

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

CERCETĂRI PRIVIND UTILIZAREA UNOR METODE MODERNE DE DETECȚIE ȘI ANALIZĂ A PATOGENILOR ÎN DIFERITE MATRICI ALIMENTARE

Doctorand: **ALZAIDI Quthama Jasmin**

Conducător științific: **Prof. Univ. Dr. MATEI Florentina**

CUVINTE CHEIE: viability-qPCR, acid lactic, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.

Promovarea unui stil de viață cât mai sănătos și sustenabil din ultimul deceniu a determinat o cerere tot mai mare de legume proaspete și alte produse tip "ready to eat". Odată cu acest val de produse pre-ambalate care au termen de valabilitate cât mai lung, au apărut tot mai des și focarele de infecție de origine alimentară. Detectarea agenților patogeni și a microorganismelor de alterare este un aspect crucial al menținerii sănătății publice, al prevenirii focarelor și al asigurării siguranței alimentelor, solului, apei și a altor probe biologice.

Tehnica real-time PCR (qPCR) a îmbunătățit detecția și cuantificarea patogenilor prin sensibilitatea și specificitatea crescută a testelor. De asemenea, rapiditatea analizelor oferită de multiplexarea și automatizarea aparatelor reprezintă un plus important pentru diferite industrii, precum cea alimentară sau farmaceutică. Cu toate acestea, această tehnică prezintă o serie de limitări legate de acuratețea rezultatelor, mai ales în cazul probelor ce conțin amestecuri de celule viabile și neviabile, generând rezultate fals negative. O strategie promițătoare pentru a evita această problemă este "viability-qPCR" (v-qPCR), care se bazează pe o serie de permeabilizatori ce pot ajuta procesul de penetrare al membranei externe în cazul bacteriilor Gram-negative de către coloranții fotoactivi (propidium monoazida PMA), mărind astfel acuratețea rezultatelor.

Scopul general al cercetărilor a vizat dezvoltarea unor metode moleculare rapide de detecție și cuantificare a unor microorganisme de alterare (*Botrytis cinerea*) sau patogeni (*E.coli*, *Salmonella* sp.) din diferite matrici alimentare, respectiv fructe și legume rapid perisabile (zmeură, mixuri de salate ambalate) și lapte. În mod specific, a fost vizată optimizarea tehnicii v-qPCR prin identificarea unei substanțe accesibile, sigure și eficiente care să permită coloranților fotoactivi (PMA) să pătrundă eficient în orice tip de matrice, respectiv acidul lactic.

Astfel, obiectivele specifice au fost următoarele:

1. Dezvoltarea unei metode qPCR de cuantificare a contaminării zmeurei proaspete cu *B. cinerea*;
2. Dezvoltarea unei metode de detecție și cuantificare a *E. coli* și *Salmonella* prin v-qPCR;
3. Utilizarea metodei v-qPCR pentru detecția *E. coli* în matrici alimentare.

În partea teoretică a lucrării s-a realizat o amplă documentare structurată în mai multe capitole referitoare la principalii patogeni întâlniți în industria alimentară și dezvoltarea și îmbunătățirea metodelor de detecție. Astfel, au fost descrise metodele moleculare (PCR, qPCR, v-qPCR) și cum au evoluat acestea, cât și dezavantajele și limitările acestora. De asemenea, a fost descrisă utilizarea permeabilizatorilor pentru detecția și cuantificarea patogenilor Gram-negativi cu scopul de a ajunge la rezultate cât mai precise.

A doua parte a lucrării, structurată în 3 capitole experimentale și un capitol de concluzii, abordează dezvoltarea unei metode moleculare de cuantificare a contaminării fructelor de zmeură cu *Botrytis cinerea*, îmbunătățirile aduse tehnicii viability qPCR și testarea noii analize pe matrici alimentare cum ar fi laptele și frunzele de spanac.

Primul capitol experimental a vizat studiul comparativ al rezultatelor de detecție a microorganismului de alterare *B. cinerea* pe probe ambalate de zmeură, prin utilizarea metodei tradiționale de cultivare în placă și a unei metode qPCR dezvoltată în laborator.

