

Primenljivost metode multipleks lančane reakcije polimeraze u otkrivanju i identifikaciji vrsta salmonela

B. Velebit, M. Mirilović, Snežana Saičić

S a d r Ź a j: Salmoneloza je jedna od najčešćih zaraznih bolesti ljudi i životinja koju izazivaju dve vrste bakterija roda *Salmonella* – *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Radi obezbeđivanja efikasne, racionalne i kvalitetne zdravstvene zaštite stanovništva, neophodna je pouzdana identifikacija i potvrđivanje uzročnika salmoneloze. Ovo se danas ostvaruje primenom metoda za izolaciju kulture, određivanje biohemijskih osobina i serološku tipizaciju upotrebom specifičnih anti-O i anti-H antiseruma. Ove metode su kompleksne, skupe i iziskuju mnogo vremena. U poslednjih nekoliko godina ubrzan razvoj molekularno-bioloških metoda omogućio je brži, jeftiniji i pouzdaniji način identifikacije, odnosno potvrđivanja ovog mikroorganizma. Princip se zasniva na izolaciji DNK iz salmonele i ciljanoj amplifikaciji određenih sekvenci serovar-specifičnih gena.

U ovom radu ispitivana je primenljivost multipleks lančane reakcije polimeraze (multipleks PCR) kao jednostavne, brze, visokoosetljive i pouzdane metode za identifikaciju *Salmonella Typhimurium* i *Salmonella Enteritidis*. Serovari koji su ispitivani čine više od 90 posto serovara *Salmonella* spp. utvrđenih u mesu. Materijal za ispitivanje predstavljala je kolekcija od 100 sojeva vrste *Salmonella*, od kojih je 45 sojeva pripadalo *Salmonella Typhimurium*, 40 sojeva pripadalo je *Salmonella Enteritidis*, kao i 15 vrsta bakterija, izabranih tako da su strukturno i funkcionalno blisko povezani sa salmonelama ili rastu pod istim uslovima i u istoj sredini kao i salmonele, koje su korišćene radi isključivanja. Rezultati ispitivanja potvrdili su da je multipleks PCR metoda veoma pouzdana za rutinski rad u laboratorijama i da znatno skraćuje i pojednostavljuje čitavu proceduru dijagnostike salmonela.

Ključne reči: *Salmonella*, PCR, identifikacija

APPLICABILITY OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION AS A METHOD FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF SALMONELLA

A b s t r a c t: Salmonellosis is one of the most common infectious diseases of humans and animals caused by organisms of the two species of *Salmonella* - *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*. In order to provide efficient and cost-effective health protection, there is a need for reliable detection and identification of causative agents of salmonellosis. This is accomplished by application of culture isolation methods, biochemical methods and serotyping using specific anti-O and anti-H antisera. These methods are complex, expensive and time-consuming. Rapid development of biomolecular methods based on isolation of DNA and subsequent amplification of serovar-specific genes, which commenced several years ago, has made identification of *Salmonella* to be a lot more faster, cheaper and more reliable.

This paper describes validation of multiplex polymerase chain reaction as a simple and highly sensitive method for detection and identification of *Salmonella* serovars - *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis*. These serovars include over 90% of *Salmonella* serovars founded in meat. A group has been assembled counting 100 samples of bacteria, which consisted of clinical isolates of *Salmonella Typhimurium* (45 samples), clinical isolates of *Salmonella Enteritidis* (40 samples) as well as control samples of bacteria which were chosen in order to reflect structural and functional similarity with *Salmonella*. Our results confirmed that multiplex PCR method is highly reliable alternative method for detection of *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella*, PCR, identification

Uvod

Salmoneloza je jedna od najčešćih zaraznih bolesti ljudi i životinja. Oboljenje izazivaju dve vrste bakterija *Salmonella* – *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. Iako su salmonele mikroorganizmi koji se primarno nalaze u crevima sisara, ptica i reptila, one su široko rasprostranjene u prirodi,

te se često mogu pronaći u otpadnim vodama, kanalizaciji ili u bilo kom materijalu koji je izložen fekalnoj kontaminaciji. Bolest je prisutna u svim zemljama, a naročito onima u kojima se obavlja intenzivni uzgoj svinja i živine.

Od salmoneloze mogu da obole sve vrste domaćih životinja; najosetljivije su mlade i gravidne životinje. Najčešći izvor salmoneloze životinja je

AUTORI: Branko Velebit, Snežana Saičić, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, Beograd
Milorad Mirilović, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar oslobođenja 11, Beograd

KONTAKT: velebit@inmesbgd.com

AUTHORS: Branko Velebit, Snežana Saičić, Institute of Meat Hygiene and Technology, Kacanskog 13, Belgrade
Milorad Mirilovic, Faculty of Veterinary Medicine, Bulevar oslobodjenja 11, Belgrade

KONTAKT PERSON: velebit@inmesbgd.com

stočna hrana kontaminirana salmonelom. U kliničkoj slici dominiraju krvav i profuzan proliv i povišena telesna temperatura kao najčešći simptomi, ali mogu da nastanu i akutna septikemija, abortus, artritis, nekroza ekstremiteta i respiratorne smetnje i zbog toga se kaže da ne postoje patognomonični simptomi. Veliki broj životinja, naročito svinje i živina, može da bude inficiran, a da ne ispoljavaju klinički vidljive simptome. Ove životinje šire infekciju u zapatu ili jatu, ali i uzrokuju trovanje hranom kod ljudi (Cooper, 1994).

