

# Ocena skuteczności metod inwersji faz antygenów rzęskowych *Salmonella*

MAGDALENA ZAJĄC, ANDRZEJ HOSZOWSKI, MAGDALENA SKARŻYŃSKA,  
ANNA LALAK, ILONA SAMCIK, DARIUSZ WASYL

Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,  
24-100 Puławy, ul. Partyzantów 57

Otrzymano 17.03.2015

Zaakceptowano 15.04.2015

Zajac M., Hoszowski A., Skarzyńska M., Lalak A., Samcik I., Wasyl D.

## Assessment of the efficacy of phase inversion methods in *Salmonella* diagnostics

### Summary

Expression of flagellar antigens is necessary to determine the complete antigenic structure of a *Salmonella* isolate. In many cases, this involves techniques that make it possible to select bacterial cells capable of expressing the currently inhibited antigen phase. The aim of the study was to compare the effectiveness of three available methods used for phase inversion of the flagellar antigens of *Salmonella*: Gard's plate, Craigie's tube and the paper bridge method. A total of 137 isolates with the expression of somatic antigen and only one of the two flagella phases were selected for the study. The three techniques identified *Salmonella* serovars in 83.2% (114/137) of the isolates tested. The paper bridge method proved to be the most effective technique, identifying inhibited antigens in 97.3% of isolates, followed by Gard's plate and Craigie's tube, which were successful in, respectively, 60.5% and 40.3% of cases. The specificity of each method was 100%. The test lasted 24 hours for all isolates tested by Gard's plate method, from 48 to 96h in the paper bridge method, and at least 48 h in Craigie's tube method. The results show that the paper bridge method is a simple and inexpensive technique of phase inversion, highly effective in *Salmonella* identification. However, if rapid identification is required, Gard's plate can be used simultaneously with the paper bridge method, so that the test can be continued by the latter method if the expected result is not achieved within the first day.

**Keywords:** *Salmonella*, phase inversion, flagellar antigens

Identyfikacja serologiczna *Salmonella* zgodna ze schematem White'a-Kauffmanna-Le Minora (WKL) (10), pomimo opracowania szeregu metod molekularnych (1, 19, 23, 24), od lat pozostaje referencyjną metodą diagnostyczną. Określenie serowaru *Salmonella* polega na identyfikacji dwóch typów antygenów: lipopolisacharydowych antygenów somatycznych (antygeny O) oraz białek flageliny (antygeny H), które są elementem składowym rzęsek warunkujących zdolność *Salmonella* do ruchu (3). Na podstawie antygenów somatycznych serowary są klasyfikowane do 46 grup serologicznych. Dziewięćdziesiąt dziewięć różnych czynników antygenowych tworzy 114 znanych obecnie antygenów rzęskowych. Kombinacje antygenów somatycznych i rzęskowych pozwoliły wyróżnić 2659 serowarów *Salmonella* (15).

Białka flageliny reprezentują dwa serologicznie różne typy, FljB i FliC, których strukturę kodują, odpowiednio, geny fljB i fliC (3, 18). Konserwatywny charakter końców 5' i 3' obu genów skutkuje identyczną strukturą 71 pierwszych i 46 ostatnich aminokwasów flageliny, które odpowiadają za połączenie z pozostałymi elementami

strukturalnymi rzęski. Różna antygenowość eksponowanej na zewnątrz komórki bakteryjnej części flageliny (181-390 aminokwasów) wynika z dużej zmienności centralnego fragmentu obu genów (19). Flageliny kodowane przez fliC określane są mianem antygenów fazy 1, a przez fljB klasyfikuje się jako antygeny fazy 2. Pojedyncza komórka *Salmonella* w danym momencie produkuje tylko jeden z typów flageliny. Domyślna orientacja genów promuje transkrypcję fliC i ekspresję fazy 1 (2). Z kolei ekspresja FljB skutkuje szeregiem przemian, których efektem jest hamowanie transkrypcji fliC. Zmiana ekspresji fazy zachodzi z częstością raz na  $10^3 \div 10^5$  generacji komórek, a proces ten jest regulowany przez układ kilkudziesięciu genów (2, 3, 19). Utrata lub brak funkcjonalności jednego z tych genów powoduje, że niektóre serowary wykształcają tylko jedną fazę antygenów lub nie są zdolne do wykształcenia sprawnych rzęsek (5, 14, 17). Niektóre serowary *Salmonella* posiadają dodatkowe antygeny „fazy R” (10) kodowane przez zlokalizowany na plazmidzie gen flpA (19, 22).

