

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

STIPE BRKIĆ

**Dokaz bakterija iz roda *Salmonella* u uzorcima podrijetlom od peradi različitim
molekularnim metodama**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Naziv zavoda: Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik: doc. dr.sc. Željko Gottstein

Mentori: doc.dr.sc. Željko Gottstein

doc.dr. sc. Danijela Horvatek Tomić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Estella Prukner-Radovčić
2. Doc. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
3. Doc. dr. sc. Željko Gottstein

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	2
2.1. BAKTERIJE RODA SALMONELLA	2
2.2. SALMONELLA U PERADI	2
2.3. DIJAGNOSTIKA SALMONELLA	3
2.3.1. Antigeni Salmonella	3
2.3.2. Izdvajanje Salmonella	4
2.3.3. Molekularna dijagnostika	5
2.3.3.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RealTime PCR)	5
2.3.3.2. LAMP metoda	6
2.4. KONTROLA I SUZBIJANJE SALMONELA	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. UZORCI I PRETRAŽENE BAKTERIJE	10
3.2. IZDVAJANJE UKUPNE DNK	10
3.3. REALTIME PCR I LAMP POČETNICE I PROBE	10
4. REZULTATI	14
5. RASPRAVA	15
6. ZAKLJUČCI	17
7. LITERATURA	18
8. SAŽETAK	20
9. SUMMARY	21
10. ŽIVOTOPIS	22

1. UVOD

Salmoneloze peradi predstavljaju jednu od najvažnijih skupina bolesti domaće peradi koje se suzbijaju kako bi se spriječilo širenje između same peradi, ali i na čovjeka. Uzrokuju ih bakterije iz roda *Salmonella* kojeg čini više od 2.463 serovarova. Stoga, kako bi se u što kraćem vremenskom periodu mogla provesti dijagnostika i dokazati prisustvo ovih bakterija važno je koristiti brze metode, naročito molekularne.

Cilj diplomskog rada je usporedba dvije molekularne dijagnostičke metode, Real Time PCR-a i LAMP-a, u dokazu genoma mikroorganizma iz roda *Salmonella* u laboratorijskim uzorcima podrijetlom od peradi s ciljem analize vremena dobivanja pozitivnih rezultata, kao i diskriminacije pozitivnih i lažno pozitivnih rezultata.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Bakterije roda *Salmonella*

Bakterije iz roda *Salmonella* dio su porodice *Enterobacteriaceae* i čini ih više od 2.463 serovarova. Klasifikacija *Salmonella* temelji se na svojstvima flagelarnog i somatskog antigena. Obično su nazvane prema mjestu prvog izdvajanja, iako nova taksonomija predlaže podjelu u pet podrodova zbog neznčajnih razlika (HAJSIG i sur., 2005.). U pokušaju pojednostavljivanja, sve su *Salmonelle*, na osnovu hibridizacijskih analiza DNK podijeljene na dvije vrste; *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. *S. enterica* podijeljena je u 6 podvrsta: *S. enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* i *indica*, s tim da je *S. enterica* subsp. *enterica* dodatno podijeljena u serovarove (BIĐIN, 2008). Serovarovi koji pripadaju podvrsti *S. enterica* subsp. *enterica* najčešće su izdvojeni izolati (više od 99,5 % izolata salmonela) i označeni su imenima koja se ne pišu kurzivom jer ne predstavljaju vrste (npr. serovar Typhimurim, Enteritidis, Dublin) (HERAK-PERKOVIĆ i sur., 2012.). *Salmonelle* su bakterije štapičasta oblika, veličine $0.7-1.5 \times 2-5 \mu\text{m}$. Većina sojeva kreće se pomoću peritrihijih flagela, osim pripadnika serovarova *S. Gallinarum* i *S. Pullorum*, koji nisu pokretljivi. Boje se gram-negativno. Kao i druge enterobakterije salmonela su kemoorganotrofne bakterije koje imaju respiracijski i fermentacijski tip metabolizma. Fakultativni su anaerobi. Optimalna temperatura rasta je 37 °C. Za salmonela je karakteristično da tvore enzime katalazu, lizin dekarboksilazu i ornitin-dekarboksilazu, a ne proizvode oksidazu. Koriste se citratima kao jedinim izvorom ugljika, daju pozitivnu MR reakciju i proizvode H₂S, ne hidroliziraju ureju, ne tvore indol i VP reakcija je negativna. Glukozu razgrađuju uz tvorbu kiselina, a redovito i plina. Ne fermentiraju laktozu, saharozu, adonit i salicin (HAJSIG i sur., 2005.).

2.2. *Salmonella* u peradi

Tipovi *Salmonella* koji zaražavaju perad mogu se svrstati u tri skupine. Prvu skupina čine zaraze s dva najopasnija serovara *S. Pullorum* i *S. Gallinarum*, drugu skupinu čine različiti serovarovi koji kod peradi često ne uzrokuju sistavne septikemije, ali su glavni uzročnik trovanja hranom kod ljudi i nazivaju se paratifikusne infekcije. Treću skupinu čine različiti opasniji sojevi *S. Arizonae* koji su uzročnici bolesti osobito u purana (BIĐIN, 2008). *S. Pullorum* uzrokuje u pilića bolest poznatu pod nazivom bijela griža pilića odnosno puloroza. Obično obole pilići i purani u dobi od dva do tri tjedna. Bolest se očituje proljevom s izmetom bijele boje, a ponekad i artritisom. Patomorfološki nalaz ističe se nalazom bijelih čvorića na

plućima te fokalnom nekrozom jetre i slezene. Smrtnost može biti vrlo visoka. Odrasle su kokoši često latentno inficirane te nose uzročnika u jajniku i šire infekciju tom salmonelom jajima (vertikalni prijenos). *S. Gallinarum* uzročnik je kokošjeg tifusa od kojeg češće obolijeva odrasla perad, ali mogu oboljeti i pilići s jednakim znakovima kao i pri infekciji sa *S. Pullorum*. U oboljelih kokoši javlja se proljev s primjesama zelenkaste boje. Smrtnost ovisi o virulenciji uzročnika i otpornosti životinje, a može iznositi više od 50%. Latentno inficirane kokoši šire infekciju vertikalno i horizontalno (HAJSIG i sur., 2005.). Salmonelna zaraza ili paratifus je zajednički naziv za zaraze uzrokovane salmonelama različitim od *S. Pullorum* ili *S. Gallinarum*, a što se u ljudi očituju simptomima koji variraju od jake crijevne groznice do blagog trovanja hranom (MEZAL i sur., 2013). Odrasla perad u načelu rijetko oboli klinički, ali je zato klinička bolest puno češća u pilića kao posljedica sasvim rane prenatalne ili postnatalne zaraze. Danas su u peradi najvažnija zaražavanja bakterijama *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Arizonae*, *S. Virchow*. Treba razlikovati bolest od zaraze jer se zaraziti mogu sve kategorije komercijalnih kokoši i drugih vrsta ptica, a o bolesti se govori tek kada se pojave simptomi. Paratifus je čest u svim fazama stočarske proizvodnje (HAJSIG i sur., 2005.).

