

Rezumatul informațiilor din Notificarea privind utilizarea în condiții de izolare a Listeriei monocytogenes, cu scopul obținerii unei tulpini modificate genetic, în vederea stabilirii mecanismului de răspuns la stresul reprezentat de presiunile înalte

I. Informații generale

1. Detalii cu privire la notificare

- a. Numărul notificării: 03/02.11.2017
- b. Data primirii notificării: 24/07/2017
- c. Titlul proiectului
Notificare privind utilizarea în condiții de izolare a Listeriei monocytogenes, cu scopul obținerii unei tulpini modificate genetic, în vederea stabilirii mecanismului de răspuns la stresul reprezentat de presiunile înalte
- d. Scopul utilizării controlate
Studiul urmărește identificarea genelor care fac ca L. monocytogenes să fie sensibilă la tratamentul cu presiune înaltă (HPP).
- e. Perioada propusă pentru utilizarea în condiții de izolare
4 ani

2. Numele și adresa utilizatorului

Notificator:

Universitatea Dunărea de Jos din Galați

Adresă notificatorului:

Galați, str. Domnească 47, cod 800008, jud. Galați, România

3. Clasa de utilizare supusă activității de inspecție și control

Clasa 2 de utilizare pentru care este adecvat nivelul 2 de izolare pentru protecția sănătății umane și a mediului

II. Informații referitoare la microorganismul modificat genetic:

1. Denumire științifică: *Listeria monocytogenes*

2. Încadrare taxonomică:

Domeniul: Bacteria,

Filumul: Firmicutes,

Clasa: Bacilli,

Ordinul: Bacillales,

Genul: *Listeria*.

3. Alte denumiri (denumire comună, denumirea tulpinii etc.)

Studiile se vor realiza cu:

- tulpina de referință *L. monocytogenes* CIP 107776 (numită și EGDe) din colecția Institutului Pasteur
- tulpinile *Listeria monocytogenes* serotip 4b și *Listeria monocytogenes* serotip 1/2a izolate din alimente

4. Descrierea tehnicilor de identificare și de detecție

Detecția și identificarea *L. monocytogenes* în alimente implică în mod tradițional metode de cultivare ce constau în pre-îmbogățire, îmbogățire și strierea pe medii selective. Ulterior se realizează identificarea pe baza morfologiei coloniilor, fermentației glucidelor și proprietăților hemolitice (Scotter et al., 2001).

Mediile cromogene pot fi folosite și pentru partea de confirmare a *L. monocytogenes*, astfel se elimină etapele laborioase din metoda ISO 11290, de exemplu ALOA Confirmation Agar (Biolife, Italia) sau CONFIRM' *L. mono* Agar (Biokar Diagnostics, Franța).

PCR și RT-PCR sunt metode rapide ce se pot aplica pentru detecția *L. monocytogenes*. Majoritatea metodelor PCR utilizate pentru detecția *Listeria* spp. și pentru stabilirea rapidă a virulenței adesea au avut ca țintă genele: *hlyA* (codifică Listeriolisin O), *iap* (genă asociată cu activitatea invazivă), *inl* (*inlA*, *inlB*, *inlC*-un grup de internaline), *prfA* (codifică proteina asociată cu activarea virulenței de grup). Una din cele mai bune căi de a detecta și confirma patogenul prin PCR, este detecția unuia dintre factorii care dau virulența, toxina listeriolisin O (LLO). Acest lucru se poate face prin detecția genei care o

codifică, hlyA (Wu et al., 2008). Gena actA aparținând genomului *L. monocytogenes* este absolut necesară bacteriilor pentru nucleația filamentului de actină și pentru virulență (Pistor et al., 1994). Fiind o genă specifică *L. monocytogenes*, gena actA a fost adesea testată pentru identificarea prin RTi-PCR a bacteriei (Oravcová et al., 2006; Zhou and Jiao, 2005).

Tipul de mobilitate este caracteristic pentru *L. monocytogenes* fiind utilizată, deseori, ca marker de identificare. Gradul de motilitate este dependent de temperatură astfel că, la temperatura de 37°C și mai mult, producția de flageli este redusă considerabil, și implicit este redusă și motilitatea (Datta et al., 2013).