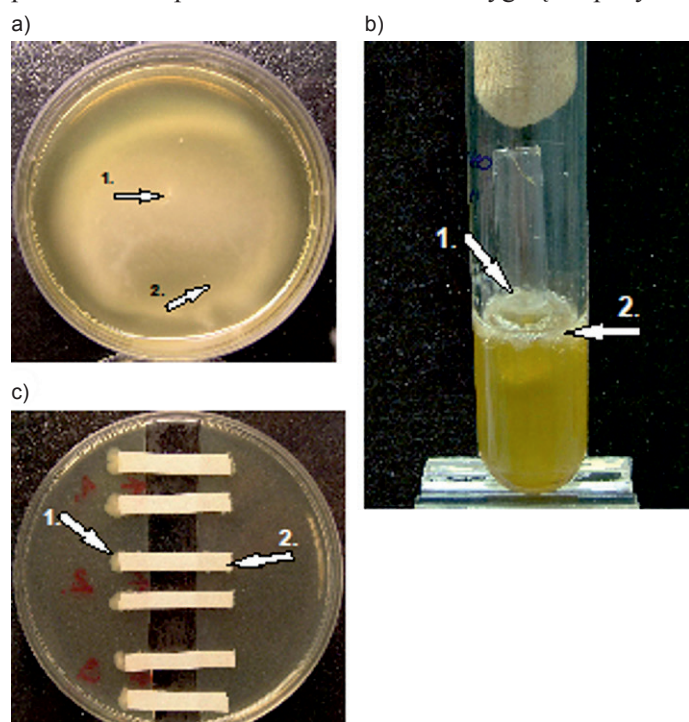
Do identyfikacji serologicznej szczepów niezbędne jest dysponowanie ponad 250 różnymi surowicami

diagnostycznymi, do produkcji których potrzebnych jest 350 antygenów. Serotypowanie zgodne z WKLM można wykonać dwiema podstawowymi technikami – aglutynacją probówkową oraz odczynem aglutynacji szkiełkowej (4, 21, 23). W obu przypadkach konieczna jest odpowiednia ekspresja antygenów rzęskowych badanego szczepu bakteryjnego. Określenie pełnej struktury antygenowej izolatów ukazujących ekspresję jednej z faz rzęskowych wymaga zastosowania technik, których celem jest wyselekcjonowanie z populacji bakterii komórek zdolnych do produkcji aktualnie zahamowanej fazy antygeny (6, 16).

Celem badań było porównanie efektywności trzech ogólnie dostępnych technik wykorzystywanych do inwersji faz antygenów rzęskowych *Salmonella*: płytki Garda, próbki Craigie'a oraz mostka bibułowego.

### Materiał i metody

W badaniach wykorzystano 137 terenowych izolatów *Salmonella* uzyskanych w weterynaryjnych laboratoriach diagnostycznych od zwierząt, z żywności i pasz. Izolaty te w badaniu metodą aglutynacji szkiełkowej wykazywały obecność antygenów somatycznych oraz jednej z dwóch faz rzęskowych. Zidentyfikowaną fazę antygenów poddawano inwersji przy pomocy trzech stosowanych równocześnie technik: płytki Garda (ryc. 1a) (16), próbki Craigie'a (ryc. 1b) (16) oraz mostka bibułowego (ryc. 1c) (4). Pierwsza metoda polegała na zastosowaniu 0,6% agaru AKG służącego do ekspresji antygenów rzęskowych *Salmonella* (13), zawierającego surowicę diagnostyczną z przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom aktualnie ekspozowanej fazy rzęskowej, dodawaną w objętości 100  $\mu$ l/10 ml do podłoża o temperaturze ok. 50°C. Po zastygnięciu pożywki



