



ANDRZEJ HOSZOWSKI, DARIUSZ WASYL, RENATA GŁOŚNICKA*,
 MARIAN TRUSZCZYŃSKI

Typy bakteriofagowe szczepów *Salmonella enteritidis* pochodzenia zwierzęcego

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Krajowy Ośrodek *Salmonella*, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, ul. Powstania Styczniowego 9b, 81-519 Gdynia

Hoszowski A., Wasyl D., Głośnicka R., Truszczyński M.

Phage types of *Salmonella enteritidis* strains of animal origin

Summary

Phage typing of 427 *Salmonella enteritidis* (SE) strains of animal origin was performed. The typing method developed by Lalko was employed. SE strains had been isolated from animals, food and animal feed during the years 1979-1986 and 1994-1997. Phage types 3 and 1 were predominant in SE strains isolated in the years 1979-1986, and were noted in 66.2% and 15.6%, respectively. Untypical reactions (RDNC) were observed in 16.9% of those strains. Phage type 1 was found in 58.7% whilst type 3 in 21.4% of the strains isolated in the years 1994-1997. RDNC reactions were noted in 15.4% and type 7 occurred in 3.6% of SE strains. Single strains belonged to type 5 and 2. One SE strain was untypable. In conclusion, the applied phage typing system proved to be valuable in epidemiological studies of SE isolates of animal origin.

Z danych epidemiologicznych wynika, że w Polsce, jak i w większości krajów europejskich, pałeczki *Salmonella* są odpowiedzialne za przeszło 90% przypadków zatruc pokarmowych człowieka (16). W etiopatogenezie salmonelozu ludzi decydującą rolę odgrywa ograniczona liczba serowarów. Jak wynika z raportu Państwowego Zakładu Higieny, dotyczącego sytuacji epidemiologicznej salmonelozu u ludzi w Polsce w 1996 r., przyczyną 88,1% zachorowań były szczepy należące do serowaru *S. enteritidis* – SE (2). Podobną sytuację, świadczącą o coraz większym udziale szczepów SE w wywoływaniu salmonelozu u ludzi, obserwuje się również w przypadku innych krajów europejskich (16) oraz w Stanach Zjednoczonych (14). Serowar ten jest również często stwierdzany u zwierząt oraz w żywności pochodzenia zwierzęcego (4, 7, 11, 13).

Metody serologiczne i biochemiczne, stosowane rutynowo od wielu lat w identyfikacji bakterii rodzaju *Salmonella*, nie są wystarczające do przeprowadzenia dokładnych badań epidemiologicznych w przypadku dominacji jednego serowaru w określonym rejonie geograficznym. Niezbędne staje się wówczas zastosowa-

nie dodatkowych technik typujących, umożliwiających dokonanie dalszego podziału szczepów należących do tego samego serowaru. Typowanie bakteriofagowe jest jedną z kilku metod, które znalazły szerokie zastosowanie w przypadku badań epidemiologicznych infekcji u ludzi, wywoływanych przez bakterie SE. Technika ta cechuje się prostotą wykonania, wysoką swoistością i dużą siłą różnicującą, co sprawia, że jest chętnie stosowana w wielu krajach (5, 6, 12, 15).

Znanych jest kilka systemów służących do typowania bakteriofagowego szczepów SE (1, 9, 15). W prezentowanej pracy wykorzystano system opracowany przez Maciarewicz i wsp. (10), a później rozwinięty przez Lalko (9). Składa się on z 8 preparatów bakteriofagowych i umożliwia podział serowaru SE na 22 typy bakteriofagowe.