2.3. Dijagnostika *Salmonella*

2.3.1. Antigeni *Salmonella*

Salmonelle posjeduju različite antigene od kojih su u dijagnostičkom smislu važni somatski (O), kapsularni (Vi) i flagelarni (H) antigeni (HAJSIG i sur., 2005). Somatski antigeni su po kemijskom sastavu ugljikohidrati i oni su termostabilni. Označavaju se arapskim brojevima. Pojedini serovarovi obično imaju više O antigena, a prema zajedničkim somatskim antigenima svrstani su u serološke skupine, označene velikim slovima od A do Z, odnosno slovima i brojkama ako se skupina dijeli na podskupine. Kapsularni Vi antigen je polisaharidne građe, a imaju ga samo pojedini serovarovi (*S. Paratyphi*, *S. Typhi* i *S. Dublin*). Taj antigen služi kao receptor za bakteriofage, a njegova prisutnost u nekom soju upućuje na virulenciju soja prema čemu je i dobio tu oznaku (LUDERITZ i sur., 1966). Vi antigen sprečava aglutinaciju s protutijelima za asomatske antigene budući da ih izvana prekriva. Po kemijskom sastavu H antigeni pripadaju bjelančevinama flagela (flagelinima) pokretljivih sojeva salmonela. Ti su antigeni termolabilni. U većini pokretljivih *Salmonella* nalaze se u antigenskom smislu dvije varijante flagela, pa se u tih serovarova razlikuju H antigeni "specifične faze i nespecifične faze" (HAJSIG i sur., 2005.). U svakoj fazi može biti jedan ili

više H antigena koji se označavaju malim slovima abecede ili brojkama. Dokazivanjem H antigena *Salmonelle* se dijele unutar pojedinih skupina u serovarove (BROADBENT i sur., 2010.).

2.3.2. Izdvajanje *Salmonella*

Dijagnostika se provodi izdvajanjem i tipizacijom uzročnika. Za bakteriološku pretragu najbolje je koristiti organe oboljelih životinja, kao što su jetra, slezena, žumanjčana vrećica, cekum i jajni folikuli. Za izdvajanje salmonela iz sadržaja crijeva i drugog kliničkog materijala koji sadržava različite bakterije upotrebljavaju se selektivne tekuće i čvrste hranjive podloge, od kojih su pojedine istodobno i diferencijalne (HAJSIG i sur., 2005.). Dodatkom anilinskih boja (briljantinskog zelenila), teških kovina (bizmuta), pojedinih kemikalija (selenita, dezoksikolata) i antimikrobnih spojeva (kloramfenikola, vankomicina, neomicina, novobiocina), u tim se podlogama selektivno slabije ili jače uspori razmnožavanje ostalih bakterija, posebice enterobakterija. Najpoznatije hranjive podloge što služe za selektivno izdvajanje salmonela su SS-agar (*Salmonella-Shigella* agar), XLD-agar (ksiloza-lizin-dezoksikolat agar), briljantin-zeleni agar, te tetrationsatni bujon po Kauffmann-Mulleru (SORIA i sur., 2011). Dodatkom indikatora, pojedinih ugljikohidrata i drugih tvari te podloge mogu istodobno poslužiti za razlikovanje *Salmonella* od ostalih enterobakterija. Primjerice, briljantin-zeleni agar sadržava pepton kao osnovni hranjivi sastojak, anilinsku boju briljantinsko zelenilo koja djelomice koči rast enterobakterija, osim *Salmonella*, šećere laktozu i saharozu, te indikator fenolno crvenilo, koji je pri kiselom pH (pH 6,4) žute boje, a pri lužnatom (pH 8,2) crvene boje (HAJSIG i sur., 2005.). Budući da većina *Salmonella* ne razgrađuje laktozu i saharozu, a razgradnjom peptona nastaju lužnate tvari, pri uzgoju bakterija hranjiva podloga i kolonije oboje se crveno. Selektivnost XLD agaru daje Nadezoksikolat koji koči rast ostalih enterobakterija (RUIZ i sur., 1996.). U svrhu razlikovanja *Salmonella* od drugih enterobakterija, XLD-agar sadržava šećere laktozu, saharozu i ksilozu, aminokiselinu lizin, kemikalije za dokazivanje tvorbe sumporovodika i indikator (fenolno crvenilo). Porastu li na toj podlozi salmonele, hranjiva podloga i kolonije tih bakterija su crvene boje jer *Salmonelle* redovito ne fermentiraju saharozu i laktozu. U početku fermentacijom ksiloze tvore kiselinu, ali kiseli pH poslije neutraliziraju lužnati sastojci koji nastaju dekarboksilacijom lizina. Većina salmonela tvori sumporovodik, pa njegovim spajanjem sa željezom, kojeg također ima u hranjivoj podlozi, nastane željezni sulfid koji središnji dio tih kolonija oboji crno (HAJSIG i sur., 2005.). Tetrationsatni bujon po Kauffmann-Mulleru je vrlo dobra tekuća selektivna podloga, osobito prikladna za izdvajanje

Salmonella iz uzorka koji ih sadržavaju u malom broju. Tijekom inkubacije u tetrationskom bujonu *Salmonelle* se razmnože (obogaćivanje materijala salmonelama), pa ih je lakše dokazati naknadnim precjepljivanjem bujonske kulture na odgovarajuće čvrsta hranjive podloge nego izravnim nacjepljivanjem materijala na čvrste podloge (SORIA i sur., 2011.).

Materijal za pretragu istodobno se nacjepljuje na čvrste i tekuće selektivne hranjive podloge, koje se inkubiraju 48 sati pri 37°C. Nakon inkubacije od 24 i 48 sati sadržaj tekućih kultura procjepljuje se na čvrste hranjive podloge. Izmet za koje se sumnja da sadržava specifične serovarove za pojedine životinjske vrste treba nacijepiti na posebne podloge za obogaćivanje jer se teško izdvajaju na uobičajenim selektivnim hranjivim podlogama. Nakon izdvajanja sumnjivih kolonija, pripadnost rodu *Salmonella* određuje se na osnovi istraživanja uzgojnih i biokemijskih osobina izolata. Pojedini serovarovi unutar roda određuju se reakcijom brze aglutinacije na predmetnici, koristeći komercijalno dostupne polivalente i monovalentne antiserume za salmonelne O antigene i flagelarne antigene prve i druge faze (HAJSIG i sur., 2005.). U serološkom dijagnosticiranju salmoneloze peradi koju uzrokuju serovarovi *S. Pullorum* i *S. Gallinarum* uspješno se upotrebljava brza krvna i brza serumska aglutinacija s obojenim antigenom. Nalaz protutijela može se očekivati najranije za dva do tri tjedna nakon infekcije. U određivanju titra protutijela upotrebljavaju se reakcija spore aglutinacije, lateks-aglutinacija, reakcija vezanja komplemenata i imunoenzimni test (NIELSEN i sur., 1995.)