5. Informații privind modificarea genetică:

a) metode utilizate pentru transformarea genetică;

Transformarea genetica a tulpinilor de *Listeria monocytogenes* se va realiza prin tehnica CRISPRi/dCas9 ((Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats).

b) metode utilizate la formarea și introducerea insertului (inserturilor) în organismul receptor sau la eliminarea unei secvențe;

Editarea genetică ce se dorește a se aplica reprezintă o nouă tehnică care permite modificarea / eliminarea genelor implicate în refacerea celulei bacteriene / a peretelui celular după ce aceasta a fost supusă unui stress reprezentat de tratamentul la presiune înaltă. Tehnologia CRISPR (*Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats*), pe care se bazează editarea genelor are la bază următoarele elemente:

- În ADN-ul bacteriilor există anumite secvențe palindromice repetitive (CRISPR) între care sunt memorate secvențe genice ale anumitor virusuri cu care celula bacteriană a intrat în contact. În momentul în care o un virus își injectează ADN-ul în celula bacteriană, acesta este memorat în secvențele repetitive CRISPR, pentru ca ulterior un complex molecular al bacteriei să elimine ADN-ul viral proaspăt integrat. CRISPR este practic sistemul imunitar specific (adaptiv) al bacteriilor. În ultimii 20 de ani cercetătorii au exploatat sistemul CRISPR, l-au adaptat de la bacterii la celulele mamiferelor, altfel încât el poate fi folosit pentru a detecta orice secvență ADN de interes și o poate elimina dintr-un genom.
- Instrumentul de editare al genelor, CRISPR-Cas9, funcționează ca o enzimă de restricție, fiind capabil să îndepărteze, selectiv, părțile nedorite dintr-un genom.
- Metoda ce va fi utilizată implică utilizarea de molecule ARN artificiale (ARNg – ARN de ghidare), cu rol de ghidare a endonucleazei Cas9, sistem care va fi direcționat către genele ce se vor descoperite a fi implicate în refacerea celulară, pentru a le împiedica exprimarea. Gena dCas9 (death Cas9, inactiva catalitic) va fi clonată sub controlul unui promotor inductibil în vectorul pIMK4 (Monk et al. 2007). Vectorul plasmidial utilizat pentru exprimarea ARN-ului de ghidare va fi inserat în tulpina *L. monocytogenes* care poartă o copie

cromozomială a pIMK4 – dCas9 pentru inducerea expresiei dCas9. Deci, transcrierea genelor țintă poate fi blocată într-un mod eficient prin inducerea dCas9, permițând analiza genelor esențiale în celula aflată în creștere.

- Genomul tulpinilor de *Listeria monocytogenes* selectate, a fost secvențiat iar prin utilizarea unor softuri adecvate s-a evidențiat absența vreunei endonucleaze Cas9 endogene care să poată interacționa cu sistemul ARN - dCas9, ce se va insera.

Pentru introducerea complexului ARNg – ARN pentru Cas9 în celula bacteriană, cât și a vectorilor plasmidiali se va utiliza electroporarea.

c) descrierea construcției insertului și/sau a vectorului;

Secvența genică a ARN-ului de ghidare va depinde de secvența genelor implicate în procesul de reparare celulară, după aplicarea șocului presional. Prin urmare, înainte de designul ARNg este nevoie să se cunoască secvența genică asupra căreia se dorește a se acționa, mai exact aceea care se va elimina. În prealabil, se vor testa diferite activități enzimatică ale enzimelor implicate în repararea anvelopei celulare. Prin urmare, pentru fiecare genă în parte, un vector plasmidial ce poartă segmentul genic codificator al ARN –ului de ghidare, va fi clonat în tulpina *L. monocytogenes EGDe* care poartă o copie a pIMK4-dCas9. În acest fel, transcrierea genei țintă va fi eficient blocată după inducerea transcrierii genei dCas9, cu inductorul specific, permițând astfel analiza genelor esențiale în celulele aflate în faza exponențială de creștere.

d) descrierea trăsăturii (trăsăturilor) genetice sau a caracteristicilor fenotipice și mai ales a oricăror trăsături și caracteristici noi, care pot fi exprimate sau nu mai sunt exprimate;

Scopul editării genomului la tulpinile de *Listeria monocytogenes* este acela de a înlătura activitatea genelor implicate în repararea membranei și a peretelui celular după tratamentul la presiune înaltă. Practic, după identificarea acestor gene, tulpinile de *Listeria monocytogenes* vor fi supuse tehnologiei CRISPR/Cas9, genele țintă vor fi eliminate iar tulpinile mutante rezultate nu vor mai putea rezista tratamentului presional, nemaifiind posibilă refacerea celulei.

Tulpinile mutante generate vor fi analizate în detaliu cu privire la proprietățile importante legate de morfologia celulară, integritate și rigiditate, în comparație cu tulpinile de referință. Inițial, caracteristicile de creștere vor fi monitorizate într-un mediu complex, într-o placă cu 96 de godeuri, utilizându-se un cititor pentru plăci de microtitrate. Susceptibilitatea la condițiile de presiune înaltă va fi testată printr-un experiment de supraviețuire, utilizându-se microscopul confocal cu scanare laser.

e) structura și cantitatea oricărui vector și/sau acid nucleic donor, rămas în construcția genetică finală a organismului modificat;

În cazul tehnicii CRISPRi, în construcția finală va exista vectorul pIMK (pL2) integrat situs specific în locusul cromozomial, tRNA Arg de la *Listeria monocytogenes EGDe*,

continând gena codificatoare a nucleazei dCas9, aflata sub controlul promotorului inductiv Pxyl/tetO.

În cazul utilizării mutagenezei tradiționale, în construcția genetică finală vor rămâne vectorii utilizați pentru procesele de transformare, care sunt ușor de controlat având în vedere faptul că sunt vectori termosensibili, respectiv *suicidali*.

Pentru dCas9 există o singură copie în genom.

f) descrierea tehnicilor de identificare și de detecție, inclusiv tehnici pentru identificarea și detecția secvenței și a vectorului inserate;

Inserarea genei pentru endonucleaza Cas9 și ARNg în celula parentală poate determina apariția câtorva genotipuri :

- un anumit procent de celule poate fi reprezentat tot de celule bacteriene nemodificate din cauza neexprimării ARNg și/sau a genei Cas9,
- un alt procent poate fi reprezentat de celule modificate homozigote sau heterozigote.

Realizarea selecției se va face prin intermediul amplificării PCR a regiunii de interes (după eliminarea genelor implicate în repararea celulară), alături de electroforeza în gel de agaroză a NHEJ (Non-Homologous End Joining) sau HDR (Homology Directed Repair) precum și secvențierea regiunii în scopul furnizării de informații cantitative.

Eliminarea prin deleție a genelor neesențiale va fi confirmată prin amplificarea PCR și secvențierea Sanger a locasului țintă din cromozom.

g) istoricul introducerilor sau utilizărilor anterioare ale microorganismului modificat genetic;

Nu există un istoric privind introducerea sau utilizarea anterioară a microorganismului modificat genetic. Se pornește de la tulpina de colecție, *Listeria monocytogenes* EGDe, care are genomul nemodificat.

Experimentele au la bază aplicarea tehnologiei CRISPR/Cas9 la *Listeria monocytogenes*, în scopul inactivării genelor codificatoare ale enzimelor implicate în regenerarea anvelopei celulare, sunt experimente inovative, care fac parte din propunerea proiectului ”*SafeFood – Dezvoltarea unui proces industrial nou pentru obținerea de alimente sigure, de calitate ridicată și sustenabile, folosind o abordare biotehnologică și cibernetică*” (ERA-IB-16-014).

h) considerații privind sănătatea umană și animală, precum și sănătatea plantelor:

Nu vor exista efecte toxice sau alergice ale microorganismelor modificate genetic obținute, altele decât cele specifice organismului parental. Genele inserate nu vor produce efecte la nivel metabolic și nici nu codifica astfel de compuși.

i) compararea microorganismului modificat cu organismul donor, cu organismul receptor sau (când este cazul) cu organismul parental, în ceea ce privește patogenitatea;

Având în vedere faptul că, tehnologia CRISPR / Cas9, care se va utiliza, nu implică procesul clasic de clonare, iar genele care intervin în procesele de reparare celulară vor fi eliminate, se poate considera că, microorganismul nou creat nu va diferi din punct de vedere al patogenității de cel parental; pe de alta parte, se poate considera că va fi mult mai sensibil la acțiunea unor factori de stress și se va afla în imposibilitatea de a se reface, în cazul în care celula este afectată sub acțiunea acestor factori (comparativ cu organismul parental).

III. Informații cu privire la utilizarea în condiții de izolare

1. Scopul utilizării controlate, inclusiv rezultatele anticipate

Obiectivul principal al proiectului este de a transforma produsele alimentare, de tip RTE (Ready-To-Eat) pe bază de pește, carne și legume, în produse sigure, cu durabilitate mai mare prin reducerea sau inhibarea capacității *Listeria monocytogenes* de a se reface după tratamentul la presiune înaltă (HPP). Aceasta ar putea să crească termenul de valabilitate al alimentelor, crescându-le rezistența față de bacteriile ce pot fi prezente în alimente (făcând alimentul un mediu neospitalier față de această bacterie) și micșorând totodată cantitatea de deșeuri alimentare rezultate din procesare și din lanțul alimentar. Prin urmare, se așteaptă obținerea următoarelor rezultate:

a). Descoperirea modului în care operează mecanismul de refacere al celulelor de *L. monocytogenes* după stressul presional aplicat timpilor diferiți și la diferite valori presionale. Acest lucru va genera o bază nouă de date privind cartografia rețelelor de reglaj genetic al bacteriilor prezente în alimente, care sunt capabile de refacere celulară, după stressul reprezentat de presiunea înaltă.

b). Predicția celor mai promițătoare gene și circuite care pot opri procesul de refacere celulară în urma tratamentului HP, pe baza unui model dinamic unic (abordare cibernetică).

c). Obținerea de produse alimentare cu contaminare zero pentru *Listeria* și creșterea duratei de păstrare a produselor alimentare existente, prin aplicarea unui concept nou de HP, adică un procedeu care țintește mecanismele care previn inactivarea *L. monocytogenes* și-i permit supraviețuirea în urma tratamentelor de presiune înaltă.

d). Îmbunătățirea procesului HP aplicat la nivel industrial prin îmbunătățirea regimului de presurizare (cicluri, durată și intensitate) care se aplică alimentelor.

2. Locația utilizării în condiții de izolare

Activitățile de cercetare asociate cu proiectul SafeFood se vor desfășura în două locații, ambele aparținând Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor (FSIA) de la

Universitatea Dunărea de Jos din Galați și ambele fiind situate în Campusul Științei, str. Domnească nr. 111, 800201 Galați. Prima locație este reprezentată de compartimentul de Microbiologie din cadrul Laboratorului de Analize Fizico-Chimice și Microbiologice pentru Alimente (LAFDMA), iar a doua locație este reprezentată de Stația pilot pentru tehnologii alternative.

3. Măsurile de limitare a riscurilor potențiale, măsurile de control și de monitorizare a introducerii prevăzute.

Riscurile potențiale care vor fi luate în discuție se referă doar la introducerea accidentală în mediu, deoarece o introducere deliberată nu va exista. Mai trebuie știut că, *L. monocytogenes* se găsește în mod normal în sol, ape și pe materialul vegetal dar, din momentul în care intră în organismul uman, dacă este atinsă doza infecțioasă, provoacă boala numită listerioză. Practic, materialul vegetal permite supraviețuirea unui număr mare de *L. monocytogenes*, fiind astfel o sursă de infecție în numeroasele cazuri de listerioze apărute la om și la animalele din ferme. În literatura de specialitate nu s-au regăsit date referitoare la anumite boli pe care această bacterie le poate provoca plantelor. În schimb, produsele animale contaminate cu *Listeria* sp., și consumate de om, pot determina această boală. Listerioza reprezintă o infecție de origine alimentară care afectează, în special vârstnicii, persoanele imunosensibile și femeile însărcinate.

