

Metody typowania bakterii *Salmonella*

BOŻENA DERA-TOMASZEWSKA

Zakład Mikrobiologii Molekularnej i Serologii, Krajowy Ośrodek *Salmonella* Wydział Lekarski
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk

Dera-Tomaszewska B.

Salmonella common typing methods

Summary

Serotyping is a traditional method of *Salmonella* typing that makes it possible to classify these bacteria by the White-Kauffmann-Le Minor scheme (formerly known as Kauffmann-White scheme) on the basis of variation in the *Salmonella* somatic (O) and flagellar (H) antigens. It is still the primary method by which *Salmonella* are identified immediately after the initial isolation of these microorganisms. It is a convenient way to categorize isolates, but surface antigens alone cannot provide information about overall genetic relatedness of strains. It is also, in most cases, not sufficient to simply carry out a successful serotyping in order to gain insights into the epidemiology and source of infection. Phage typing, based on the susceptibility to a panel of standard bacteriophages, is a historically important epidemiological tool for the categorization of *Salmonella*, but like serotyping, it does not reflect the overall bacterial genotype. Therefore, numerous typing methods have been developed to further analyse the origin of *Salmonella* isolates. They may broadly be considered as phenotypic, genotypic and DNA sequence-based. Different techniques are useful in different circumstances, depending on the reason for the investigations. In laboratory practice a combination of these methods is often used. They are used in outbreak investigations or for tracking epidemiology and resistance. Although serotyping and phage typing are very important stages of the routine *Salmonella* investigation procedure, they are often combined with other techniques. Those that are most commonly used for *Salmonella* typing are discussed in detail in this paper. Brief description as well as advantages and disadvantages of these common typing methods are given.

Keywords: *Salmonella*, typing methods, phenotypic typing, genotypic typing, DNA sequence-based typing

Diagnostyka mikrobiologiczna jest podstawowym narzędziem umożliwiającym wykrycie i identyfikację czynnika etiologicznego zakażenia oraz dokonanie wyboru właściwego leczenia. Do podstawowych metod diagnostyki bakteriologicznej należą: hodowla i izolacja drobnoustrojów, określanie profili biochemicznych, oznaczenie lekooporności oraz badania serologiczne (4). Klasyczne metody diagnostyczne nie utraciły do dzisiaj swojej dominującej roli, pomimo rozwoju innych metod i pomimo ściśle związanej z nimi konieczności utrzymywania bakterii przy życiu. W rutynowej diagnostyce pałeczek *Salmonella* zastosowanie mają przede wszystkim metody konwencjonalne, bakteriologiczne, zmierzające do izolacji i identyfikacji bakterii w metodach hodowlanych (23, 43).

W codziennej praktyce laboratoryjnej nieznane szczepy, izolowane z próbek materiałów klinicznych, produktów spożywczych, od zwierząt, z materiałów odzwierzęcych, z pasz i innych, identyfikowane są wstępnie do rodzaju *Salmonella* na podstawie ich właściwości biochemicznych i w dalszej kolejności – na podstawie reakcji serologicznych z antygenami somatycznymi (O) i rzęskowymi (H). Typowanie sero-

logiczne (serotypowanie) jest ważnym etapem postępowania diagnostycznego.

O różnicach w wykrywalności pałeczek *Salmonella* decyduje wiele parametrów: rodzaj i wielkość badanej próbki, źródło jej pochodzenia, rodzaj i skład zastosowanych pożywek, czas i temperatura namnażania selektywnego czy liczba kolonii pobranych do badania. A zatem zastosowanie odpowiednio dobrej procedury oraz wybór właściwej metody i odpowiednich pożywek decyduje o skuteczności wykrywania bakterii *Salmonella* (43). Stosowane są: płynne pożywki nieselektywne, płynne i półpłynne pożywki wybiórczo-namnażające, stałe pożywki wybiórczo-różnicujące oraz pożywki (tzw. szeregi biochemiczne) pozwalające na określenie cech biochemicznych izolowanych drobnoustrojów, czyli zdolności do metabolizowania różnych substancji lub wytwarzania określonych enzymów (8).