2.3.3. Molekularna dijagnostika

U dijagnostici bakterija roda *Salmonella* koriste se i molekularne metode, posebno metoda PCR (eng. Polymerase Chain Reaction; hrv. lančana reakcija polimerazom) te u novije vrijeme i LAMP (eng. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*; hrv. petljom posredovano izotermalno umnažanje) (NOTOMI i sur., 2000.).

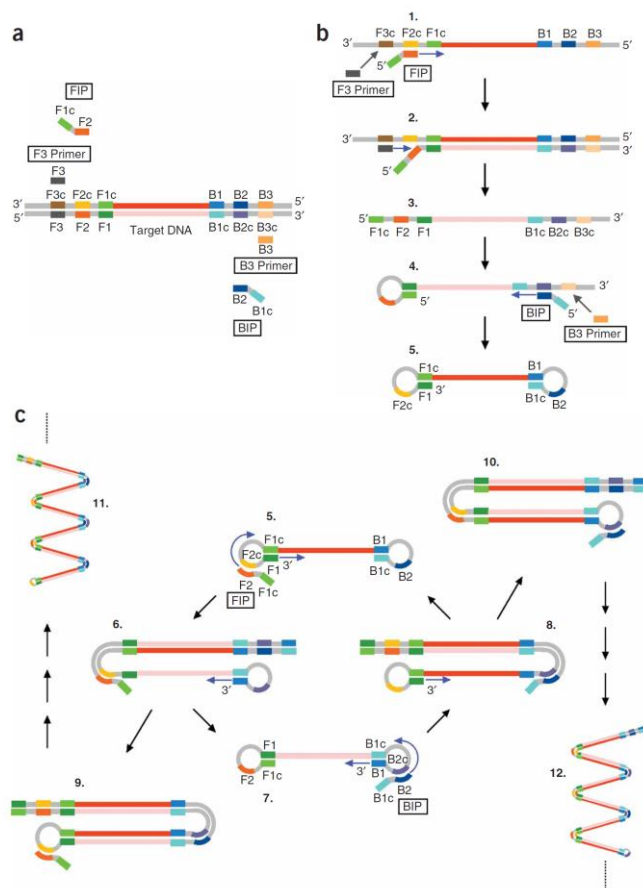
2.3.3.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RealTime PCR)

Klasična metoda PCR je semikvantitativna te je stoga potreba za preciznijom kvantifikacijom nukleinskih kiselina (DNK/RNK) dovela do razvoja tehnike nazvane lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RealTime PCR) (LÖFSTRÖM i sur., 2010.). RealTime PCR je pouzdana i precizna metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNK te je stoga i metoda izbora u dijagnostici salmonela. Za reakciju su potrebne vrlo male količine DNK/RNK što omogućava upotrebu ove metode u slučajevima kada na raspolaganju imamo

vrlo male količine tkiva (mikrodisekcija) (MALORNY i sur., 2008). Produkti lančane reakcije polimeraze obilježeni su fluorescentnom bojom te se kontinuirano analiziraju tokom reakcije bilo fluorescentnom bojom (najčešće se koristi SYBR Green) koja se interkalira u dvostruku uzvojnici DNK ili primjenom različitih proba obilježenih fluorescentnom bojom i prigušivačem (Q-quencher), pri čemu se emitira fluorescenciju tek degradacijom probe i razdvajanjem od prigušivača. Dakle, mjerenjem fluorescencije mjerimo nastalu DNK jer količina fluorescencije razmjerna je količini PCR produkta (LÖFSTRÖM i sur., 2010.). Nakon završene PCR reakcije, uređaj se može programirati da načini krivulju taljenja (disocijacijska krivulja), u kojoj se mjeri fluorescencija u odnosu na temperaturu. Tako RealTime PCR određuje i točku taljenja (*melting point*) novonastalog proizvoda, odnosno trenutak u kojem se dva lanca DNK odvoje i fluorescencija naglo prestaje. Ovim provjeravamo specifičnost produkta, jer svi produkti za specifičan par početnica moraju imati istu krivulju taljenja (eng. *melting curve*). Danas se u praksi sve više koriste fluorescencijski obilježeni oligonukleotidi (probe) (Taqman). Metoda se zasniva na korištenju neobilježenih specifičnih početnica te specifične obilježene probe. RealTime PCR koristi se za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju DNK/RNK. Apsolutnom kvantifikacijom možemo precizno odrediti broj kopija u nekom uzorku uspoređujući fluorescenciju sa standardnom krivuljom. Relativnom kvantifikacijom možemo analizirati relativne promjene u količini transkripta (RISTOV i sur., 2007.)

2.3.3.2. LAMP metoda

U dijagnostici *Salmonella* u novije vrijeme koristi se i LAMP (eng. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*; hrv. petljom posredovano izotermalno umnažanje) metoda kojom se, slično kao i PCR reakcijom, umnaža specifičan odsječak genoma. NOTOMI i sur. (2000.) su razvili ovu specifičnu metodu kojom se DNK umnaža u kratkom vremenu s visokom specifičnošću i učinkovitošću u uvjetima stalne temperature.



Slika 1. LAMP metoda (preuzeto iz TOMITA i sur., 2008.)

Mehanizam LAMP reakcije je prikazan na Slici 1. Metoda se temelji na korištenju 4 seta specifično dizajniranih početnica: F3, B3, FIP i BIP, gdje F označava uzlazni smjer umnažanja (*forward*), a B silazni smjer (*backward*). Početnice prepoznaju 6 specifičnih sljedova DNK koje okružuju ciljni fragment koji želimo umnožiti (F1c, F2c i F3c sljedovi se nalaze na 3' kraju dok se B1, B2 i B3 sljedovi nalaze na 5' kraju fragmenta). F3 i B3 početnice su jednostavne i sadrže samo jednu domenu te svaka početnica prepoznaje samo jedan od šest specifičnih sljedova. FIP i BIP su složene i sadrže dvije domene te svaka može prepoznati po dva specifična sljeda. Zbog toga FIP i BiP početnice imaju važnu ulogu tijekom LAMP reakcije te se dodaju u suvišku. (TOMITA i sur., 2008.).

LAMP reakcija se sastoji od dva koraka umnažanja pomoću *Bst*-DNA polimeraze. U prvom koraku se počinje stvarati prva petlja (Slika 1.b), dok se u drugom koraku petlje amplificiraju (Slika 1.c). U prvom koraku, u reakciji su uključena sva četiri seta početnica, s tim da se prvo dodaje FIP početnica te zatim *Bst* DNA polimeraza započinje sintezu. F3 početnica će razdvojiti lance DNA kako sljedeći krug sinteze bude napredovao. Nakon dodavanja BIP i B3 početnica, krajnji produkt amplifikacije će biti struktura s dvije petlje na

krajevima (struktura 5). Drugi korak reakcije, amplifikacija, će ponovnim dodatkom FIB i BIP početnica dovesti do stvaranja strukture 7, od koje se mogu stvoriti produženi produkti (strukture 9-12) ponovljenom elongacijom i recikliranjem (Slika 1.c) (TOMITA i sur.,2008.). Prednost LAMP nad PCR je mogućnost umnažanja nukleinskih kiselina sa većom specifičnošću u izotermalnim uvjetima (NOTOMI i sur., 2000.).

