



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA MICROBIOLOGIE - IMUNOLOGIE**

Drd. OBADĂ MIHAI DORU

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**«CERCETĂRI PRIVIND UTILIZAREA UNUI PROGRAM DE SCREENING ȘI
CONTROL AL TOXIINFECȚIILOR CU *SALMONELLA SPP.* ȘI *CAMPYLOBACTER SPP.* PRIN MODELE OPTIME DE INVESTIGAȚIE FENOTIPICĂ ȘI MOLECULARĂ»**

*Cuvinte cheie: consum colectiv, serotipizare, materiale biologice,
alimente, tipizare M.L.S.T.*

În problematica de sănătate publică, toxiinfecțiile alimentare continuă să ocupe o pondere importantă întrucât sunt prezente pe toate meridianele globului pământesc. Rapoartele OMS apreciază că în lume milioane de persoane suferă de boli provocate de contaminarea alimentelor. Toxiinfecțiile sunt o problemă mult mai mare pentru guverne și industria alimentară de azi comparativ cu ultimele decade.

Toxiinfecțiile alimentare, ele trebuiesc mereu și obligatoriu adaptate la situațiile individuale întâlnite la nivel local sau la nivel de țară chiar dacă există ghiduri generice.

Implementarea unui de program de screening și control necesită luarea în considerare și amănuntele specifice unui teritoriu sau a unei țări cu privire la educația culinară, orientarea religioasă, condiții geografice și deontologia profesională a aparatului de implementare și control a astfel de programe.

Focarele de toxiinfecții alimentare necesită implicații profunde în domenii diferite ca medicina internă, epidemiologie, medicină de laborator, microbiologie și chimie alimentară, controlul sanitar al alimentelor precum și în managementul calității.

Gradul de noutate al tezei constă în faptul că tehnica M.L.S.T. în România nu a mai fost până în prezent utilizată, iar cele două protocoale de lucru pentru *Salmonella spp* și *Campylobacter spp.* nu au mai fost testate și optimizate în România. Prezentul studiu aduce



informații noi atât pe plan național cât și internațional privind structura genetică a tulpinilor de *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.* izolate din produse alimentare și materiale biologice în România și pune la dispoziția cercetătorului interesat, un protocol de tipizare și un studiu de identificare a factorilor de virulență pentru *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*

Teza intitulată "Cercetări privind utilizarea unui program de screening și control al toxiinfecțiilor cu *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.* prin modele optime de investigație fenotipică și moleculară" cuprinde 269 pagini, fiind redactată în IX capitole și este structurată conform criteriilor în vigoare, în două părți. Prima parte (cap. I, II, și III) reprezintă 20,44% și sintetizează principalele date bibliografice din literatura de specialitate privitor la caracterizarea genurilor bacteriene *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*, descrierea succintă a toxiinfecțiilor alimentare produse de genurile *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*, și descrierea unor tehnici de tipizare a izolatelor genurilor menționate, constituind „*Stadiul actual al cunoașterii*”, iar partea a 2-a (cap. V, VI, VII, VIII, IX) se referă la cercetările proprii și reprezintă 79,56%. Fiecare capitol din partea a 2-a are în cuprins material și metode de lucru, rezultatele obținute, cu discutarea lor și concluziile parțiale.

Lucrarea este ilustrată cu un număr de 69 figuri, 40 tabele și se bazează pe 205 titluri bibliografice.

În **capitolul IV**, intitulat „*Scopul și obiectivele tezei*”, sunt prezentate obiectivele cercetărilor care au urmărit: efectuarea de investigații microbiologice și de biologie moleculară și un controlul a unor focare de toxiinfecții alimentare produse de genurile bacteriene *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*

Cercetările propuse au fost de a contribui la realizarea și elaborarea unui program de screening și control al toxiinfecțiilor alimentare produse de *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*.

