

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XLIII
2013
SUPPLEMENT 3**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Bożena Dera-Tomaszewska

Epidemiologia i chorobotwórczość pałeczek *Salmonella* Enteritidis oraz serowarów *Salmonella* izolowanych w Polsce po raz pierwszy

Epidemiology and pathogenicity of Salmonella Enteritidis and Salmonella serovars first isolated in Poland

Rozprawa habilitacyjna

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Katedry Mikrobiologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Krajowy Ośrodek *Salmonella*
Kierownik: dr hab. n. med. Lidia Piechowicz

GDAŃSK 2013

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
Marek Grzybiak

HONOROWY REDAKTOR NACZELNY
HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Stefan Raszeja

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – Adam Szarszewski
sekretarz redakcji – Włodzimierz Kuta
redaktor techniczny – Tadeusz Skowyra
Tomasz Bączek, Zdzisław Bereznowski, Dariusz Kozłowski, Anna Grygorowicz, An-
drzej Hellmann, Jerzy Kuczkowski, Krzysztof Narkiewicz, Michał Obuchowski,
Zbigniew Kmieć, Julian Świerczyński, Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales Academiae Medicae Gedanensis
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales Academiae Medicae Gedanensis are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Motto:

*“Not all salmonella-types are equally
pathogenic for man, although none of them
can be considered as essentially harmless”.*

F.N. Sickenga

(Transmission of salmonellae and pathogenes of salmonellosis
in man. W: The world problem of salmonellosis, Hague, E. Van
Oye, Dr. W. Junk Publisher, 1964, str. 219)

**Z okazji 50-lecia Krajowego Ośrodka *Salmonella* (1957 –
2007) – z wyrazami szacunku i w dowód uznania, pracę
dedykuję wszystkim, którzy swoją karierę naukową i ży-
cie zawodowe związali z jego działalnością.**

Składam serdeczne podziękowania

Pani prof. dr hab. med. Renacie Głońskiej, wieloletniemu Kierownikowi Krajowego Ośrodka *Salmonella* i opiekunowi naukowemu niniejszej rozprawy, za otwartość, życzliwość, stworzenie warunków do pracy, do stawiania hipotez i ich weryfikacji, za czas poświęcony na dyskusję merytoryczną w ramach wszystkich realizowanych prac,

ś.p. Pani prof. dr hab. med. Annie Podhajskiej, która zaszczerpiła we mnie zainteresowanie nauką i skierowała na drogę pracy naukowej, ś.p. Pani dr hab. Janinie Lalko i ś.p. Pani prof. dr hab. med. Krystynie Pietkiewicz za ogromną życzliwość, motywowanie do pracy i rozwoju zainteresowań naukowych

oraz

moim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej, bez których współpracy i przyjaźni praca ta nigdy by nie powstała, a także wszystkim pozostałym Osobom, które poświęcały mi swój cenny czas, dzieliły się swoimi doświadczeniami, wspierały w trudnych chwilach i okazywały wyrozumiałość.

Szczególne podziękowania składam Pani prof. Annie Kędzi, Kierownikowi Katedry Mikrobiologii, za wnikliwą ocenę merytoryczną niniejszej pracy, za wielką życzliwość, wsparcie i wszelką pomoc niezbędną przy realizacji procesu habilitacyjnego.

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	10
1. Wstęp.....	13
1.1. Rodzaj <i>Salmonella</i>	13
1.1.1. Ogólna charakterystyka bakterii <i>Salmonella</i>	13
1.1.2. Występowanie pałeczek <i>Salmonella</i>	15
1.1.3. Klasyfikacja i nazewnictwo bakterii <i>Salmonella</i>	20
1.1.4. Struktura antygenowa bakterii <i>Salmonella</i>	24
1.1.4.1. Antygeny somatyczne	25
1.1.4.2. Antygeny otoczkowe.....	31
1.1.4.3. Antygeny rzęskowe	34
1.1.4.4. Schemat White'a-Kauffmanna-Le Minora.....	37
1.2. Genetyczne podstawy zróżnicowania bakterii <i>Salmonella</i>	39
1.2.1. Ogólna charakterystyka genomu <i>Salmonella</i>	40
1.2.1.1. Analiza porównawcza sekwencji genomów <i>Salmonella</i>	40
1.2.1.2. Wyspy patogenności bakterii <i>Salmonella</i>	41
1.2.2. Pozachromosomalne elementy genetyczne bakterii <i>Salmonella</i>	42
1.2.2.1. Plazmidy.....	42
1.2.2.2. Bakteriofagi.....	47
1.3. Patogeneza zakażeń <i>Salmonella</i>	49
1.3.1. Ogólna charakterystyka mechanizmów zakażeń <i>Salmonella</i>	49
1.3.2. Udział czynników wirulencji w patogenezie zakażeń <i>Salmonella</i>	50
1.4. Etiologia i charakterystyka kliniczna zakażeń <i>Salmonella</i>	55
1.5. Izolacja i identyfikacja bakterii <i>Salmonella</i>	58
1.5.1. Typowanie serologiczne	66
1.5.2. Typowanie bakteriofagowe	67
1.6. Zapobieganie, zwalczanie i kontrola zakażeń spowodowanych bakteriami <i>Salmonella</i>	69
1.7. Serowary <i>Salmonella</i> występujące w Polsce w latach 1946 – 1994	72
1.8. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar Enteritidis	84
1.8.1. Występowanie pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis	85
1.8.2. Typy bakteriofagowe <i>Salmonella</i> Enteritidis	88
1.8.3. Białko szoku termicznego Hsp60 bakterii <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	94
2. Cele pracy.....	100
3. Materiał i metody	102
3.1. Typowanie biochemiczne i serologiczne	102
3.1.1. Szczepy bakteryjne	102
3.1.2. Hodowla szczepów	102
3.1.3. Testy biochemiczne	103

3.1.4. Surowice diagnostyczne do identyfikacji serologicznej bakterii	
<i>Salmonella</i>	104
3.1.5. Aglutynacja szkiełkowa.....	104
3.1.6. Schemat typowania serologicznego szczepów <i>Salmonella</i>	105
3.2. Typowanie bakteriofagowe.....	106
3.2.1. Szczepy bakteryjne	106
3.2.2. Podłoża do typowania bakteriofagowego	106
3.2.3. Zestaw bakteriofagów typujących	106
3.2.4. Metoda typowania bakteriofagowego.....	107
3.3. Dane epidemiologiczne o zakażeniach <i>Salmonella</i> w Polsce	107
3.4. Analiza statystyczna epidemiologicznych wskaźników zakażeń	
<i>Salmonella</i> u ludzi w Polsce w latach 1995 – 2007	110
3.5. Określanie podobieństwa immunologicznego i molekularnego pomiędzy	
białkiem Hsp60 bakterii <i>S. Enteritidis</i> i ludzkim białkiem Hsp60	111
3.5.1. Otrzymywanie endogennego białka Hsp60 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	111
3.5.1.1. Szczep bakteryjny	111
3.5.1.2. Hodowla bakterii.....	111
3.5.1.3. Liza komórek bakteryjnych.....	112
3.5.1.4. Precypitacja białek bakteryjnych.....	112
3.5.1.5. Oczyszczanie białka z zastosowaniem złoża Sepharose 4B.....	112
3.5.1.6. Elucja preparatywna białka Hsp60 <i>S. Enteritidis</i>	112
3.5.2. Określanie czystości, masy cząsteczkowej i swoistości białka	
Hsp60 <i>S. Enteritidis</i>	113
3.5.3. Oznaczanie stężenia białka Hsp60 <i>S. Enteritidis</i>	114
3.5.4. Otrzymywanie surowic króliczych anty-Hsp60 <i>Salmonella</i>	
Enteritidis	115
3.5.5. Syntetyczne fragmenty ludzkiego białka Hsp60.....	115
3.5.6. Porównywanie reakcji serologicznych białka Hsp60 <i>S. Enteritidis</i> ,	
ludzkiego białka Hsp60 i jego syntetycznych fragmentów	
metodą ELISA	116
3.5.6.1. Antygeny	116
3.5.6.2. Test ELISA.....	116
3.5.6.3. Zahamowanie reakcji immunoenzymatycznej	
w teście ELISA	117
3.5.6.4. Standaryzacja metody	118
4. Wyniki.....	119
4.1. Badania serologiczne i epidemiologiczne – wyniki badań własnych i opracowań	
dokonanych na podstawie opublikowanych danych epidemiologicznych	
dotyczących serowarów <i>Salmonella</i> występujących u ludzi w Polsce	119

4.2. Analiza epidemiologicznych wskaźników zakażeń <i>Salmonella</i> (ogółem i dla wybranych serowarów) u ludzi w Polsce w latach 1995 – 2007.....	145
4.2.1. Rozkład współczynników zakażeń <i>Salmonella</i> w czasie.....	145
4.2.2. Analiza statystyczna trendu współczynników zakażeń <i>Salmonella</i>	146
4.2.2.1. Test chi-kwadrat dla trendu.....	147
4.2.2.2. Trend liniowy.....	149
4.2.2.3. Regresja Poissona.....	151
4.3. Typowanie bakteriofagowe pałeczek <i>S. Enteritidis</i> – wyniki badań własnych i opracowań dokonanych na podstawie opublikowanych danych epidemiologicznych dotyczących typów bakteriofagowych występujących w Polsce.....	154
4.4. Określenie podobieństwa immunologicznego i prawdopodobnych rejonów podobieństwa molekularnego pomiędzy białkiem Hsp60 bakterii <i>S. Enteritidis</i> i ludzkim białkiem Hsp60.....	161
4.4.1. Otrzymanie endogennego białka Hsp60 <i>S. Enteritidis</i>	161
4.4.2. Porównanie reakcji serologicznych białka Hsp60 <i>S. Enteritidis</i> , ludzkiego białka Hsp60 i jego syntetycznych fragmentów w testach ELISA.....	162
5. Dyskusja.....	167
6. Wnioski.....	188
7. Piśmiennictwo.....	191
8. Streszczenie.....	224
9. Summary.....	231
10. Aneks.....	238

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i> / polimorfizm długości zamplifikowanych fragmentów DNA
ATTC	American Type Culture Collection
AT	szczepy atypowe – nietypowo reagujące z fagami typującymi
BSA	<i>bovine serum albumin</i> / albumina surowicy wołowej
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> / cykliczny adenozyonomonofosforan
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA)
cfu	<i>colony forming unit</i> / jednostka tworząca kolonię
CIP	Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur (Paryż, Francja)
CL	<i>confluent lysis</i> / całkowita liza
CT	<i>cholera toxin</i> / toksyna <i>V. cholerae</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / kwas deoksyrybonukleinowy
DSMZ	Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (Brunszwik, Niemcy)
DT	<i>definitive type</i> / typ bakteriofagowy (w odniesieniu do <i>S. Typhimurium</i>)
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> / test immunoenzymatyczny fazy stałej
EMM	Edwards Motility Medium
FAFLP	<i>fluorecent amplified fragment length polymorphism</i> / polimorfizm długości zamplifikowanych fragmentów DNA z zastosowaniem markerów fluorescencyjnych
FAO	Food and Agriculture Organization
FRCI	symbol, którym oznaczono wzorcowy szczep prezentujący nowy, trzeci gatunek w obrębie rodzaju <i>Salmonella</i>
GIS	Główny Inspektorat Sanitarny
GlcNAc	N-acetyloglukozamina
GNU	rekurencyjny akronim od słów <i>GNU's Not Unix</i> (GNU to uniksopodobny system operacyjny złożony wyłącznie z wolnego oprogramowania)
GroEL	białko szoku termicznego <i>E. coli</i> z rodziny białek Hsp60
GUS	Główny Urząd Statystyczny
H	antygen rzęskowy
HACCP	<i>hazard analysis and critical control points</i> / analiza zagrożeń i krytycznych punktów kontroli
Hfr	<i>high frequency of recombination</i> / wysoka częstość rekombinacji (w odniesieniu do szczepów bakteryjnych)
Hsp	<i>heat shock protein</i> / białko szoku termicznego
H ₂ S	siarkowodor
ICSP	International Committee on Systematic of Prokaryotes
Inc	<i>incompatibility</i> / niezgodność (grupa niezgodności w odniesieniu do plazmidów)
IS	<i>insertion sequence</i> / sekwencja insercyjna
IgY	<i>immunoglobulin Y</i> / immunoglobulina Y
KCN	cyjanek potasu