Salmonele prolaze kroz lanac ishrane prenošenjem iz primarne proizvodnje do proizvođača hrane i domaćinstava. Infekcija ljudi nastaje kada ljudi pojedu kontaminiranu hranu životinjskog porekla, ali i drugih vrsta namirnica, uključujući i zeleno povrće. Najrizičnije namirnice su meso živine, svinjsko meso, jaja i proizvodi od jaja. Sirovo meso živine smatra se sumnjivim na prisustvo salmonele i podleže posebnom režimu obrade. Jaja se kontaminiraju salmonelom za vreme polaganja. Radi sprečavanja kontaminacije primenjuju se postupci pasterizacije jaja, ali to ne znači da su ona sigurno „slobodna” od salmonele. U poslednjih nekoliko godina u svetu je opisano više slučajeva akutnog gastroenteritisa uzrokovanog konzumiranjem ovakvih jaja.

Radi obezbeđivanja efikasne, racionalne i kvalitetne zdravstvene zaštite stanovništva, neophodna je identifikacija i potvrda uzročnika salmoneloze. Do kraja 2005. godine identifikovano je oko 2560 različitih serovara bakterije *Salmonella enterica*. Svi serovari mogu da uzrokuju pojavu bolesti kod ljudi. Prema podacima Instituta za zaštitu zdravlja Srbije (Nacionalna referentna laboratorija za salmonelu) u Srbiji i Crnoj Gori u periodu od 2000. do 2005. godine u potpunosti je serotipizovano 29216 primoizolata salmonele, od kojih su dva serovara bila najzastupljenija. U 90,48 posto slučajeva izolovana je *Salmonella Enteritidis*, a u 3,58 posto izolovana je *Salmonella Typhimurium* (Global Salm-Surv (GSS) Country Databank, 2006). Podaci referentnih laboratorija iz Evropske unije takođe ukazuju da su ova dva serovara najzastupljenija i u evropskim zemljama. Ogromna većina serovara salmonele, u koje se ubrajaju *Salmonella Enteritidis* i *Salmonella Typhimurium*, ima širok spektar domaćina, za razliku od serovara adaptiranih samo na jednu ili nekoliko životinjskih vrsta; *Salmonella Choleraesuis* na svinju, *Salmonella Dublin* na goveda, dok je *Salmonella Typhi* adaptirana samo na humanu populaciju. Različiti sindromi bolesti i različita adaptiranost na specifičnog domaćina, u zavisnosti su od antigenog profila salmonele. Zbog toga je neophodno razlikovati *Salmonella* serovare jedne od drugih, da bi bili sigurni da je svaki patogen tačno utvrđen i identifikovan.

Razlikovanje *Salmonella* serovara zasnovano je na različitosti O-antigena i H-antigena. O-antigeni su polisaharidni domeni u lipopolisaharidnom kompleksu ćelijskog zida salmonela, dok su H-antigeni domeni proteina flagelina koji je osnovna strukturna jedinica lokomotornih organela—flagela. Da bi se tačno identifikovao određen serovar salmonele, nakon izolacije kulture primenjuju se metode za određivanje biohemijskih osobina kao i serološka tipizacija upotrebom specifičnih anti-O i anti-H antiseruma kao i upotrebom anti-Vi antiseruma (De Boer i Beumer, 1999). Ovaj tradicionalan način izolacije, identifikacije i potvrde je kompleksan, skup i iziskuje mnogo vremena.

U poslednjih nekoliko godina, razvojem visokoosetljivih molekularnih metoda i dešifrovanjem genoma salmonele (McClelland i sar., 2001), omogućen je mnogo brži, jeftiniji i pouzdaniji način identifikacije, a time i konfirmacije ovog mikroorganizma. Multipleks PCR metoda zasniva se na izolaciji DNK iz salmonele, a zatim se, iz dobijenog izolata DNK, ciljano amplifikuju određene sekvence serovar-specifičnih gena. Čitav postupak traje oko šest časova, za razliku od standardnih metoda koje traju od tri do pet dana. Prednost ove metode naročito se ispoljava u situacijama kada se pojavljuju nagle epidemije i/ili enzootije salmoneloze, jer tada je neophodna brza i pouzdana identifikacija serovara-uzročnika. Ovo istraživanje imalo je za cilj da se ispita primenljivost metode multipleks PCR za izolaciju i detekciju dva dominantna serovara salmonele u Srbiji.

Materijal i metode

Eksperimentalni rad odvijao se u dve faze. U prvoj fazi eksperimenta, sastavljena je kolekcija od 100 sojeva bakterija koju su sačinjavali terenski izolati *Salmonella Typhimurium*, terenski izolati *Salmonella Enteritidis*, kao i uzorci kontrolnih bakterija. 35 sojeva *Salmonella Typhimurium* (izolovanih iz objekata za klanje svinja) dobijeno je ljubaznošću dr Nedeljka Karabasila sa Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, a 10 sojeva *Salmonella Typhimurium*, kao i 40 sojeva *Salmonella Enteritidis* (izolovani u objektima za klanje pilića, sa trupova pilića i iz kontaminiranih jaja) poticalo je iz sopstvene kolekcije Instituta za higijenu i tehnologiju mesa. Kontrolni sojevi bakterija izabrani su tako da su strukturno i funkcionalno blisko povezani sa salmonelama ili rastu pod istim uslovima i u istoj sredini kao i salmonele. Struktura primoizolata i kontrolnih sojeva bakterija data je u tabeli 1. Bakterije su podvrgnute standardnoj metodi za izolaciju i identifikaciju salmonela, propisanoj

međunarodnim ISO 6579:2002 standardom. Po ovoj metodi, salmonele se izoluju tako što se materijal koji se ispituje kaskadno propušta kroz neselektivnu tečnu podlogu za predobogaćivanje (*puferizovana peptonska voda*), a nakon toga u selektivne tečne

podloge (*Rappaport Vassilliadis bujon i Müller Kauffman tetratonat novobiocin bujon, Merck AG, Nemačka*). Zatim se bujonska kultura presejava na čvrste selektivne podloge (*XLD i briljant zeleni, SS-agar* itd).

