

GREITAS *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IR *SALMONELLA CHOLERAESUIS* NUSTATYMAS KIAULIŲ FEKALIJŲ MĖGINIUOSE MODIFIKUOTA LIZDINE POLIMERAZĖS GRANDININE REAKCIJA

Arūnas Stankevičius¹, Rytis Čepulis¹, Kristina Sajūtė¹, Marija Stankevičienė²

¹Lietuvos veterinarijos akademijos Imunologijos laboratorija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;

²Lietuvos veterinarijos akademijos Užkrečiamųjų ligų katedra, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas; tel. (8~37) 36 28 44; faks. (8~37) 36 24 17; el. paštas: sarunas@lva.lt

Santrauka. Gyvulių salmonelių infekcija ir salmonelės, aptinkamos maisto produktuose, turi neigiamą poveikį visuomenės sveikatai, dėl to būtina sugriežtinti visos maisto grandinės veterinarinės sanitarijos priežiūrą ir ieškoti veiksmingų diagnostikos priemonių.

Įprastai salmonelių nustatymas trunka keletą dienų. PGR ar lizdinės PGR testai buvo pritaikyti tyrimo laikui sutrumpinti, bet jų naudojimas dėl komplekso manipuliacijų dar gali užteršti tiriamąjį mėginį, o polimerazės grandininės reakcijos inhibitoriai, esantys tiriamojoje medžiagoje, gali tiesiogiai veikti testo efektyvumą. Siekiant išvengti šių problemų ir žymiai sutrumpinti tyrimo laiką, įdiegta ir išbandyta vieno mėgintuvėlio lizdinė PGR, kuriai specifiniai pradmenys parinkti iš *InvA* geno sekų. Tyrimams naudotos kiaulių fekalijos, eksperimentiškai užkrėstos *S. typhimurium* ir *S. choleraesuis*. Modifikuotos nPGR jautrumas buvo atitinkamai 150 cfu/g fekalijų ir 15 cfu/ml druskos tirpalo. Tuo tarpu aptikimo lygis taikant įprastą PGR, kaip ir tradicinę lizdinę PGR, siekė 150 ir 15 cfu/ml druskos tirpalo ir atitinkamai 15×10^7 ir 15×10^2 cfu/g kiaulių fekalijų. Testo jautrumas padidėjo iki 15 cfu/g, kai 4 valandas buvo gausinama buferiniame peptono vandenyje. Gautiems tyrimų rezultatams su modifikuota nPGR salmonelių serotipas įtakos neturėjo. Galima teigti, jog 4 etapų procedūra, apimanti 4 valandų gausinimą, DNR ekstrakciją, PGR amplifikaciją ir žinomo molekulinės masės produkto elektroforezę (283 bp) gali būti naudojama kaip *Salmonella* spp. patvirtinimo testas kiaulių fekalijose.

Raktažodžiai: kiaulės, fekalijos, salmonelės, PGR metodas.

RAPID DETECTION OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IR *SALMONELLA CHOLERAESUIS* IN SWINE FAECAL SAMPLES BY ONE TUBE NESTED POLYMERASE CHANE REACTION

Summary. Public health implications of *Salmonella* infections in animals and products of thereof enforce strengthening of the surveillance and search for efficient diagnostic tools. Conventional *Salmonella* detection takes several days. Polymerase chain reaction (PCR) or conventional nested PCR tests have been developed to shorten analysis time but still can generate contaminants due to complex manipulations and can be hampered by inhibitors of PCR present in the tested sample. To overcome those problems and shorten analysis time we have developed one-tube nested PCR assay based on the detection of *Salmonella*-specific *invA* gene using well defined primer sets. Swine faeces spiked with *S. typhimurium* and *S. choleraesuis* were used as a sample model. The assay was able to detect 150 CFU/g faeces compared to 15 CFU/ml in saline. Simultaneously, the detection level of the applied single PCR tests as well as conventional nPCR reached 150 and 15 CFU/ml of saline and, respectively, 15×10^7 and 15×10^2 CFU/g of swine faeces. The sensitivity of the test was increased up to 15 CFU/g using enrichment in buffered peptone water for 4 hours. No serovar-dependent differences were observed. It was concluded that 4-step procedure including 4-hour nonselective pre-enrichment, DNA extraction, PCR amplification and electrophoretic detection of known molecular weight product (283 bp) can be used as a screening test for *Salmonella* detection in swine faeces.

Keyword: swine, faeces, *Salmonella*, PCR.

Įvadas. Salmonelių išsiskyrimas su kiaulių fekalijomis yra svarbus aplinkos užteršimo mikroorganizmais šaltinis. Skerdžiamos užsikrėtusios, bet nesergančios kiaulės gali būti svarbiausias *Salmonella typhimurium* užkrato šaltinis, labai pavojingas visai maisto grandinei. Taigi efektyvių ir nebrangių greitos diagnostikos metodų plėtojimas yra vienas veiksnių, mažinantis salmonelių prostrūkį tarp žmonių ir gyvūnų. Nors užsikrėtusių salmonelėmis kiaulių bandų patikrai dažniausiai taikomas imunofermentinės analizės metodas (IFA), mikrobiologiniai sukėlėjo kultivavimo metodai suteikia galimybę aiškiai nustatyti, kokia salmonelių grupė sukelia problemas, kaip pasireiškia infekcija.