Celem pracy było: a) określenie typów fagowych w populacji szczepów SE izolowanych od zwierząt w latach 1979-1986 oraz 1994-1997; b) dokonanie analizy częstości występowania poszczególnych typów fagowych w zależności od źródła izolacji szczepu; c) ocena przydatności systemu typowania fagowego szczepów SE, opracowanego przez Lalko (9), w epidemiologii salmonelozu u zwierząt.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Typowaniu fagowemu poddano szczepy *S. enteritidis*, izolowane od zwierząt, z surowców i żywności pochodzenia zwierzęcego, środowiska chowu zwierząt oraz z pasz w latach 1979-1986 (70 szczepów) i 1994-1997 (357 szczepów).

Typowanie bakteriofagowe szczepów *S. enteritidis*. Posłużono się systemem opracowanym przez Lalko (9) składającym się z 8 preparatów fagowych.

Podłoża użyte do typowania szczepów:

1. bulion:

Nutrient broth	15,0
NaCl	8,5
H ₂ O dest.	ad 1000 ml
pH 7,2-7,4;	sterylizacja 121°C, 15 min.

2. podłoże agarowe:

Nutrient broth	15,0
NaCl	8,5
Agar Difco	15,0
H ₂ O dest.	ad 1000 ml
pH 7,2-7,4;	sterylizacja 121°C, 15 min.

Typowanie przeprowadzano według metody opisanej przez Craigie i wsp. (3). Badany szczep *S. enteritidis* namnażano przez 2 godz. w temp. 37°C w 4 ml bulionu, a uzyskaną hodowlę wylewano na płytkę z podłożem agarowym i rozprowadzano po całej powierzchni. Nadmiar hodowli usuwano, a zawierającą podłoże agarowe płytkę, z uchylonym wieczkiem pozostawiano na około 30 minut w komorze laminarnej. Następnie na podłoże nanoszono, za pomocą ezy o średnicy 3 mm, każdy z 8 preparatów bakte-

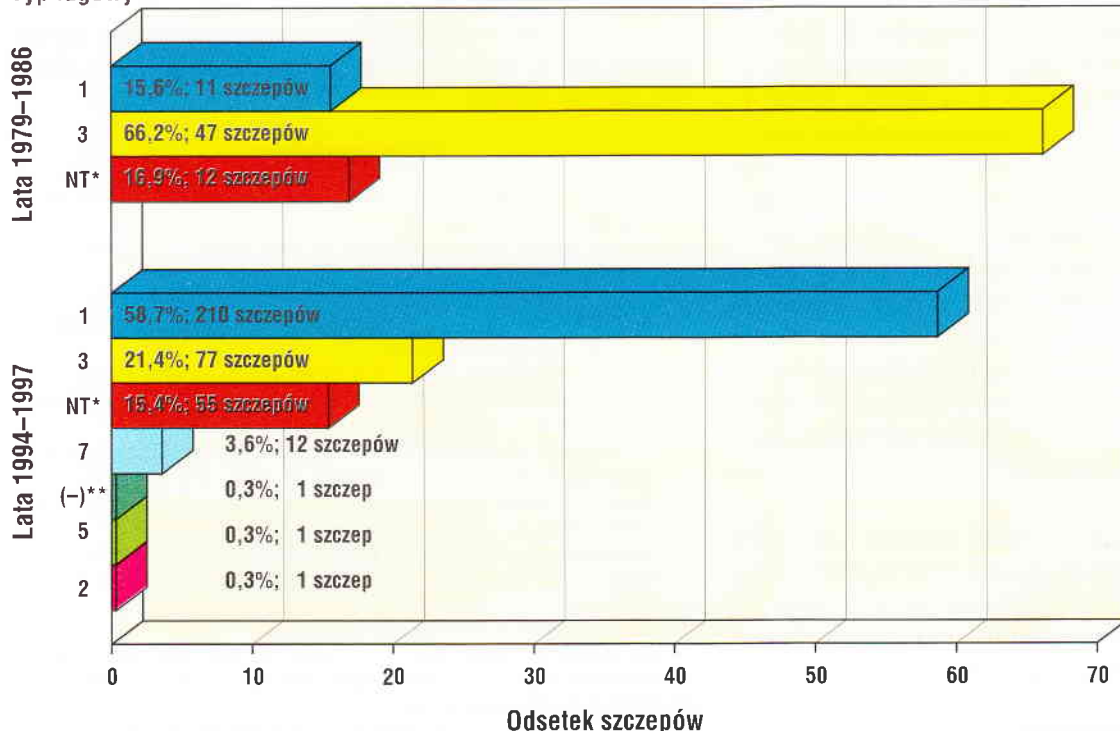
riofagowych. Wyniki odczytywano po inkubacji płytek w 37°C przez 18-24 godzin i interpretowano, posługując się schematem opracowanym przez Lalko (9). W przypadku uzyskania wyników niezgodnych ze schematem badanie powtarzano, typując 3 pojedyncze kolonie danego szczepu.