Tabela 1. Struktura primoizolata i kontrolnih sojeva bakterija
Table 1. The structure of primoisolates and control bacteria

Naziv bakterije/ Species of bacteria	Broj uzoraka/ Number of samples	Napomena/ Remark
<i>Salmonella</i> Typhimurium	45	Terenski izolati/ Field isolates
<i>Salmonella</i> Enteritidis	40	Terenski izolati/ Field isolates
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	ATCC 35654
<i>Citrobacter freundii</i>	1	ATCC 43864
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	ATCC 19433
<i>Escherichia coli</i>	1	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1	ATCC 35150
<i>Hafnia alvei</i>	1	/
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	/
<i>Proteus vulgaris</i>	1	ATCC 49132
<i>Proteus mirabilis</i>	1	ATCC 51329
<i>Shigella flexneri</i>	1	ATCC 12022
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	ATCC 23715
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	ATCC 14028
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1	ATCC 13076
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	1	ATCC 7001
UKUPNO/ TOTAL	100	

Tipične izrasle kolonije ispitane su biohemijski, upotrebom komercijalnog kita API 20E (*Biome-riex, Francuska*), koji je prilagođen za biohemijsku identifikaciju *Enterobacteriaceae*.

Poslednji korak u prvoj fazi eksperimenta bila je serotipizacija. Cilj ovog koraka bio je da se utvrdi prisustvo specifičnih O- i H-antigena za *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis i, na taj način, serološki potvrditi nalaz salmonela. Serotipizacija je izvedena metodom „slide agglutination”, tj. aglutinacijom na predmetnom staklu, pomoću specifičnih anti-O i anti-H seruma (*Statens Serum Institute, Danska*).

Posle identifikacije vrsta salmonela iz ispitanih uzoraka, pristupilo se drugoj fazi eksperimenta u kojoj su determinisani genomi *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis. Nakon analize genoma *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis „BLAST” softverom, kao i pregledom podataka iz literature, odabrano je 5 serovar-spe-

cifičnih gena. Gen *invA* zajednički je za sve serovare salmonele (*Malorny i sar., 2003*), *Sdf I* karakterističan je za serovar *Salmonella* Enteritidis (*Agron i sar., 2001*), a *rfbJ*, *fliC* i *fljB* specifični su za serovar *Salmonella* Typhimurium (*Itoh i sar., 1997; Hirose i sar., 2002*). Na kraju eksperimenta, ispitana je primenljivost metode multipleks PCR u svakodnevnom laboratorijskom radu u preciznoj detekciji vrsta salmonela kao i diferencijaciji njihovih serovara. Softverskom analizom konstruisani su parovi prajmera koji se komplementarno vežu ispred i iza odgovarajuće sekvence određenog gena. Sekvence korišćenih prajmera date su u tabeli 2.

Izolacija bakterijske DNK obavljena je korišćenjem kita *DNeasy Tissue kit (Quiagen, Nemačka)*. Multipleks PCR reakcija izvedena je u reakcionoj smeši zapremine 25 µl, koja je sadržavala 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 1,25 U *TaqDNA* polimeraze (*Fermentas, Litvanija*), 200 µM dez-oksিনukleotid trifosfata (*Fermentas, Litvanija*), po

Tabela 2. Nukleotidne sekvence korišćene kao prajmeri u multipleks PCR-u
Table 2. Nucleotid sequences used as primers with multiplex PCR

Prajmer/ Primer	Target gen/ Target gene	Dužina prajmera/ Primer length (bp)	Sekvenca/ Sequence	Veličina amplifikovanog fragmenta/ Size of amplified fragment (bp)	Referenca ¹ / Reference ¹
RfbJ-s RfbJ-as	<i>rfbJ</i>	24 24	5'-CCAGCACCAGTTCCAACCTTGATAC-3' 5'-GGCTTCCGGCTTTATTGTAAAGCA-3'	663	AE008792
FliC-s FliC-as	<i>fliC</i>	24 24	5'-ATAGCCATCTTTACCAGTTCCCCC-3' 5'-GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC-3'	183	D13689
FliB-s FliB-as	<i>fliB</i>	24 24	5'-ACGAATGGTACGGTCTCTGTAACC-3' 5'-TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG-3'	526	AF045151
139-s 141-as	<i>invA</i>	26 22	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3' 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	284	*
Sdf I-s Sdf I-as	-	23 22	5'-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3' 5'-TGAACACTACGTTTCGTTCTTCTGG-3'	304	**

¹Brojevi označavaju Genbank-EMBL-DDBL ID brojeve navedenih sekvenci u bazama podataka

¹Numbers designate Genbank-EMBL-DDBL ID numbers of the sequences in databases

* Malorny i sar. (2003)

**Herrera-Leon i sar. (2004)

0,2 µM svakog od navedenih pet parova prajmera i pet µL ispitujuće DNK. Za izvođenje PCR reakcije u thermocycleru (*Flexigene 412, Techne, Nemačka*) pripremljen je sledeći program: inicijalna denaturacija DNK pri temperaturi od 95°C u trajanju od dva minuta, 30 ciklusa sa denaturacijom pri 95°C – 1 min, vezivanje prajmera (annealing) 57°C – 1 min i elongacija pri temperaturi od 72°C – 1 min, kao i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od pet minuta. Amplifikovana DNK je separisana elektroforezom na 2% agarozu gelu. Trake su obojene etidijum bromidom i vizuelizovane na UV transluminatoru.