kDa	kilodalton
KDO	kwask 3-deoksy-D-manno-oktulozonowy
KOS	Krajowy Ośrodek <i>Salmonella</i>
kpz	kilo par zasad
LPS	<i>lipopolysaccharide</i> / lipopolisacharyd
LT	<i>heat-labile toxin</i> / ciepłowrażliwa toksyna <i>E. coli</i>
M	<i>mukoid</i> / śluzowy (w odniesieniu do antygeny)
MIP	<i>macrophage inducing proteins</i> / białka indukujące makrofagi
MLEE	<i>multilocus enzyme electrophoresis</i> / elektroforetyczna analiza izoenzymów
MLST	<i>multilocus sequence typing</i> / sekwencjonowanie określonych fragmentów kilku wybranych genów odznaczających się pewnym stopniem polimorfizmu
MLVA	<i>multilocus variable number of tandem repeats analysis</i> / polimorfizm ilości tandemowych powtórzeń
Mpz	mega par zasad
MurNAC	kwask N-acetylmuraminowy
MZiOS	Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej
NIZP-PZH	Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
NT	szczyepy nie typujące się – nie reagujące z fagami typującymi
O	antygen somatyczny
OL	<i>opaque lysis</i> / mętna liza
OD	<i>optical density</i> / gęstość optyczna
OMP	<i>outer membrane protein</i> / białko błony zewnętrznej
ONPG	<i>ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside</i> / <i>ortho</i> -nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> / elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> / fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / łańcuchowa reakcja polimerazy
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i> / elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym
PMF	<i>proton motive force</i> / siła protonomotoryczna
PO ₄	grupa fosforanowa
PT	<i>phage type</i> / typ bakteriofagowy
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride membrane</i> / membrana wykonana z polifluorku winilidenu (stosowana do elektrotransferu)
PZH	Państwowy Zakład Higieny
R	<i>rough</i> / szorstki (forma szorstka w odniesieniu do bakterii)
RAPD	<i>random amplification of polymorphic DNA</i> / losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA
RTD	<i>routine test dilution</i> (najwyższe rozcieńczenie preparatu fagowego pozwalające uzyskać całkowitą lub prawie całkowitą lizę ze szczepem homologicznym)
S	<i>smooth</i> / gładki (forma gładka w odniesieniu do bakterii)
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SCL	<i>semi-confluent lysis</i> / prawie całkowita liza
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> / dodecylosiarczan sodu
ser.	serowar
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i> / wyspa patogenności bakterii <i>Salmonella</i>

ST	<i>heat-stable toxin</i> / ciepłooporna toksyna <i>E. coli</i>
subsp.	<i>subspecies</i> / podgatunek
TBS	<i>tris buffered saline</i> / fizjologiczny roztwór soli buforowany Trisem
TSI	<i>triple sugar iron agar</i> / agarowe podłoże trójcukrowe z żelazem
TTSS	<i>type three secretion system</i> / system sekrecji typu III
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i> / zmienna liczba tandemowych powtórzeń
war.	wariant
WHO	World Health Organization
WHOCC-Salm	WHO Collaborating Centre for Reference and Research on <i>Salmonella</i>

1. WSTĘP

1.1. RODZAJ *SALMONELLA*

1.1.1. Ogólna charakterystyka bakterii *Salmonella*

Powszechnie dziś znane i cieszące się „złą sławą” bakterie z rodzaju *Salmonella*, powodują zachorowania ludzi i zwierząt. Pałeczki *Salmonella* występują głównie w przewodzie pokarmowym zwierząt stałocieplnych, a także gadów, płazów, ptaków oraz ludzi. Niektóre serowary charakteryzują się znaczącą adaptacją do określonych organizmów i dlatego nazywane są gatunkowo swoistymi (tzw. host-adapted serowary). Niektóre z nich powodują wyłącznie zachorowania ludzi (np. *S. Typhi*), inne tylko wybranych gatunków zwierząt (np. *S. Gallinarum*, *S. Abortusequi*, *S. Abortusovis*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*) [390]. Pozostałe mogą stanowić przyczynę zakażeń i ludzi, i zwierząt. Wszystkie należy traktować jako potencjalnie chorobotwórcze zarówno dla przedstawicieli świata zwierzęcego, jak i człowieka. Nawet taki serowar jak *Salmonella Gallinarum*, o szczególnych preferencjach względem gospodarza (drób), powszechnie uważany za nieszkodliwy dla człowieka, może stanowić zagrożenie dla ludzi. Duża liczba tych drobnoustrojów (duża dawka zakażająca) może spowodować zachorowanie [351]. W Polsce izolowano pałeczki *Salmonella Gallinarum* zarówno od osób chorych, jak i z przypadków zakażeń bezobjawowych [84, 216].

Rodzaj *Salmonella* należy do rodziny *Enterobacteriaceae* [35, 105, 115] i stanowi najliczniejszą grupę bakterii w obrębie tej rodziny. Obejmuje on dwa gatunki: *Salmonella enterica* (w obrębie którego wyosobniono 6 podgatunków) i *Salmonella bongori* [309]. Gram-ujemne, ruchliwe, peritrichalnie urzęsione, średniej wielkości pałeczki z rodzaju *Salmonella*, o ogólnych cechach zgodnych z definicją rodziny *Enterobacteriaceae*, prezentują ponadto właściwości decydujące o ich odrębności rodzajowej [35, 105, 198]. Nie fermentują laktozy z powodu braku enzymu β -galaktozydazy, nie fermentują również sacharozy, adonitolu i salicyny. Fermentacja glukozy przebiega z wytworzeniem kwasu i gazu lub tylko kwasu. Bezgazowa fermentacja glukozy stanowi cechę znamioną diagnostycznie i jest typowa dla *Salmonella Typhi* – pałeczki duru brzuszego, często też występuje u *Salmonella Typhisuis* czy *Salmonella Gallinarum*. Warianty nie wytwarzające gazu podczas fermentacji glukozy spotykane są również wśród innych typów serologicznych. Znakomita większość pałeczek *Salmonella* fermentuje dulcytol. Najważniejszymi wyjątkami wśród serotypów nie fermentujących tego alkoholu są pałeczki *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Gallinarum* biowar Pullo-*rum* i *Salmonella Choleraesuis*. *Salmonella* nie wytwarzają acetylometylokarbinolu, dają dodatnią reakcję z czerwieńią metylową, co wskazuje na tzw. kwaśny typ fermentacji cukrów. Większość z nich dobrze rośnie na podłożach zawierających cytrynian, wyko-

rzystywany jako jedyne źródło węgla. Nie rosną w obecności cyjanku potasu (KCN), nie wytwarzają ureazy, dezaminazy fenyloalaniny oraz dekarboksylazy kwasu glutaminowego. Z nielicznymi wyjątkami (*Salmonella* Paratyphi A; niektóre szczepy *Salmonella* Gallinarum) wytwarzają dekarboksylazę lizyny. W większości nie rozrzedzają żelatyny i nie rozkładają kwasu malonowego, natomiast szybko rozkładają sole niektórych kwasów organicznych (d-winian sodowo-potasowy, cytrynian, mucynian). Nie wytwarzają indolu. Większość szczepów należących do rodzaju *Salmonella* wytwarza siarkowodor (H_2S). W odniesieniu do arabinozy, ksylozy, ramnozy, trehalozy i inozytolu poszczególne serowary *Salmonella* zachowują się różnie [198].

Istnieją jednak pewne odstępstwa, czasem nawet dosyć znaczne, od podanej definicji biochemicznej rodzaju *Salmonella*, opierającej się głównie na cechach charakterystycznych dla przedstawicieli najliczniej reprezentowanego podgatunku *enterica*. Najważniejsze z nich to: niewytwarzanie gazu podczas fermentacji węglowodanów, brak zdolności rozkładania dulcytolu, wytwarzania dekarboksylazy lizyny czy ornityny, brak wzrostu na podłożu cytrynianowo-amonowym, fermentacji mannitolu czy rozkładania d-winianu sodowo-potasowego, a także wytwarzanie śladowych ilości lub brak wytwarzania H_2S . Wśród znanych serotypów *Salmonella* opisano odmiany wytwarzające indol, szczepy fermentujące laktozę, sacharozę lub salicynę, a także wykazujące zdolność wzrostu w obecności KCN.

Pamiętać jednak należy, że brak zdolności do fermentacji dulcytolu postrzegane jako odstępstwo od powszechnie prezentowanego profilu biochemicznego większości pałeczek *Salmonella* stanowi cechę istotną w identyfikacji przedstawicieli podgatunków *arizonae*, *diarizonae* i *houtenae* [149, 309]. Podobnie jak brak zdolności do rozkładania d-winianu sodowo-potasowego jest cechą stałą, charakterystyczną dla wszystkich pozostałych podgatunków (poza *enterica*) gatunku *Salmonella enterica* i dla gatunku *Salmonella bongori*. Laktozę fermentuje 25% przedstawicieli podgatunku *arizonae* i 75% podgatunku *diarizonae* a zdolność do fermentacji salicyny jest jedną z cech charakterystycznych dla podgatunku *houtenae*. Żelatynazę wytwarzają pałeczki *Salmonella* z podgatunków *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* i *indica*. Możliwość rozkładania kwasu malonowego wyróżnia pałeczki podgatunków *salamae*, *arizonae* i *diarizonae*. Wzrost w obecności KCN stanowi cechę istotną w identyfikacji bakterii *Salmonella* z podgatunku *houtenae* i z gatunku *Salmonella bongori*.

Bakterie *Salmonella* nie należą do wybrednych drobnoustrojów, doskonale rosną na zwykłych podłożach, powszechnie używanych do badań w pracy laboratoryjnej. Skąpy wzrost wykazują jedynie szczepy prezentujące takie serowary jak: *S. Typhi*, *S. Abortusovis*, *S. Sendai* i *S. Gallinarum* [105, 198]. Występując w formie gładkiej „S” (*smooth*), bakterie te rosną w podłożach płynnych w postaci równomiernego zmętnienia, a na stałych podłożach agarowych tworzą wypukłe, lśniące kolonie, o gładkiej powierzchni i równych brzegach. W postaci szorstkiej „R” (*rough*), tworzą osad w hodowlach płynnych, a kolonie na podłożu agarowym są płaskie, mają nieregularne brzegi, szorstką i

suchą powierzchnię. Niektóre szczepy, posiadające antygen M (*mucoïd*), rosną, tworząc śluzowate kolonie. Bakterie *Salmonella* zachowują zdolność do wzrostu i prawidłowego metabolizmu zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Rosną dobrze w zakresie temperatur 8 – 45°C i przedziale pH od 4,0 do 9,5. Optymalną temperaturę wzrostu stanowi 37°C. Bakterie te są wrażliwe na ogrzewanie i nie przeżywają temperatury powyżej 70°C, co pozwala eliminować je z produktów spożywczych w procesie pasteryzacji. Pałeczki *Salmonella* są odporne na wysychanie. Przeżywają nawet przez lata, szczególnie w wysuszonym kale, w kurzu, w suszonych paszach i suszonej żywności. Opisano także długotrwałe przeżywanie tych bakterii w wodzie i ziemi. Procesy takie jak solenie, czy wędzenie, mają ograniczony wpływ na przeżywalność pałeczek *Salmonella*. Tak wysoka oporność na suszenie, solenie, wędzenie a także zamrażanie, wyjaśnia dlaczego bakterie te bez trudu przeżywają w różnych produktach spożywczych [47]. Do zakażenia u ludzi dochodzi głównie drogą pokarmową w następstwie spożycia skażonej wody lub żywności przeważnie pochodzenia zwierzęcego, skażonej pierwotnie (produkty pochodzące od zwierząt chorych) lub skażonej wtórnie kałem zwierząt albo ludzi chorych lub nosicieli. U dzieci również ważną rolę w zakażeniach odgrywa droga fekalno-oralna. Te chorobotwórcze dla człowieka bakterie wywołują między innymi dur brzuszny [141], dury rzekome [142], a najczęściej ostre dolegliwości żołądkowo-jelitowe nazywane potocznie zatruciem pokarmowym, objawiającym się bólami brzucha, gorączką, biegunką, nudnościami i wymiotami [15]. Zakażenie pałeczkami z rodzaju *Salmonella* często wiąże się z trudnym do zwalczenia i niekiedy długotrwałym nosicielstwem tych bakterii. Częstość występowania zakażeń *Salmonella* jest najwyższa w miesiącach letnich. Na zakażenia szczególnie narażone są osoby z tzw. grupy podwyższonego ryzyka: dzieci do 5 lat, osoby starsze i osoby z upośledzoną funkcją układu immunologicznego.