Wyniki i omówienie

Z danych przedstawionych na ryc. 1 wynika, że w latach 1979-1986 typy fagowe 1 i 3 były najczęściej rejestrowane wśród badanych szczepów SE. Wykryto je odpowiednio, w 15,6% i 66,2% izolatów. W 16,9% szczepów oznaczonych na rycinie jako NT (nietypowe) stwierdzono wystąpienie wzorców reakcji odbiegających od schematu typowania. W latach 1994-97 sytuacja ta uległa zmianie, gdyż do typu 1 zaklasyfikowano 58,7% badanych szczepów *S. enteritidis* zaś do typu 3 – 21,4%. Wystąpienie wcześniej nie rejestrowanego typu 7 odnotowano w przypadku 3,6% badanych szczepów. W pojedynczych przypadkach wykrywano szczepy zaliczane do typów 5 i 2 oraz nie ulegające lizie (-) pod wpływem stosowanych preparatów fagowych. Wystąpienie reakcji nietypowych zanotowano u 15,4% szczepów (szczepy NT).

W tab. 1 przedstawiono dane umożliwiające dokonanie analizy częstości występowania poszczególnych typów fagowych w zależności od źródła izolacji. Okazało się, że typy fagowe 1 i 3 są stwierdzane często, zarówno wśród szczepów izolowanych od drobiu, jak i tych pochodzących z produktów spożywczych. Typy fagowe 1 i 3 są również często wykrywane w obrębie

Typ fagowy



Ryc. 1. Typy fagowe szczepów *S. enteritidis*

Objaśnienia: NT* – szczepy nietypowe – reagujące niezgodnie ze schematem, (-)** – szczepy nie reagujące z fagami typującymi

szczepów SE uzyskiwanych od ludzi. Potwierdzałyby to pogląd, że drób jest istotnym rezerwuarem chorobotwórczych dla człowieka szczepów SE. Wystąpienie typu 7, będącego w latach 1981-1990 częstą przyczyną zakażeń człowieka (6), zaobserwowano w 3,4% szczepów. Szczepy wyizolowane od lisów należały do 1 i 3 typu fagowego, co może być związane z żywieniem tych zwierząt drobiowymi odpadkami rzeźniami, często zakażonymi pałeczkami *Salmonella*. Typy fago-

Tab. 1. Typy bakteriofagowe szczepów *S. enteritidis* w zależności od źródła izolacji

Źródło izolacji	Liczba szczepów	Typy bakteriofagowe						
		1	2	3	5	7	NT*	(-)**
Drób	326 100%	174 53,3%	1	78 23,9%	1	11 3,4%	61 18,7%	
Surowce i żywność pochodzenia zwierzęcego	34 100%	18 52,9%		12 35,3%			4 11,8%	
Środowisko fermi	11	6		3		1		1
Świnie	10	3		6			1	
Lisy	10	6		4				
Pasze	5	2		3				
Cielęta	3			3				
Nieznane	28 100%	12 42,9%		15 53,6%			1	
Razem	427	221	1	124	1	12	67	1

Objaśnienia: * – szczepy nietypowe – reagujące niezgodnie ze schematem; ** – szczepy nie reagujące z fagami typującymi.