Ryc. 1. Hodowla bakteryjna szczepu *S. Typhimurium* z dodatkiem surowicy H:i (1 – miejsce posiewu hodowli; 2 – miejsce pobrania hodowli do aglutynacji szkiełkowej z surowicą diagnostyczną H:1,2): a) na płytce Garda, b) w próbce Craigie'a c) w metodzie mostka bibułowego

w centrum jej powierzchni punktowo posiewano badany izolat i inkubowano przez noc w temperaturze  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , uzyskując wzrost hodowli na całej powierzchni pożywki. Materiał do oznaczeń serologicznych pobierano z miejsca maksymalnie oddalonego od miejsca posiewu. W kolejnej metodzie hodowlę bakteryjną inkubowano w próbówce z 0,25% agarem półpłynnym, do którego uprzednio dodano odpowiednią surowicę diagnostyczną w ilości 100  $\mu$ l/10 ml pożywki (ryc. 1b). Badany szczep posiewano eżąd pożywki w rurce znajdującej się wewnątrz próbówki, a inkubację ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) prowadzono do momentu zmętnienia całej pożywki. Do oznaczeń pobierano hodowlę tuż spod powierzchni agaru na zewnątrz rurki (ryc. 1b) i wysiewano na płytkę z agarem AKG. Hodowlę do aglutynacji pobierano po inkubacji ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , przez noc) z różnych części powierzchni pożywki. Metoda mostka bibułowego została opublikowana w 2005 r. przez Chiou i wsp. (4). Zastosowana w badaniach modyfikacja tej metody polegała na połączeniu brzegów szczeliny (1 cm) w agarze odżywczym jałowymi mostkami z bibuły (Whatman 3Chr) o długości ok. 3 cm i szerokości 0,5 cm (ryc. 1c), które były następnie nasączone 20  $\mu$ l surowicy diagnostycznej. Bezpośrednio z agaru AKG wykonywano posiew badanego izolatu na jeden z brzegów mostka, a płytkę inkubowano w  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  do momentu pojawienia się po przeciwległej stronie wzrostu bakterii, które następnie przesiewano na agar AKG. Do inwersji oraz reakcji aglutynacji szkiełkowej używano surowic diagnostycznych tych samych producentów oraz serii (Immunolab, Sifin lub SSI).

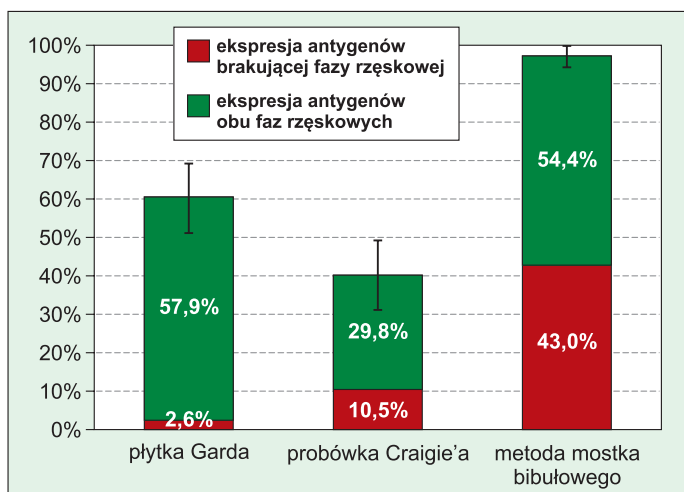
**Kryteria oceny.** Za wynik dodatni przyjęto uzyskanie reakcji umożliwiającej identyfikację serowaru badanego szczepu *Salmonella*. Jeżeli żadna z zastosowanych technik inwersji fazy nie pozwoliła na uzyskanie wyniku dodatniego w ciągu 96 godz., przyjmowano, że szczep reprezentuje właściwości antygenowe nie pozwalające na identyfikację serowaru. W analizie statystycznej obliczono specyficzność metod oraz wykorzystano test niezależności  $\chi^2$  ( $P = 0,05$ ) i test zgodności metod (test  $\kappa$  – kappa).