Rezultati dobijeni standardnom metodom ISO 6579:2002 i rezultati dobijeni metodom multipleks PCR, statistički su obrađeni, u skladu sa ISO 16140:2003 standardom. Ovim standardom, propisani su postupci za validaciju alternativnih dijagnostičkih metoda. S obzirom da je ispitivana metoda kvalitativnog tipa, primenjen je tehnički protokol za validaciju kvalitativnih metoda.

Za procenu rezultata rada, korišćena je tabela 2×2 slučaja. Usvojeno je da je metoda serološke tipizacije, propisana ISO 6579:2002 standardom, „zlatni standard“, pri čemu rezultati serološke tipizacije mogu da budu samo dihotomne vrednosti (ili „+“ ili „-“). Rezultati ispitivane multipleks PCR metode koju poredimo sa „zlatnim standardom“ ta-

kođe su izraženi u obliku dihotomnih vrednosti ili „+“ ili „-“. Shodno navedenom, postojala su četiri moguća ishoda u poređenju standardne i ispitivane metode:

- **Sigurno pozitivan rezultat** – situacija kada je i serotipizacijom i multipleks PCR-om dobijen pozitivan rezultat (*serovar identifikovan*);
- **Sigurno negativan rezultat** – situacija kada je i serotipizacijom i multipleks PCR-om dobijen negativan rezultat (*serovar nije identifikovan*);
- **Lažno pozitivan rezultat** – situacija kada je PCR metodom dobijen pozitivan rezultat (*serovar identifikovan*), a metodom serotipizacije negativan rezultat (*serovar nije identifikovan*);
- **Lažno negativan rezultat** – situacija kada je PCR metodom dobijen negativan rezultat (*serovar nije identifikovan*), a metodom serotipizacije pozitivan rezultat (*serovar identifikovan*)

Predviđeno je da se na osnovu dobijenih rezultata, odredi selektivnost, relativna tačnost, relativna osetljivost, relativna specifičnost i *Kappa index* metode multipleks PCR u otkrivanju i identifikaciji bakterija vrste *Salmonella enterica*, odnosno serovara

Salmonella Typhimurium i *Salmonella Enteritidis*. Za statističku obradu rezultata, korišćen je McNemara test i softver *Number Cruncher Statistical System* (NCSS 2004).

Rezultati i diskusija

Svih 85 izolata salmonele ispoljilo je rast na XLD i Rambach agaru. Kolonije izrasle na XLD agaru bile su crvene boje, sa crnom tačkom u sredini i zonom roza boje podloge oko kolonije. Inicijalna tamnocrvena boja podloge promenila se u blago roze boju. Veličina kolonija varirala je od 0,5 do 1 mm u prečniku. Pozitivne kontrole salmonela takođe su izrasle u vidu gore opisanih kolonija, sa izuzetkom kontrole *Salmonella Choleraesuis*, koja je rasla u vidu žuto-crvenih kolonija bez crne tačke. Na XLD agaru nisu utvrđene morfološke razlike između kolonija *Salmonella Typhimurium* i *Salmonella Enteritidis*. *Citrobacter freundii* i *Shigella flexneri* nisu izrasli na XLD agaru. *Escherichia coli* izrasla je u obliku belih, krupnih kolonija, bez promene boje podloge kod *E. coli* O157:H7 i promenom inicijalne crvene boje podloge u žutu kod *E. Coli* ATCC 25922. Ostale kontrolne bakterije rasle su nespecifično, u vidu belih kolonija različitih dimenzija i žute boje podloge.

Paralelnim kultivisanjem na Rambach agaru (diferencijalno-selektivna podloga) utvrđen je rast kolonija kod 85 uzoraka salmonele. Kolonije salmonele izrasle na Rambach agaru bile su roze-tamnocrvene boje, vlažne i ispupčene, okružene tankom zonom zamućenja, pri čemu je inicijalna boja podloge iz roze prešla u žutonarandžastu boju. Utvrđeno je da je promena boje podloge kod kolonija *Salmonella Enteritidis* difuznog tipa, dok je kod *Salmonella Typhimurium*, uglavnom, ograničena na neposrednu okolinu kolonija. Veličina kolonija varirala je od 0,5 do 3 mm u prečniku. *Salmonella Choleraesuis* je na Rambach agaru rasla u obliku žutih kolonija na žutoj podlozi. Isti oblik i boju kolonija, te boju podloge ispoljila je i *Yersinia enterocolitica*. *Escherichia coli* rasla je u obliku zelenih kolonija na žutonarandžastoj boji podloge. *Enterococcus faecalis* i *Shigella flexneri* nisu rasli na Rambach agaru.

