Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

mgr Bartosz Hornik

Opracowanie multipleksowego systemu badań przesiewowych patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności metodą multipleksowej amplifikacji PCR połączonej z detekcją fluorescencyjną

Praca doktorska wykonana

w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod kierunkiem

prof. dr hab. Agnieszki Piotrowskiej – Cyplik

Praca powstała w wyniku realizacji
I edycji konkursu w programie MNiSW „Doktorat wdrożeniowy"
realizowanej na WNoŻiŻ UPP w latach 2017-2021 na podstawie
umowy nr 52/DW/2017/01/1 zawartej w dniu 16.11.2017 r.
pomiędzy Ministrem Nauki i Szkolnictwa Wyższego,
a Wydziałem Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
oraz Instytutem Genetyki Sądowej w Bydgoszczy.

Poznań 2021

Poznań, 30.09.2021

mgr Bartosz Hornik

pod kierunkiem

prof. dr hab. Agnieszki Piotrowskiej – Cyplik

Opracowanie multipleksowego systemu badań przesiewowych patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności metodą multipleksowej amplifikacji PCR połączonej z detekcją fluorescencyjną

Streszczenie

Niniejsza praca doktorska powstała na potrzeby wdrożenia w Instytucie Genetyki Sądowej sp. z o.o. metodyki pozwalającej na zaoferowanie usługi badań przesiewowych mleka krowiego pod kątem patogenów wywołujących zapalenie wymion u bydła mlecznego. W tym celu opracowano multipleksową reakcję PCR pozwalającą na jednoczesną identyfikację kilkunastu patogenów odpowiedzialnych za etiologię mastitis (oraz dwóch genów lekooporności).

Część literaturowa pracy obejmuje charakterystykę zapalenia wymion – najczęstszej i generującą największe straty choroby bydła mlecznego. Przedstawia aktualny stan wiedzy na temat metod stosowanych w diagnostyce ogólnej (informującej jedynie o występowaniu choroby) jak i specyficznej (wskazującej czynniki etiologiczne) mastitis oraz zagrożenia wynikające ze stosowania głównie diagnostyki ogólnej. W części literaturowej scharakteryzowano również najczęściej występujące patogeny związane z etiologią mastitis.

W części doświadczalnej pracy doktorskiej przedstawiono wybrane do identyfikacji w opracowywanej metodzie patogeny oraz geny lekooporności wraz ze specyfikacją stosowanych wzorców materiału genetycznego. Zaprezentowano kryteria opracowywanych oraz wybranych na podstawie literatury starterów PCR, opisano metodykę poboru próbek do badań. Przedstawiono przeprowadzony eksperyment mający na celu dobór metody izolacji

pozwalającej uzyskiwać największą ilość DNA z danej objętości próbki mleka. Kolejnym aspektem przedstawionym w części naukowej było testowanie starterów oraz optymalizacja reakcji multiplex-PCR jak i warunków elektroforezy kapilarnej na dwóch analizatorach genetycznych. Przedstawiono również obszerną walidację metody przeprowadzoną w celu scharakteryzowania najważniejszych parametrów reakcji takich jak: określenie limitów oznaczalności oraz limitów detekcji systemu, wyznaczenie czułości oraz zakresów linowości dla poszczególnych identyfikowanych produktów PCR, powtarzalności, odtwarzalności oraz specyficzności opracowanej reakcji.

Zaprojektowana reakcja multiplex-PCR pozwala identyfikować jednocześnie trzynaście gatunków bakterii - *Staphylococcus aureus, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus agalactiae, Eschierichia coli, Enterococcus faecalis, Streptococcus uberis, Mycoplasma bovis, Klebsiella pneumoniae, Corynebacterium bovis* oraz *Staphylococcus* z grupy CNS (*epidermidis, haemolyticus, chromogenes, sciuri*), jeden rodzaj alg - *Prototheca*, jeden rodzaj grzybów - *Candida* oraz dwa geny lekooporności - mecA i blaNDM-1.