### Wyniki i omówienie

Zastosowane techniki pozwoliły na zidentyfikowanie serowaru *Salmonella* u 114 (83,2%) badanych izolatów. Izolaty te zakwalifikowano do 18 serowarów (tab. 1). W przypadku pozostałych 23 izolatów uznano, że reprezentują jednofazowe, atypowe warianty serologiczne. Posługując się płytką Garda inwersję faz uzyskano w 60,5% (95%CI = 51,5% ÷ 69,5%) ze 114 izolatów, natomiast próbka Craigie'a była skuteczna w 40,3% (95%CI = 31,4% ÷ 49,4%) przypadków (ryc. 2). Metoda mostka bibułowego pozwoliła na określenie antygenów szukanej fazy w odniesieniu do 97,3% (95%CI = 94,4% ÷ 100%) izolatów. Stwierdzone różnice w skuteczności poszczególnych metod do inwersji faz rzęskowych były istotne statystycznie ( $P \leq 0,001$ ). Specyficzność każdej z metod wyniosła 100%. W metodzie mostka bibułowego w największym odsetku testowanych izolatów uzyskano ekspresję wyłącznie brakującej fazy antygenów rzęskowych (43,0%). W pozostałych 54,4% uzyskano ekspresję obu faz antygenów. W przypadku płytki Garda i próbki Craigie'a odsetek izolatów wykazujących obecność tylko poszukiwanej fazy wyniósł 2,6% i 10,5%.

