parametri funcționali ai metodei puse la punct;
11. Timpul scurt, unele probleme tehnice și mai ales lipsa fondurilor a făcut imposibilă efectuarea testelor necesare pentru a se pune la punct o metodă de detectare a celor patru bacterii luate în considerare;
12. Cu toate că obiectivul principal al proiectului a fost parțial realizat, din motive obiective, rezultatele obținute sunt încurajatoare;
13. Cercetările inițiate prin acest proiect ar trebui continuate, pentru a se valorifica rezultatele obținute până în prezent, și punerii la punct a metodei de detectare simultană a celor patru bacterii, ceea ce ar constitui o premieră mondială.
14. Laboratorul de biologie moleculară din cadrul Laboratorului de Siguranță Alimentară al Facultății de Medicină Veterinară, dotat în principal cu fonduri din acest proiect, dispune de specialiști capabili să realizeze aceste obiective în condițiile unei finanțări corespunzătoare.

Director proiect,
Șef de lucrări dr. Viorel FLORIȘTEAN