2.4. Kontrola i suzbijanje salmonela

Prema Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju iz 2017. godine (ANON., 2017) određuje se uzimanje uzoraka konzumnih nesilica, rasplodne peradi i tovne peradi vrste *Gallus gallus* radi pretrage na prisutnost bakterija iz roda *Salmonella*, laboratorijsko pretraživanje i mjere koje se provode u slučaju sumnje i/ili potvrđenog slučaja *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Kod rasplodne peradi pretražujemo još i na *S. Hadar*, *S. Infantis* ili *S. Virchow*, također prema Naredbi. U slučaju tovnih i rasplodnih purana, Naredba određuje uzimanje uzoraka radi pretrage na prisutnost *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, što uključuje laboratorijsko pretraživanje, te mjere koje se provode u slučaju sumnje i/ili potvrđenog slučaja neka od ta dva serovara. Prema Nacionalnom programu kontrole salmoneloze peradi koji donosi Uprava za veterinarstvo i koje traje od 1. siječnja do 31. prosinca tekuće godine (ANON., 2016.), određuje se redovno uzimanje uzoraka rasplodnih i tovnih purana i konzumnih nesilica i rasplodne i tovne peradi vrste *Gallus gallus*. Učestalost i vrsta uzorkovanja ovisi o različitoj uzgojnoj skupini i vrsti peradi. Ako govorimo o uzimanju uzoraka iz valionice, tada uzimamo vidno uprljanje podloške košarica za valenje i ljuske razbijenih jaja uzetih iz više različitih odvojenih košarica za valenje. Kod ostalih uzgojnih nastambi uzimamo skupne uzorke fecesa koji se pojedinačno uzimaju na što više različitih mjesta u nastambi za uzgoj peradi. U uzorcima iz jata koji se drže u kavezima uzorkujemo feces iz pokretnih vrpca za prikupljanje izmeta, strugača ili dubokih jama ovisno o tipu kaveza. Kod uzoraka navlake za obuću, gdje se navlake za obuću stavljaju na obuću i uzorci se uzimaju šetanjem po nastambi peradi, a same navlake moraju imati zadovoljavajuću apsorpcijsku sposobnost upijanja vlage. Površinanavlake za obuću mora biti natopljena odgovarajućom otopinom (0.8% fiziološka, 0,1% peptonska dionizirana voda). Prije slanja i dostave, sve uzorke po skupini treba staviti u puferiranu peptonsku vodu (BPW) koja je prije toga ugrijana na sobnu temperaturu. Svi uzorci se moraju dostaviti u službeni laboratorij u roku 24 sata od prikupljanja ili ih treba držati u hladnjaku ako nismo u mogućnosti poslati ih u roku 24 sata. U laboratoriju se uzorci moraju čuvati na hladnom

mjestu do ispitivanja, koje mora započeti u roku 48 sati nakon primitka ili najkasnije 96 sati nakon uzorkovanja.

Otkrivanje relevantnih serotipova salmonele provodi se u skladu s Izmjenom 1. norme EN/ISO 6579-2002/Amd1:2007. „Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. – Izmjena 1.: Prilog D: Otkrivanje *Salmonelle* spp. u fekalijama životinja i uzorcima okoliša u primarnoj fazi proizvodnje” (ANON., 2007.). U pogledu uzoraka navlaka za obuću, uzoraka prašine i drugih fekalnih materijala moguće ih je ujediniti za daljnje kultiviranje. Za to treba inkubirati oba uzorka u BPW. Od svakog uzorka treba oduzeti 1 ml inkubirane BPW i temeljito promiješati, zatim od nje oduzeti 0,1 ml mješavine i nacijepiti je na pločice MSRV (metoda s polutvrdom podlogom po Rappaport-Vassiliadis). Na početku inkubacije uzoraka u BPW ne smije se miješati, vrtiti i tresti nakon inkubacije jer to ispušta inhibitorne čestice i smanjuje mogućnost kasnije izolacije na MSRV. Iz svakog pozitivnog uzorka tipizira se barem jedan izolat po shemi Kaufmann-White.

Svako jato u kojem se laboratorijskom pretragom dostavljenih uzoraka utvrdi prisutnost relevantnih serovarova salmonela nadležni veterinarski inspektor mora ovlaštenoj veterinarskoj organizaciji narediti ponovno uzorkovanje iz sumnjivih jata te njihovu žurnu dostavu u nacionalni referentni laboratorij. Dodatni uzorak mora biti pretražen bakteriološki i serološki. Tokom sumnje na relevantne serovarove *Salmonelle* u jatu nadležni veterinarski inspektor mora posjedniku životinja narediti provedbu mjera, a to su zabrana premještanja peradi i jaja s gospodarstva, zabrana valenja jaja podrijetlom od jata sumnjivih na salmonelozu, zabranu premještanja hrane za životinje i zabranu iznošenja gnoja s gospodarstva. Treba provesti odgovarajuće čišćenje, pranje i dezinfekciju prostorija, opreme, pribora, vozila na mjestima proizvodnje i skladištenja odgovarajućim dezinfekcijskim sredstvom. Takve mjere ostaju na snazi sve dok se dodatnim laboratorijskim pretraživanjem ne isključi prisutnost relevantnih serovarova *Salmonelle*. Ukoliko se potvrdi prisutnost navedenih serovarova takvo se jato smatra zaraženim te nadležni veterinarski inspektor mora narediti provedbu mjera koje se sastoje od zabrane korištenja antimikrobnih sredstava u svrhu liječenja peradi oboljelih od salmoneloze, sva perad u pozitivnom jatu mora biti uništena ili zaklana kako bi se u najvećoj mogućoj mjeri smanjio rizik od daljnjeg širenja salmonele, neškodljivo ukloniti gnoj, također treba provesti odgovarajuće čišćenje prostorija, aparata, pribora i vozila na mjestima proizvodnje i skladištenja hrane za perad s time da se po završetku dezinfekcije bakteriološki kontrolira njezina učinkovitost i nema uvođenja nove peradi u objekt do dobivanja negativnog rezultata kontrole učinkovitosti dezinfekcije.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci i pretražene bakterije

U istraživanju je korištena *S. Enteritidis* kao pozitivni uzorak, namnožen na hranjivoj podlozi u laboratoriju Zavoda za bolesti peradi s klinikom, te uzorci podrijetlom s farmi peradi kao što su obrisci kloake, opreme, organi lešina i sl.