Ispitivanjem biohemijskih osobina pomoću API 20E sistema, utvrđeno je da salmonela ispoljava biohemijski profil prikazan u tabeli 3. Poređenjem rezultata, utvrđeno je da se oba ispitivana serovara biohemijski razlikuju samo u sposobnosti fermentacije, odnosno oksidacije inozitola. *Salmonella Typhimurium* može da razlaže ovaj supstrat, dok *Salmonella Enteritidis* nema tu mogućnost. Oksidaza test je kod svih ispitanih salmonela negativan, s obzirom da salmonele ne poseduju enzim citohrom

oksidazu. Oksidaza test je pozitivan samo kod kontrolne bakterije *Aeromonas hydrophila*, jer je to jedina bakterija u eksperimentu koja poseduje ovaj enzim. Serološkim ispitivanjima kod svih 85 uzoraka utvrđena je karakteristična antigenska struktura, tj. kod 40 uzoraka *Salmonella Enteritidis* nastupila je aglutinacija sa O:9, H:g,m i H:m antiserumima, dok su 43 uzorka *Salmonella Typhimurium* aglutinirali sa O:4 i H:i antiserumima, a 2 uzorka sa O:4 i H:2 antiserumima. Upotrebom SG2 antisera kod 43 izolata indukovana je fazna inverzija H:i flagelarnog antigena u H:2, a upotrebom SG6 antisera kod 2 izolata indukovana je inverzija H:2 u H:i flagelarni antigen. Nijedan od kontrolnih sojeva bakterija nije aglutinirao ni sa jednim od korišćenih antisera.

Ispitivanjem izolata, metodom multipleks PCR-a, utvrđeno je da se kod svih 40 izolata *Salmonella Enteritidis* formiraju 2 DNK fragmenta u agarozu gelu. Jedan DNK fragment od 284 bp odgovara genu *invA*, a drugi DNK fragment od 304 bp odgovara Sdf I delu DNK koji poseduje isključivo *Salmonella Enteritidis* (slika 1).

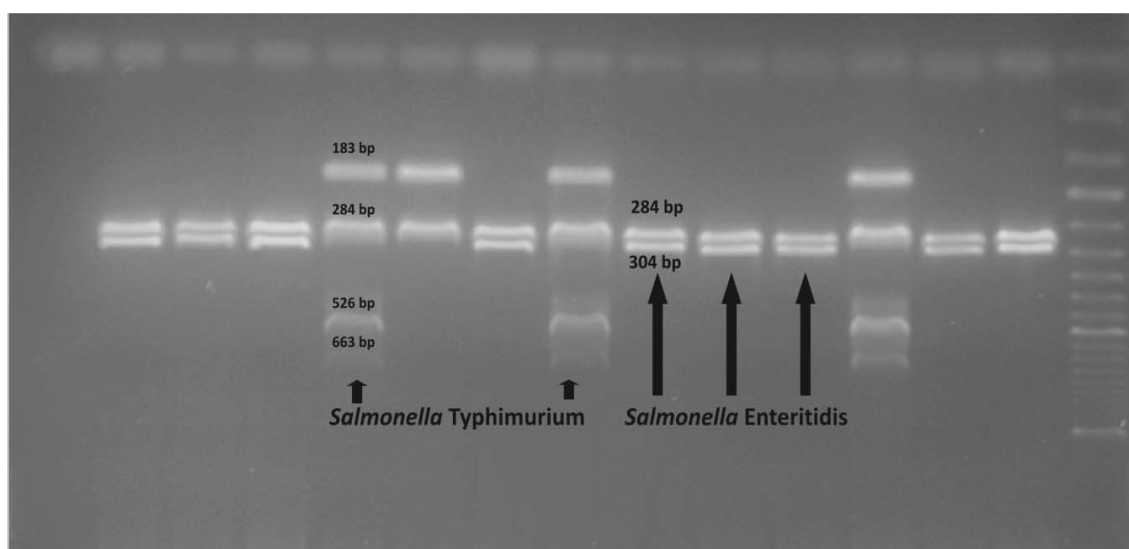
Kod 44 izolata *Salmonella Typhimurium* formirala su se 4 DNK fragmenta u agarozu gelu. Prvi DNK fragment od 183 bp odgovara genu *fliC*, drugi DNK fragment od 284 bp odgovara genu *invA*, treći DNK fragment od 526 bp odgovara genu *fljB* i četvrti DNK fragment od 663 bp odgovara genu *rfbJ*. Jedan izolat, koji je prvobitno serološki identifikovan kao *Salmonella Typhimurium*, nije formirao DNK fragmente u agarozu gelu.

Pregledom amplifikata DNK kontrolnih bakterija, utvrđeno je postojanje dva bleđa nespecifična (*non-target*) DNK fragmenta kod *Citrobacter freundii* (prvi približno 400 bp, a drugi 750 bp), jednog bleđog *non-target* DNK fragmenta kod *Escherichia coli* O157:H7 (približno 400 bp), jednog jasno izraženog *non-target* DNK fragmenta kod *Klebsiella oxytoca* (približno 1000 bp) kao i jednog jasno izraženog *non-target* DNK fragmenta kod *Shigella flexneri* (približno 450 bp). Kod *Salmonella Choleraesuis* utvrđeno je postojanje dva DNK fragmenta, jedan je odgovarao genu *invA*, a drugi je odgovarao genu *fljB* *Salmonella Typhimurium*. Svi navedeni *non-target* fragmenti bili su jasno razdvojeni od očekivanih fragmenta. Ostali kontrolni sojevi bakterija nisu formirali artefakte u agarozu gelu (slika 2 i tabela 4).