Z każdej pożywki wybiórczo-różnicującej izoluje się co najmniej po dwie kolonie, uwzględniając kolonie podejrzone i wątpliwe. Wybrane kolonie poddaje się badaniom za pomocą testów biochemicznych. Właściwe odczytanie cech biochemicznych jest możliwe

tylko w przypadku czystych hodowli bakteryjnych. Każdy izolat, podejrzany o przynależność do rodzaju *Salmonella* na podstawie prezentowanych właściwości biochemicznych, potwierdza się serologicznie metodą aglutynacji szkiełkowej. Rozpoznanie serologiczne wyosobnionego izolatu polega na określeniu jego struktury antygenowej. Identyfikacja wszystkich wariantów serologicznych pałeczek z rodzaju *Salmonella* odbywa się przy pomocy surowic diagnostycznych. W celu oznaczenia grupy serologicznej można również posłużyć się testem lateksowym. Umożliwia on wykrycie i identyfikację grupowych antygenów pałeczek *Salmonella* w pierwotnych hodowlach bakteryjnych (uzyskanych w wyniku namnażania w płynnej pożywce seleninowo-fosforanowej) już w ciągu jednej doby od przyjęcia materiału diagnostycznego do badania. Postępowanie służące pełnej identyfikacji serowarów z użyciem zestawów surowic zawierających przeciwciała dla określonych antygenów somatycznych i rzęskowych wyznacza schemat White'a-Kauffmanna-Le Minora (18), znany dawniej jako schemat Kauffmanna-White'a. Różnicowanie to obejmuje aglutynację z surowicami grupowo-swoistymi, a następnie w obrębie grupy z surowicami typowo-swoistymi. Efektem końcowym badania jest uzyskanie przy pomocy surowic diagnostycznych określonego typu serologicznego pałeczek z rodzaju *Salmonella* (ryc. 1).

Czasami oznaczenie dokładnej budowy antygenowej pałeczek *Salmonella* jest niewystarczające do ich ostatecznego zidentyfikowania i zachodzi potrzeba dodatkowego różnicowania biochemicznego. Na przykład w grupie O:7 sytuacja taka dotyczy szczepów *S. Paratyphi C* (Vi-ujemnych), *S. Choleraesuis* i *S. Typhissuis*. Dodatkowe różnicowanie biochemiczne wymagane jest również w przypadku konieczności określenia przynależności do gatunku lub podgatunku badanych pałeczek *Salmonella*, w sytuacji gdy określenie pełnego wzoru antygenowego (który jest taki sam np. dla 2 lub 3 serowarów w obrębie danej grupy serologicznej) nie definiuje jednoznacznie ich statusu taksonomicznego.

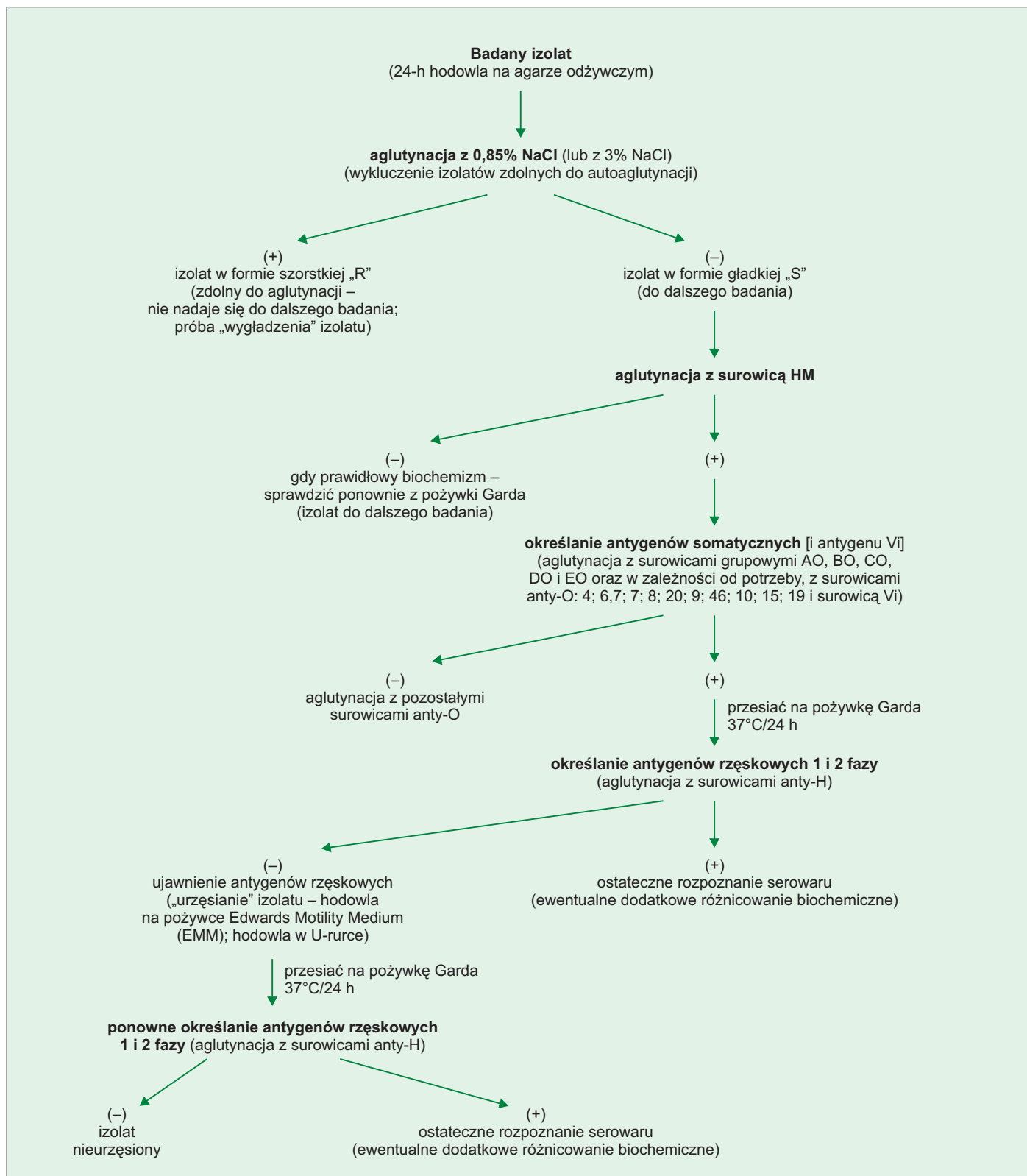
Przedstawiony cykl postępowania diagnostycznego stanowi optymalną metodę pozwalającą na szybkie uzyskiwanie wyników w przypadku tego typu badań. Zaprezentowana metodyka – ze względu na odpowiedni dobór pożywek do namnażania i izolacji – uwzględnia na każdym etapie badań możliwość wyhodowania bakterii *Salmonella* z badanej próbki. Stwarza również możliwość określenia pewnych cech mających istotne znaczenie przy rozpoznawaniu tych drobnoustrojów. Część etapów diagnostyki bakteriologicznej, oczywiście poza koniecznością uzyskania czystej hodowli, można zautomatyzować. Obecnie coraz więcej laboratoriów wprowadza automatyczne metody diagnostyczne (34).