3.2. Izdvajanje ukupne DNK

Ukupna DNK izdvojena je korištenjem komercijalnog kita *GenEluteTM* (Sigma, Njemačka), prema uputi proizvođača. Izdvojena DNK čuvana je do analize na -20 °C.

3.3. RealTime PCR i LAMP početnice i probe

Za dokaz bakterija iz roda *Salmonella* LAMP postupkom korištene su prethodno objavljene LAMP početnice koje umnažaju *fim Y* gen (TANG i sur., 2012.). Korišteno je šest početnica (FIP, BIP, F3, B3, LF i LB) čije su sekvence prikazane u Tablici 1. Također, za dokaz istih bakterija postupkom RealTime PCR primjenom TaqMan probe korištene su također prethodno objavljene početnice i TaqMan proba obilježena FAM bojom (TOMITA i sur., 2008.) koje umnažaju odsječak *ttr* gena (Tablica 1.).

Svaki uzorak analiziran je u duplikatu, uz pozitivnu (*S. Enteritidis*) i negativnu kontrolu (ultračista voda) (Slika 2.).

Tablica 1. LAMP i Real Time PCR početnice i probe.

Početnica	Sekvenca
FIP	5' GCACGTCAGCAAAGCGTACCTT-GGGAAGGTTAAGGAGGGTGA 3'
BIP	5' AGAGGCGCCTTGCGCTAAAG-CCAAACCTCGCTTATCGGAA 3'
F3	5' CGAAGAAAGCTTTGCCTGTG 3'
B3	5' CAGTACGCGAAGCCTTGTT 3'
LF	5' CGTGTAGTTTACCGGCTTAAACAA 3'
LB	5' CAATCATCAACCAGTCAGTACGGC 3'
qRT-PCR F	5'- CTCACCAGGAGATTACAACATGG-3'

qRT-PCR R	5'- AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC-3'
qRT-PCR Proba	5'-[FAM] CG+ACGGCG+AG+ACCG[BHQ]-3'

a)

All	1	2	3	4	5
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
A	REF 1 FAM	REF 5 FAM	REF 9 FAM	REF 13 FAM	REF 17 FAM
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
B	REF 1 FAM	REF 5 FAM	REF 9 FAM	REF 13 FAM	REF 17 FAM
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC
C	REF 2 FAM	REF 6 FAM	REF 10 FAM	REF 14 FAM	REF 18 FAM
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC
D	REF 2 FAM	REF 6 FAM	REF 10 FAM	REF 14 FAM	REF 18 FAM
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	
E	REF 3 FAM	REF 7 FAM	REF 11 FAM	REF 15 FAM	
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	
F	REF 3 FAM	REF 7 FAM	REF 11 FAM	REF 15 FAM	
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	
G	REF 4 FAM	REF 8 FAM	REF 12 FAM	REF 16 FAM	
	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	
H	REF 4 FAM	REF 8 FAM	REF 12 FAM	REF 16 FAM	

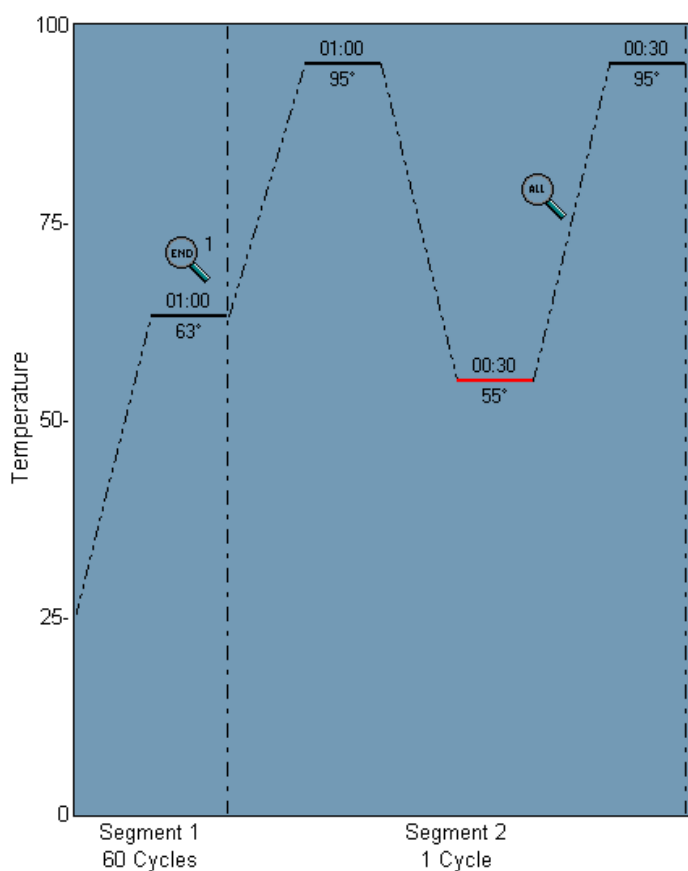
b)

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown 12.88											
B	Unknown 12.54											
	Unknown											
C	46.76 Unknown											
D	52.00 NTC											
	NTC											
E	59.19 NTC											
	NTC											
F	No Ct 3											
G												
H												

Slika 2. Organizacija uzoraka u duplikatu pri izvođenju a) Realtime PCR i b) LAMP reakcije.

Analize su provedene u plastičnim tubicama zapremine 0,2 ml (stripovi od 8 tubica) s prikladnim čepovima s ravnim prozirnim poklopcem kako bi se mogla očitati reakcija.

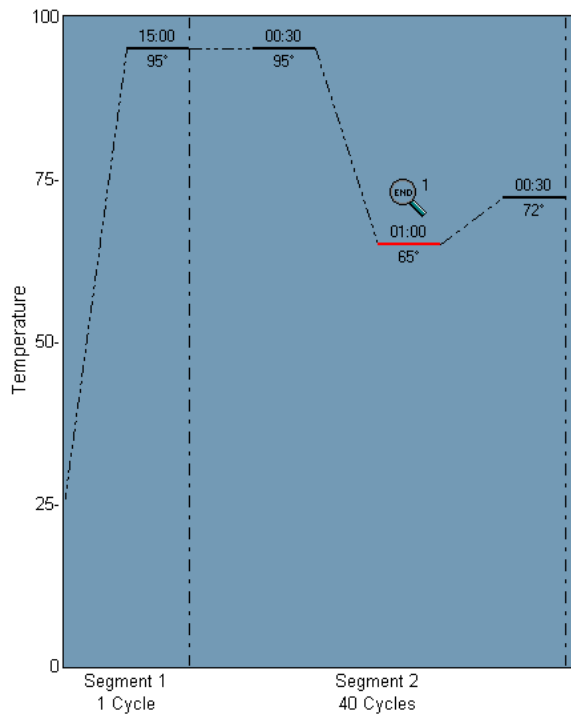
LAMP reakcija provedena je u 20 μl reakcijske smjese koja sadrži: 1 μl BST polimeraze (8U/ μl) uz 2 μl pripadajućeg pufera (10x) (NewEngland Biolabs, SAD), 1 μl dNTP (Promega, SAD), 1 μl Sybr Safe DNA gel stain (20x) (Life technologies, SAD), 6,7 μl vode, početnica u količini 0,4 μl 100 μM FIP, 0,4 μl 100 μM BIP, 0,5 μl 10 μM F3, 0,5 μl 10 μM B3 početnice, 2 μl 10 μM LoopB, 2 μl 10 μM LoopF, i 5 μl DNK. Reakcija je optimizirana na 63°C i analizirana na uređaju Mx3005p (Stratagene, SAD) uz primjenu računalnog programa MxPro (Stratagene, SAD) iočitavanje SYBR green fluorescencije nakon svakog ciklusa od jedne minute tijekom 60 ciklusa, uz naknadno očitavanje disocijacijske krivulje (Slika 3.).