1.1.2. Występowanie pałeczek *Salmonella*

Bakterie *Salmonella* stanowią przyczynę zakażeń około 3 bilionów osób rocznie na całym świecie. Zgodnie z szacunkowymi danymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), około 22 miliony spośród wszystkich przypadków stanowią zakażenia pałeczką duru brzusznego, odpowiedzialną za 200 tysięcy zgonów rocznie [69, 74]. Dur brzuszny rozprzestrzenił się na drodze fekalno-oralnej, poprzez skażoną żywność i wodę, i najczęściej występuje na obszarach o złym stanie sanitarno-higienicznym. Większość przypadków duru brzusznego dotyczy tzw. krajów rozwijających się, szczególnie na subkontynencie indyjskim i w Południowo-Zachodniej Azji. Dur brzuszny stanowi endemiczną chorobę również w innych rejonach Azji oraz w Afryce [296]. Zachorowania na dur brzuszny są również powszechnie notowane na Środkowym Wschodzie, w niektórych państwach południowej i wschodniej Europy oraz w centralnej i południowej Ameryce.

W pozostałej części świata – w krajach rozwiniętych, pałeczki duru brzuszego stanowią przyczynę zachorowań jedynie u osób podróżujących do krajów rozwijających się i powodują 3 – 30 przypadków zakażeń na każde 100 tysięcy podróżnych [354]. Epidemiologia durów rzekomych (paradurów) jest opisana mniej dokładnie niż epidemiologia duru brzuszego. Szacunkowe dane sugerują, że 25% wszystkich tzw. gorączek jelitowych (*enteric fever*) może być spowodowana przez pałeczki *S. Paratyphi A* [74]. Co więcej, *S. Paratyphi A* stanowi jedną z głównych przyczyn zakażeń *Salmonella* w południowej Azji [283] i może powodować tak ciężki przebieg choroby jak pałeczki *S. Typhi* [249]. W krajach rozwijających się, przebieg choroby spowodowanej zakażeniem *S. Paratyphi A*, jest zwykle podobny do zakażenia spowodowanego przez *S. Typhi*, chociaż (jak to wynika z badań przeprowadzonych w Indonezji, dotyczących kontroli czynników ryzyka zakażeń rozpatrywanych w aspekcie pojedynczych przypadków) drogi przenoszenia tego zarazka są inne niż pałeczek *S. Typhi*, a współzakażenia (*S. Paratyphi A* i *S. Typhi*) rzadko rejestrowane [388]. Wydaje się mało prawdopodobnym, aby te dwa serowary, których rezerwuarem jest człowiek (*human-restricted serovars*), dzieliły jakąkolwiek inną niszę ekologiczną poza jelitem człowieka. Bezpośredni transfer lekooporności powinien być zatem rzadkim wydarzeniem, jakkolwiek oba te serowary mogą nabywać podobne plazmidy ze wspólnego źródła, jakim jest naturalna flora jelita człowieka.

W świecie obserwujemy wciąż znaczne ilości przypadków salmoneloz zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Częste są nadal izolacje pałeczek *Salmonella* z żywności i pasz, a także z otoczenia. Wszystkie państwa borykają się z tym problemem, stanowiącym aktualne, jak i potencjalne zagrożenie, modyfikowane przez różne czynniki, np.: takie jak klimat, przemysł, czy nawyki żywieniowe. Problem ten jest najmniej groźny w państwach skandynawskich. Stosunkowo niewielka liczba przypadków zakażeń pałeczkami *Salmonella* w tych krajach jest między innymi wynikiem wprowadzenia ustawy dotyczącej poddawania termicznej obróbce importowanych środków spożywczych skażonych pałeczkami *Salmonella*. Większość bowiem problemów związanych z zakażeniami powstało w wyniku naruszenia prostych zasad higieny. Problemy te jednak mogą zostać pokonane, czego przykładem od dziesiątków już lat jest Dania. Szalenie trudno jest uzyskać faktyczne dane epidemiologiczne dotyczące zakażeń u ludzi spowodowanych pozostałymi serowarami *Salmonella* (poza *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, B i C), ponieważ wielu pacjentów, w przypadku zwykłej salmonelozy nie poddaje się konsultacji medycznej, nie podlegając tym samym żadnej rejestracji. W Anglii i Walii rejestruje się u ludzi 20 do 30 tysięcy przypadków salmonelozy rocznie. Jakkolwiek, szacuje się, iż do każdego zarejestrowanego przypadku salmonelozy należałoby doliczyć co najmniej 3 dodatkowe, co zwiększyłoby liczbę wszystkich przypadków do około 100 tysięcy rocznie. W krajach Unii Europejskiej zakażeniu pałeczkami *Salmonella* (poza *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, B i C) ulega około 350 tysięcy osób w ciągu roku. Rejestruje się również około 1000 zgonów rocznie [119, 120]. W Polsce, w ciągu ostatnich lat, obserwujemy

wprawdzie spadek liczby zakażeń pałeczkami *Salmonella* u ludzi, ciągle jednak notujemy średnio około 20 tysięcy przypadków bakteriologicznie potwierdzonej salmonelozy w skali roku [274, 291, 292, 293]. W Stanach Zjednoczonych liczba zakażeń wynosi około 200 tysięcy przypadków rocznie [256]. Serowarami dominującymi na świecie są *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Niebezpieczeństwo wynikające ze zwiększonej inwazyjności niektórych serowarów *Salmonella* stało się problemem na skalę światową – przykładem może być *Salmonella* Enteritidis. Problem ten stał się jeszcze bardziej złożony z powodu, rejestrowanego w wielu krajach, dramatycznego wzrostu liczby zakażeń u ludzi spowodowanych *Salmonella* Enteritidis. Ten alarmujący wzrost zakażeń potwierdził pandemiczny charakter ekspansji tego serowaru [325]. Niezwykle przydatne informacje dotyczące geograficznego rozmieszczenia serowarów *Salmonella* na świecie, otrzymujemy dzięki państwom, które prowadzą rejestrację importowanych przypadków i źródeł ich pochodzenia. Niektóre państwa również systematycznie zbierają i analizują informacje dotyczące importowanych przypadków zatruc pokarmowych. Wszystkie te dane uwzględniające źródło geograficzne, pozwalają na ustalenie związków pewnych serowarów z określonymi rejonami świata, co jest szczególnie ważne dla tych regionów, gdzie występowanie przypadków zakażeń „pochodzenia krajowego” jest sporadyczne. Większość zakażeń ludzi spowodowanych pałeczkami *Salmonella* (poza *S. Typhi* i *S. Paratyphi* A, B i C) związanych jest głównie ze spożyciem żywności pochodzenia zwierzęcego, szczególnie mięsa drobiowego i jaj, chociaż inne produkty spożywcze odgrywają również znaczącą rolę. Badania prowadzone w latach 1995 – 2005, dotyczące ognisk zatruc pokarmowych o zasięgu międzynarodowym, wykazały ogromną różnorodność produktów spożywczych odpowiedzialnych za zakażenia pałeczkami *Salmonella* u ludzi (tab. 1).

Tabela 1. Ogniska zatruc pokarmowych *Salmonella* (o zasięgu międzynarodowym) zarejestrowane na świecie w latach 1995 – 2005, z uwzględnieniem produktów odpowiedzialnych za zakażenie [311]
Table 1. Recent cross-border outbreaks of non-typhoidal salmonellosis illustrates the diversity of transmission, 1995 – 2005 [311]

Rok <i>Year</i>	Państwo <i>Country involved</i>	Liczba przypad- ków <i>Number of cases</i>	Serowar <i>Serovar</i>	Skażony pro- dukt (nośnik) <i>Vehicle</i>	Uwagi <i>Notes</i>
1995	Wielka Brytania	27	<i>S. Agona</i>	przekąska z cząbrem	produkt importowany z Izraela
1997	USA, Fin- landia	około 242	<i>S. Stanley</i>	kielki lucerny	

Rok <i>Year</i>	Państwo <i>Country involved</i>	Liczba przypad- ków <i>Number of cases</i>	Serowar <i>Serovar</i>	Skażony pro- dukt (nośnik) <i>Vehicle</i>	Uwagi <i>Notes</i>
1997	Europa Zachodnia	nieznana	<i>S. Livingsto- ne</i>	nieznany	wiele przypadków zakażeń nabytych w czasie pobytu zagra- nicą, w szczególności w Tunezji
1998	Niemcy, Austria, Belgia, Szwecja, Finlandia, Wielka Brytania	nieznana	<i>S. Blockley</i>	wędzony wę- gorz (zidenty- fikoway jako przyczyna zatruc w kilku krajach)	
2000	Islandia, Anglia, Walia, Holandia, Szkocja, Niemcy	396	<i>S. Typhimu- rium</i>	sałata	
2000- 01	Kanada (157) USA (11)	168	<i>S. Enteritidis</i>	migdały	
2001	Australia, Szwecja	nieznana	<i>S. Typhimu- rium</i>	chałwa (imp. Turcja)	obecność skażonej chałwy stwierdzono również w Niem- czech, Norwegii i Wielkiej Brytanii
2001	Australia, Kanada, Wielka Brytania	nieznana	<i>S. Stanley</i>	orzechy (imp. Chiny)	
2001	kilka państw europej- skich	nieznana	<i>S. Oranien- burg</i>	czekolada wyprodukowa- na w Niem- czech	
2001	państwa skandynaw- skie	301	<i>S. Enteritidis</i>	drób	wiele przypadków dotyczyło turystów powracających z Krety i z Karpat
2003	Australia, Nowa Zelandia	nieznana	<i>S. Montevi- deo</i>	produkty za- wierające ziarno seza- mowe (np.: chałwa)	produkty importowa- ne z Egiptu i Libanu

Rok <i>Year</i>	Państwo <i>Country involved</i>	Liczba przypad- ków <i>Number of cases</i>	Serowar <i>Serovar</i>	Skażony pro- dukt (nośnik) <i>Vehicle</i>	Uwagi <i>Notes</i>
2004	nieznane	nieznana	<i>S. Enteritidis</i>	migdały	obecność skażonych migdałów stwierdzono w Chinach, na Tajwanie, w Korei, we Francji, Włoszech, w Japonii, Malezji, Meksyku i Wielkiej Brytanii
2004	nieznane	nieznana	<i>S. Thompson</i>	sałata Ruccola	obecność skażonej sałaty wykazano w Norwegii, Szwecji i Wielkiej Brytanii
2005	Kanada (3), USA (2)	5	<i>S. Thompson</i>	prysmaki dla zwierząt domowych	zakażeniu uległy osoby zajmujące się sprzedażą tych artykułów
2005	Szwecja (6), Szwajcaria (3), Niemcy (2), Austria (5), Wielka Brytania (3), Francja (27)	48	<i>S. Stourbridge</i>	niepasteryzowany ser (z Francji)	
2005	Majorka	178	<i>S. Goldcoast</i>	nieznany	turyści ze Szkocji (37), Irlandii (6), Szwecji (6) Norwegii (8), Danii (3), Niemiec (20) i Finlandii (4) ulegli zakażeniu podczas pobytu na Majorce
2005	Dania	22	<i>S. Typhimurium</i>	carpppaccio z surowej wołowiny	produkt importowany z Włoch

Istnieje obszerne piśmiennictwo pochodzące z całego świata, dotyczące rozpowszechnienia pałeczek *Salmonella* wśród ludzi i niemal wszystkich rodzajów zwierząt, zawierające oceny sytuacji epidemiologicznych w poszczególnych krajach oraz propozycje kontroli i zwalczania salmoneloz. Ze względu na odmienne zasady opracowywania raportów dotyczących zakażeń pałeczkami *Salmonella*, dane epidemiologiczne z różnych państw są trudno porównywalne. Jakkolwiek w niektórych państwach liczby rejestrowanych przypadków zakażeń *Salmonella* przedstawia się w postaci pewnych stałych współczynników (obecnie dostępnych także w różnych internetowych bazach danych), pozwalających oszacować fak-

tyczną sytuację epidemiologiczną. Stąd też pewne kierunki, tendencje, zjawiska dotyczące salmoneloz, ilustrowane za pomocą tych danych liczbowych mogą być uznane za wskaźnik paralelnych zjawisk mających miejsce w rzeczywistości.