Standartinis salmonelių nustatymo metodas susideda iš pirminio sukėlėjo gausinimo buferiniame peptono vandenyje, gausinimo Rappaport-Vassiliadis terpėje ir selektyvinio salmonelių auginimo ant agarų bei tolesnio biocheminio identifikavimo. Šios tyrimų procedūros gali trukti 5–7 paras. Ūkiuose gausiai naudojami antibiotikai gali dar labiau apsunkinti ir taip ilgoką salmonelių kultūrų išskyrimą ir tolimesnį jų serologinį bei biocheminį identifikavimą. Kartais jis tampa neįmanomas arba pailgėja iki 15–30 dienų.

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) tapo ypač svarbus ir reikšmingas metodas *Salmonella* spp. fekalijose ir klinikiniuose mėginiuose identifikuoti

(Amavisit et al., 2001; Feder et al., 2001; Schrank et al., 2001; Gentry-Weekset et al., 2002; Oliveira et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Arnold et al., 2004). Yra duomenų, kad fekalijose esančios inhibitorinės medžiagos, tokios kaip bilirubino, hemoglobino degradacijos produktai, polisacharidų kompleksas, gali sumažinti reakcijos efektyvumą (Lantz et al., 1997; Monteiro et al., 1997). Yra aprašytų metodų, kurie leidžia ekstrahuoti DNR tiesiogiai iš fekalijų mėginių (Amavisit et al., 2001; McOrist et al., 2002). Buvo net pasiūlytas salmonelių pirminės inkubacijos ir PGR metodas, kuris leidžia gausinti salmoneles tiriamajame mėginyje ir kartu atskiesti inhibitorines medžiagas. Tačiau šis metodas taip pat reikalauja daug laiko sąnaudų ir neužtikrina reikiamos DNR kokybės (Schrank et al., 2001; Gentry-Weeks et al., 2002; Oliveira et al., 2002; Arnold et al., 2004). Buvo pasiūlytas labai jautrus ir specifinis lizdinės polimerazės grandininės reakcijos (nPGR) metodas (Waage et al., 1999; Whyte et al., 2002; Liu et al., 2002), bet jo pritaikymą riboja didelė tikimybė keliais PGR etapais, atidarinėjant ir uždarinėjant mėgintuvėlius ir perkeliant reakcijos matricą į kitą mėgintuvėlį gauti klaidingai teigiamus rezultatus (McGoldrick et al., 1999).

Darbo tikslas – paruošti ir išbandyti tikslų, specifiską ir jautrų vieno uždaro mėgintuvėlio nPGR metodą, kuris leistų salmoneles identifikuoti kiaulių fekalijų mėginiuose.

Medžiagos ir metodai. *Mėginių paruošimas.* *S. typhimurium* ir *S. choleraesuis* padermės, 12 valandų inkubuotos ant agarų, buvo naudojamos paruošti $0,5^{\circ}$ McFarlando (15×10^7 cfu/ml) 0,9% NaCl tirpale. Dešimt kartų atskiestomis salmonelemis eksperimentiškai buvo užkrėsti kiaulių fekalijų mėginiai. Eksperimentams naudotos kiaulių fekalijos nebuvo natūraliai užsikrėtusios salmonelemis. Jos buvo surinktos iš ūkių, kuriuose salmoneliozė nebuvo pastebėta, o mikrobiologiniai tyrimai ir PGR buvo neigiami salmonelių atžvilgiu. DNR ekstrakcijai buvo naudojami 0,1 g fekalijų arba 100 μ l 0,9% NaCl tirpalas.

Eksperimentiniai fekalijų mėginiai buvo gerai sumaišomi su žinomu kolonijas formuojančių salmonelių skaičiumi ir paliekami kambario temperatūroje nusėsti prieš paimant fekalijų mėginį DNR ekstrakcijai. PGR jautrumas buvo vertinamas pagal identifikuotas salmoneles 0,9% NaCl tirpale, eksperimentiškai užkrėstuose fekalijų mėginiuose, taip pat ištyrus kiaulių fekalijose 15 cfu salmonelių mėginius, skirtingą laiką pagausinus buferiniame peptono vandenyje pagal ISO 6579:2002 reikalavimus. nPGR efektyvumas įvertintas ir tiriant natūraliai užkrėtus kiaulių fekalijų mėginius. Silikoninės membranos komercinės kolonėlės (Genomic DNA Prep Plus, Heliconus, A&A Biotechnol) buvo panaudotos DNR ekstrakcijai iš 0,9% NaCl arba peptono vandens 100 μ l tirpalo, priklausomai nuo vykdomo eksperimento. Trečiuoju bandymu reikiamas kiekis tirpalo buvo imamas iš vandens peptono ir tiriamojo mėginio kas valandą pirmąsias 8 valandas, vėliau – 12, 18 ir 24 inkubacijos valandą. Eksperimentiškai salmonelemis užkrėsti ir neužkrėsti mėginiai buvo tiriami tuo pačiu metu. Toliau 150 fekalijų mėginių pateiktų rutininiams

tyrimams, buvo ištirti vieno mėgintuvėlio nPGR, kartu atliekant 4 valandų pirminį salmonelių gausinimą.