Slika 3. Temperaturna krivulja LAMP reakcije (segment 1-LAMP reakcija, segment 2-očitavanje disocijacijske krivulje).

RealTime PCR reakcijaprovedena je u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala: 12,5 μl Universal Mastermix 2X (Promega, Njemačka), 1 μl svakog primera (25 μM) (Sigma, Njemačka), 0,6 μl probe (1 μM) (Sigma, Njemačka), 0,2 μl ROX (1 μM) (Promega, Njemačka), 5,7 μl deionizirane vode i 4 μl DNK. Rezultati su očitani također na uređaju

Mx3005P (Stratagene, SAD) uz primjenu računalnog programa MxPro (Stratagene, SAD) pri slijedećim uvjetima: 95 °C 15 minuta, umnažanje tijekom 40 ciklusa s denaturacijom pri 95 °C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica pri 65 °C tijekom 60 sekundi i ekstenzijom pri 72 °C tijekom 30 sekundi na čijem kraju se i očitava fluorescencija (Slika 4.).



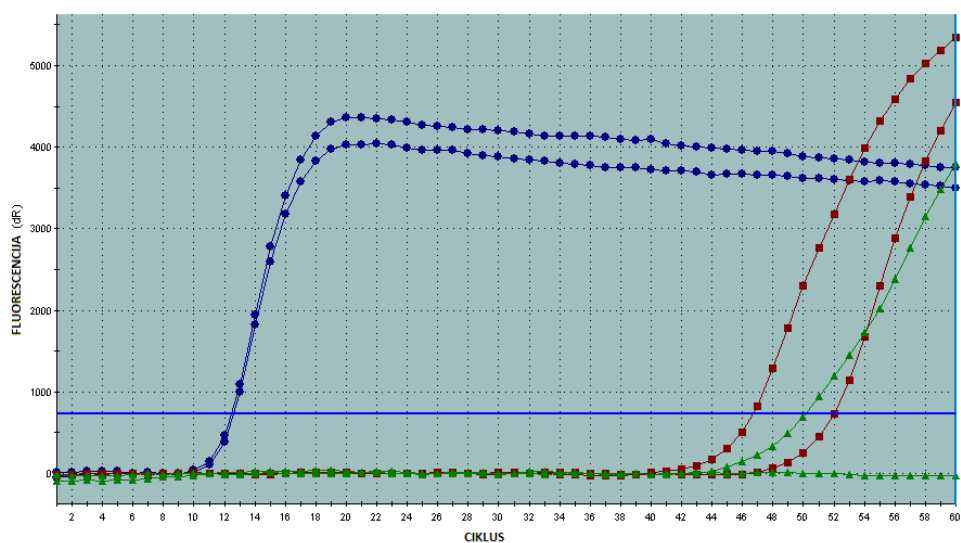
Slika 4. Temperaturna krivulja RealTime PCR reakcije.

Reakcija se smatra pozitivnom ukoliko je došlo do razvoja amplifikacijske krivulje prije 39. ciklusa kod RealTime PCR reakcije, tj. Ct vrijednost je ispod 39 ili ukoliko se uz nastanak amplifikacijske krivulje kod LAMP reakcije disocijacijska krivulja uzorka poklapa s disocijacijskom krivuljom pozitivne kontrole.

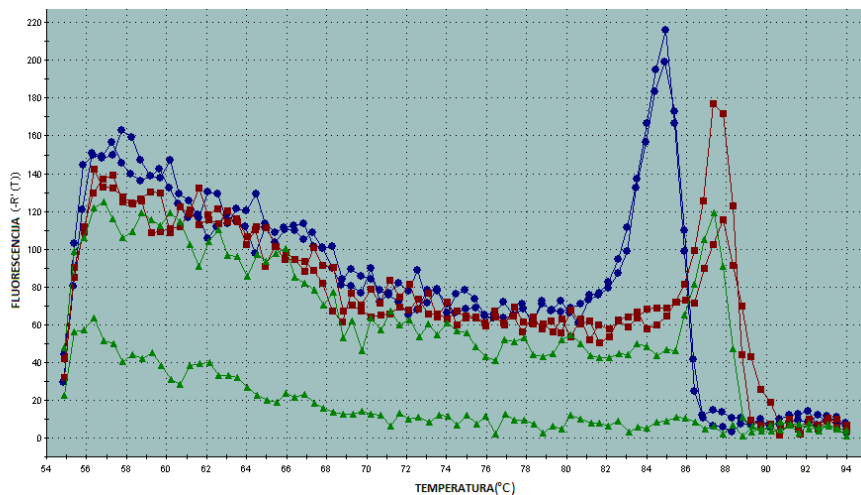
4. REZULTATI

Rezultati analize uzoraka LAMP metodom pokazuju da se amplifikacijska krivulja počinje uzdizati već nakon 10 minuta reakcije za pozitivni uzorak. No, nakon 45 minuta dolazi i do pojave amplifikacije u negativnom i nepoznatom uzorku (Slika 5.).

Analiza disocijacijske krivulje pokazuje da je ona različita između pozitivne kontrole i nepoznatog i negativnog uzorka što potvrđuje da su negativni i nepoznati uzorak negativni (Slika 6.).