Tab. 1. Zestawienie szczepów *Salmonella* objętych badaniem

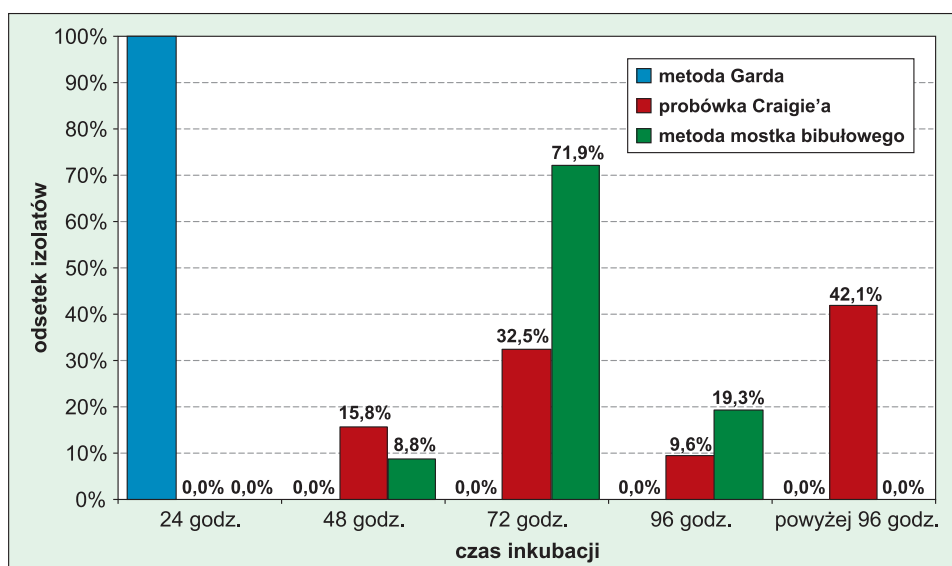
Rozpoznany serowar <i>Salmonella</i>	Faza antygenowa wymagająca inwersji	Liczba szczepów badanych	Liczba (%) wyników dodatnich (uzyskanie ekspresji szukanej fazy antygenu rzęskowego)					
			płytki Garda		probówka Craigie'a		mostek bibułowy	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:1,2)	H1: i	30	16	53	9	30	29	97
	H2:1,2	9	5	55	0	0	8	89
	razem	39	21	54	9	23	37	95
<i>S. Mbandaka</i> (6,7,14:z <sub>10</sub> :e,n,z <sub>15</sub> )	H1: z <sub>10</sub>	16	7	44	4	25	16	100
	H2:e,n,z <sub>15</sub>	2	1	50	2	100	2	100
	razem	18	8	44	6	33	18	100
<i>S. Infantis</i> (6,7,14:r:1,5)	H1: r	11	5	45	9	82	11	100
	H2: 1,5	2	2	100	0	0	2	100
	razem	13	7	54	9	69	13	100
<i>S. Virchow</i> (6,7,14:r:1,2)	H1: r	8	5	62	5	62	8	100
	H2: 1,2	1	1	100	1	100	1	100
	razem	9	6	67	6	67	9	100
<i>S. Putten</i> (13,23:d:l,w)	H1: d	7	5	71	4	58	7	100
	H2: l,w	1	1	100	1	100	1	100
	razem	8	6	75	5	62	8	100
<i>S. Hadar</i> (6,8:z <sub>10</sub> :e,n,x)	H1: z <sub>10</sub>	5	5	100	2	40	5	100
	H2: e,n,x	0	-	-	-	-	-	-
	razem	5	5	100	2	40	5	100
<i>S. Saintpaul</i> (1,4,[5],12:e,h:1,2)	H1: e,h	3	2	67	2	67	3	100
	H2: 1,2	1	1	100	0	0	0	0
	razem	4	3	75	2	50	3	75
<i>S. Indiana</i> (1,4,12:z:1,7)	H1: z	0	-	-	-	-	-	-
	H2: 1,7	3	3	100	0	0	3	100
	razem	3	3	100	0	0	3	100
<i>S. Newport</i> (6,8,20:e,h:1,2)	H1: e,h	3	1	33	2	67	3	100
	H2: 1,2	0	-	-	-	-	-	-
	razem	3	1	33	2	67	3	100
<i>S. Salford</i> (16:l,v:e,n,x)	H1: l,v	2	2	100	2	100	2	100
	H2: e,n,x	0	-	-	-	-	-	-
	razem	2	2	100	2	100	2	100
<i>S. Schwarzengrund</i> (1,4,12,27:d:1,7)	H1: d	1	0	0	1	100	1	100
	H2: 1,7	1	0	0	0	0	1	100
	razem	2	0	0	1	50	2	100
<i>S. Thompson</i> (6,7,14:k:1,5)	H1: k	2	0	0	0	0	2	100
	H2: 1,5	0	-	-	-	-	-	-
	razem	2	0	0	0	0	2	100
<i>S. Anatum</i> (3,10,{15}{15,34}:e,h:1,6)	H1: e,h	0	-	-	-	-	-	-
	H2: 1,6	1	1	100	1	100	1	100
	razem	1	1	100	1	100	1	100
<i>S. Chester</i> (1,4,[5],12:e,h:e,n,x)	H1:e,h	1	1	100	1	100	1	100
	H2: e,n,x	0	-	-	-	-	-	-
	razem	1	1	100	1	100	1	100
<i>S. Heidelberg</i> (1,4,[5],12:r:1,2)	H1: r	1	1	100	0	0	1	100
	H2: 1,2	0	-	-	-	-	-	-
	razem	1	1	100	0	0	1	100
<i>S. Lexington</i> (3,10,{15}{15,34}:z <sub>10</sub> :1,5)	H1: z <sub>10</sub>	0	-	-	-	-	-	-
	H2: 1,5	1	1	100	1	100	0	0
	razem	1	1	100	1	100	0	0
<i>S. Livingstone</i> (6,7,14:d:l,w)	H1: d	1	1	100	0	0	1	100
	H2: l,w	0	-	-	-	-	-	-
	razem	1	1	100	0	0	1	100
<i>S. Mikawasima</i> (6,7,14:y:e,n,z <sub>15</sub> )	H1: y	1	1	100	0	0	1	100
	H2: e,n,z <sub>15</sub>	0	-	-	-	-	-	-
	razem	1	1	100	0	0	1	100



Ryc. 2. Częstość ekspresji poszczególnych faz antygenów rzęskowych w zastosowanych metodach inwersji faz rzęskowych *Salmonella*

Zestawienie wyników, z uwzględnieniem końcowej identyfikacji szczepów przedstawiono w tab. 1. Do faz rzęskowych najczęściej wykazujących silną ekspresję i wymagających inwersji należały: H:i (26,3%), H:z<sub>10</sub> (19,3%), H:r (17,5%), a w dalszej kolejności H:1,2 (9,6%) i H:d (8,7%).