w 1 i 3 rejestrowano również w populacji szczepów *S. enteritidis* uzyskanych ze środowiska chowu zwierząt oraz od świń i z pasz. Trzy szczepy SE wyizolowane od cieląt należały do typu 3. W 67 przypadkach odnotowano wystąpienie reakcji niezgodnych ze schematem (szczepy oznaczone jako NT pochodziły głównie od drobiu i z produktów spożywczych). Może to się wiązać ze stosowaniem chemioterapeutyków i środków dezynfekcyjnych podczas chowu zwierząt, podawaniem środków spożywczych procesom technologicznym czy dodawaniem do nich konserwantów, wpływających na strukturę ściany komórkowej bakterii (8). Biorąc pod uwagę fakt, że koniecznym warunkiem lizy komórki bakteryjnej jest połączenie bakteriofaga ze specyficznym dla niego receptorem ściany komórkowej, to czynniki zmieniające jej strukturę mogą powodować zmianę wrażliwości bakterii na fagi. W efekcie, może się to wyrażać występowaniem nietypowych reakcji.

Oznaczanie typów fagowych w obrębie szczepów SE wyizolowanych od zwierząt nie było wykonywane w Polsce na większą skalę, zarówno w oparciu o zastosowany przez nas system Lalko (9), jak i schemat opracowany przez Ward i wsp. (15).

Wnioski

1. Typowanie bakteriofagowe szczepów *S. enteritidis*, w oparciu o system opracowany przez Lalko, może być wykorzystane w badaniach epidemiologicznych u

różnych gatunków zwierząt, gdyż cechuje go wystarczająca zdolność różnicowania szczepów, specyficzność reakcji oraz powtarzalność uzyskiwanych wyników.

2. Częstość występowania poszczególnych typów fagowych w populacji szczepów *S. enteritidis* ulega zmianie w czasie.

Piśmiennictwo

1. Anderson E. A.: The world problem of salmonellosis. E. Van Oye, De W. Junk Publ., Haga, 1964, s. 84.
2. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, rok 1996, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa 1997.
3. Craigie J., Felix A.: Lancet 1, 823, 1947.
4. Fajński Z.: Mat. sesji nauk. Pałeczki Salmonella w paszach i salmonelozy u zwierząt. Giżycko 11-12.09.1997.
5. Fantasia M., Filetici E.: Intern. J. Food Microb. 21, 7, 1994.
6. Głównicka R., Kunikowska D., Dziedziusko H., Tokarska-Klumejko E.: Bull. Inst. Mar. Trop. Gdynia 41, 145, 1990.
7. Kopczeński A., Strzałkowski L.: Mat. sesji nauk.: Pałeczki Salmonella w paszach i salmonelozy u zwierząt. Giżycko 11-12.09.1997.
8. Kunicki-Goldfinger W. J. H.: Życie bakterii. PWN, Warszawa 1982, s. 386.
9. Lalko J.: Bull. Inst. Mar. Trop. Gdynia 28, 187, 1977.
10. Maciarewicz M., Kalużewski S., Lalko J.: Med. Dośw. 20, 2, 1968.
11. Poppe C., McFadder K. A., Brouwer A. M., Demczuk W.: Can. J. Vet. Res. 57.
12. Poppe C.: Intern. J. Food Microb. 21, 1, 1994.
13. Strzałkowski L., Kopczeński A., Przewoski W.: Mat. sesji nauk.: Pałeczki Salmonella w paszach i salmonelozy u zwierząt. Giżycko 11-12.09.1997.
14. Tauxe E. V.: Emerging Inf. Dis. 3, 4, 1997.
15. Ward L. R., De Sa J. D. H., Rowe B.: Epidem. Inf. 99, 291, 1987.
16. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. Sixth report 1990-1992. FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin, 1995.

Adres autora: dr Andrzej Hoszowski, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy