Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

mgr Łukasz Kaczorowski

Opracowanie zestawu systemów do jakościowej i ilościowej diagnostyki patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności metodą real-time PCR

Praca doktorska wykonana

w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod kierunkiem

prof. dr hab. inż. Pawła 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 Łukasz Kaczorowski

pod kierunkiem

prof. dr hab. Pawła Cyplik

Opracowanie zestawu systemów do jakościowej i ilościowej diagnostyki patogenów w mleku wywołujących mastitis i genów lekooporności metodą real-time PCR

Streszczenie

Mastitis, czyli zapalenie wymienia, to najczęstsza choroba bydła mlecznego na świecie przynosząca każdego roku poważne straty ekonomiczne, m.in.: poprzez utratę ilości mleka oraz jego jakości, koszty leczenia, a także ewentualnego brakowania krów.

Celem pracy było opracowanie zestawu real-time PCR do oceny jakościowej i ilościowej obecności patogenów oraz ich genów lekooporności w mleku krów chorych na mastitis. Dokonano również aktualnego przeglądu stanu wiedzy na temat mastitis i jego diagnostyki.

Do metody wyselekcjonowano 21 drobnoustrojów (*S. aureus, S. agalactiae, S. dysgalactiae, S. uberis, E. coli, Enterococcus spp., K. pneumoniae, S. marcescens, C. bovis, T. pyogenes, M. bovis, Mycoplasma spp., C. albicans, Candida spp., Prototheca spp, L. monocytogenes, P. aeruginosa, S. simulans, S. chromogenes, S. epidermidis, S. haemolyticus),* trzy geny lekooporności: *mecA* (gen oporności na metycylinę), *blaNDM-1* (gen *NewDelhi*), geny kodujące toksyny wydzielane przez bakterie *E. coli*, umożliwiające wykrycie szczepów *ETEC* (enterotoksygenne szczepy *E. coli*) oraz fragment bydlęcego DNA umożliwiający kontrolę procesu izolacji DNA oraz reakcji real-time PCR.

Wybrane drobnoustroje oraz geny lekooporności podzielono w sześć reakcji multipleksowych. Dokonano optymalizacji stężeń starterów oraz sond w reakcji, a także dobrano odpowiedni profil temperaturowy reakcji real-time PCR.

W końcowym etapie dokonano walidacji reakcji, na którą składały się: ocena limitu detekcji oraz oznaczalności, ocena specyficzności, ocena powtarzalności i odtwarzalności, ocena liniowości i wydajności oraz określenie zakresu roboczego. Uzyskano finalnie zestaw do reakcji real-time PCR, charakteryzujący się wysoką specyficznością i czułością, umożliwiający jednoczesną analizę 20 drobnoustrojów oraz trzech genów lekooporności, w krótkim czasie.

Słowa kluczowe:
mastitis, zapalenie wymienia, diagnostyka mastitis, jakość mleka, izolacja DNA, real-time PCR, multipleksowy real-time PCR

Abstract

Mastitis, known as inflammation of the udder, is the most common disease of milk cows occurring worldwide that brings serious economic loss, e.g.: loss of quantity and quality of milk, costs of cow treatment, and possibly culling of the affected cows.

The aim of the study was development of real-time PCR kit for qualitative and quantitative analysis of pathogens and their antibiotic resistance genes in milk of the mastitis affected cows. Review of the current knowledge of mastitis was also described in this thesis.

For the method development 21 microorganism were selected (*S. aureus, S. agalactiae, S. dysgalactiae, S. uberis, E. coli, Enterococcus spp., K. pneumoniae, S. marcescens, C. bovis, T. pyogenes, M. bovis, Mycoplasma spp., C. albicans, Candida spp., Prototheca spp, L. monocytogenes, P. aeruginosa, S. simulans, S. chromogenes, S. epidermidis, S. haemolyticus),* three antibiotic resistance genes: *mecA* (methicillin resistance gene), *blaNDM-1* (*NewDelhi* gene), toxin coding genes, secreted by *E. coli*, allowing for the detection of *ETEC* strains (enterotoxigenic *E. coli* strains) and fragment of bovine DNA allowing to monitor both: DNA isolation and real-time PCR reaction.

Selected microorganism and antibiotic resistance genes were divided into six separate multiplex reactions. Concentration of primers and probes in reactions were optimized and the best temperature parameters of the real-time PCR reaction were selected.

In the final stage, the reaction was validated. Validation parameters were consisted of: limit of detection and quantification, specificity, repeatability and reproducibility, linearity and efficiency, working range setting. Real-time PCR kit was developed, characterized by high specificity and sensitivity, allowing to analyze 20 microorganism and three antibiotic resistance genes simultaneously, in short time.

Key words:
mastitis, inflammation of the udder, mastitis diagnostic, milk quality, DNA isolation, real-time PCR, multiplex real-time PCR

Łukasz Kaczorowski