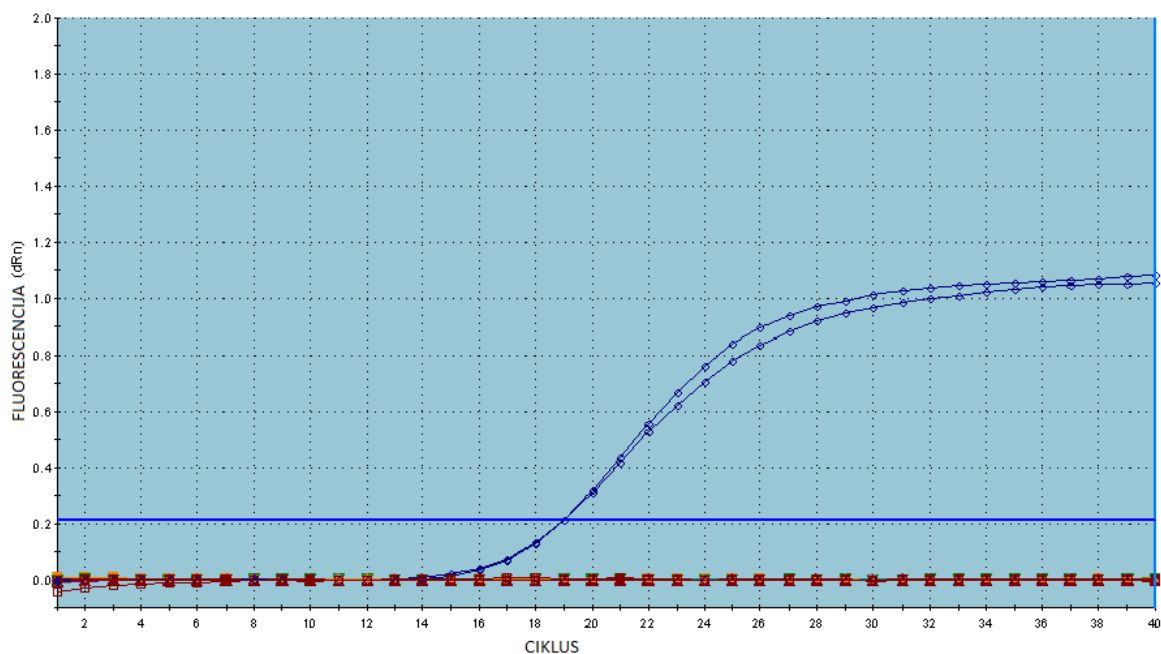


Slika 5. Prikaz amplifikacijskih krivulja kod LAMP metode (plavo- pozitivna kontrola, crveno- nepoznati uzorak, zeleno- negativna kontrola)



Slika 6. Prikaz disocijacijske krivulje kod LAMP metode (plavo- pozitivna kontrola, crveno- nepoznati uzorak, zeleno- negativna kontrola)

Rezultati RealTime PCR reakcije pokazuju da dolazi do amplifikacije samo kod pozitivnog uzorka koji ima Ct vrijednost oko 24, dok kod drugih uzoraka nema amplifikacije (Slika 7.).



Slika 7. Prikaz amplifikacijskih krivulja kod RealTime PCR metode (plavo- pozitivna kontrola, crveno – nepoznati uzorci i negativna kontrola)

5. RASPRAVA

Niz je zaraznih bolesti peradi koje mogu narušiti proizvodnju ali i ugroziti čovjeka (HERAK-PERKOVIĆ i sur., 2012.). Salmoneloze su skupina bakterijskih bolesti čiji pojedini sojevi mogu izravno ugroziti samo zdravlje peradi u uzgoju, poput *S. Gallinarum* i *S. Pullorum*, te je njihova dijagnostika vrlo važna. No, niz sojeva ne uzrokuje značajne kliničke probleme u peradi, no kao zoonoza, prenosi se na čovjeka, putem proizvoda poput jaja i mesa, u kojeg može stvoriti značajne zdravstvene probleme (BIĐIN, 2008.). Upravo iz tog razloga važna je kontinuirana kontrola i monitoring jata peradi kako bi se spriječilo širenje ovih mikroorganizama na putu od „farme do stola“. Ova je bolest tipičan primjer bolesti koja je u

temeljima kontrole zdravlja životinja i ljudi tzv. pristupa „Jedno zdravlje“ (eng. „*One Health*“) upravo zbog značajne ugroze čovjeka od namirnica životinjskog podrijetla. Kontinuirane kontrole različitih uzoraka u svim razinama proizvodnje samih životinja, ali i ljudi koji sudjeluju u njoj, za ovu skupinu bakterija vrlo su važne kako bi se na vrijeme spriječilo širenje na čovjeka. Stoga dijagnostika zaraznih bolesti zahtjeva promptnu reakciju, naročito u slučaju bolesti koje se brzo šire i imaju zoonotski karakter. Uz to je važno imati mogućnost alternativne metode dokaza mikroorganizma u uzorku čime se sigurno potvrđuje etiologija bolesti. Ovakav pristup je narušen u ekstenzivnim nelaboratorijskim uvjetima u kojima također treba brzo doći do rezultata. Molekularna dijagnostika poput LAMP-a pokazala se vrlo vrijednom upravo u takvim uvjetima. Ova metoda ne zahtjeva skupu i kompliciranu opremu, a uz veliku specifičnost daje pozdane rezultate (TOMITA i sur., 2008.). U ovom istraživanju se upravo usporedbom dviju metoda, LAMP i RealTime PCR-a primjenom TaqMan probe, pokazalo koliko je LAMP metoda brza, i uz očitavanje disocijacijske krivulje je značajno kraća od RealTime PCR reakcije (NOTOMI i sur., 2000.). No ono što je najvažnije je specifičnost i osjetljivost reakcije. Obje metode mogu dokazati vrlo male količine DNK/RNK u uzorku te su vrlo osjetljive, pogotovo u usporedbi s klasičnim PCR-om od kojeg su za 10 do 100 puta osjetljivije (TANG i sur., 2012.). Specifičnost se s druge strane osigurava primjenom TaqMan probe u slučaju RealTime PCR reakcije te je vjerojatnost lažno pozitivnih reakcija značajno smanjena, iako ne i isključena. No, kod LAMP reakcije specifičnost se osigurava primjenom kompleksnog sustava početnica, no i usprkos ove specifičnosti može doći do amplifikacije u uzorku, najčešće zbog autoamplifikacije početnica. No, ova se nespecifičnost može razlučiti upravo primjenom disocijacijske krivulje koja tada daje jasnu sliku između pozitivnog i lažno-pozitivnog uzorka (NOTOMI i sur., 2000.).

6. ZAKLJUČCI

1. Salmoneloze su bolesti različitih vrsta peradi, a u Republici Hrvatskoj se provodi obvezna kontrola ovih bakterija u jatima peradi na temelju naređenih mjera propisanih Naredbom o zaštiti životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju, te Nacionalnim programima kontrole.
2. Dijagnostika salmoneloza, posebno provedena korištenjem modernim molekularnih metoda, omogućava identifikaciju uzročnika u vrlo kratkom vremenskom razdoblju.
3. Metode kao što su LAMP i RealTime PCR osiguravaju specifičnost, osjetljivost i brzinu u potvrdi etiološke dijagnoze.
4. Lažno pozitivni nalazi mogu se razlučiti usporednom primjenom dviju metoda, te korištenjem disocijacijske krivulje koja tada jasno razlikuje pozitivni od lažno pozitivnog uzorka.