Zarówno bezpośrednią identyfikację bakterii *Salmonella* obecnych w badanym materiale, jak i pośrednią

ich identyfikację, prowadzoną w oparciu o czystą hodowlę, a także wykazywanie charakterystycznych typów oporności na leki (R-type) można prowadzić również metodami molekularnymi (1, 4, 35, 37). Wybór metody molekularnej należy dostosować do problemu, który zamierza się rozwiązać: wykrywanie, identyfikacja, różnicowanie czy badania taksonomiczne (6, 20, 26, 31-33, 39, 42). Istotne są również aspekty techniczne, tj.: stopień trudności wykonania, zaplecze badawcze, łatwość interpretacji wyników, czas wymagany do analizy, całkowite koszty stosowanej metody oraz koszty pojedynczej próby. Wybrana metoda powinna być wystarczająco czuła, powtarzalna i powinna posiadać duży potencjał różnicujący. Porównanie najczęściej stosowanych metod różnicowania drobnoustrojów z uwzględnieniem powyższych parametrów opisano w opracowaniu Krawczyk (26). Na przykład, dzięki czułości i selektywności metod wykorzystujących technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), możliwe jest bezpośrednie wykazanie obecności pałeczek *Salmonella* w materiale pobranym od pacjenta poprzez wykrycie specyficznej dla tego drobnoustroju sekwencji DNA (2, 24, 29). Przy zastosowaniu metod molekularnych możliwa jest również identyfikacja serowarów *Salmonella*. Można dokonać rozpoznania aż ponad stu różnych serowarów z wykorzystaniem techniki hybrydyzacji na mikromacierzach w odmianie ArrayTube, w której cała reakcja hybrydyzacji zachodzi w odpowiednio przygotowanej probówce Eppendorfa (45, 46). Metoda ta pozwala również na pełną identyfikację serowarów nawet w przypadku „defektywnych” szczepów *Salmonella* (30), których nie można określić w tradycyjny sposób, czyli szczepów szorstkich, nieurzęsionych czy szczepów dwufazowych, które utraciły zdolność wytwarzania jednej z faz antygenu rzęskowego. Technika mikromacierzy umożliwia także wykrywanie obecności genów warunkujących lekooporność pałeczek Gram-ujemnych, w tym bakterii *Salmonella* (7).

W diagnostyce zakażeń pałeczkami z rodzaju *Salmonella* zastosowanie praktyczne ma również określanie poziomu przeciwciał we krwi czy w żółtkach jaj kurzych (5, 12, 22, 47). Niekiedy badanie takie stanowi jedynie dostępną metodę diagnostyczną (9). Techniki immunologiczne obejmują obszerną grupę metod, dostępnych również w postaci różnych testów szybkiego wykrywania bakterii *Salmonella*, bazujących na immunodysztylizacji, immunoaglutynacji, immunoprecypitacji i technikach immunoenzymatycznych. W przypadku niektórych zakażeń *Salmonella* obecność swoistych przeciwciał dla antygenów czynnika etiologicznego może być wykazana równolegle z izolacją bakterii w metodach hodowlanych.