Cercetările au avut la bază următoarele obiective:

- izolarea tulpinilor de *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.* din diverse nișe ecologice : produse alimentare de origine animală, probe de fecale și identificarea acestora pe baza caracterelor culturale, biochimice, și prin tipizare serologică;
- identificarea prin P.C.R. a genelor care sintetizează factori de virulență pentru *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*;

- identificarea tipurilor de secvență nucleotidice specifice pentru tulpinile de *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.* izolate din materiale biologice (fecale, urină, etc) și produse alimentare (ouă, branză, caș, carne, etc);
- determinarea caracteristicilor izolatelor din produse alimentare și din materiale biologice și compararea lor;
- identificarea genotipului ancestral și a relațiilor filogenetice între diferite tipuri de secvență;
- Supravegherea și investigarea focarelor de toxiinfecții alimentare cu *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.* în Județul Iași.
- Măsuri de control al toxiinfecțiilor alimentare cu *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*
- Stabilirea unei proceduri pentru screeningul și controlul toxiinfecțiilor alimentare cu *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*

În **capitolul V**, intitulat „**Materiale și metode de lucru**” sunt descrise metodele clasice de izolare și identificare a genurilor *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*, precum și tehnica P.C.R. și cea M.L.S.T. a acestor genuri bacteriene.

În **capitolul VI**, intitulat „**Prevalența și factorii de risc asociați cu diseminarea bacteriilor din genul Salmonella**” au fost identificate serotipurile de *Salmonella spp.* utilizând metoda aglutinării pe lamă. Antigenele reprezentate de tulpinile izolate și antiserurile polivalente și monovalente flagelare, acestea au fost încadrate în șapte serovaruri, cu următoarea incidență: *Salmonella enteritidis* (50,88%), *Salmonella typhimurium* (33,34%), *Salmonella kottbus* (5,28%), *Salmonella litchfield* (3,50%), *Salmonella virchow* (3,50), *Salmonella umbilo* (1,75%), *Salmonella rissen* (1,75%). Din cele 57 de tulpini luate în studiu, 54 de tulpini (94,73%) au fost izolate de la bolnavi cu boală diareică acută și 3 de tulpini (5,267%) de la persoane cu toxiinfecții alimentare.

Prin diferite reacții P.C.R. au fost investigate 30 de tulpini de *Salmonella spp.* pentru identificarea unor factori de virulență specifici.

Importanța determinării caracteristicilor izolatelor din produse alimentare și din materiale biologice este evidentiată prin studiul factorilor de virulență, care a permis identificarea



izolatelor cu caracter epidemic – purtătorii genei *sopE*, precum și a celor a căror virulență este transmisă prin plasmidă – purtătorii genei *pefA*.

În studiul nostru toate izolatele de *Salmonella spp.* de origine umană au prezentat fragmentele de gene *pefA* și *sopE*; astfel, izolatele umane au prezentat un pronunțat caracter epidemic iar transmiterea factorilor de virulență s-a făcut prin intermediul plasmidei.

Profile alelice ale acestor tulpini au fost determinate prin tehnica M.L.S.T. și tipul de secvență a acestor tulpini a fost atribuit prin comparație cu cele deținute în baza de date MLST. Tehnica M.L.S.T. a fost efectuată pe un număr de 12 tulpini de *Salmonella enterica* izolate din diferite materiale biologice umane și produse alimentare. Prin tehnica M.L.S.T. au fost identificate cinci tipuri de secvență : ST-11, ST-19, ST-212, ST-582 și ST-142.

Tipul de secvență ST 11 a fost identificat în cazul izolatelor *Salmonella heidelberg*, iar ST 19 a fost identificat în cazul izolatelor *Salmonella tphimurium* și *Salmonella enteritidis*. *Salmonella bovismorbificans* ST 142 a fost identificată în cazul unei tulpini de origine umană izolată dintr-un bazin de colectare a fecalelor umane din Anglia. Acesta este primul caz de *Salmonella bovismorbificans* raportat în Anglia. Studiul actual sugerează faptul că *Salmonella kottbus* ST 212, identificat la 3 tulpini și ST 582, identificat la o singură tulpină, a apărut ca o problemă majoră de sănătate publică în diferite produse alimentare în România. *Salmonella enterica* ST 212 nu a fost raportată a fi izolată anterior din ouă, carne de pasăre și caș de oaie și am identificat o sursă (piele gât pasăre) de la care tipul de secvență ST 582 poate fi izolat. În plus, sugerăm o distincție între ST 212 și ST 582. Izolate de *Salmonella kottbus* ST 212 analizate au caracter epidemic (au gena *sopE*), în timp izolatele de *Salmonella kottbus* ST 582 nu au caracter epidemic (nu au gena *sopE*).