1.1.3. Klasyfikacja i nazewnictwo bakterii *Salmonella*

Jedną z najbardziej charakterystycznych cech świata mikroorganizmów jest jego ogromna różnorodność. Konieczność zapanowania nad tym bogactwem wymagała opracowania pewnego systemu, który pozwoliłby na uporządkowanie wszystkich mikroorganizmów według określonych zasad [64, 66, 245, 279]. Taksonomia jest właśnie tą dziedziną nauk biologicznych, która zajmuje się teorią i praktyką tworzenia systemów klasyfikacyjnych organizmów i obejmuje trzy działy. Klasyfikacja to jeden z działów taksonomii, który porządkuje organizmy w grupy, tak zwane taksony. Klasyfikacja polega na podziale organizmów żywych na spokrewnione grupy [247, 260]. Podziału dokonuje się na podstawie występowania podobnych cech. Dwa pozostałe działy to identyfikacja i nazewnictwo (nomenklatura). Identyfikacja jest praktycznym działem taksonomii, a jej celem jest określenie czy badany mikroorganizm należy do wcześniej oznaczonego, czy do zupełnie nowego taksonu, któremu należy nadać nową nazwę. Nazewnictwo zajmuje się terminologią stosowaną do oznaczania poszczególnych taksonów. Nazewnictwo, to nadawanie nazw poszczególnym grupom taksonomicznym zgodnie z międzynarodowymi zasadami [225, 246]. W przeszłości, w badaniach taksonomicznych posługiwano się głównie metodami umożliwiającymi ocenę właściwości fenotypowych bakterii. Obecnie, do tego celu, wykorzystywane są również metody biologii molekularnej, a zwłaszcza technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Dzięki temu, możliwe jest dokonanie charakterystyki i bezpośredniego porównania genomów bakteryjnych. Filogenetyczne pokrewieństwo określone na podstawie ewolucyjnie zachowanych (konserwatywnych) sekwencji genomów stało się podstawą najnowszej taksonomii bakterii [205]. Jej struktura narzuca porządek klasyfikacji drobnoustrojów uwzględniający również ich genetyczne podobieństwo. Współczesna klasyfikacja bakterii opiera się zatem na analizie cech morfologicznych, fizjologicznych, biochemicznych, chemicznych i genetycznych bakterii. Wprowadzenie technik genotypowych do badań z zakresu systematyki, stało się przyczyną toczących się obecnie reorganizacji wielu taksonów i wynikających z tego powodu zmian w klasyfikacji i nazewnictwie. Prace nad systematyką bakterii trwają od kilku lat i mają na celu zmodyfikowanie ich taksonomii tak, by była ona wiernym odbiciem ich filogenezy. Zmianom taksonomicznym nie oparł się również rodzaj *Salmonella* [148, 368].

Według propozycji Le Minora i Popoffa [226, 308], uzupełnionej badaniami Reevesa [323], które podgatunek *Salmonella enterica* subsp. *bongori* wyniosły do rangi gatunku, do rodzaju *Salmonella* należą dwa gatunki (*species*):

1. *Salmonella enterica*,
w obrębie którego wydzielono sześć podgatunków (*subspecies*):
S. enterica subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*,
S. enterica subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp.
indica.
2. *Salmonella bongori*.

Niniejsza propozycja zgłoszona przez jej autorów do zatwierdzenia przez Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP), została prawomocnie zaakceptowana decyzją Komisji wyrażoną w stosownym dokumencie – Opinion 80, opublikowanym w 2005 roku [177]. Uzyskana legalizacja dotyczyła jedynie zmian proponowanych w nazewnictwie zgodnie z zakresem kompetencji w/w Komisji, która ocenia wyłącznie poprawność nomenklatury taksonów, a nie poprawność systematyczną. Komisja nie wypowiadała się na temat koncepcji istnienia dwóch gatunków w obrębie rodzaju *Salmonella*. Nowe nazwy taksonów stały się obowiązujące w momencie ich opublikowania (tzw. „nowy” system). Równocześnie, decyzją ICSP zachowano wszystkie, wcześniej zatwierdzone nazwy (tzw. „stary” system), przy czym „stary” system nazewnictwa używany jest już przez niewielu bakteriologów. Zmiany w klasyfikacji i nazewnictwie bakterii *Salmonella*, zaproponowane przez Le Minora i Popoffa, przedstawione w ostatecznej wersji w Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision [308], zostały szybko zaakceptowane i są już powszechnie stosowane w praktyce, w tym przez tak wiodące ośrodki jak WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHOCC-Salm) (Instytut Pasteur, Paryż, Francja), czy Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Atlanta, USA). Proponowane zmiany są odzwierciedleniem najnowszych osiągnięć w zakresie taksonomii rodzaju *Salmonella*. Cechy biochemiczne poszczególnych gatunków i podgatunków pozwalające na ich różnicowanie w obrębie rodzaju *Salmonella* oraz ich wrażliwość na działanie faga O1 przedstawiono w tabeli 2.

Bakterie z podgatunku *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolowane są głównie od zwierząt stałocieplnych. Pałeczki należące do pozostałych podgatunków *Salmonella enterica* oraz gatunku *Salmonella bongori* – przede wszystkim od zwierząt zmiennoocieplnych i ze środowiska naturalnego. W ramach wewnątrzgatunkowego różnicowania bakterii *Salmonella* istnieje możliwość wyodrębnienia wielu wariantów serologicznych – tak zwanych serowarów, na podstawie identyfikacji antygenów somatycznych, rzęskowych oraz antygeny otoczkowego Vi (jeżeli jest obecny). Zgodnie z zasadami prezentowanymi w Bacteriological Code (1990 Revision) [225], preferowany jest termin „serowar” (wariant serologiczny), który powinien zastąpić funkcjonujący do tej pory termin „serotyp” (typ serologiczny). W przeszłości, wszystkim serowarom *Salmonella* nadawano nazwy.

Tabela 2. Cechy różnicujące pomiędzy gatunkami i podgatunkami *Salmonella* [149, 309]
 Table 2. Differential characters of *Salmonella* species and subspecies [149, 309]

gatunek <i>species</i>	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
podgatunek <i>subspecies</i>							
właściwości / characters							
Dulcytol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonian	-	+	+	+	-	-	-
Żelatyna	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
d-winian sodowo- potasowy	+	-	-	-	-	-	-
Galakturonian	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutaminotrans- feraza	+(*)	+	-	+	+	+	+
β-glukuronidaza	d	d	-	+	-	d	-
Mucynian	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicyna	-	-	-	-	+	-	-
Laktoza	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-
Liza fagiem O1	+	+	-	+	-	+	d
środowisko wy- stępowania / usual habitat	zwierzęta stało- cieplne <i>warm- blooded animals</i>	zwierzęta	zmiennocieplne i środowisko / <i>cold-blooded animals and environment</i>				

(*) Typhimurium d, Dublin - ; + = 90% lub więcej reakcji dodatnich; - = 90% lub więcej reakcji ujemnych; d = różne serowary mogą prezentować różne typy reakcji; ONPG = *ortho*-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd; KCN= cyjanek potasu

(*) = Typhimurium d, Dublin - ; + = 90% or more positive reactions; - = 90% or more negative reactions; d = different reactions given by different serovars; ONPG = *ortho*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside; KCN= potassium cyanide

W 1966 roku, na Kongresie Mikrobiologii w Moskwie (Ninth International Congress of Microbiology), podjęto decyzję o zaprzestaniu nadawania nazw wariantom serologicznym *Salmonella*, z wyjątkiem serowarów należących do podgatunku *enterica*, który obejmuje ponad 99,0% wszystkich izolowanych szczepów *Salmonella*. Nazwy pozostałych serowarów zastąpiono odpowiednimi wzorami antygenowymi.

Funkcjonujący przez wiele lat, sposób zapisywania nazw serowarów *Salmonella* [197] wymagał również pewnych regulacji. Le Minor i Popoff zaproponowali [226, 308], by nazwy serowarów były pisane z wielkiej litery i nie kursywą np.: Typhi, Paratyphi B, Enteritidis, Agona. Pełna nazwa serowaru pierwszego podgatunku powinna uwzględniać nazwę rodzaju (pisaną kursywą i z wielkiej litery), epitet określający gatu-

nek, podgatunek i nazwę danego wariantu serologicznego, np. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium, a w dopuszczalnej, uproszczonej wersji – jedynie nazwę rodzaju, symbol określający podgatunek *enterica* oraz nazwę serowaru np. *Salmonella* subsp. I ser. Typhimurium. W praktyce klinicznej nazwa podgatunku nie musi być wymieniana, gdyż jedynie serowary podgatunku *enterica* noszą nazwy. Typhimurium, London, Paratyphi B, Typhi, Enteritidis, Hadar, Mbandaka czy Newport, są serowarami podgatunku *enterica*. Skrócone nazwy serowarów podgatunku *enterica*, np. *Salmonella* serowar Typhimurium, *Salmonella* ser. Typhimurium lub *Salmonella* Typhimurium mogą być używane w rutynowej praktyce. Serowary pięciu pozostałych podgatunków *Salmonella enterica* i serowary gatunku *Salmonella bongori* opisuje się wzorami antygenowymi. Przynależność serowarów do tych podgatunków określono następującymi symbolami: II – serowary *S. enterica* subsp. *salamae*, IIIa – *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb – *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV – *S. enterica* subsp. *houtenae*, VI – *S. enterica* subsp. *indica*. Pełna nazwa serowarów pozostałych podgatunków *Salmonella enterica* powinna zawierać nazwę rodzajową, nazwę podgatunku (lub symbol oznaczający dany podgatunek) i nazwę serowaru wyrażoną wzorem antygenowym, np. *Salmonella enterica* subsp. *salamae* 17:b:z₂₆ lub w postaci skróconej *Salmonella* subsp. II 17:b:z₂₆, a nawet *S.* II 17:b:z₂₆ [227], jeżeli z kontekstu wynika jednoznacznie, że użyty skrót nazwy rodzajowej (*S.*) dotyczy bakterii *Salmonella*. Serowary drugiego gatunku – *Salmonella bongori*, oznaczono symbolem V. Liczbę aktualnie [149] znanych wariantów serologicznych w poszczególnych gatunkach i podgatunkach rodzaju *Salmonella*, ilustruje tabela 3.