W typowaniu prowadzonym na użytek dochodzeń epidemiologicznych wykorzystywane jest znaczne zróżnicowanie (zarówno fenotypowe, jak i genotypowe) istniejące w obrębie populacji drobnoustrojów poszczególnych gatunków (15, 21, 28, 38, 40), w tym



Ryc. 1. Schemat typowania serologicznego izolatów bakteryjnych podejrzanych o przynależność do rodzaju *Salmonella*

również *Salmonella enterica* czy *Salmonella bongori*. Typowanie oparte na poszukiwaniu markerów, które pojawiają się fenotypowo (phenotypic typing), polega zwykle na: ocenie wzrostu bakterii na pożywkach mikrobiologicznych, analizie morfologii komórek i kolonii bakteryjnych (mikro- i makromorfologia), określaniu profili biochemicznych, analizie lekooporności,

typowaniu bakteriofagowym, typowaniu bakteriocynowym, serotypowaniu, elektroforetycznej ocenie profili białkowych (często uzupełnianych również techniką immunoblotingu) czy elektroforetycznej analizie izoenzymów, polegającej na porównywaniu aktywności natywnych enzymów. Wiele metod fenotypowych charakteryzuje się dużą czułością i specy-

ficznością w zakresie uzyskiwanych wyników, co czyni je cennym narzędziem w ręku mikrobiologa i epidemiologa. Chociaż metody te spełniają swoje zadanie, to jednak większość z nich obarczona jest cechą niepełnej stabilności klonalnej ekspresji markerów. Wadą części metod fenotypowych jest wpływ zmieniającego się w czasie stanu fizjologicznego badanych komórek na uzyskiwane wyniki oraz ograniczenie możliwości ich stosowania tylko do niektórych grup taksonomicznych. Stąd często konieczne jest tworzenie odrębnego i wyspecjalizowanego warsztatu na potrzeby analizy izolatów określonego taksonu. Najlepiej oceniane są metody immunologiczne i elektroforetyczna analiza izoenzymów.

Metody molekularne wykorzystujące genetyczną analizę kwasów nukleinowych (genotypic typing) sięgają po wiele technik (17), z których powszechne zastosowanie znalazła zarówno analiza chromosomowego, jak i plazmidowego DNA. W większości stosowanych metod porównuje się otrzymane (w wyniku zastosowanych procedur i rozdziału elektroforetycznego) wzory prążków fragmentów badanego DNA, stanowiące swoistego rodzaju odciski genetyczne, które poprzez analogię do wyjątkowości charakteryzującej odcisk ludzkiego palca nazywa się „fingerprints”. Ogromne możliwości, jakie daje biologia molekularna, sprawiły, że techniki te szybko się rozwijają i ulepszają. Zostały uproszczone i upowszechnione techniki izolacji i powielania DNA oraz ustalania jego sekwencji w stopniu, który pozwala na ich rutynowe wykorzystywanie w laboratoriach mikrobiologicznych. Obecnie za najlepsze dla potrzeb epidemiologii uważa się: technikę PFGE – elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym (pulsed field gel electrophoresis), rybotypowanie oraz sekwencjonowanie fragmentów DNA (sequence-based typing). Do celów dochodzeń epidemiologicznych stosowana jest również metoda z użyciem mikromacierzy DNA (DNA microarrays), pozwalająca na jednoczesną ekspresję wielu tysięcy genów (3, 16, 36, 45, 46). Sondy przydatne w tej dziedzinie znajdują już zastosowanie w badaniach wewnątrzgatunkowego polimorfizmu genów u niektórych gatunków bakterii, w tym również u pałeczek *Salmonella*.

Dla poszczególnych drobnoustrojów metody wykorzystywane do identyfikacji i dochodzeń epidemiologicznych mogą wykazywać różną skuteczność i dlatego zazwyczaj rekomendowane są techniki i metody wypróbowane dla określonego rodzaju czy gatunku. Metody najczęściej stosowane do typowania bakterii z rodzaju *Salmonella* przedstawiono w tab. 1, z uwzględnieniem ich pozytywnych i negatywnych aspektów w diagnostyce tych drobnoustrojów.