Mikrobiologinis tyrimas. Norint įvertinti vieno mėgintuvėlio lizdinę nPGR techniką, pritaikytą nustatyti *Salmonella* spp. kiaulių fekalijose, 150 atsitiktinai parinktuose kiaulių fekalijų mėginiuose buvo atlikti standartiniai mikrobiologiniai tyrimai. 10 g fekalijų buvo inkubuojama buferiniame peptono vandenyje (1:10 v/v; 37°C, 18 \pm 2 h), salmoneles gausinamos Rappaport-Vassiliadis sojų terpėje (santykiu 1:100 v/v; 42°C, 24 \pm 2 h) ir Mueller-Kauffman terpėje su novobiocinu (santykiu 1:10 v/v; 37°C, 24 \pm 2h) ir auginamos ant XLD ir BxLH agarų. Įtartinos salmonelių kolonijos toliau buvo tiriamos biochemiškai.

PGR. Vieno etapo tradicinei PGR buvo naudojamas 50 μ l reakcijos mišinys: 5 μ l tiriamosios DNR, 5 μ l 10xPGR buferio (100mM Tris-HCH, pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8% nonidet P40, Fermentas), 12 μ l MgCl₂ (25 mM, Fermentas), po 1 μ l kiekvieno dNTPs (10 mM, Fermentas), po 20 pmol kiekvieno 139/141 arba SA07/09 pradmenų (1 lentelė), 0,3 μ l (1,25 U) Taq DNA polimerazės (Fermentas), 16,07 μ l DEPC vandens. Atlikti 38 amplifikavimo ciklai (1 lentelė).

Vieno mėgintuvėlio lizdinė PGR (nPGR). Reakcijai taikytas McGoldrick ir kitų tyrėjų pirmą kartą aprašytas (1999) ir mūsų modifikuotas vieno mėgintuvėlio nPGR metodas. Pirmiausia buvo paruošiami reagentai antram, t. y. lizdinės PGR etapui. Šiam tikslui paruošiamas reakcijos mišinys, kuriame yra 5 μ l 22% trechalozės (Sigma), naudojamos kitiems reakcijos komponentams išlaikyti, 20 pmol/ μ l kiekvieno iš vidinių nukleotidų pradmenų SA09 ir SA10 (1 lentelė), 1 μ l dNTPs mišinio (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,25 μ l Taq DNA polimerazės (1,25 U, Fermentas). Į kiekvieno 0,2 ml Eppendorfo mėgintuvėlio dangtelį tokio lizdinės PGR mišinio išpilstoma po 8,25 μ l ir paliekama kambario temperatūroje džiūti 2 val. Taip išdžiovinti lizdinės PGR reagentai tinkami naudoti 6 mėnesius.

Kitame etape buvo panaudoti tie patys 0,2 ml Eppendorfo mėgintuvėliai, kurių kamšteliuose buvo trechalozėje išdžiovinti nPGR komponentai. Eilinė PGR buvo atliekama minėtų mėgintuvėlių dugne. Amplifikacijai buvo naudojamas 50 μ l mišinys: 5 μ l tiriamosios DNR, 5 μ l 10xPGR buferio (100mM Tris-HCH, pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40, Fermentas), 5 μ l MgCl₂ (25 mM, Fermentas), 2 μ l dNTPs (10 mM, Fermentas), po 5 pmol išorinių pradmenų SA07 ir SA08 (20 pmol/ μ l koncentracija, 1 lentelė), 1 μ l 10% tritonX-100 (Sigma), 0,5 μ l (2,5 U) Taq DNA polimerazės (Fermentas), 29,25 μ l DEPC vandens. PGR mišiniui, esančiam mėgintuvėlio dugne, atskirti nuo nPGR komponentų mėgintuvėlio kamštelyje buvo naudojamas mineralinis aliejus (Sigma). Vieno mėgintuvėlio nPGR buvo atliekama amplifikatoriuje „Mastercycler[®]“ (Eppendorf). Sumaišius tiriamos DNR ir PGR mišinį buvo atliekama 25 ciklų amplifikacijos reakcija (1 lentelė). Pasibaigus pirmajam amplifikacijos etapui mėgintuvėliai buvo apverčiami keletą kartų, kad susimaišytų ir ištirtų nPGR komponentai mėgintuvėlio dangtelyje su pirmosios PGR produktais, esančiais dugne.

Tada mėgintuvėliai buvo trumpai centrifuguojami ir atliekama 40 ciklų nPGR (1 lentelė).

PGR produktai buvo analizuojami 2% agarozės gelyje (Top Vision™ GQ Agarose, Fermentas), dažytame etidžio bromidu (koncentracija 1 µg/ml.). 10µl PGR produkto buvo atliekama elektroforezė 1xTBE buferyje

(90mM Tris, 90mM boro rūgšties, 2 mM EDTA), leidžiant 120 V srovę 45 min. PGR rezultatai buvo matomi UV lempos spinduliuose, esant specifiniam DNR juostelių švytėjimui 284 bp, 544 bp arba 283 bp molekulinį žymeklį „GeneRuler™“ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) atitinkančiose pozicijose.

1 lentelė. **Specifinės *Inva* geno oligonukleotidinių pradmenų poros iš *S. typhimurium* SPI-1 regiono pagal J. A. Galan ir kt. (1992) ir PGR parametrai**

Pradmens pavadinimas	Pradmenų seka 5' → 3' (atitikmuo)	Pozicija	Produkto dydis	PGR sąlygos, temperatūra/laikas		
				denatūracija	hibridinimas	išplėtimas
Paprasčia PGR (Burkhalter et al., 1995; Rahn et al.1992)						
139	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	371-655	284 bp	95°C/30s ^b	64°C/ 30 s	72°C/ 30 s ^c
141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC					
SA07	TGAATATCGTACTGGCGATATTGGTGTTTA	212-756	544 bp	A: 95°C/5s ^b	65°C/ 30 s	72°C/ 40 s ^c
SA08	GGACAAATCCATACCATGGCGAGTCAT					
Lizdinė PGR (Burkhalter et al., 1995)						
SA09	GAAATTATCGCCACGTTTCGGGC	373-656	283 bp	B: 95°C/5s	60°C/ 30s	72°C/ 40 s ^e
SA10	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC					

^a Registracijos Nr. M90846); ^b pradinis denatūravimas buvo atliktas 95°C temperatūroje 1 min. ir 94°C temperatūroje 3 min. atitinkamai su 139/141 ir SA07/SA08; ^c galutinis praplėtimas atliktas 72 °C temperatūroje 4 min. ir 72 °C temperatūroje 3 min. atitinkamai su 139/141 ir SA07/SA08 pradmenimis; ^d pradinė denatūracija atlikta 94 °C temperatūroje 3 min.; ^e galutinio išplėtimo etapas 72 °C temperatūroje – 3 min.

Statistinė duomenų analizė atlikta kompiuterine programa „Graph Prism™“. Santykinis tikslumas, specifiškumas ir jautrumas apskaičiuotas pagal ISO16140 (2003) aprašytas formules. Reakcijos specifiškumo tyrimuose buvo panaudota dešimt *Brachyspira hyodysenteriae* ir šešios *Lawsonia intracellularis* lauko padermės.

Tyrimų rezultatai. Norint įvertinti paruoštą vieno mėgintuvėlio lizdinės polimerazės grandininės reakcijos (nPGR) metodą buvo atlikta keletas skirtingų PGR reakcijų, kurios leido nustatyti metodo jautrumą eksperimentiškai salmonelėmis užkrėstuose 0,9% NaCl mėginiuose. Naudojant įprastą vieno etapo PGR mažiausiai salmonelių buvo 15 cfu reakcijai su 139/141 oligonukleotidiniais pradmenimis ir 25 cfu su SA07/08 pradmenimis. Dviejų skirtingų mėgintuvėlių nPGR ir paruošta vieno mėgintuvėlio nPGR parodė ≤ 1,5 cfu jautrumą vienoje reakcijoje. Visiškai priešingi rezultatai išryškėjo, kai įprasta ir vieno mėgintuvėlio nPGR buvo

atliekama su eksperimentiškai salmonelėmis užkrėstais fekalijų mėginiais, kurie nebuvo inkubuoti pirminėje salmonelių pagausinimo terpėje. Šiuo atveju PGR rezultatai buvo teigiami tik mėginyje esant labai dideliame salmonelių kiekiui (2 lentelė). Įprastinė vieno etapo PGR su pradmenimis 139/141 arba SA07/08 salmoneles fekalijų mėginyje leido identifikuoti tik esant jų koncentracijai atitinkamai 150x10⁵ cfu/100 µl. Vieno mėgintuvėlio nPGR buvo daug jautresnė ir parodė 150 cfu/100 µl ar net 15 cfu/100 µl jautrumą (2 lentelė). Tačiau statistiškai patikimi skirtumai tarp gautų ir lauktų tyrimų rezultatų (p<0,05) esant labai mažam salmonelių kiekiui (15 arba ≤1,5 cfu/100µl) rodo, kad teigiami PGR rezultatai šiuo atveju gali būti atsitiktiniai. Tuo tarpu vieno mėgintuvėlio ar eilinė nPGR su dideliu kiekiu eksperimentiškai užkrėstų salmonelėmis fekalijų mėginių (≥1500 cfu/100 µl, 2 lentelė) statistiškai reikšmingų skirtumų tarp lauktų ir gautų rezultatų neturėjo.

2 lentelė. **Teigiamų mėginių skaičius, nustatytas vieno mėgintuvėlio nPGR eksperimentiškai užkrėstuose kiaulių fekalijų mėginiuose**

Salmonelių serotipas	Užkrėtimo laipsnis, cfu/ml*				
	150000	15000	1500	150	15
<i>Choleraesuis</i>	16	16	15	4	0
<i>Typhimurium</i>	16	16	11	1	0
Neigiama kontrolė*					
Fekalijų mėginių blankas	0	0	0	0	0

Pastaba. *Po 16 mėginių buvo tiriama kiekvienam užkrėtimo laipsniui ir neigiamai kontrolei

Norint įvertinti vieno mėgintuvėlio nPGR sistemą identifikuojant nedidelį kiekį salmonelių fekalijose, buvo

palygintos dvi dažniausiai pasitaikančios Lietuvoje kiaulių salmonelių padermės (2 lentelė). Nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp lauktų ir gautų tyrimų rezultatų su užkrėstais mėginiais, turinčiais ≥ 150 cfu/100 μ l *S. typhimurium* arba *S. choleraesuis*. Tačiau nPGR su 15 cfu/100 μ l minėtų serotipų salmonelėmis jau parodė ženklus skirtumus tarp laukto ir gauto rezultato. Teigiamų nPGR mėginių skaičius skirtingo užkrėtimo lygio mėginiams nepriklausė nuo salmonelių serotipo.

Vadovaujantis 2 lentelės tyrimo rezultatais, 15 cfu/g *S. typhimurium* ir *S. choleraesuis* serotipai buvo atrinkti tolimesniems tyrimams su vieno mėgintuvėlio nPGR, pritaikant standartinį salmonelių gausinimą BWP. Tyrimai parodė, kad statistiškai patikimų skirtumų tarp laukto ir gauto rezultato su abiem serotipais praėjus 4 valandoms po pirminio salmonelių gausinimo BWP nepastebėta.

3 lentelė. *Salmonella* spp. nustatymas tiriant vieno mėgintuvėlio nPGR ir mikrobiologiniu metodu

Tyrimo objektas	Tirtų mėginių skaičius	Vieno mėgintuvėlio nPGR	Kultivavimo metodas	Sujungtas (nPGR ir kultivavimo metodas)
Kiaulių fekalijų mėginiai	150	48 (32%)	36 (24%)	51 (34%)
Kiaulininkystės ūkiai	25	11 (44%)	8 (32%)	12 (48%)

Pastaba. Visi fekalijų mėginiai 4val. inkubuoti BWP.

Vieno mėgintuvėlio nPGR metodu ištyrus 25 ūkius, *Salmonella* spp. fekalijose buvo nustatyta 11-oje ūkių (44%), o įprastais mikrobiologiniais metodais salmoneles pavyko išaiškinti 8-juose ūkiuose (32%). Palyginus nPGR ir kultivavimo metodų 25 ūkių tyrimų rezultatus paaiškėjo, kad salmonelės buvo identifikuotos 12-oje ūkių (48%).

Tyrimų rezultatų aptarimas ir išvados. Nauji tyrimų ir rutininės diagnostikos metodai turi būti tikslūs, jautrūs, specifiški ir lengvai pakartojami. Keletas PGR metodų, pagrįstų *Salmonella* spp. virulentiškumo geno *InvA* identifikavimu, buvo aprašyti (Rahn et al., 1992; Burkhalter et al., 1995; Malorny et al., 2003). Nepaisant to, kad trechaloze paremtas vieno mėgintuvėlio nPGR pasirodė labai efektyvus identifikuojant virusus (McGoldrick et al., 1999; Stadejek et al., 2002), kiek mums žinoma, šios technologijos salmonelių diagnostikai nebuvo pritaikytos.

Tyrimai parodė, kad polisacharidas trechaloze leido lizdinėje PGR pritaikyti vieno uždaro mėgintuvėlio technologiją *Salmonella* spp. kiaulių fekalijų mėginiuose nustatyti. Tyrimų eigoje paprastai ir lizdinei PGR buvo parinkti oligonukleotidiniai pradmenys iš *InvA* geno sekų, kurios randamos beveik visose salmonelėse. *InvA* PGR reakcija naudojant pradmenų 139/141 porą parodė ypač platų salmonelių identifikavimo spektrą, įskaitant beveik visus serotipus ir potipius, ir buvo labai selektyvi ir naudinga tarptautiniuose diagnostikos įvertinimo tyrimuose (Malorny et al., 2003). Lizdinės PGR vidiniai pradmenys SA09/SA10 buvo labiau panašūs į aprašytus 139/141 pradmenims, tačiau šiek tiek sutrumpinti, kad būtų galima optimizuoti hibridinio temperatūrą. Išorinė

buvo iširta vieno mėgintuvėlio nPGR ir su 150 atsitiktinai parinktų kiaulių fekalijų mėginių, kurie prieš atliekant PGR 4 valandas buvo inkubuojami pirminėje salmonelių gausinimo terpėje.

Salmonella spp. fekalijų mėginiuose buvo identifikuota 48 atvejais (32%) (3 lentelė). Taikant įprastus kultivavimo metodus salmoneles pavyko izoliuoti 36 fekalijų mėginiuose (24%). Pagrindiniai identifikuoti salmonelių serotipai buvo *S. typhimurium* (23%), *S. choleraesuis* (65%), kiti – 12%.

Vieno mėgintuvėlio nPGR nepavyko salmoneles nustatyti trijuose mėginiuose, kuriuose įprastu kultivavimo metodu jos buvo išskirtos. Kai nPGR duomenys buvo palyginti su įprastu salmonelių kultivavimo metodu, paaiškėjo, kad *Salmonella* spp. buvo nustatyta 51 mėginyje iš tirtų 150 (34%) (3 lentelė).

pradmenų pora SA07/SA08, panaudota nPGR reakcijose, parinkta pagal originalias *InvA* geno nukleotidų sekas, paskelbtas J. A. Galan ir kitų tyrėjų (1992). Dėl itin panašių lizdinės PGR pradmenų pozicijos paruošta vieno mėgintuvėlio nPGR reakcija gali būti palyginta su rezultatais, gautais įgyvendinant dabartinę Europos mokslinį projektą apie PGR validaciją ir standartizaciją, identifikuojant maistinės kilmės patogenus, įskaitant ir *Salmonella* spp. (Malorny et al., 2003).

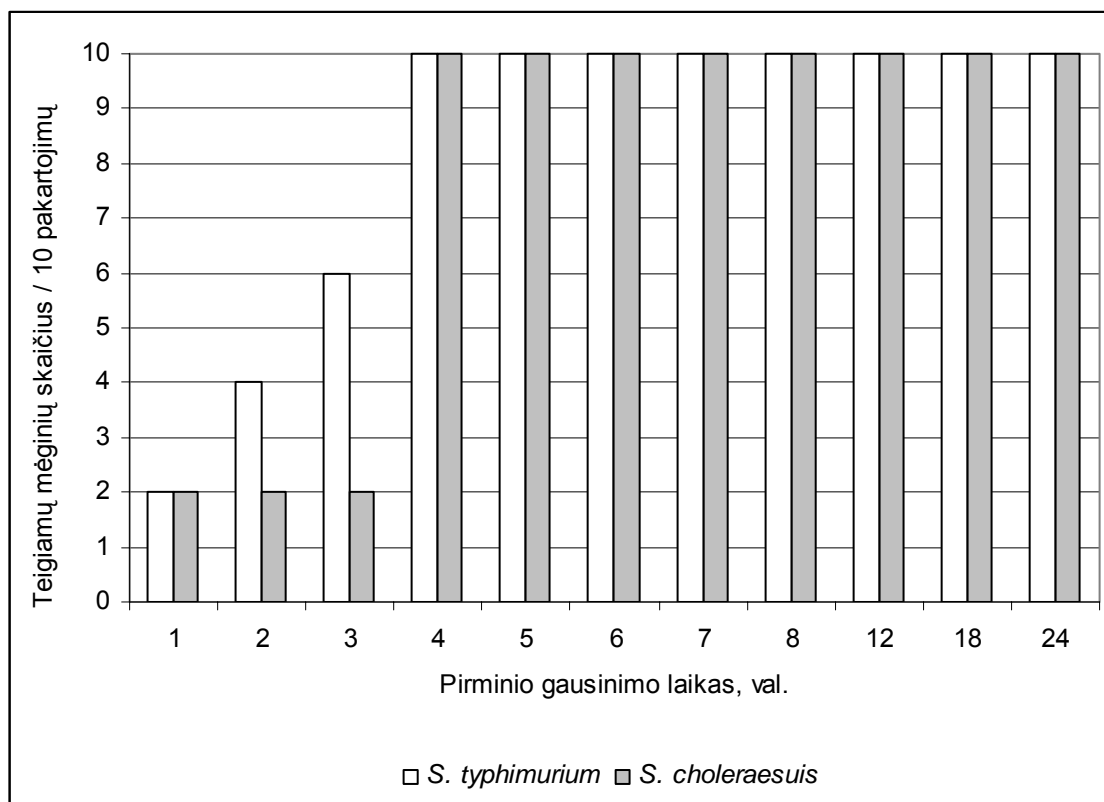
Vieno mėgintuvėlio nPGR panaudojimas eksperimentiniuose tyrimuose ir rutininėje diagnostikoje parodė keletą svarbių pranašumų – didelį specifiskumą, jautrumą, greitį, lengvą pritaikymą ir klaidingai teigiamų ar neigiamų rezultatų nebuvimą. Vieno mėgintuvėlio nPGR jautrumas ir specifiskumas įvertintas su eksperimentiškai užkrėstais salmonelių mėginiais. Reikėtų pažymėti, kad per visą tyrimų laiką mes negavome nespecifinių PGR produktų, nes jie gali būti gaunami tik pirmos reakcijos metu su išoriniais pradmenimis. Antros reakcijos metu (lizdinė PGR) toks PGR produktas negalėtų amplifikuotis dėl komplementarumo nebuvimo vidiniams PGR oligonukleotidiniams pradmenims. Taigi atkrito poreikis PGR produktų specifiskumą patvirtinti hibridizacijos (Feder et al., 2001) metodu.

Kitas svarbus diagnostinės PGR veiksnys – specifiskumas – patvirtintas pasirinktiems oligonukleotidiniams pradmenims su 43 *Salmonella* spp. padermėmis ir 21 serotipu (Burkhalter et al., 1995; Rahn et al., 1992). Todėl, atsižvelgę į ankstesnius rezultatus, savo tyrimuose panaudojome tik dvi dažniausiai paplitusias Lietuvos kiaulių populiacijoje salmonelių padermes. Su

kitais patogeniniais mikroorganizmais, įskaitant gana dažnai kiauliniškystės ūkiuose pasitaikančias *Bachyspira hyodysenteriae* ir *Lawsonia intracellularis* (duomenys neparodyti), specifinių PGR produktų nebuvo gauta.

Norint padidinti reakcijų jautrumą esant labai nedideliame salmonelių kiekiui mėginyje, keliuose tyrimuose buvo pritaikyta lizdinė PGR (Waage et al., 1999; Whyte et al., 2002; Liu et al., 2002). Tačiau šie nPGR metodai turėjo didelių trūkumų, nes kiekviename PGR etape reikėjo keletą kartų atidaryti mėgintuvėlius, įdėti reakcijos reagentus arba pirmosios reakcijos produktus lizdinei PGR. Tuo tarpu pagrindinis paruošto vieno mėgintuvėlio nPGR pranašumas buvo tas, kad metodas leido sumažinti tiriamųjų mėginių atsitiktinės kontaminacijos riziką. Rezultatai parodė, kad visų eksperimentų metu nebuvo gauta nė vieno klaidingai teigiamo rezultato, įskaitant ir visas neigiamas kontroles

(2 lentelė). Vieno mėgintuvėlio nPGR jautrumas buvo nustatytas tiriant eksperimentiškai žinomu kiekiu salmonelių užkrėstus mėginius ir pasiekė 150 cfu ar net 15 cfu vienoje reakcijoje (2 lentelė). Tai gerokai didesnis jautrumas, nei dažniausiai pasiekiamas atliekant įprastą PGR. Būtina pažymėti, kad ženklūs skirtumai ($p < 0,05$) tarp gautų ir lauktų rezultatų tiriant mėginius, kuriuose buvo mažai salmonelių (15 or ≤ 1.5 cfu/100 μ l), rodo, kad salmonelių pirminio gausinimo etapas būtinas, kai norima pasiekti didesnę nPGR jautrumą ir pasikartojančius rezultatus. Šie faktai patvirtinti ženkliu 15 cfu/g salmonelių kiekio padidėjimu jau po 4 valandų pirminio gausinimo sultinyje (Pav.). Vieno mėgintuvėlio nPGR panaudojimas padidino salmonelių nustatymo limitą fekalijose, nes įprasta PGR buvo galima salmoneles identifikuoti tik esant labai didelei jų koncentracijai eksperimentiškai užkrėstame fekalijų mėginyje.



Pav. Teigiamų mėginių skaičius, gautas vieno mėgintuvėlio lizdine PGR ištyrus fekalijų mėginius, eksperimentiškai užkrėstus 15 CFU/g salmonelių kultūra ir skirtingą laiką gausintus mėsos peptono sultinyje. (*Salmonella* spp. fekalijų mėginiai atskiesti BWP santykiu 1:10 ir 0,1ml naudotas DNR ekstrakcijai)

Tyrimai įrodė, kad vieno mėgintuvėlio nPGR rezultatams salmonelių serotipas įtakos neturėjo. Vadinas, paruoštas vieno mėgintuvėlio nPGR metodas galėtų būti plačiai taikomas epidemiologiniuose tyrimuose, kur ūkyje gali būti salmonelių nešiotojų ir gali būti nustatyta keletas skirtingų salmonelių serotipų. Vieno mėgintuvėlio nPGR metodas su eksperimentiškai užkrėstais 15 cfu/g salmonelių mėginiais po 18 val. pirminio gausinimo BWP parodė teigiamus rezultatus su abiem tirtais salmonelių serotipais. Be to, tie patys mėginiai parodė teigiamus rezultatus jau po 4 val.

pirminio fekalijų mėginių inkubavimo BWP. Santykinis tikslumas, jautrumas ir specifiškumas neparodė skirtumo tarp gautų ir lauktų rezultatų. Reikėtų pažymėti, kad 4 val. pirminė fekalijų mėginių inkubacija vandens peptono sultinyje ir vieno mėgintuvėlio nPGR leido nustatyti *S. typhimurium* ir *S. choleraesuis* per 10–12 valandų. Tai gerokai trumpiau nei atliekant įprastinę mikrobiologinę salmonelių diagnostiką. Pritaikius paruoštą nPGR metodą, pirminis salmonelių gausinimo trukmė ir nustatymas sutrumpėjo nuo 5–7 parų taikant standartinį kultivavimo metodą iki mažiau nei 10 valandų.

Gauti rezultatai taip pat rodo, kad paruoštą vieno mėgintuvėlio nPGR metodą galima taikyti ir tiriant natūraliai salmonelėmis užkrėstus mėginius, atsitiktinai surinktus iš įvairių Lietuvos kiaulininkystės ūkių. 150 fekalijų mėginių palyginamieji tyrimai įrodė, kad nPGR buvo jautresnis nei įprasta salmonelių kultivavimo metodika, padėjusi nustatyti 32% ir 24% teigiamų mėginių (3 lentelė). Nepaisant to, kad teigiamų mėginių skaičius padidėjo iki 51 (34%), kai buvo sujungti 150 fekalijų mėginių kultivavimo ir nPGR rezultatai, mūsų paruoštu metodu negalėjome identifikuoti trijų mėginių (5,9%), kurių patogenas buvo nustatytas įprastu mikrobiologiniu kultivavimo metodu.