Czas trwania badania, obejmujący etap inwersji fazy oraz przygotowanie hodowli do aglutynacji, zależał od metody i wyniósł 24 godz. w przypadku wszystkich izolatów testowanych metodą płytki Garda, od 48 do 96 h przy zastosowaniu mostka bibulowego (w przypadku 71,9% izolatów wynik uzyskano w ciągu 96 godz.) oraz co najmniej 48 godz. w probówce Craigie'a (ryc. 3). W dwóch ostatnich metodach do wykonania aglutynacji konieczny był posiew na agar półpłynny, co wpływało na wydłużenie czasu niezbędnego do identyfikacji struktury antygenowej badanego izolatu *Salmonella* o kolejną dobę. Stosując probówkę Craigie'a w 47,3% przypadków nie zaobserwowano wzrostu bakterii w agarze półpłynnym (ryc. 3).



Ryc. 3. Czas trwania badania izolatów w zastosowanych metodach inwersji faz rzęskowych *Salmonella*

Odpowiednio dobrane metody identyfikacji *Salmonella*, pozwalające na szybkie uzyskanie wiarygodnego wyniku, są kluczowym warunkiem wykorzystywania wyników badań laboratoryjnych. Niebagatelne znaczenie dla laboratorium diagnostycznego ma koszt oznaczenia. Pomimo opracowania wielu technik molekularnych (1, 8, 20, 25), podstawową od blisko stu lat i jedyną metodą identyfikacji *Salmonella* dopuszczoną przy badaniu próbek uzyskiwanych w trakcie realizacji krajowych programów zwalczania *Salmonella* w stadach drobiu na terenie UE pozostaje serotypowanie w oparciu o WKLM. Do określenia pełnej struktury antygenowej izolatu *Salmonella* niejednokrotnie niezbędne jest wykorzystywanie inwersji faz rzęskowych. Każda z prezentowanych technik jest prosta i nie wymaga dodatkowego wyposażenia laboratorium mikrobiologicznego.

Podstawową cechą różniącą wykorzystane metody jest ich skuteczność. Metoda mostka bibulowego pozwala zidentyfikować do 100% izolatów wykazujących pełną strukturę antygenową. Dla porównania, probówka Craigie'a pozwoliła na identyfikację mniej niż połowy badanych izolatów, a płytki Garda nieco więcej niż połowę. Wyniki te są zbliżone z wnioskami autorów metody mostka bibulowego (4), którzy wśród przyczyn ewentualnej nieskuteczności metody wyliczają błędy laboratoryjne, takie jak niedostateczne wysuszenie powierzchni agaru lub niepełne nasączenie mostka surowicą. W prezentowanych badaniach „barierę przeciwciał” na mostku bibulowym uzyskano poprzez zwiększenie jego szerokości oraz większą niż w pierwotnych badaniach objętość surowicy (4). Objętość ta była jednak i tak kilkakrotnie mniejsza niż w pozostałych porównywanych metodach.

Wadą metody mostka bibulowego jest konieczność wydłużenia czasu badania związanego z dodatkowym etapem inkubacji hodowli na agarze odżywcym oraz większym nakładem pracy, co wpływa na koszt takiego postępowania, jednakże cenę metody mostka bibulowego można obniżyć poprzez jednoczesne wykonanie na tym samym agarze odżywcym inwersji kilku izolatów *Salmonella*. Bezkonkurencyjna w tym aspekcie pozostaje płytka Garda, dająca możliwość wykonania aglutynacji szkiełkowej bezpośrednio z hodowli uzyskanej na agarze z dodatkiem surowicy. Należy jednak podkreślić, że czas badania w metodzie mostka bibulowego został skrócony w stosunku do wersji pierwotnej na skutek rezygnacji z kilkugodzinnego etapu przednamnażania. Również rezygnacja z przygotowania hodowli do badania (zawiesina w płynie fizjologicznym z dodatkiem formaliny) nie odbiła się negatywnie na skuteczności metody (4). Należy podkreślić, że

subiektywnie oceniana jakość odczynu aglutynacji (intensywność i czas powstawania strąków antygen – przeciwciała) w przypadku hodowli uzyskanej na mostku bibułowym była lepsza niż obserwowana w przypadku płytki Garda. Pozwala to na wydajniejszą identyfikację tzw. „trudnych” izolatów *Salmonella*, w tym wykazujących właściwości autoaglutynacyjne (25).