W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej bakterii z rodzaju *Salmonella*, zarówno dla celów sanitarno-epidemiologicznych, jak i leczniczych, ciągle jeszcze dominującymi metodami są: typowanie serologiczne i typowanie bakteriofagowe. Chociaż typowanie bak-

teriofagowe jest możliwe do wykonania wyłącznie w laboratoriach referencyjnych, to jest ono niezwykle ważne. Pozwala na przeprowadzenie wnikliwych obserwacji nad ustaleniem związku pomiędzy źródłem zakażenia i przypadkiem chorobowym oraz podjęcie skutecznych środków w zwalczaniu źródeł i dróg szerzenia się zakażeń. Chociaż różne, nowe metody typowania molekularnego szczepów *Salmonella* (rybotypowanie, typowanie IS200, analiza profilu plazmidowego i analiza mikrorestrykcyjna plazmidów) wydają się przydatne w badaniach epidemiologicznych, ciągle jeszcze szczególne usługi epidemiologii oddaje lizotypia (11, 13, 14, 25, 27, 41, 44). Pozwala ona na wyróżnienie, w obrębie jednego serowaru, szeregu typów bakteriofagowych, różniących się między sobą intensywnością lub brakiem wrażliwości na działanie pewnych bakteriofagów uznanych za standardowe. Różne zestawy fagów wykorzystywane są do typowania różnych serowarów (19, 23). Te powszechnie stosowane służą przede wszystkim do różnicowania pałeczek *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Typhi*, ale istnieje również możliwość subtypowania w obrębie takich serowarów, jak: *S. Abortusovis*, *S. Adelaide*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Bareilly*, *S. Blockley*, *S. Bovismorbificans*, *S. Braenderup*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Good*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Minnesota*, *S. Montevideo*, *S. Newport*, *S. Oranienburg*, *S. Panama*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi C*, *S. Potsdam*, *S. Thompson*, *S. Virchow*, *S. Waycross* i *S. Weltevreden*. Typowanie bakteriofagowe według określonych schematów może być nadal polecane jako standardowa, szybka i tania metoda do prowadzenia badań epidemiologicznych zakażeń wywołanych przez pałeczki *Salmonella*. Umiejętnie wykorzystane wyniki typowania bakteriofagowego przynoszą duży postęp w pracach epidemiologicznych i epizootologicznych – zwiększają znacznie prawdopodobieństwo rozpoznania źródła zakażenia, pozwalają ocenić jednorodność ognisk zatruc pokarmowych i poznać mechanizmy szerzenia się zakażenia.

Jednak najlepsze wyniki w rozpoznawaniu zarazka uzyskuje się stosując metody kompleksowe. Chociaż typowanie serologiczne i bakteriofagowe bakterii *Salmonella* stanowi nadal bardzo ważny etap postępowania diagnostycznego, to jednak coraz częściej łączy się je z innymi metodami typowania, wykorzystującymi głównie techniki analizy DNA, z których większość, dzięki rozwojowi biologii molekularnej, może być już rutynowo wykorzystywana w laboratoriach mikrobiologicznych. Doceniając ogromne możliwości technik molekularnych, należy jednak zgodzić się raczej z tymi, którzy uważają, że metody te nie mogą jeszcze w pełni zastąpić klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej. Diagnostyka mikrobiologiczna jest dziedziną bardzo rozległą i poważne laboratoria nie mogą zawęzić swej aktywności jedynie do tak zwanych szybkich testów, nawet tych opierających się na metodach biologii molekularnej.

Tab. 1. Metody najczęściej stosowane do typowania bakterii z rodzaju *Salmonella* (11)