Măsurile luate pentru a se evita introducerea accidentală în mediu a tulpinilor de *L. monocytogenes* modificate genetic sunt următoarele:

a. Atât experimentele, cât și accesul în spațiile de lucru se vor realiza numai cu avizul directorului de proiect. Toate experimentele se vor desfășura cu personal special instruit pentru lucrul cu microorganisme modificate genetic.

b. Prin respectarea normelor de lucru cu microorganisme modificate genetic și a căilor de acces, situațiile de producere a unui accident sunt minimalizate. În cazul unui posibil accident de contaminare, zona cu riscul cel mai mare de contaminare este reprezentată de sala în care se vor realiza inoculările, urmată de sala de termostatare și sala de decontaminare ale laboratorului LAFDMA. Niciuna din sălile laboratorului de microbiologie nu prezintă canalizare de pardoseală iar spălarea ustensilelor de laborator, care nu sunt de unică utilizare, se face după autoclavarea acestora, deci nu e posibil ca listeriile obișnuite sau modificate genetic să ajungă la canal.

c. În cazul unui posibil accident, cercetătorii vor lua imediat măsurile de dezinfecție prin aplicarea hipocloritului/etanolului, care s-a demonstrat a fi foarte eficient în inactivarea tulpinilor de *Listeria* sp. Traficul cercetătorilor între diferitele săli va fi restricționat iar hainele de protecție contaminate vor fi îndepărtate înainte de părăsirea zonei în care s-a produs accidentul, introduse în saci din plastic autoclavabili și autoclavate ulterior.

d. De la laboratorul de microbiologie la stația pilot de presiune înaltă, tulpinile de *L. monocytogenes*, obișnuite sau modificate genetic, vor fi transportate pe principiul celor trei recipiente. Se vor folosi tuburi Eppendorf ca recipient primar, care vor fi introduse în pungi din material plastic sigilabile și apoi într-o cutie metalică. Este puțin probabil ca în timpul transportului pe distanța care separă LAFCMA de stația pilot, pentru tratamentul la presiune înaltă (cca 100 m) să se producă vreun accident care să conducă la răspândirea în mediul înconjurător a listeriilor. Dacă apare totuși o astfel de situație, ambalajele deteriorate vor fi colectate în saci autoclavabili și autoclavate, iar suprafața contaminată va fi decontaminată prin flambare cu ajutorul unui arzător portabil.

e. În cazul în care, contaminarea s-ar produce în timpul tratamentului probei în cadrul stației pilot de presiuni înalte (corp E), prin situația puțin probabilă a deteriorării ambalajului, se vor aplica măsurile de dezinfectare, iar propilen glicolul care este folosit ca mediu de presurizare, va fi colectat și tratat ca deșeu biologic contaminat, fiind distrus ulterior (dovadă proces verbal de predare al materialelor periculoase). Și această situație e puțin probabilă de a se petrece. Este de menționat că echipamentul în care se realizează tratamentul la presiune înaltă este separat prin pereți din plexiglas de restul echipamentelor din sala de tratamente alternative. Prin urmare, extinderea contaminării, din incinta în care se află stația pilot de presiuni înalte în alte zone, este practic imposibilă.

4. Probabilitatea producerii efectelor potențial nocive

Evaluarea calitativă a riscului se realizează conform hotărârii C278/26 din jurnalul Oficial al Uniunii Europene:

Nivel de risc (R = P x E): pe o scară de la 1 la 7

Caracterizarea microorganismelor.

Probabilitate:

Crescută	4	5	6	7	4
Medie	3	4	5	6	3
Scăzută	2	3	4	5	2
Foarte scăzută	1	2	3	4	1
	1	2	3	4	
	Limitat	Moderat	Grav	Foarte grav	
	EFACT				

Concluzie: *Listeria monocytogenes* are o probabilitate scăzută de a contamina incinta sau de a fi eliberată în mediu (2) și un efect limitat, ca urmare a faptului că tulpinile modificate genetic au o virulență redusă, iar probele testate nu ajung să fie ingerate (1) și astfel rezultă un nivel de risc scăzut (Nivelul de risc = 2 x 1 = 2).