Biorąc pod uwagę częstość występowania jednofazowych szczepów *Salmonella* oraz problemy podczas posługiwania się klasyczną fenotypową metodą serotypowania, należy rozważyć wprowadzenie na szerszą skalę technik biologii molekularnej, zwłaszcza bazujących na reakcjach PCR, których stosowanie jest niezbędne w odniesieniu do jednofazowych szczepów *Salmonella* Typhimurium (7). Warto odnotować, że niektóre z technik biologii molekularnej naśladują ideę zawartą w schemacie WKLM, gdyż stwarzają możliwość wykrywania genów kodujących strukturę antygenową *Salmonella* (9, 24). Kolejnym przykładem metody, którą można zastosować do identyfikacji *Salmonella*, jest Multilocus sequence typing (MLST). Na podstawie różnic w sekwencjach siedmiu genów rdzeniowych pozwala ona wyróżnić typy ST (Sequence types), które są specyficzne dla określonych serowarów (1). Pomimo że metoda w niektórych przypadkach wykazuje rozbieżności z serotypowaniem wg WKLM, jej autorzy uważają, że może ona zastąpić dotychczas stosowaną klasyfikację referencyjną. Na razie jest stosowana wyłącznie w dochodzeniu epidemiologicznym (1), dając możliwość zidentyfikowania stosunkowo dużej liczby (~ 600) serowarów. W przypadku innych metod np. techniki opartej na mikromacierzach wykorzystujących różnorodność genetyczną szczepów, liczba ta jest znacznie niższa (11, 24, 25), a metody immunoseparacji identyfikują *Salmonella* tylko do poziomu grupy (9). Pomimo faktu, że w określonym czasie na danym obszarze geograficznym znaczenie epidemiologiczne ma ograniczona liczba serowarów *Salmonella* (12), opracowane w latach 30. XX wieku serotypowanie prawdopodobnie jeszcze na długi czas pozostanie metodą referencyjną.

Reasumując, uzyskane wyniki wskazują na fakt, że zmodyfikowana metoda mostka bibułowego opisana przez Chiou i wsp. (4) jest prostą, relatywnie szybką i tanią techniką inwersji faz rzęskowych, która gwarantuje wysoką skuteczność przy identyfikacji serowarów *Salmonella*. Jeżeli jednak z jakichkolwiek powodów laboratorium diagnostycznemu zależy na czasie uzyskania ostatecznego wyniku badania, można podjąć próbę zastosowania płytki Garda. Biorąc pod uwagę znacznie niższą skuteczność tej metody, możliwe jest zastosowanie obu metod równocześnie, a w przypadku braku oczekiwanego wyniku w pierwszej dobie badania – jego kontynuacja z wykorzystaniem mostka bibułowego.

### Piśmiennictwo

1. Achtman M., Wain J., Weill F. X., Nair S., Zhou Z., Sangal V., Krauland M. G., Hale J. L., Harbottle H., Uesbeck A., Dougan G., Harrison L. H., Brisse S.: Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS pathogens 2012, 8, e1002776.