Technika	Krótką charakterystyka	Zalety	Wady
Fenotypowa			
Typowanie serologiczne (serotypowanie)	Aglutynacja antygenów somatycznych O i rzęskowych H. Wymaga zmiany faz do pełnej identyfikacji	Wygodna; łatwa do zastosowania w laboratoriach diagnostycznych. Reprezentuje znaną metodę. Może być stosowana jako skriningowa do wykrywania obecności pałeczek <i>Salmonella</i> , jak i do serotypowania	Oparta na markerach, które można wybrać (selectable markers) i dlatego nie odzwierciedla prawdziwej klasyfikacji. Droga; wymagane jest szerokie spektrum surowic diagnostycznych
Typowanie bakteriofagowe	Wrażliwość bakteryjnych izolatów na działanie wybranych bakteriofagów uznanych za standardowe	Dobrze ugruntowana dla <i>S. Typhi</i> , Enteritidis, Typhimurium i innych. Dostarcza przydatnych, biologicznie użytecznych danych epidemiologicznych	Nie jest powszechnie dostępna; stosowanie ograniczone do laboratoriów referencyjnych ze względu na konieczność utrzymywania kolekcji fagów. Typowanie bakteriofagowe nie odzwierciedla prawdziwej klasyfikacji. Nie jest możliwe dla wszystkich serowarów <i>Salmonella</i>
Lekooporność (R-type)	Wrażliwość na różne antybiotyki	Tania i łatwa do przeprowadzenia. Dostarcza użytecznych informacji na poziomie jednostki i poziomie populacji	Ten sam fenotypowy wzorec oporności może być zależny od różnych mechanizmów genetycznych. Oporność może ulec gwałtownej zmianie. Nie stanowi narzędzia właściwej klasyfikacji
Genotypowa			
Losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA (RAPD ¹)	Amplifikacja z wykorzystaniem losowych starterów	Łatwa do wykonania. Użyteczna do badania ognisk	Międylaboratoryjne wyniki badań nie są porównywalne
Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR ²) dla wybranych genów lub wysp	PCR dla genów lekooporności, czynników patogenności lub markerów metabolicznych	Bezpośrednie zastosowania do izolatów o znanych różnicach genetycznych	Identyfikacja genów jest trudna. Stosowana do różnicowania w obrębie serowarów; jeszcze nie jest dostępna do określania serowarów
Profil plazmidowy	Analiza plazmidów zawartych w izolacie	Dobra do badania ognisk	Poszczególne izolaty mogą łatwo nabywać lub tracić plazmidy. Nie stanowi narzędzia prawdziwej klasyfikacji
Analiza restrykcyjna plazmidów	Trawienie plazmidowego DNA enzymami restrykcyjnymi	Użyteczna do opisywania rozprzestrzeniania się oporności w populacjach bakteryjnych	Może być używana tylko dla szczepów, które zawierają podobne plazmidy. Nie mówi nic o bakteryjnym gospodarzu
Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE ³)	Restrykcyjne trawienie genomowego DNA i rozdział na żelu agarozowym przy użyciu zmiennego pola elektrycznego	Znormalizowana do celów porównawczych pomiędzy różnymi laboratoriami	Potrzebne kosztowne wyposażenie i odpowiednie oprogramowanie do porównywania wyników. Stosowanie ograniczone do laboratoriów referencyjnych/naukowych. Dla genomów <i>Salmonella</i> zmienność sekwencyjna badanych prób poniżej 1%
Polimorfizm długości zampifikowanych fragmentów DNA (AFLP ⁴ /FALFP ⁵)	Oparta na PCR modyfikacja elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). Markery fluorescencyjne do wykazania różnic pomiędzy fragmentami	Bardziej stabilna niż PFGE i zapewnia wyższy poziom różnicowania. Grupowanie dostosowane do zespołów serowarów	Kosztowne wyposażenie; do badania wyłacznie próbki stanowiące małe frakcje genomu wyznaczane poprzez miejsca cięcia enzymami restrykcyjnymi
Zmienna liczba tandemowych powtórzeń (VNTR ⁶ /MLVA ⁷)	Wielkość produktów PCR wskazuje liczbę kopii krótkich sekwencji repetytywnych	Stabilna i powtarzalna, może być zautomatyzowana. Zastosowano do typowania <i>S. Typhi</i> i <i>S. Typhimurium</i>	Wymaga zdefiniowania dla każdego obecnie znanego serowaru, może nie różnicować tak dobrze jak PFGE
Typowanie IS200 ⁸ lub rybotypowanie	Analiza wielokrotności elementów insercyjnych IS200 lub genów rRNA w oparciu o trawienie enzymami restrykcyjnymi i reakcję hybrydyzacji typu Southern	Elementy IS200 są dosyć stałymi elementami w naturalnych populacjach bakteryjnych. Zastosowano do typowania kilku serowarów	Rozróżnianie pomiędzy szczepami na niewysokim poziomie
Elektroforetyczna analiza izoenzymów (MLEE ⁹)	Izolowanie wybranych enzymów, ocena ich aktywności i punktu izoelektrycznego	Użyteczna na potrzeby ogólnej epidemiologii	Bardzo trudna technika, która nie może być zautomatyzowana
Oparta na sekwencji			
Sekwencjonowanie określonych fragmentów kilku wybranych genów odznaczających się pewnym stopniem polimorfizmu (MLST ¹⁰)	Porównanie sekwencji 7 genów kodujących enzymy metabolizmu podstawowego (tzw. „house-keeping genes”)	Określa podtypy <i>Salmonella</i> poprzez wykazanie filogenetycznego/ewolucyjnego pokrewieństwa. Dane w postaci cyfrowej, dokładnie powtarzalne	Nie różnicuje w obrębie serowaru. Analiza sekwencji jest obecnie kosztowna; stosowanie ograniczone do laboratoriów naukowych/referencyjnych
Mikromacierze	Hybrydyzacja DNA-DNA całego genomu ze znanymi sekwencjami DNA. Wykazanie obecności określonych genów w badanych fragmentach DNA	Obecność lub brak określonych genów może być wykazywana dla całych genomów kilku izolatów. Doskonała do określania genetycznego zróżnicowania	Bardzo kosztowna. Wykrycie mutacji punktowych trudne. Może wykrywać jedynie cechy reprezentowane na płytkach, nie może rozpoznawać nowo pojawiających się insercji