Tabela 3. Liczba aktualnie znanych wariantów serologicznych w poszczególnych gatunkach i podgatunkach rodzaju *Salmonella* [149]

Table 3. Actual number of serovars in each species and subspecies of genus *Salmonella* [149]

gatunek / species	podgatunek subspecies	n
1. <i>Salmonella enterica</i>		
	<i>enterica</i>	1531
	<i>salamae</i>	505
	<i>arizonae</i>	99
	<i>diarizonae</i>	336
	<i>houtenae</i>	73
	<i>indica</i>	13
2. <i>Salmonella bongori</i>		
		22
Razem:		2579

Najniższą w hierarchii jednostką taksonomiczną jest podgatunek. Serowar nie posiada statusu taksonomicznego. Nie podlega więc zasadom nomenklaturowym prezentowanym w Bacteriological Code (1990 Revision) [225, 332], regulującym nazewnictwo taksonów. Bakteriologowie mają zatem pewną dowolność i mogą kontynuować stosowanie nazw serowarów *Salmonella* pisanych kursywą i z małej litery, jak to proponował Kauffmann [197] (tzn. *Salmonella newport*, *Salmonella enteritidis*), co niestety mylnie sugeruje, że mamy do czynienia z gatunkiem. Jednak większość bakteriologów akceptuje zmiany w nomenklaturze serowarów i sposobie ich zapisywania, o czym świadczy coraz szersze stosowanie ich w praktyce.

W miarę rozwoju technik badawczych (biologia molekularna, serologia, mikroskopia elektronowa), ciągle odkrywane są nowe bakterie. W marcu 2005 roku, podano do wiadomości publicznej [382] informację dotyczącą odkrycia nowego gatunku bakterii *Salmonella*, dla którego zaproponowano nazwę *Salmonella subterranea* [349]. Analiza sekwencji 16S rDNA szczepu FRCI wyizolowanego z zanieczyszczonego, podpowierzchniowego osadu o niskim wskaźniku pH, wykazała, że jest on w 96,4% podobny do *Salmonella bongori* i w 96,3% podobny do *Enterobacter cloacae*. Szczep ten został uznany za szczep wzorcowy (*type strain*) nowego gatunku *Salmonella* i zdeponowany w kilku powszechnie dostępnych kolekcjach organizmów, między innymi w American Type Culture Collection (ATCC), w kolekcji Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oraz w Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur (CIP) (szczep FRCI = ATCC BAA-836 = DSM 16208 = CIP 109002). I chociaż część taksonomistów przeciwna jest tworzeniu nowych taksonów (gatunków lub rodzajów) wyłącznie w oparciu o cechy jednego szczepu (tzw. *one-strain taxa*) [379], prawomocne zaistnienie nowego, trzeciego gatunku w obrębie rodzaju *Salmonella* stało się faktem. Krajowy Ośrodek *Salmonella* (Gdańsk, Polska), podobnie jak inne, wiodące ośrodki na świecie, pozytywnie ustosunkował się do zmian w klasyfikacji rodzaju *Salmonella* i zmian w nazewnictwie zaproponowanych przez Le Minora i Popoffa wprowadzając je do rutynowej diagnostyki bakterii *Salmonella* i upowszechniając w kraju [85, 133]. Zmiany w dziedzinie taksonomii rodzaju *Salmonella* uwzględniono również w nazewnictwie stosowanym w niniejszej pracy (z wyjątkiem wykazu piśmiennictwa – tytuły cytowanych publikacji przytaczano w oryginale).

1.1.4. Struktura antygenowa bakterii *Salmonella*

Antygenami nazywamy czynniki natury żywej i nieżywej, które po wprowadzeniu do ustroju kręgowców, wzbudzają odpowiedź immunologiczną (humoralną i komórkową) i swoiście reagują z produktami tej odpowiedzi. Najczęściej są to duże cząstki białek oraz cukrów, lipidy, komórki drobnoustrojów i inne. W szerszym zaś aspekcie, antygen praktycznie oznacza każdą cząsteczkę, która może być swoiście roz-

poznawana przez elementy układu odporności nabytej, tzn. komórki B i/lub T. Antygeny cechuje:

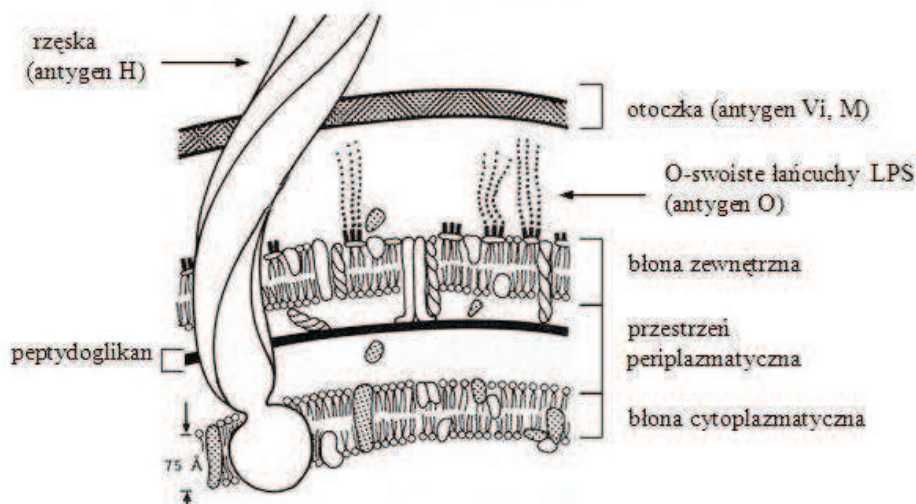
1. immunogenność – właściwość pobudzania do wytwarzania immunoglobulin lub swoistej odpowiedzi komórkowej
2. swoistość – właściwość nadawania swoistego piętna produktom odpowiedzi immunologicznej (immunoglobulinom lub komórkom immunologicznie kompetentnym), która powoduje, że reagują one jedynie z antygenami powodującymi ich wytwarzanie lub z antygenami posiadającymi identyczne determinanty antygenowe.

U Gram-ujemnych pałeczek z rodzaju *Salmonella* wyróżniamy 3 rodzaje antygenów:

1. antygeny somatyczne (O)
2. antygeny rzęskowe (H)
3. antygeny otoczkowe (K); występują tylko u niektórych przedstawicieli rodzaju *Salmonella* (antygen Vi, antygen M).

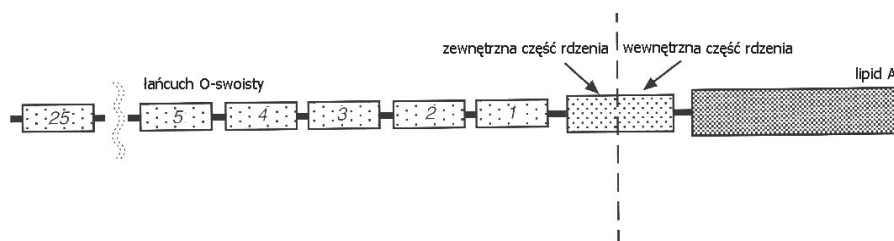
1.1.4.1. Antygeny somatyczne

Oslony komórek bakterii Gram-ujemnych, w tym również pałeczek *Salmonella*, stanowią jedną z najbardziej złożonych struktur komórkowych [46, 406]. Zawierają one: błonę cytoplazmatyczną, przestrzeń periplazmatyczną z warstwą peptydoglikanu i charakterystyczną dla tych bakterii błonę zewnętrzną (ryc. 1). Każda z wymienionych części ma specyficzną budowę tworząc łącznie osłonę ochronną komórki. Stanowi ona również warstwę, przez którą odbywa się transport cząsteczek zarówno do wnętrza, jak i na zewnątrz komórki. Błona cytoplazmatyczna jest półprzepuszczalną, dwuwarstwową błoną, będącą barierą pomiędzy cytoplazmą i otaczającym ją środowiskiem. Pomiedzy błonami: cytoplazmatyczną i zewnętrzną, powstaje obszar zwany przestrzenią periplazmatyczną. Ma ona najprawdopodobniej charakter żelu, w którym znajduje się cienka warstwa peptydoglikanu i liczne białka. Peptydoglikan, sztywne ściany komórkowej, czasem zwany również mureiną, zbudowany jest z cukrów i aminokwasów. Peptydoglikan składa się z długich łańcuchów dwóch pochodnych cukrowych, N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) i kwasu N-acetylmuraminowego (MurNAc), podstawionych bocznymi łańcuchami peptydowymi zbudowanymi z naprzemiennie występujących aminokwasów w konfiguracji D i L przyłączonych do MurNAc.



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny przez ścianę komórkową bakterii *Salmonella* (według [235])
 Fig. 1. Schematic cross section of the surface envelope of *Salmonella* bacteria (according to [235])

Sztywność zapewniają wiązania poprzeczne między łańcuchami peptydowymi. Charakter bocznych łańcuchów peptydowych oraz wiązań między nimi jest odmienny u różnych gatunków bakterii. Błona zewnętrzna prezentuje unikatową budowę. Jej podstawowym składnikiem są fosfolipidy, białka i pełniący funkcje ochronne lipopolisacharyd (LPS), zwany również endotoksyną. Wszystkie bakterie Gram-ujemne i tylko one wytwarzają endotoksyny. Odkrycie, że wszystkie endotoksyny stanowią różne modyfikacje tej samej cząsteczki, stanowiło ogromny przełom w badaniach nad tymi substancjami. Lipopolisacharyd znajduje się w zewnętrznej warstwie błony zewnętrznej. Ta termostabilna endotoksyna będąca jedną z głównych składników błony zewnętrznej [46], stanowi 3 – 5% suchej masy komórki bakteryjnej. Lipopolisacharyd jest heteropolimerem, składającym się z zakotwiczonego w błonie lipidu A, polisacharydowego rdzenia oraz hydrofilowego, O-swoistego łańcucha cukrowego, który jest najbardziej wyeksponowaną na zewnątrz częścią LPS decydującą o jego swoistości serologicznej (ryc. 2).



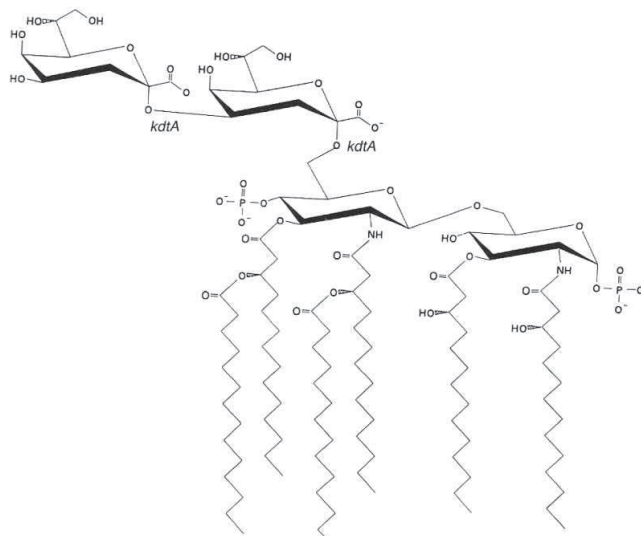
Ryc. 2. Schemat struktury lipopolisacharydu w formie gładkiej S. Lipid A jest połączony, poprzez wewnętrzną i zewnętrzną część oligosacharydowego rdzenia, z jedną z powtarzających się oligosacharydowych podjednostek tworzących O-swoisty łańcuch mogący przybierać różną długość. Długość O-swoistego łańcucha bakterii *Salmonella* determinowana jest przez 25-40 tworzących go podjednostek (według [335])

Fig. 2. Schematic representation of the S-form lipopolysaccharide. Lipid A is joined via inner- and outer- core oligosaccharide, to the repeating oligosaccharide that forms the O-side chain. The length of the O-side chain is variable, but between 25 and 40 units is common in *Salmonella* (according to [335])

LPS odpowiada za kilka cech bakterii Gram-ujemnych:

1. jest powodem istnienia wypadkowego ładunku ujemnego na powierzchni komórki bakteryjnej
2. stanowi barierę utrudniającą dostęp szkodliwym cząsteczekom do powierzchni komórki, pełni zatem funkcje ochronne
3. długie O-swoiste łańcuchy charakteryzują się zmiennością strukturalną i w związku z tym odgrywają rolę w unikaniu przez bakterie Gram-ujemne odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

Lipidowy składnik endotoksyny, lipid A, osadzony w zewnętrznej warstwie dwuwarstwowej błony zewnętrznej bakterii, w rzeczywistości jest głównym jej składnikiem i najbardziej konserwatywną częścią LPS. Stanowi on najbardziej fascynującą składową endotoksyny. Jest on zarówno czynnikiem toksycznym endotoksyny, jak i czynnikiem powodującym wzrost odporności organizmu zakażonego bakteriami. Lipid A prawie zawsze zawiera dwie cząsteczki glukozy z przyłączoną grupą fosforanową (PO_4) i zmienną liczbę kwasów tłuszczowych. Minimalną ilość składników tworzących już pełnowartościową cząsteczkę LPS zaobserwowano u mutantów Re bakterii *Salmonella*. Cząsteczka LPS tych mutantów składa się z lipidu A i dwóch reszt kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (KDO) (ryc. 3).