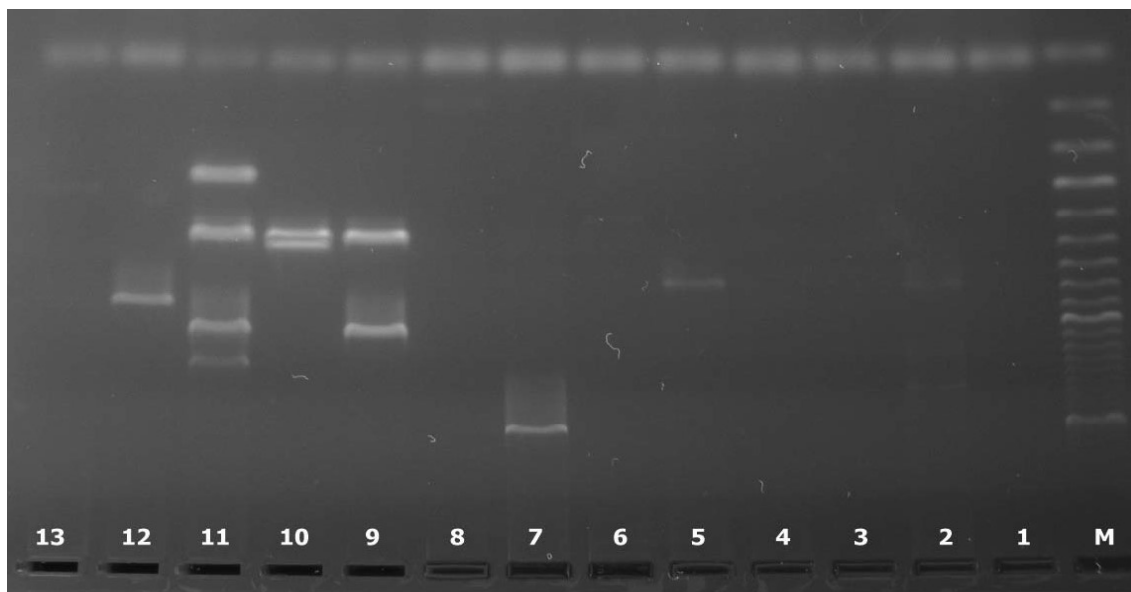
Selektivnost je mera stepena odgovora koji daju ciljani (*target*) mikroorganizmi i *non-target* mikroorganizmi, a sastoji se od inkluziviteta i ekskluziviteta. Inkluzivitet je u ovom eksperimentu iznosio 98,85 posto. Ekskluzivitet je iznosio 100 posto. Relativna tačnost metode iznosila je 99 posto. Relativna osetljivost metode iznosila je 98,85 posto.

Tabela 3. Rezultat API biohemijskog ispitivanja
Table 3. Biochemical testing (API) results

SUPSTRAT/ SUBSTRATE	REAKCIJA/ENZIM/ REACTION/ENZYME	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
2-nitrofenil-βD-galaktopiranozid	β – galaktozidaza/ β - galactosidase	–	–
L-arginin	Arginin dihidrolaza/ Arginine dehydrogenase	+	+
L-lizin	Lizin dekarboksilaza/ Lysine-decarboxylase	+	+
L-ornitin	Ornitin dekarboksilaza/ Ornithine decarboxylase	+	+
Natrijum-citrat	Utilizacija citrata/ Citrate utilisation	+	+
Natrijum-tiosulfat	Proizvodnja H ₂ S/ H ₂ S production	+	+
Urea	Ureaza/Urease	–	–
L-triptofan	Triptofan deaminaza	–	–
L-triptofan	Proizvodnja indola	–	–
Natrijum piruvat	Proizvodnja acetoina (Voges Proskauer reakcija)	–	–
Želatin	Želatinaza	–	–
D-glukoza	Fermentacija/oksidacija	+	+
D-manitol	Fermentacija/oksidacija	+	+
Inozitol	Fermentacija/oksidacija	+	–
D-sorbitol	Fermentacija/oksidacija	+	+
L-ramnoza	Fermentacija/oksidacija	+	+
D-saharoza	Fermentacija/oksidacija	–	–
D-melibioza	Fermentacija/oksidacija	+	+
Amigdalinalin	Fermentacija/oksidacija	–	–
L-arabinoza	Fermentacija/oksidacija	+	+
Oksidaza test	Oksidacija	–	–



Slika 1. DNK fragmenti ispitivanih sojeva
Picture 1. DNA fragments of investigated strains



Slika 2. DNK fragmenti kontrolnih sojeva
Picture 2. DNA fragments of control strains

Tabela 4. Rezultati ispitivanja primenom multipleks PCR metode
Table 4. Results of investigation using multiplex PCR method

Redni broj No	Naziv bakterije Bacterium name	REZULTATI PCR-a/PCR results					Veličina amplifikovanog fragmenta/ Size of amplified fragment (bp)
		invA	Sdf I	rfbJ	fliC	fliB	
1.	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 35654	-	-	-	-	-	
2.	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 43864	-	-	-	-	-	350-400, 750
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	-	-	-	-	-	
4.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	
5.	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	-	-	-	-	-	400
6.	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	-	-	
7.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	1.000
8.	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 49132	-	-	-	-	-	
9.	<i>Salmonella Choleraesuis</i> ATCC 7001	+	-	-	-	?	
10.	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	+	+	-	-	-	
11.	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	+	-	+	+	+	
12.	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-	-	-	-	450
13.	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	-	-	-	-	-	
14.	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	
15.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	

Relativna specifičnost metode iznosila je 100 posto. *Kappa indeks* iznosio je 0,957.