Analiza arborelui filogenetic pe baza secvențelor fragmentului de genă *aroC* cu ajutorul programului *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* prin metoda Neighbour Joining a evidențiat asemănarea filogenetică între ST 582 și ST 142 și între ST 19 și ST 212. Analiza arborelui filogenetic pe baza secvențelor fragmentului de genă *dnaN* a evidențiat înrudirea filogenetică între ST 11 și ST 582 și între ST 142 și ST 212. Analiza arborelui filogenetic pe baza secvențelor fragmentului de genă *hisD* a evidențiat înrudirea filogenetică între ST 142 și ST 582 și între ST 11 și ST 212. Analiza arborelui filogenetic pe baza secvențelor fragmentului de genă *sucA* a evidențiat înrudirea filogenetică între ST 212 și ST 11 ambele fiind emergente din ST 19, iar pe baza secvențelor fragmentului de genă *thrA* evidențiat înrudirea filogenetică între



ST 19 și ST 212 ambele fiind emergente din ST 142 și ST 582. Pe baza secvențelor fragmentului de genă *purE* a evidențiat înrudirea filogenetică între ST 142 și ST 11, ST 19 și ST 582 fiind asemănătoare filogenetic și pe baza secvențelor fragmentului de genă *hemD* evidențiat înrudirea filogenetică între ST 142 și ST 212 și între ST 11 și ST 582.

În **capitolul VII**, intitulat „**Prevalența și factorii de risc asociați cu diseminarea bacteriilor din genul *Campylobacter***” au fost identificate serotipurile de *Campylobacter spp.* și caracteristicile genetice ale tulpinilor de *Campylobacter jejun*, am caracterizat 10 izolate din Anglia cu ajutorul a două tehnici moleculare : P.C.R. și M.L.S.T.

În cazul celor 10 izolate de *Campylobacter spp.* s-a identificat prezența genelor *groEL* și *hipO*. Altfel spus, prin identificarea acestor gene s-a demonstrat faptul că aceste izolate sunt *Campylobacter spp.* și mai exact specia *Campylobacter jejuni*. Tipul de secvență ST-21 (4 izolate) a fost identificat în cazul izolatelor de origine umană. El este raportat ca fiind cel mai frecvent complex clonal izolat de la oameni. Tipul de secvență ST-45 (6 izolate) a fost identificat în cazul izolatelor de origine animală (păsări). El este raportat ca fiind cel mai frecvent complex clonal izolat din mediul înconjurător.

În perioada 2008-2011 au fost înregistrate oficial 322 de cazuri de toxiinfecții alimentare cu germeni din genul *Salmonella*, iar raportările oficiale ale României cu privire la infecțiile cu *Campylobacter ssp.* apar din 2008 (2 cazuri confirmate) și 2009 (254 cazuri confirmate).

În **capitolul VIII**, intitulat „**Planificarea și pregătirea unui program de screening și control al toxiinfecțiilor alimentare cu *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.***” sunt descrise o serie de strategii de supraveghere și monitorizare a toxiinfecțiilor alimentare produse de genurile bacteriene menționate mai sus.

Toxiinfecțiile alimentare produse de germeni din genul *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.* trebuie menținute mereu într-un sistem european de alertă epidemiologică, deoarece reprezintă un risc ridicat pentru sănătatea populației. Se impune un program de screening și control continuu, mai ales la noi în țară unde controlul surselor este foarte greu de făcut din cauza faptului că mare parte din alimentele de origine animală nu sunt supuse controlului sanitar-veterinar, ele având ca proveniență exploatațiile non-profesionale.

În **capitolul IX** sunt sintetizate în cele 22 concluzii finale, principalele aspecte desprinse în urma cercetărilor efectuate și câteva recomandări în ceea ce privește utilizarea tehnicilor P.C.R. și M.L.S.T. în România.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

Acest studiu aduce un grad înalt de noutate, prin aceea că România, deși este o țară în care există programe de supraveghere și control, progresul genetic în studierea tulpinilor autohtone de *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.*s-a făcut într-un ritm lent unde tehnicile P.C.R. și M.L.S.T. abia încep să fie aplicate, cu rezultate remarcabile.