Objaśnienia: ¹ RAPD = Random Amplification of Polymorphic DNA; ² PCR = Polimerase Chain Reaction; ³ PFGE = Pulsed Field Gel Electrophoresis; ⁴ AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphism; ⁵ FALFP = Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism; ⁶ VNTR = Variable Number of Tandem Repeats; ⁷ MLVA = Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis; ⁸ IS200 = Insertion Sequence 200; ⁹ MLEE = Multilocus Enzyme Electrophoresis; ¹⁰ MLST = Multilocus Sequence Typing

Piśmiennictwo

1. Aissa R. B., Al-Galla N.: Molecular typing of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Corvallis, Anatum and Typhimurium from food and human stool samples in Tunisia, 2001-2004. *Epidemiol. Infect.* 2008, 136, 468-475.
2. Alvarez J., Sota M., Vivanco A. B., Perales I., Cisterna R., Rementeira A., Garaizar J.: Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 1734-1748.
3. Anjum M. F.: Revealing the mosaic nature of *Salmonella* genomes using microarrays, [w:] Rhen M., Maskell D., Mastroeni P., Threlfall J.: *Salmonella. Molecular Biology and Pathogenesis*. Horizon Bioscience, Norfolk 2007, 169-190.
4. Bannister B., Gillespie S., Jones J.: Gastrointestinal infections and food poisoning, [w:] Bannister B., Gillespie S., Jones J.: *Infection. Microbiology and Management*. Blackwell Publishing, Oxford 2006, 167-193.
5. Barrow P. A.: Serological diagnosis of *Salmonella* by ELISA and other tests, [w:] Wray C., Wray A.: *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, New York 2000, 407-427.
6. Bartkowiak J.: Badania molekularne w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych. *Przegl. Epidemiol.* 2003, 57, 381-389.
7. Batchelor M., Hopkins K. L., Liebana E., Slickers P., Ehrlich R., Mafura M., Aerostrup F., Mevius D., Clifton-Hadley F. A., Woodward M. J., Davies R. H., Threlfall E. J., Anjum M. F.: Development of a miniaturized microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008, 31, 440-451.
8. Chapin K. C., Lauderdale T.-L.: Reagents, stains, and media: Bacteriology, [w:] Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover J. C.: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC 2003, 354-383.
9. Constantine N. T., Lana D.: Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases, [w:] Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover J. C.: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC 2003, 218-233.
10. Cooke F. J., Threlfall E. J., Wain J.: Current trends in the spread and occurrence of human salmonellosis: molecular typing and emerging antibiotic resistance, [w:] Rhen M., Maskell D., Mastroeni P., Threlfall J.: *Salmonella. Molecular Biology and Pathogenesis*. Horizon Bioscience, Norfolk 2007, 1-27.
11. Dera-Tomaszewska B., Głównicka R.: Typy bakteriofagów *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce w latach 1986-1995. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1999, 51, 73-79.
12. Dera-Tomaszewska B., Głównicka R.: Zastosowanie immunoblottingu do diagnostyki duru brzusznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2007, 59, 241-250.
13. Dera-Tomaszewska B., Głównicka R.: Zastosowanie schematu Ward i wsp. do typowania bakteriofagów szczepów *Salmonella* Enteritidis występujących w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1999, 5, 281-288.
14. Duijkeren E. van, Wanner W. J. B., Houwers D. J., van Pelt W.: Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 11, 3980-3985.
15. Fielt J., Gniadkowski M.: Analiza genetyczna w bakteriologii i epidemiologii zakażeń bakteryjnych, [w:] Bala J. (red.): *Biologia molekularna w medycynie*. PWN, Warszawa 2006, 528-549.
16. Garaizar J., Porwollik S., Echeita A., Rementeria A., Herrera S., Wong R. M.-Y., Frye M., Usera M. A., McClelland M.: DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 2074-2078.
17. Goldman B. S., Halling C.: Genomics and the use of genomic tools to study pathogenic bacteria, [w:] Nickerson C. A., Schurr M. J.: *Molecular Paradigms of Infectious Diseases. A bacterial perspective*. Springer, New York 2006, 78-114.
18. Grimont P. A. D., Weill F.-X.: Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France 2007.
19. Guinée P. A. M., Leeuwen W. J.: Phage typing of *Salmonella*, [w:] Bergen T., Norris J. R.: *Methods in Microbiology*. Academic Press Inc., New York 1978, 157-191.
20. Gurtler V., Mayall B. C.: Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001, 51, 3-16.
21. Hollinger K.: Epidemiology and salmonellosis, [w:] Wray C., Wray A.: *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, New York 2000, 341-353.
22. Jagielski M., Kałużewski S.: Serodiagnostics duru brzusznego i durów rzekomych. Wyd. Medyczne PZH, Warszawa 2001.
23. Jones Y. E., McLaren I. M., Wray C.: Laboratory aspects of *Salmonella*, [w:] Wray C., Wray A.: *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, New York 2000, 393-405.
24. Kongmuang U., Luk J. M. C., Lindberg A. A.: Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 3072-3074.
25. Kowalczyk-Pecka D., Wernicki A., Puchalski A.: Lekowrażliwość oraz typy bakteriofagów szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych na terenie mikroregionu lubelskiego. *Przegl. Epidemiol.* 2003, 57, 201-209.
26. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* 2007, 46, 367-378.
27. Lalko J.: *Salmonella enteritidis* bacteriophage typing. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia* 1977, 28, 187-194.
28. Landeras E., GonzálezHevia M. A., Mendoza M. C.: Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis. Relationship between food, water and pathogenic strains. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 43, 81-90.
29. Lin J. S., Tsen H. Y.: Development and use of polymerase chain reaction for the detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples. *J. Food Prot.* 1999, 62, 1103-1110.
30. Madajczak G., Szych J.: Ocena testu Premi®Test *Salmonella* do identyfikacji nietypujących się pałeczek *Salmonella*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2010, 62, 29-36.
31. Malek W., Wdowiak S.: Współczesna systematyka bakterii. *Post. Mikrobiol.* 1996, 35, 119-137.
32. Malek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Szlachetka M.: Dylematy z koncepcją i definicją gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* 2008, 47, 177-182.
33. Nolte F. S., Caliendo A. M.: Molecular detection and identification of microorganisms, [w:] Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover J. C.: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC 2003, 234-266.
34. O'Hara C. M., Weinstein M. P., Miller J. M.: Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms, [w:] Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover J. C.: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC 2003, 185-217.
35. Olsen J. E.: Molecular typing of *Salmonella*, [w:] Wray C., Wray A.: *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, New York 2000, 429-446.
36. Pawliczak R., Kowalski M. L.: Badanie ekspresji genów metodą microarray – perspektywy wykorzystania w medycynie. *Alerg. Astma Immun.* 2001, 6, 77-85.
37. Pieniążek N. J.: Podstawy diagnostyki molekularnej, [w:] Bala J.: *Biologia molekularna w medycynie*. PWN, Warszawa 2006, 506-519.
38. Rushdy A. A., Wall R., Seng C., Wall P. G., Stuart J. M., Ridley A. M., Threlfall E. J., Ward L. R.: Application of molecular methods to a nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 4. *J. Hosp. Infect.* 1997, 36, 123-131.
39. Schoolnik G. K.: Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002, 5, 20-26.
40. Sool D. R., Lockhart S. R., Pujol C.: Laboratory procedure for the epidemiological analysis of microorganisms, [w:] Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover J. C.: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC 2003, 139-161.
41. Tokarska-Pietrzak E., Kunikowska D., Dera-Tomaszewska B., Głównicka R.: Typowanie bakteriofagów w diagnostyce *Salmonella* Enteritidis. *Mat. Konf. „Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią”*, 5-6 października 2007, Gdańsk-Sobieszewo, P-17, s. 54.
42. Vandame P.: Taxonomy and classification of bacteria, [w:] Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover J. C.: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC 2003, 271-285.
43. Waltman W. D.: Methods for the cultural isolation of *Salmonella*, [w:] Wray C., Wray A.: *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, New York 2000, 255-372.
44. Ward L. R., de Sa J. D., Rowe B.: A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* 1987, 106, 291-294.
45. Wattiau P., Van Hoesche M., Schlicker C., Vander Veken H., Imberechts H.: Comparison of classical serotyping and PremiTest assay for routine identification of common *Salmonella enterica* serovars. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 12, 4037-4040.
46. Wattiau P., Weijers T., Andreoliu P., Schilker C., Vander Veken H., Maas H. M. E., Verbruggen A. J., Heck M. E. O. C., Wanner W. J., Imberechts H., Vos P.: Evaluation of the PremiTest *Salmonella*, a commercial low-density DNA microarray system intended for routine identification and typing of *Salmonella enterica*. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 123, 293-298.
47. Wysocki J., Dera-Tomaszewska B., Tokarska-Pietrzak E., Strzałkowski L., Głównicka R.: Agglutination assays and ELISA for detecting egg yolk antibodies in flocks naturally infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Rec.* 2002, 151, 304-305.

Adres autora: dr Bożena Dera-Tomaszewska, ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk; e-mail: bodeto@gumed.edu.pl