Gauti duomenys taip pat rodo, kad vieno mėgintuvėlio nPGR metodas po 4 val. fekalijų mėginio inkubavimo pirminio gausinimo terpėje buvo daug jautresnis, nei salmonelių nustatymas kultivavimo metodu (3 lentelė). Tai leidžia manyti, kad šis nPGR metodas galėtų būti taikomas vienas kaip greitas *Salmonellas* spp. rutininės stebėsenos metodas kiaulių fekalijų mėginiuose. Reikėtų taip pat pažymėti, kad paruoštas nPGR metodas leido fekalijose patvirtinti teigiamus mėginius genties lygiu, tačiau nenustatė rūšies ar serotipo. Kita vertus, epidemiologiniams tyrimams arba stebėsenos tikslams rūšies ar salmonelių serotipo nustatymas nėra labai svarbus, ypač kiaulininkystės ūkiuose, kur salmonelėmis užsikrečiama labai dažnai ir kur daugiau nei vienas salmonelių serotipas buvo izoliuotas (Feder et al., 2001). Kadangi kiaulių salmoneliozė gali padaryti ne tik ekonominių nuostolių, bet ir daug žalos žmonių sveikatai, reikalingi labai greiti, tikslūs ir jautrūs salmonelių nustatymo metodai. Anksčiau PGR buvo taikoma patvirtinti salmonelių mikrobiologinio tyrimo rezultatus. Tačiau šių tyrimų duomenys įrodo, kad paruoštas vieno mėgintuvėlio nPGR metodas dėl didelio jautrumo, tikslumo, specifiskumo ir atlikimo greičio galėtų būti greitas testas nustatant *Salmonella* spp. kiaulių fekalijų mėginiuose. Gauti rezultatai taip pat leidžia šį nPGR metodą pritaikyti ir maisto produktų kontrolei, kai reikia labai greitai, per vieną dieną, patikrinti įtartinus produktus.

Literatūra

- Amavisit P., Browning G. F., Lightfoot D., Church S., Anderson G. A., Witherar K. G., Markham P. F., 2001. Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. *Vet. Microbiol.* 79, 63–74.
- Arnold T., Scholz H. C., Marg H., Rosler U., Hensel A., 2004. Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *Salmonella* in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. *J. Vet. Med. B* 51, 459–463.
- Burkhalter P.W., Muller C., Luthy, J., Cardian U., 1995. Detection of *Salmonella* spp. in eggs: DNA analyses, culture techniques, and serology. *J. AOAC Internat.* 78, 1531–1537.
- Feder, I., Nietfeld, J. C., Galland, J., Yeary, T., Sargeant, J. M., Oberst, R., Tamplin, M. L. and Luchansky J. B., 2001. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2477–2484.
- Galan J.E., Ginocchio C., Costeas P., 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174, 4338–4349.
- Gentry-Weeks C., Hutcheson H. J., Kim L. M., Bolte D., Traub-Dargatz J., Morley P., Powers B., Jessen M., 2002. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1487–1492.
- Lantz P. G., Matsson M., Wadstrom T., Radstrom P., 1997. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Microbiol. Methods.* 28, 159–167.
- Liu T., Liljebjelke K., Bartlett E., Sanches S., Maurer J. J., 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection *Salmonella* in poultry environment. *J. Food Prot.* 65, 1227–1232.
- Malorny B., Hoorfa J., Bunge C., Helmuth R., 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 290–296.
- McGoldrick A., Bensaude E., Ibata G., Sharp G., Paton D.J., 1999. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J. Virol. Methods* 79, 85–95.
- McOrist A., Jackson M., Bird A., 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J. Microbiol. Methods.* 50, 131–139.
- Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry K. G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J., Megraud T., 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35, 995–998.
- Oliveira S. D., Rodenbusch C. R., Rocha M. C. Ce. S. L., Canal C. W., 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 217–221.
- Oliveira S. D., Santos L. R., Schuch D. M., Silva A. B., Salle C. T., Canal C. W., 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87, 25–35.
- Rahn, K., De Grandis S. A., Clarke R. C., McEwen S. A., Galan J. E., Ginocchio C., Curtiss R. III, Gyles C. L., 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probe* 6, 271–279.
- Schrank I. S., Mores M. A., Costa J. L., Frazzon A. P., Soncini R., Schrank A., Vainstein M. H., Silva, S. C., 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect salmonella in poultry industry products and clinical samples. *Vet. Microbiol.* 82, 45–53.
- Stadejek T., Stankevicius A., Storgaard T., Oleksiewicz M. B., Belak S., Drew T.W., Pejsak Z., 2002. Identification on radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Eastern Europe: Towards a common ancestor for European and American viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 1861–1873.
- Waage A. S., Vardund T., Lund V., Kapperud G., 1999. Detection of low number of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by nested polymerase chain reaction assay. *J. Appl. Microbiol.* 87, 418–428.
- Whyte P., Gill K. Mc., Collins J.D., Gormley E., 2002. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet. Microbiol.* 86, 53–60.