Kao osnova za identifikaciju svakog serovara, korišćeni su njihovi specifični geni. Smatrano je da je neophodno prvo da se ustanovi da li izolovani mikroorganizam zaista pripada vrsti *Salmonella enterica*. Rezultate prvih pokušaja utvrđivanja zajedničkog gena za sve salmonele objavio je *Rahn i sar.* (1992). On je opisao set prajmera 139-141, koji služi za specifičnu amplifikaciju 284-bp sekvence gena *invA*, lociranog na SPI-1 „ostrvu patogenosti salmonela“. Ovaj gen kodira protein InvA, koji je sastavni deo injektizoma – organele odgovorne za prenos proteina iz salmonele u ćeliju domaćina. Međutim, amplifikacioni uslovi u našem eksperimentu izmenjeni su i optimizovani, zbog činjenice da u reakcionoj smeši postoje još četiri dodatna para prajmera. Tako je vreme vezivanja prajmera (*annealing*) skraćeno sa 2 minuta na 1 minut, a temperatura *annealing-a* sa 53°C podignuta na mnogo strožiju temperaturu od 57°C. Osim toga i vreme ekstenzije skraćeno je sa 3 minuta na 1 minut.

Kada je definitivno utvrđen par prajmera za identifikaciju vrste, istraženi su geni i prajmeri koji su specifični za svaki serovar ponaosob. Nekoliko istraživača je ranijih godina opisalo mogućnost specifične detekcije *Salmonella Typhimurium*. *Khan i sar.* (2000) opisali su multipleks PCR metodu za detekciju *Salmonella Typhimurium* korišćenjem florfenikol (*flo*), integron (*int*), invazionog (*inv*) i virulentnog (*spvC*) gena. Međutim, *Bolton i sar.* (1999) utvrdili su da je samo 88% izolata *Salmonella Typhimurium* bilo pozitivno na prisustvo gena *spvC*. Osim toga, oni su ukazali da postoje i drugi serovari salmonele koji poseduju *int* i *spvC* gene. *Soumet i sar.* (1999) opisali su PCR sistem za identifikaciju *Salmonella Typhimurium* korišćenjem gena *fliC* odgovornog za sintezu H:i antigena. Međutim ovom metodom nije bilo moguće razlikovati *Salmonella Typhimurium* od nekoliko ostalih serovara koji poseduju H:i flagelarni antigen. *Echeita i sar.* (2002) opisali su metodu multipleks PCR za detekciju najčešćih flagelarnih antigena druge faze. Međutim, nijednu od opisanih metoda nije specifično identifikovao serovar *Salmonella Typhimurium*. Tek su *Lim i sar.* (2003) opisali metodu kojom bi se serovar *Typhimurium* mogao da specifično dokaže. U našem eksperimentu za detekciju ovog serovara korišćen je skup od tri para prajmera. Prvi par prajmera specifično je amplifikovao 663-bp sekvencu gena *rfbJ*, koji je odgovoran za sintezu O:4 antigena. Drugi par prajmera amplifikovao je 183-bp sekvencu gena *fliC* (sinteza H:I antigena), a treći par prajmera amplifikovao je 526-bp sekvencu gena *fljB* (sinteza H:1,2 antigena).

Pouzdana identifikacija serovara *Salmonella Enteritidis* zasnovana je na paru prajmera Sdf I (*Faktor razlikovanja Salmonella – Salmonella Differentiation Factor*) koje su prvi opisali *Agron i sar.* (2001). Ovi prajmeri ne amplifikuju DNK sekvence serovara *Salmonella Gallinarum* i serovara *Salmonella Dublin* koji su izuzetno bliski serovaru *Salmonella Enteritidis*.

Tokom istraživanja utvrđeno je da prajmeri u reakcionoj smeši ne pokazuju unakrsnu specifičnost prema genima drugih mikroorganizama, odnosno da ne postoje lažno pozitivni rezultati. Međutim, ustanovljeno je da se pri amplifikaciji formiraju nespecifični DNK fragmenti DNK i to, dva bleđa *non-target* DNK fragmenta (amplifikovan deo DNK lanca koji po redosledu nukleotida ne odgovara ispitivanom genu) kod *Citrobacter freundii* (prvi približno 400 bp, a drugi 750 bp), jedan bleđi *non-target* DNK fragment kod *Escherichia coli* O157:H7 (približno 400 bp), jedan jasno izražen *non-target* DNK fragment kod *Klebsiella oxytoca* (približno 1000 bp) kao i jedan jasno izražen *non-target* DNK fragment kod *Shigella flexneri* (približno 450 bp). Kod *Salmonella Choleraesuis* utvrđeno je postojanje dva DNK fragmenta, jedan je odgovarao genu *invA*, a drugi je odgovarao genu *fljB* *Salmonella Typhimurium*. Razlog pojave identičnih fragmenata DNK kod *Salmonella Choleraesuis* i *Salmonella Typhimurium* leži u činjenici da sekvence prajmera *fljB-s* i *fljB-as* specifično amplifikuju deo *fljB* gena *Salmonella Choleraesuis* koji je sličan *fljB* genu *Salmonella Typhimurium*. Ovaj gen kodira H-antigen druge faze kod oba serovara, pri čemu serovar *Salmonella Choleraesuis* poseduje H:1,5 antigen, a serovar *Typhimurium* H:1,2 antigen. Svi navedeni „*non-target*“ fragmenti bili su jasno razdvojeni od očekivanih fragmenata. Ostali kontrolni sojevi bakterija nisu formirali artefakte u agarozu gelu. Formiranje artefaktnih fragmenata kod *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella oxytoca* i *Shigella flexneri*, nastalo usled nespecifičnog delovanja DNK polimeraze na genom ovih bakterija u prvim fazama amplifikacionog ciklusa, moglo bi da se spreči dodavanjem posebne vrste DNK polimeraze, takozvane „*Hotstar*“ polimeraze. Ova vrsta polimeraze ne ispoljava svoju enzimsku aktivnost sve dok temperatura ne dosegne kritičnu granicu. Takođe, moguće je da bi i manji broj ciklusa, mogao da spreči nastajanje ovih artefakata.