Prin însămânțarea în placă a probelor de zmeură pe mediu specific nu a fost detectat miceliu care să indice prezența speciei *B. cinerea* pe nici una din cele trei probe comerciale ambalate și aflate la raft. Având în vedere rezultatele incerte obținute prin tehnica microbiologică clasică, s-a făcut apel la tehnica qPCR, fiind dezvoltată metoda de detecție cu perechea de primeri Bc3F/Bc3R. Liniaritatea curbei standard obținute a fost observată în toată gama utilizată, având un coeficient de corelație ($R_2=0,9929$) care indică o variabilitate foarte scăzută inter-test.

A fost obținută o eficiență de amplificare de 85,18%. În condițiile descrise, valoarea maximă C_t care ar putea fi folosită a fost de 32 și corespunde unei concentrații de ADN de 9,8 fg. Prin tehnica dezvoltată, prezența *B. cinerea* a fost detectată în două din cele trei probe comerciale, având valori în jurul a 3,8-4,2 fg.

Astfel, prin metoda qPCR dezvoltată se poate detecta chiar și cea mai mică cantitate de *B. cinerea* prezentă în probă, prin utilizarea primerilor Bc3F și Bc3R, obținându-se rezultate precise. Tehnica simplă propusă poate fi eficientă pentru examinarea de rutină a mai multor probe pe zi.

Următoarele două capitole experimentale, referitoare la bacterii patogene a vizat, în mod specific, optimizarea tehnicii v-qPCR prin identificarea unei substanțe accesibile, sigure și eficiente care să permită coloranților fotoactivi (PMA) să pătrundă eficient în orice tip de matrice, respectiv acidul lactic. A fost dezvoltată o metodă v-q-PCR care a utilizat acidul lactic ca și permeabilizator pentru detecția și cuantificarea *E.coli* și *Salmonella* sp.

Într-o primă fază, s-a constatat că acidul lactic în concentrație redusă (5-20 mM) nu afectează viabilitatea tulpinii de *E.coli*, în timp ce tulpina de *Salmonella* sp. nu este inhibată la concentrații mai mici de 10 mM. La ambele tulpini acidul lactic (AL) acționează sinergic cu antibioticul ciprofloxacin (CIP 1) și poate fi utilizat pentru a mări acțiunea antibacteriană. Pretratamentul cu 10 mM AL are efect maxim de permeabilizare a membranei celulare la *E.coli*, iar în acest caz indicele dCt-neviabil care cuantifică reducerea semnalului qPCR are valoarea medie de 14,5. La tulpina *S. Typhimurium*, PMA pătrunde eficient membrana externă, iar valorile de reducere a semnalului (dCt non-viabile) pentru probele tratate cu PMA și probele PMA + AL 10 mM nu diferă din punct de vedere statistic. De asemenea a fost calculată limita de detecție și curba standard pentru tulpina de *E.coli* pentru a evalua performanța tehnicii de detecție implementate.

Ulterior, testele de permeabilizare cu acid lactic și analiza qPCR cu colorant PMA au fost aplicate pe probe de lapte și frunze de spanac achiziționate din comerț. S-a arătat că utilizarea acidului lactic împreună cu v-qPCR reprezintă o nouă aprofundare pentru detecția specifică și cuantificarea cu acuratețe a patogenilor viabili Gram-negativi, atât în condiții de cultură, cât și în matrix alimentar. Această abordare poate contribui la promovarea metodologiilor de detectare a agenților patogeni și la sprijinirea eforturilor de a proteja sănătatea publică și siguranța alimentară.

Studiile realizate oferă informații utile despre utilizarea acidului lactic care se dovedește a fi un permeabilizator eficient, ieftin și cu toxicitate redusă, care are potențialul de a fi utilizat la detecția și cuantificarea patogenilor Gram-negativi prin metoda PMA-qPCR deoarece îmbunătățește eficiența reacției.