Ryc. 3. Lipopolisacharyd prezentujący „minimalny” chemotyp, występujący u mutantów Re bakterii *Salmonella*, znany również jako KDO₂-lipid A. Dwie reszty KDO połączone są z acetylowanym dwucukrem glukozaminą (lipid A). Połączenie KDO z glukozaminą wymaga obecności produktu genu *kdtA* (według [335])

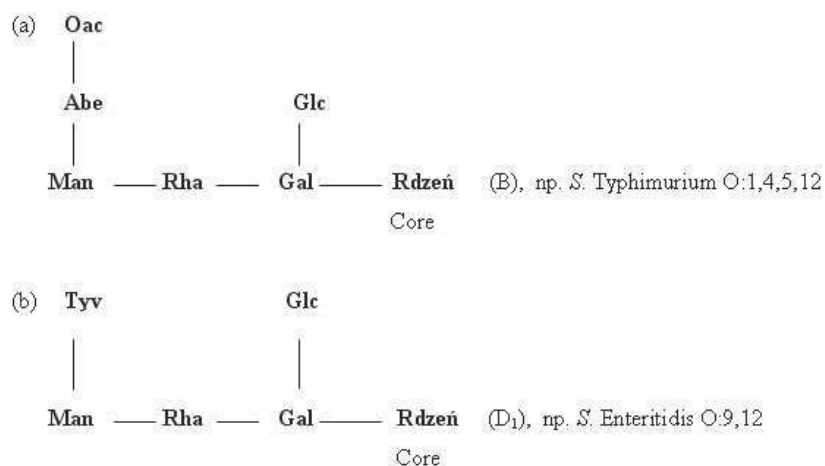
Fig. 3. The minimal Re chemotype lipopolysaccharide of Salmonella, sometimes known as KDO₂-lipid A. Two KDO residues are linked to the acetylated glucosamine disaccharide (lipid A). Linkage of the KDO to the glucosamine disaccharide involves the product of the kdtA gene (according to [335])

Synteza LPS rozpoczyna się od syntezy lipidu A, do którego następnie przyłączany jest fragment polisacharydowy zbudowany z oligocukru rdzenia oraz powtarzających się podjednostek cukrowych wchodzących w skład O-swoistego łańcucha. Biosynteza lipidu A zachodzi w cytoplazmie. Tylko cztery geny biorą udział w jego syntezie: *lpxA*, *lpxB*, *lpxC* oraz *lpxD*. Kodują one enzymy, które są odpowiedzialne za ostateczną postać tej składowej lipopolisacharydu. Zaburzenie struktury lipidu A powoduje niemożność namnażania się bakterii. Nie znany jest powód, dla którego obecność właśnie tej komponenty LPS jest niezbędna do zapewnienia bakteriom zdolności do życia. Lipid A, jest bardzo toksyczny dla człowieka i dla innych ssaków [199]. Jego obecność w układzie krwionośnym, nawet w bardzo niewielkich stężeniach, prowadzi do szoku toksycznego i śmierci.

Oligosacharydowy rdzeń LPS składa się z dwóch części: wewnętrznej, związanej z lipidem A oraz zewnętrznej, związanej z łańcuchem O-swoistym. Część wewnętrzna rdzenia zawiera rzadko występujące w przyrodzie cząsteczki cukrów prostych, jak na przykład heptozę czy KDO. Heptozą jest siedmiowęglowym cukrem, podczas gdy najbardziej typowymi są monocukry sześciowęglowe. KDO, występujący we wszystkich endotoksynach, stanowi ogniwo łączące O-swoisty łańcuch wielocukrowy z lipidem A.

Za biosyntezę olisacharydowego rdzenia LPS bakterii *Salmonella* Typhimurium, odpowiedzialnych jest aż 18 różnych genów [215, 335]. Prawie wszystkie zlokalizowane są w regionie *waa* (zwanym dawniej *rfa*) na chromosomie bakteryjnym (79 minuta na chromosomie *S. Typhimurium* LT2). Część rdzeniowa LPS nie ma istotnego wpływu na odpowiedź immunologiczną organizmu w przebiegu zakażenia i tylko w wyjątkowych przypadkach (bakterie z LPS pozbawionym łańcucha O) rdzeń staje się czynnikiem uruchamiającym produkcję swoistych przeciwciał.

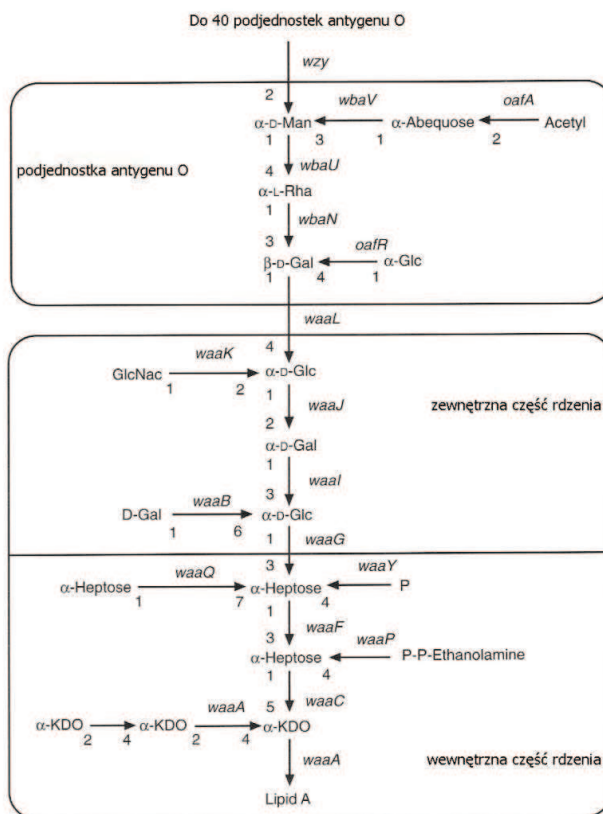
Typowy łańcuch O-swoisty utworzony jest przez 25 – 40 powtarzających się jednostek, z których każda zawiera nie więcej niż 8 cząsteczek monocukru (3 – 8 cukrów). Rodzaje tych monocukrów oraz ich kolejność w obrębie podstawowej jednostki, a także liczba podjednostek wchodzących w skład łańcucha często się różnią. Łańcuch O-swoisty jest najbardziej zmiennym fragmentem i tą częścią endotoksyny, która stymuluje wytwarzanie przeciwciał, rozpoznających określony łańcuch O-swoisty, a nie rozpoznających innych cząsteczek. Tak więc różne serowary *Salmonella* wytwarzają odmienne łańcuchy O-swoiste i wywołują syntezę różnych przeciwciał. Z kilkoma wyjątkami, enzymy odpowiedzialne za biosyntezę tej części LPS są kodowane przez geny zlokalizowane w regionie *wba* (zwanym dawniej *rfb*) chromosomu bakteryjnego (45 minuta na mapie genetycznej *S. Typhimurium* LT2), w pobliżu genu *his* kodującego histydynę [335]. Kodują one enzymy wymagane do syntezy cukrowych prekursorów antygeny O, ich polimeryzacji oraz transportu do miejsca ligacji. Różnorodność struktur O-polisacharydowych jest związana z częstym polimorfizmem regionu *wba*. Struktury determinowane przez geny strukturalne mogą podlegać różnym modyfikacjom. Geny odpowiedzialne za te modyfikacje nie są sprzężone i występują poza głównymi loci genów uczestniczących w biosyntezie LPS. Dość często spotykane modyfikacje u *Salmonella* to O-acetylacja abekwozy (efekt ekspresji genu *oafA*) wśród szczepów z grupy O:4 (dawniej grupa B), powodująca zamianę faktora O:4 na O:5 oraz glikozylacja galaktozy (wynik działania genu *oafR*) często obecna w grupach O:2 (dawniej grupa A), O:4 (B) i O:9 (dawniej grupa D₁), warunkująca pojawienie się antygeny cząstkowego 12₂ (ryc. 4) [148, 236].



Ryc. 4. Reprezentatywne, powtarzające się podjednostki tworzące O-swoisty łańcuch wielocukrowy u bakterii: (a) *Salmonella* Typhimurium - grupa O:4 (B), (b) *Salmonella* Enteritidis - grupa O:9 (D₁); Oac, grupa O-acetylowa; Abe, abekwoza; Man, mannoza; Rha, ramnoza; Gal, galaktoza; Glc, glukoza; Tyv, tyweloza (według [335], zmodyfikowano)

Fig. 4. Representative O side-chain repeat units from: (a) *Salmonella* Typhimurium - group O:4 (B), (b) *Salmonella* Enteritidis - group O:9 (D₁); Oac, O-acetyl group; Abe, abequose; Man, mannose; Rha, rhamnose; Gal, galactose; Glc, glucose; Tyv, tyvelose (according to [335], modified)

Dzikie (*wild-type*) szczepy z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz szczepy innych bakterii Gram-ujemnych, wytwarzające kompletny LPS, zwane są gładkimi „S”, zaś szczepy nie wytwarzające łańcuchów O-swoistych znane są jako szorstkie „R”, od morfologii kolonii wytwarzanych na podłożu stałym. Mutanty R niosą mutację (w rejonie *waa*, *wba* lub genu *wzy* odpowiedzialnego za polimeryzację podjednostek O-swoistego łańcucha) wpływającą na jeden z etapów syntezy LPS i powodują syntezę niekompletnego polimeru [46]. Zmiany mutacyjne wpływające na skrócenie rdzenia również powodują syntezę LPS pozbawionego O-swoistego łańcucha; powstają tzw. mutanty głęboko szorstkie. Strukturę chemiczną kompletnej cząsteczki LPS bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium przedstawiono na rycinie 5. Obecnie, 58 antygenów somatycznych (58 różnych determinant antygenowych) wykorzystuje się do identyfikacji serologicznej bakterii *Salmonella*. Antygeny somatyczne oznakowane są numerami. W przypadku różnych serowarów, antygeny opisane w schemacie White’a-Kauffmanna-Le Minora tym samym numerem są zawsze do siebie podobne, ale nie zawsze identyczne.