Kod jednog izolata serotipski je utvrđena pripadnost B-grupi salmonela, odnosno pripadnost serovaru *Salmonella Typhimurium*. Međutim, metodom multipleks PCR nisu nastali karakteristični fragmenti u gelu. Uzroci nastanka ove pojave mogu različito da se tumače. Najverovatnije mogućnosti

su da nije izolovana dovoljna količina DNK iz ćelija, ili se DNK razgradila u toku postupka. Izuzetno je značajno da se tokom izvođenja PCR metode svi sastojci reakcione smeše drže na ledu, kako se čestim topljenjem i zamrzavanjem komponente ne bi uništile ili smanjila njihova aktivnost. Ovo naročito važi za enzim DNK polimerazu.

Rezultati razrade metode ukazuju da ona visokom selektivnošću, tačnošću i specifičnošću predstavlja dobru alternativnu metodu u odnosu na standardne metode, mereno vrednošću Kappa indeksa.

Ekonomski gledano, ova metoda je, izuzimajući početne troškove nabavke uređaja, ubedljivo najjeftinija, s obzirom da se troše male količine reagenasa. U proseku, multipleks PCR je dvostruko jeftiniji u odnosu na serotipizaciju. Metoda je jednostavna za izvođenje, mada je za osposobljavanje stručnog osoblja neophodno dosta vremena. Osim toga, prostor i oprema za izvođenje su specifični, jer je apsolutni preduslov besprekorna higijena materijala i sterilnost komora u kojima se manipulirše reaktantima.

Zaključci

1. Set prajmera 139–141, koji specifično amplifikuju deo gena *invA*, visoko je pouzdan za iden-

tifikaciju vrste *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, što se zasniva na činjenici da svi serovari salmonele poseduju ovaj gen.

2. Set prajmera koji amplifikuju gene *rfbJ*, *fliC* i *fliB*, strogo je specifičan i pouzdan za identifikaciju *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*.

3. Set prajmera Sdf I koji amplifikuje deo genoma *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* strogo je specifičan i dovoljno pouzdan za apsolutnu potvrdu ovog serovara.

4. Prilikom amplifikacije ispitivanog DNK materijala, utvrđeno je da *Taq* polimeraza korišćena u eksperimentu, nespecifično amplifikuje delove genoma *E. coli* O157:H7, *C. freundii*, *K. oxytoca* i *S. flexneri*, zbog nestabilnosti i nespecifičnosti ovog enzima pri temperaturi inicijalne denaturacije od 95°C.

5. U multipleks PCR sistemu, neophodno je da se koristi termostabilna *Hotstart* DNK polimeraza koja nema nespecifično delovanje.

6. Rezultati ispitivanja primenljivosti multipleks PCR metode pokazuju da je metoda veoma pouzdana za primenu u laboratorijama u kojima se ispituje veliki broj uzoraka, tako da bi njeno uvođenje u dijagnostiku omogućilo brže otkrivanje i identifikaciju salmonela.

Literatura

- Agron, P. et al., 2001. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4984–4991;
- Bolton, L., Kelley, L., Lee, M., Fedorka-Cray, P., Maurer, J., 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1348–1351;
- Cooper, G., 1994. Salmonellosis - infections in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines - a review. *Vet. Bull.*, 64, 123–143;
- De Boer, E., Beumer, R., 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 119–130;
- Echeita, M.A., Herrera, S., Garaizar, J., Usera, M.A., 2002. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. *Res. Microbiol.* 153, 107–113;
- Global Salm-Surv (GSS) Country Databank, 2006. World Health Organisation. http://thor.dfvf.dk/portal/page?_pageid=53,1&_dad=portal&_schema=PORTAL;
- Herrera-Leon, S. et al., 2004. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2581–2586;
- Hirose, K. et al., 2002. Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB* and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *J. Clin. Microbiol.* 40, 633–636;
- Itoh, Y. et al., 1997. Amplification of *rfbE* and *fliC* genes by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella* Serovar Enteritidis, Dublin and galinarum-pullorum. *Microbiol. Immunol.* 41, 791–794;
- Khan, A.A., Navaz, M.S., Khan, S.A., Cerniglia, C.E., 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 355–360;
- Lim, Y.H. et al., 2003. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Selective Detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, 151–155;
- Malorny, B., Bunge, C., Hoorfar, J., Helmuth, R., 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 290–296;
- McClelland, M. et al., 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413 (6858), 852, 6;
- Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002), 2005. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland;
- Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods (ISO 16140:2003), 2003. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland;
- Rahn, K. et al., 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes* 6, 271–279;
- Soumet, C. et al., 1999. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 1–6.