7. LITERATURA

1. ANON. (2007): EN/ISO 6579-2002/Amd1:2007. „Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. – Izmjena 1.: Prilog D: Otkrivanje *Salmonelle* spp. u fekalijama životinja i uzorcima okoliša u primarnoj fazi proizvodnje
2. ANON. (2016): Nacionalni program kontrole salmoneloze peradi. Uprava za veterinarstvo, Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.
3. ANON. (2017): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju iz 2017. godine (NN 5/2017)
4. BIĐIN, Z. (2008): Bakterioze u: Bolesti peradi, Zagreb, Veterinarski fakultet, 223-234
5. BROADBENT, S.E., M.R., DAVIES, M.W., VAN DER WOUDE (2010) : Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism *Mol Microbiol.* 77, 337–353.
6. HAJSIG, D., T., NAGLIĆ, J., MADIĆ, LJ., PINTER (2005): Porodica *Enterobacteriaceae*. u: Veterinarska mikrobiologija: Specijalna bakteriologija i mikologija, 71-78
7. HERAK-PERKOVIĆ, V., Ž., GRABAREVIĆ, J., KOS, (2012): Zarazne bolesti u: Veterinarski priručnik, 6.izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2416-2435.
8. LÖFSTRÖM, C., F., HANSEN, J., HOORFAR (2010): Validation of a 20-h real-time PCR method for screening of *Salmonella* in poultry faecal samples *Veterinary Microbiology* 144, 511–514.
9. LÜDERITZ, O., A.M. STAUB, O. WESTPHAL (1966): Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. *Bacteriol Rev* 30, 192–255.
10. MALORNY, B., C., LÖFSTRÖM, M., WAGNER, N., KRAMER, J., HOORFAR (2008): Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied an Enviromental Microbiology* 74, 1299-1340.

11. MEZAL, E.H., A., SABOL, M.A., KHAN, N., ALI, R., STEFANOVA, A.A., KHAN (2013): Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food microbiology*, 38, 67-74.
12. NIELSEN, B., D., BAGGESEN, F., BAGER, J., HAUGE GAARD, P., LIND (1995). The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology* 47, 205-218.
13. NOTOMI, T., H., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, T., YONEKAWA, K., WATANABE, N., AMINO, T., HASE (2000): Loop-mediated isothermal amplification of DNA *Nucleic Acids Res* 28, e63.
14. RISTOV AMBRIOVIĆ, A., A., BROZOVIĆ, B., MAĐARIĆ BRUVO, H., ĆETKOVIĆ, M., HERAK BOSNAR, D., HRANILOVIĆ, S., KATUŠIĆ HEČIMOVIĆ, N., MEŠTROVIĆ RADAN, S., MIHALJEVIĆ, N., SLADE, D., VUKAJLIJAC (2007): Analiza DNA i RNA uporabom lančane reakcije polimerazom. u: *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković 384-389.
15. RUIZ, J., M.L., NUNEZ, J., DIAZ, I., LORENTE, J., PEREZ, J., GOMEZ (1996): Comparison of Five Plating Media for Isolation of *Salmonella* Species from Human Stools. *Journal of clinical microbiology* 34, 686-688.
16. SORIA, M. C., M.A., SORIA, D.J., BUENO. J. L., COLAZO (2011): A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction assay for *Salmonella* detection in poultry feed. *Poultry Science* 90, 2606-2618.
17. TANG, T., A. CHENG, M. WANG, X. LI, Q. HE, R. JIA, D. ZHU, X. CHEN (2012): Development and clinical verification of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* species in suspect infected ducks. *Poultry Science* 91, 979-986.
18. TOMITA, N., Y., MORI, H., KANDA, T., NOTOMI (2008) : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols* 3, 877-872

8. SAŽETAK

Salmoneloze su zarazne bolesti ljudi i životinja uzrokovane bakterijama roda *Salmonella*. Zarazne bolesti uzrokovane salmonelama kod peradi možemo svrstati u 3 skupine. Prvu skupinu čine zaraze s dva negibljiva serovara, *S. Pullorum* (uzrokuje pulurozu) i *S. Gallinarum* (uzrokuje tifus). Drugu skupinu čine serovari *S. Arizonae* (najčešće u purana) dok u treću skupinu spadaju zaraze različitim serotipovima salmonela koje su najčešći uzročnici trovanja hranom u ljudi, te se jednim imenom nazivaju paratifusne infekcije. Zaražena perad jedan je od glavnih prirodnih rezervoara salmonela koje se konzumacijom zaraženog mesa ili jaja mogu prenijeti na ljude i uzrokovati trovanja, te je zbog toga jako važno kontrolirati sustave proizvodnje mesa i jaja podrijetlom od peradi. Brza i precizna metoda otkrivanja salmonela je stoga od izuzetne važnosti u prevenciji širenja zaraze. U ovom istraživanju smo usporedili LAMP i RealTime PCR metode u svrhu detekcije *Salmonella* u različitim uzorcima podrijetlom od peradi. LAMP se pokazao kao jednostavnija i brža metoda u usporedbi s RealTime PCR zbog bržeg očitovanja disocijacijske krivulje. Međutim, obje metode imaju visoku specifičnost i osjetljivost pa mogu dokazati vrlo male količine genetskog materijala u uzorku.

Ključne riječi: *Salmonella*, LAMP, RealTime PCR

9. SUMMARY

Detection of bacteria in genus *Salmonella* using different molecular methods in samples originated from poultry

Salmonellosis is disease of humans and animals caused by bacteria of genus *Salmonella*. Infectious diseases caused by *Salmonella* in poultry can be divided into three groups. First group consists of infections by non-motile serovars *S. Pullorum* (causes pulorosis) and *S. Gallinarum* (causes typhus). Second group encompasses infections by *S. Arizonae* serovar (most common in turkeys), while the third group consists of diseases commonly called paratyphoid infections and are most typically seen in cases of food poisoning in humans and are caused by various salmonella serotypes. Infected poultry is one of the most important natural reservoir of *Salmonella* that could be transferred to humans by infected meat and egg consumption and cause poisoning. That is why it is very important to control system of production of meat and egg derived from poultry. Fast and precise method for *Salmonella* detection is therefore of utmost importance in prevention of infection spread. In this study, we compared LAMP and RealTime PCR methods for detection of *Salmonella* in different samples derived from poultry. We showed that LAMP method is simpler and faster comparing to Real Time PCR due to faster appearance of dissociation curve. Nevertheless, both methods have high specificity and sensitivity and are able to detect very small amounts of genetic material in the sample.

Keywords: *Salmonella*, LAMP, Real Time PCR

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 5. kolovoza 1991. u Zadru. Pohađao sam Osnovnu školu Stanovi , a nakon toga Opću gimnaziju Jurja Barakovića u Zadru. Tokom svog osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja uvijek sam se zanimao za prirodne predmete, a ljubav prema životinjama me usmjerila da 2010. upišem studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Zbog ugodne suradnje sa doc. dr. sc. Željkom Gottsteinom i doc. dr. sc. Danijelom Horvatek Tomić tokom obveznog predmeta Bolesti peradi, odabrao sam izraditi ovaj diplomski rad na Zavodu za bolesti peradi s klinikom pod njihovim mentorstvom.