Ryc. 5. Struktura chemiczna lipopolisacharydu bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium. Gal, galaktoza; Glc, glukoza; GlcNac, N-acetyl-D-glukozamina; Heptose, L-glicero-D-manno-heptose; KDO, kwas 3-deoksy-D-manno-oktulozonowy; Man, mannoza; P, fosforan; P-P-Etanolamina, pirofosforan etanolaminy; Rha, ramnoza; Abequose, abekwoza; Acetyl, grupa kwasowa pochodząca z kwasu octowego $-\text{COCH}_3$. Uwzględniono geny odpowiedzialne za poszczególne etapy syntezy LPS (według [148])

Fig. 5. Chemical structure of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide. Gal, galactose; Glc, glucose; GlcNac, N-acetyl-D-glucosamine; Heptose, L-glicero-D-manno-heptose; KDO, 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid; Man, mannose; P, phosphate; P-P-Ethanolamine, ethanolamine pyrophosphate; Rha, rhamnose; Acetyl, a functional group with chemical formula $-\text{COCH}_3$. Genes known to be required for synthesis of the LPS at various points are shown (according to [148])

1.1.4.2. Antygeny otoczkowe

Do opisanego warstw strukturalnych, które często występują na powierzchni komórek bakteryjnych, stosuje się różne określenia [50]. Ścisła i gęsta warstwa nosi nazwę otoczki. W przypadku, gdy jest rzadka i może zostać łatwo utracona, określana jest mianem

śluzu. Otoczki oraz śluzę zbudowane są z wielocukrów, czasem nazywa się je glikokaliksem. Niektóre bakterie wytwarzają otoczki typu białkowego. Warstwy zewnętrzno-mórkowe pełnią kilka funkcji. Stanowią barierę przepuszczalności ze środowiska zewnętrznego do powierzchni komórki, chronią bakterie przed fagocytozą, działaniem substancji toksycznych, wysychaniem i często uczestniczą w adhezji bakterii do różnych powierzchni, w tym również do powierzchni komórek gospodarza [50]. Dwa rodzaje antygenów otoczkowych Vi oraz M, występują u niektórych przedstawicieli rodzaju *Salmonella*.

Antygen Vi

Odkryta w 1934 roku przez Felix'a i Pitt'a, powierzchniowa struktura okrywająca bakterie *Salmonella* Typhi została przez nich nazwana antygenem Vi (*virulence*) ze względu na jej zdolność zwiększania wirulencji pałeczek *S. Typhi* obserwowanej podczas laboratoryjnego zakażenia myszy oraz zdolność indukowania odpowiedzi immunologicznej u królików [386]. Antygen Vi, zlokalizowany w otoczce bakteryjnej, jest liniowym homopolimerem kwasu N-acetylogalaktozaminouronowego. *O*-acetylacja polisacharydu przy trzecim węglu (C3) dotyczy 60% reszt kwasowych [335]. Stwierdzono również istnienie antygenów Vi nie posiadających grup *O*-acetylowych w pozycji C3 [236]. Antygen otoczkowy Vi może być wytwarzany przez szczepy *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* i niektóre szczepy *S. Dublin* oraz przez *Citrobacter freundii* [198]. Antygen Vi cechuje się termostabilnością, opornością na działanie alkoholu i kwasu solnego. Szczepy posiadające antygen Vi nie aglutynują z surowicami anty-*O*, z wyjątkiem szczepów *S. Paratyphi C*, u których obecność antygeny Vi redukuje jedynie zdolność do aglutynacji z przeciwciałami anty-*O*, nie eliminując jej całkowicie [80]. W celu usunięcia maskującego efektu antygeny otoczkowego, szczep należy ogrzewać w temperaturze 100°C przez 10 – 15 minut [236] lub jak sugerują inni autorzy, przez 60 minut [335]. Jak wykazały wyniki testów przeprowadzonych przez Kauffmanna [198], antygen Vi obecny w szczepie *Salmonella* Paratyphi C (Vi+), którym eksperymentalnie zakażano myszy, nie miał wpływu na wirulencję tych bakterii. Szczep *S. Paratyphi C* nie posiadający antygeny Vi (Vi-), był w pełni wirulentny podobnie jak szczep Vi+. Na podstawie przeprowadzonych badań, Kauffmann argumentował, że antygen ten, nazywany wprawdzie „antygenem Vi” (*virulence*), nie ma nic wspólnego z wirulencją bakterii. Późniejsze badania wykazały jednak, że stanowi on istotny czynnik chorobotwórczości bakterii, które go posiadają [80, 318, 348, 361, 386]. Właściwości antygeny Vi bakterii *S. Typhi* – wspomaganie wirulencji i działanie ochronne, ustalono [80, 386] w oparciu o następujące dane: (a) prawie wszystkie szczepy *S. Typhi* izolowane z krwi pacjentów chorych na dur brzuszny są Vi-dodatnie (Vi+), podczas gdy szczepy izolowane z kału lub moczu mogą być Vi+ lub Vi-ujemne (Vi-); (b) szczepy Vi+ charakteryzuje mniejsza 50% dawka letalna (LD₅₀) dla myszy niż szczepy Vi-; (c) ochotnicy zakażeni szczepami *S. Typhi*

Vi+ wykazywali większą zachorowalność, włączając bakteremię i gorączkę, niż osoby zakażane szczepami Vi-; (d) dwa kontrolne badania kliniczne, przeprowadzone na obszarach charakteryzujących się wysoką zapadalnością na dur brzuszny, wykazały protekcyjne działanie szczepień niezdegradowanym antygenem Vi. Badaniami *in vitro* wykazano również, że wielocukier ten podlega ekspresji w ludzkich makrofagach [79]. Szczepy *S. Typhi* produkujące antygen Vi okazały się być bardziej odporne na lizę, niż szczepy defektywne w zakresie syntezy tego wielocukru. Słabiej stymulują alternatywną drogę aktywacji dopełniacza, są wolniej fagocytowane przez neutrofile [239]. Badania *in vitro* prowadzone na liniach ludzkich komórek nabłonkowych i makrofagach dowiodły, że antygen Vi *S. Typhi* obniża ekspresję interleukiny-8 (IL-8) w komórkach nabłonkowych, zmniejszając tym samym infiltrację komórek fagocytujących [318]. Badania Sharma i Qadri [348] wykazały znaczącą rolę regulatorową antygeny Vi w obniżaniu wczesnej odpowiedzi zapalnej komórek nabłonkowych jelita podczas infekcji *S. Typhi*. W regulacji tej, pośredniczyć może zarówno antygen Vi, który w obfitości wydzielany jest na zewnątrz komórki bakteryjnej (ponad 98% syntetyzowanego antygeny Vi) [80, 374], jak i antygen Vi związany z powierzchnią komórki (pozostałe 2%), współekspozowany z antygenem O:9 *S. Typhi*. Trzy regiony, *viaA*, *viaB* i *ompB*, znajdujące się na chromosomie, zawierają geny kontrolujące produkcję antygeny Vi. Występowanie regionów *viaA* i *ompB*, odgrywających funkcje regulacyjne w procesie syntezy antygeny Vi, nie ogranicza się jedynie do gatunków, czy rodzajów bakterii produkujących ten antygen. Natomiast locus *viaB* występuje wyłącznie u szczepów będących w stanie wytwarzać antygen Vi. Zawiera on geny kodujące enzymy wymagane do syntezy polisacharydu (*wcdABCD*), jego transportu na zewnątrz (*wza*, *wzm*, *wzt*, *wzf*) i osadzenia na powierzchni komórki bakteryjnej (*wcdE*) [148, 386]. Antygen Vi charakteryzuje się także silnymi właściwościami immunogennymi [2, 204, 361]. Obecność antygeny Vi wiąże się również z obecnością receptorów dla kilku fagów bakteryjnych określanych wspólnym mianem fagów Vi. Jeden z nich, bakteriofag Vi II, posłużył do opracowania [71, 72] metody różnicowania szczepów *Salmonella Typhi* Vi-dodatnich na tzw. typy bakteriofagowe. Typowanie bakteriofagowe dostarcza wielu cennych informacji niezbędnych do uzyskania pełnej orientacji w badaniach epidemiologicznych.

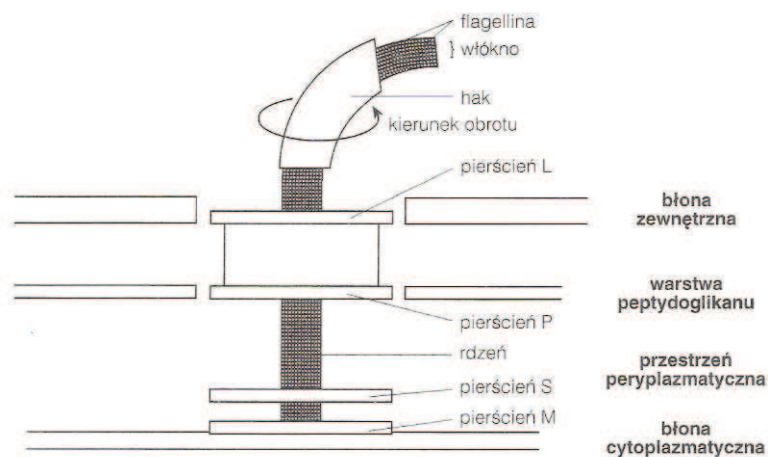
Antygen M

Bakterie *Salmonella* rzadko tworzą śluzowate kolonie. Śluzowa warstwa powierzchniowa komórek tworzących takie kolonie ma związek z obecnością antygeny określonego przez Kauffmanna mianem antygeny śluzowego (*mucoïd antygen*) [236]. Antygen ten wytwarzany jest bardzo obficie podczas wzrostu w niskich temperaturach i przy dużych stężeniach soli. Występuje przede wszystkim u *S. Paratyphi* B. Antygen M wydaje się być podobnym u wszystkich wytwarzających go serowarów *Salmonella*. Absorpcja krzyżowa wykazała wręcz identyczność antygenów M pałeczek *S. Paraty-*

phi B i *S. Potsdam*. Badania chemiczne wykazały, że antygen M pałeczek *S. Paratyphi B* jest wielocukrem, pozbawionym atomów azotu, składającym się w 40% z glukozy. Śluzową postać szczepów *S. Paratyphi B* będących jednocześnie w formie szorskiej „R” często izolowano od nosicieli duru rzekomego typu B. Rewersja do normalnej postaci była możliwa poprzez hodowlę w podłożu bulionowym z dodatkiem żółci. Śluzową warstwę powierzchniową (antygen M) wytwarzały również szczepy prezentujące takie serowary jak *S. Potsdam*, *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Muenchen*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Rostock*, *S. Moscow*, *S. London* czy *S. Anatum* [198]. Antygen M nie ma znaczenia diagnostycznego, wpływa jednak hamująco na aglutynację O-antygenów. Posiada podobną budowę (jeżeli nie taką samą, to przynajmniej ze wspólną frakcją), zarówno u wszystkich wytwarzających go szczepów *Salmonella* (niezależnie od wariantu serologicznego), jak i u innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* [198, 236]. Wykazano podobieństwo pomiędzy antygenem otoczkowym pałeczek *Klebsiella* (typ 13) i antygenem śluzowym *S. Paratyphi B*.

1.1.4.3. Antygeny rzęskowe

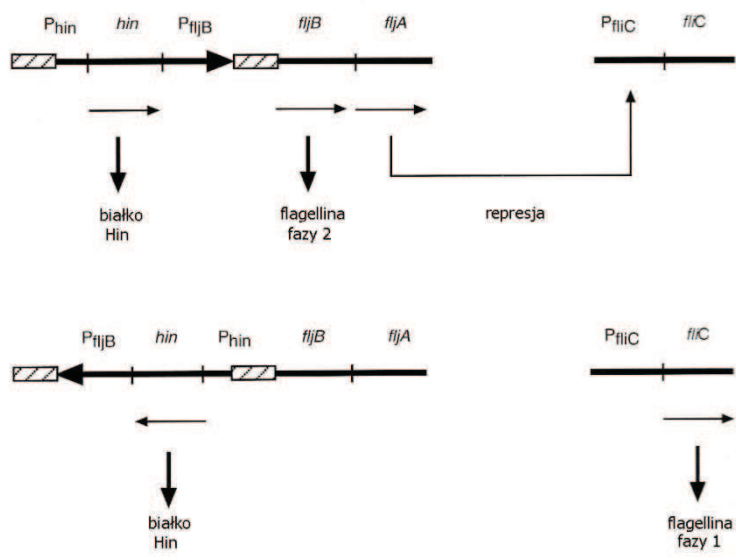
Wiele bakterii porusza się za pomocą specjalnej struktury zwanej rzęską [406]. Rzęska bakteryjna jest długim (około 20 nm), cienkim organellum zakotwiczonym jednym końcem w komórce. Drugi koniec rzęski jest wolny. Część rzęski zakotwiczona w błonie cytoplazmatycznej i osłonach zewnętrznych jest otoczona dwiema parami pierścieni (ciałko podstawowe). U bakterii Gram-ujemnych zewnętrzna para pierścieni (L i P) jest związana z LPS oraz peptydoglikanem ściany bakteryjnej. Wewnętrzna para pierścieni (S i M) znajduje się w błonie cytoplazmatycznej lub tuż nad nią. Tak zwany hak jest elementem łączącym ciało podstawowe z włóknem rzęski [236]. Budowę ciała podstawowego i haka rzęski bakterii *Salmonella* przedstawiono na rycinie 6. Rzęski są sztywnymi organellami, które się nie zginają, lecz obracają. Ruch obrotowy rzęski jest napędzany przez ciało podstawowe, które działa jak motor. Za ruch rotacyjny rzęski najprawdopodobniej odpowiadają pierścienie, a siłą napędzającą ten ruch jest siła protonomotoryczna (PMF, *proton motive force*) wytwarzana na skutek pompowania jonów wodoru (H^+) w poprzek błony. Kierunek obrotu rzęski (ruch zgodny lub przeciwny do ruchu wskazówek zegara) decyduje o rodzaju ruchu komórki bakteryjnej. Rzęski organizmów peritrichalnych, do których należą pałeczki *Salmonella*, w trakcie ich ruchu w kierunku przeciwnym do wskazówek zegara zachowują się jak pojedyncza wiązka i komórka porusza się do przodu.