2. Baker S., Holt K., Whitehead S., Goodhead I., Perkins T., Stocker B., Hardy J., Dougan G.: A linear plasmid truncation induces unidirectional flagellar phase change in H:z66 positive *Salmonella* Typhi. Mol. Microbiol. 2007, 66, 1207-1218.
3. Bonifield H. R., Hughes K. T.: Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. J. Bacteriol. 2003, 185, 3567-3574.
4. Chiou C. S., Huang J. F., Tsai L. H., Hsu K. M., Liao C. S., Chang H. L.: A simple and low-cost paper-bridged method for *Salmonella* phase reversal. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2006, 54, 315-317.
5. Dauga C., Zabrovskaja A., Grimont P. A.: Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 2835-2843.
6. Davies R. H., Wray C.: Immunomagnetic separation for enhanced flagellar antigen phase inversion in *Salmonella*. Lett. Appl. Microbiol. 1997, 24, 217-220.
7. EFSA/Biohaz. Scientific opinion on monitoring and assessment of public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. EFSA Journal 2010, 8, 1-44.
8. Fabre L., Zhang J., Guigon G., Le Hello S., Guibert V., Accou-Demartin M., De Romans S., Lim C., Roux C., Passet V., Diancourt L., Guibourdenche M., Issenhuht-Jeanjean S., Achtman M., Brisse S., Sola C., Weill F. X.: CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. PLoS One 2012, 7, e36995.
9. Fitzgerald C., Collins M., Van Duyne S., Mikoleit M., Brown T., Fields P.: Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. J. Clin. Microbiol. 2007, 45, 3323-3334.
10. Grimont P. A. D., Weill F.-X.: Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9<sup>th</sup> edition ed., WHO Collaborating Centre for Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris 2007.
11. Guard J., Sanchez-Ingunza R., Morales C., Stewart T., Liljebjelke K., Van Kessel J., Ingram K., Jones D., Jackson C., Fedorka-Cray P., Frye J., Gast R., Hinton A.: Comparison of *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*. FEMS Microbiol. Lett. 2012, 337, 61-72.
12. Hoszowski A., Skarżyńska M., Wasyl D., Zajac M., Lalak A., Samcik I., Wnuk D.: Serowary *Salmonella* występujące u zwierząt, w żywności i paszach w Polsce w latach 2005-2010. Med. Weter. 2012, 68, 411-417.
13. Hoszowski A., Wasyl D.: Pożywka agarowa AKG do ekspresji faz antygenów rzęskowych *Salmonella*, sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie pożywki do identyfikacji antygenów rzęskowych *Salmonella*. Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy 2012, P-401498.
14. Imre A., Olasz F., Nagy B.: Development of a PCR system for the characterisation of *Salmonella* flagellin genes. Acta Vet. Hung. 2005, 53, 163-172.
15. Issenhuht-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., De Pinna E., Nair S., Fields P. I., Weill F. X.: Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res. Microbiol. 2014, 165, 526-530.
16. Juenker A. P.: A rapid method of phase isolation in *Salmonella* cultures. J. Bacteriol. 1946, 52, 609.
17. Kilger G., Grimont P. A.: Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fljC* gene. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 1108-1110.
18. Madajczak G.: *Salmonella* multiphasic flagellar antigen. Postępy Hig. Med. Dosw. 2012, 66, 446-451.
19. McQuiston J. R., Parrenas R., Ortiz-Rivera M., Gheesling L., Brenner F., Fields P. I.: Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fljC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 1923-1932.
20. Prendergast D. M., Grady D. O., Mccann A., McCabe E., Fanning S., Egan J., Fanning J., Gutierrez M.: Application of PCR for rapid detection and serotyping of *Salmonella* spp. from porcine carcass swabs following enrichment in semi-solid agar. Food Res. Int. 2012, 45, 993-999.
21. Schrader K. N., Fernandez-Castro A., Cheung W. K., Crandall C. M., Abbott S. L.: Evaluation of commercial antisera for *Salmonella* serotyping. J. Clin. Microbiol. 2008, 46, 685-688.
22. Smith N. H., Selander R. K.: Molecular genetic basis for complex flagellar antigen expression in a triphasic serovar of *Salmonella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 956-960.
23. Wattiau P., Boland C., Bertrand S.: Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. Appl. Environ. Microbiol. 2011, 77, 7877-7885.
24. Yoshida C., Lingohr E. J., Trognitz F., Maclaren N., Rosano A., Murphy S. A., Villegas A., Polt M., Franklin K., Kostic T., Kropinski A. M., Card R. M.: Multi-laboratory evaluation of the rapid genosubtyping array (SGSA) for the identification of *Salmonella* serovars. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2014, 80, 185-190.
25. Zajac M., Hoszowski A., Wasyl D.: Identification of common, non-typable and autoagglutinating *Salmonella* strains with Premi®Test *Salmonella* Assay. Acta Vet. Hung. 2013, 61, 425-431.

Adres autora: mgr Magdalena Zajac, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;  
e-mail: magdalena.zajac@piwet.pulawy.pl