Pomyślne przeprowadzona walidacja reakcji multiplex-PCR pozwoliła na wdrożenie metody w Instytucie Genetyki Sądowej sp. z o.o. w formie procedury badawczej PB-16 „Oznaczanie jakościowe patogenów wywołujących mastitis w mleku metodą multiplex-PCR z detekcją fluorescencyjną" stanowiącej załącznik do niniejszej pracy doktorskiej. Oferowana metodyka poza szerokim spektrum badanych czynników etiologicznych oferuje również, dzięki zastosowaniu elektroforezy kapilarnej z detekcją fluorescencyjną, bardzo wysoką czułość oraz specyficzność metody (co potwierdzają uzyskane wyniki walidacji), a przy tym pozwala uzyskiwać wyniki znacznie szybciej (nawet do sześciu godzin) niż dotychczas stosowane metody diagnostyki specyficznej mastitis. Otrzymywane wyniki informujące o etiologii infekcji mogą pozwolić hodowcom na precyzyjny dobór leków stosowanych profilaktycznie i terapeutycznie, zmniejszenie zużycia antybiotyków mające wpływ na poprawę jakości oraz bezpieczeństwa oferowanych produktów jak i dobrostanu zwierząt.

Abstract

This doctoral thesis was created with a purpose of implementation at the Instytut Genetyki Sądowej sp.z o.o. methodology to offer a cow's milk screening service for pathogens causing mastitis in dairy cattle. For this purpose, a multiplex PCR reaction was developed,

allowing for the simultaneous identification of several pathogens responsible for the etiology of mastitis and two drug resistance genes.

The literature review section of the dissertation covers the characteristics of mastitis - the most common and loss-making dairy disease. It presents the current state of knowledge about the methods used in general diagnostics - advising only the presence of the disease and specific diagnostics - indicating the etiological factors of mastitis. This part also covers the risks resulting from mainly use of general diagnostics. The most common pathogens associated with the etiology of mastitis are also characterized in literature review part.

In the experimental part of the doctoral dissertation, selected for identification in developed reaction pathogens and drug resistance genes are presented along with the specification of the genetic standard material used in the established method. The criteria of PCR primers developed and selected on the basis of literature research are presented, the methodology of material sampling is described. The paper presents an experiment aimed at selecting an isolation method that would allow to obtain the highest amount of DNA from a given volume of a milk sample. Another aspect presented in the scientific part was primer testing and optimization of the multiplex-PCR reaction and capillary electrophoresis conditions on two different instruments - genetic analyzers. An extensive validation of the method was also presented, carried out in order to characterize the most important reaction parameters, such as: determination of limits of quantification and limits of detection, determination of sensitivity and linearity ranges for individually identified PCR products, repeatability, reproducibility and specificity of the developed reaction.

The designed multiplex-PCR reaction allows for the identification of thirteen species of bacteria - *Staphylococcus aureus, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus agalactiae, Eschierichia coli, Enterococcus faecalis, Streptococcus uberis, Mycoplasma bovis, Klebsiella pneumoniae, Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species from the CNS group (*epidermidis, haemolyticus, chromogenes, sciuri*), one type of algae - *Prototheca*, one type of fungi - *Candida* and two drug resistance genes - mecA and blaNDM-1.

Successful validation of the multiplex-PCR reaction allows the method to be implemented at Instytut Genetyki Sądowej sp.z o.o. in a form of the research procedure PB-16 "Qualitative determination of pathogens causing mastitis in milk using the multiplex-PCR method with fluorescence detection" add as attachment to this doctoral dissertation. The provided methodology, apart from the wide spectrum of investigated etiological factors, also

offers, thanks to the use of capillary electrophoresis with fluorescence detection, a very high sensitivity and specificity of the method (which is confirmed by the obtained validation results), and at the same time allows to obtain results much faster, even up to six hours compared to the diagnostics methods used so far. The obtained results informing about the etiology of infection may allow breeders to precisely select prophylactic and therapeutic drugs, reduce the use of antibiotics, which improves the quality and safety of the offered products and animal welfare.

Bartosz Słomik