Ryc. 6. Budowa typowej rzęski bakterii *Salmonella* (według [277])
 Fig. 6. Model of the basal structure of a flagellum from *Salmonella* (according to [277])

Antygen rzęskowy pałeczek *Salmonella* ma ścisły związek z rzęskami tych bakterii [178]. Jest termolabilnym białkiem zwanym flagelliną (50–58 kDa) [176], zlokalizowanym na rzęskach, ulegającym zniszczeniu pod wpływem alkoholu, kwasu solnego i enzymów proteolitycznych. Sekwencja aminokwasów w białku wyznacza determinanty antygenowe tego antygeny. Jedynym, naturalnie występującym w przyrodzie serowarem nie posiadającym antygeny rzęskowego jest *Salmonella Gallinarum*. W wyniku zachodzących mutacji zdarzają się również formy bezrzęskowe wśród innych wariantów serologicznych. Część szczepów *Salmonella* produkuje tylko jeden rodzaj antygeny rzęskowego – takie szczepy nazywamy jednofazowymi. Znakomita ich większość może alternatywnie ujawniać dwie fazy antygeny rzęskowego – takie szczepy nazywamy dwufazowymi. Fazę 1 antygeny rzęskowego nazywano dawniej specyficzną, fazę 2 – niespecyficzną. Zwykle w hodowli występują jednocześnie komórki prezentujące antygen rzęskowy zarówno w 1, jak i w 2 fazie. Szczepy prezentujące dwufazowe serowary posiadają dwa geny kodujące syntezę flagelliny: *fliC* i *fljB* [148, 178]. Gen *fliC* jest odpowiedzialny za syntezę flagelliny fazy 1 (H1), a *fljB* za syntezę flagelliny fazy 2 (H2). Ekspresja genu *fliC* jest blokowana przez produkt genu *fljA*, będącego częścią operonu *flj*. „Przełączenie” ekspresji jednego genu (*fliC*) na ekspresję drugiego (*fljB*) i odwrotnie, kontrolowane jest przez graniczący z genem *fljB* fragment DNA (750 par nukleotydów) zwany determinantą faz, zawierający, między innymi, sekwencję kodującą promotor genu *fljB* (ryc. 7). Białko Hin, produkt genu *hin*, jest niezbędne do inwersji faz (faza 1 ↔ faza 2) w procesie syntezy flagelliny bakterii *Salmonella*. Dostępność dwóch systemów genetycznych (geny kodujące flagellinę oddalone są od siebie na chromosomie

bakteryjnym) odpowiedzialnych za ekspresję różnych rodzajów flagelliny pozwala bakteriom pokonać działania obronne podejmowane przez zakażony organizm.



Ryc. 7. System inwersji faz antygenu rzęskowego u bakterii *Salmonella*. Literą P oznaczono promotory. Zakreskowane obszary wskazują fragmenty, które uległy inwersji. Strzałki wskazują kierunki transkrypcji (według [148])

Fig. 7. Flagellar phase inversion system in *Salmonella*. Promoters are indicated with capital P. Hatched zones indicate inverted repeats. Arrows indicate transcription directions (according to [148])

Faktory H-antygenów oznaczono małymi literami alfabetu i numerami, np. b; c; e,h; 1,2; 1,6. Nowo odkrywane faktory oznaczano literą „z” i numerem (np. z₂₉; z₃₈; z₄,z₂₃). W obrębie rodzaju *Salmonella* wyróżniamy 65 różnych antygenów rzęskowych (nie licząc tzw. R-faz antygenów rzęskowych, czy antygenów H trzeciej fazy, wykrywanych w przypadku niektórych serowarów). Ta antygenowa różnorodność jest konsekwencją różnic w budowie cząsteczki flagelliny. Rzęski bakterii *Salmonella* posiadają również receptor wiążący faga χ [148]. Wrażliwość na faga χ determinowana jest nie tylko samą obecnością rzęsek, ale również rodzajem antygeny H. Na przykład bakterie *Salmonella* posiadające antygen rzęskowy H:d są wrażliwe na działanie faga, podczas gdy bakterie *Salmonella* z H:g-antygenem są odporne na faga χ [178, 236].

1.1.4.4. Schemat White'a-Kauffmanna-Le Minora

Struktura antygenowa bakterii *Salmonella* jest złożona. Posiadają one antygeny somatyczne O (58 różnych O-antygenów o znaczeniu diagnostycznym), antygeny otoczkowe Vi i M oraz 114 (wszystkich łącznie) różnych antygenów rzęskowych H. Kauffmann i White opracowali schemat klasyfikacji tych bakterii w oparciu o ich właściwości serologiczne, określone na podstawie reakcji szczepów *Salmonella* z odpornościami surowicami króliczymi. Schemat ten, obecnie z pewnymi modyfikacjami [149], posiada duże znaczenie praktyczne. Służy do identyfikacji serologicznej bakterii z rodzaju *Salmonella*. Zmianie uległa również nazwa schematu. W dowód uznania zasług profesora Le Minora, pełniącego przez wiele lat funkcję dyrektora WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, znany od wielu lat schemat nazywany schematem Kauffmanna-White'a, nosi obecnie nazwę schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora [149].

W schemacie zawarta jest struktura antygenowa wszystkich znanych obecnie serowarów pałeczek *Salmonella* (ryc. 8). Ilość wariantów serologicznych aktualnie prezentowanych w zmodyfikowanym schemacie White'a-Kauffmanna-Le Minora wynosi 2 579 [149].

Serowary zebrane są w 46 grupach serologicznych, charakteryzujących się wspólnymi antygenami somatycznymi i różnymi antygenami rzęskowymi. Antygeny rzęskowe występują w jednej lub dwóch fazach. W pewnych, szczególnych przypadkach mogą pojawiać się antygeny rzęskowe trzeciej fazy i tzw. R-fazy antygeny H. Wyjątek stanowi *Salmonella* Gallinarum. Szczepy prezentujące ten serowar nie wytwarzają rzęsek (nie posiadają antygeny rzęskowego) i nie mają zdolności ruchu. Nieurzęsione warianty innych serowarów występują rzadko [105].

Grupy serologiczne pałeczek *Salmonella*, wydzielone w diagnostycznym schemacie White'a-Kauffmanna-Le Minora na podstawie antygenów somatycznych, historycznie oznaczano wielkimi literami alfabetu od A do Z i cyframi od 51 do 67. W zmodyfikowanej wersji schematu zrezygnowano z takiego sposobu określania grup. Oznakowanie grup *Salmonella* uległo zmianie. Bardziej logicznym wydaje się oznaczanie grup przy użyciu charakterystycznych dla nich czynników antygenów somatycznych (dawne oznakowanie alfabetyczne tymczasowo zachowano w nawiasach, zalecając jednak by unikać ich stosowania [149]). Na przykład grupa wcześniej określana jako B, obecnie oznaczona jest jako grupa O:4. Dawną grupę K, oznaczono obecnie jako O:18, grupę D₃ – jako O:9,46,27, grupę H – charakterystycznymi dla niej czynnikami somatycznymi O:6,14, a dawna grupa E₄ nosi obecnie nazwę – grupa O:1,3,19 i tak dalej.

Group O:4 (B)				
Presentation of factor O:27 was modified. See page 8.				
Type	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen		
		Phase 1	Phase 2	Other
Kisangani	1,4,5,12	a	1,2	
Hessarek'	4,12,127	a	1,5	
Fulica'	4,5,12	a	[1,5]	
Arechualeta	4,5,12	a	1,7	
Bispebjerg	1,4,5,12	a	e,n,x	
Tinda	1,4,12,27	a	e,n,x ₁₁	
II	1,4,5,12,127	a	e,n,x	
Hiettwilen	1,4,12	a	1,w	
Nakuru	1,4,12,27	a	x ₁	
II	1,4,12,127	a	x ₁₀	
Paratyphi B ²	1,4,5,12	b	1,2	[r ₁ ,l ₁ ,t ₁]
Limete	1,4,12,127	b	1,5	
II	4,12	b	1,5	
Canada	4,12,127	b	1,6	
Uppsala	1,4,12,27	b	1,7	
Abony	1,4,5,12,127	b	e,n,x	
II	1,4,5,12,127	b	[e,n,x]	
Wagania	1,4,12,27	b	e,n,x ₁₁	
Wien	1,4,12,127	b	1,w	
Tripoli	1,4,12,27	b	x ₁	
Schleissheim'	4,12,27	b	-	
Legon	1,4,12,127	c	1,5	
Abortusovis	4,12	c	1,6	
Alendorf	4,12,127	c	1,7	
Bosau	4,12	c	e,n,x	
Jenicho	1,4,12,27	c	e,n,x ₁₁	
Hallfold	1,4,12,27	c	1,w	
Bury	4,12,27	c	x ₁	
Stanley	1,4,5,12,127	d	1,2	
Eppendorf	1,4,12,127	d	1,5	
Itzcany	1,4,12,27	d	1,6	

18/166

1

2

3

4

5

Group O:50 (Z)				
Type	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen		
		Phase 1	Phase 2	Other
IV	50	x	-	
Rochdale	50	b	e,n,x	
II	50	b	x ₁	
IV	50	b	-	
Hemmingford	50	d	1,5	[x ₁₀]
IV	50	d	-	
II	50	e,n,x	1,7	
II	50	[g,m],x ₁	[1,5]	
IIIa	50	g,x ₁₁	-	
IV	50	g,x ₁₁	-	
II	50	g,x ₁₁	e,n,x	
II	50	m,j	x ₁	x ₁₀
IIIb	50	i	1,5,7	
IIIb	50	i	e,n,x,x ₁₁	
IIIb	50	i	x ₁	
IIIb	50	i	x ₁₁	
IIIb	50	k	1,5,7	
II	50	k	e,n,x	x ₁₀
IIIb	50	k	e,n,x,x ₁₁	
IIIb	50	k	x ₁	[x ₁₀ ,l ₁ ,t ₁ ,x ₁₁ ,l ₁₁ ,t ₁₁]
II	50	k	x ₁	
IIIb	50	k	x ₁₁	
IIIb	50	k	x ₁₁	
Fass	50	l,v	1,2	
IIIb	50	l,v	e,n,x,x ₁₁	
IIIb	50	l,v	x ₁	
IIIb	50	l,v	x ₁₁	
IIIb	50	l,v	x ₁₁	
VI	50	l,v	x ₁₀	
II	50	l,w	e,n,x,x ₁₁	x ₁₀
II	50	l,w	x ₁₀	
IIIb	50	r	1,5,7	

93/166

1

2

3

4

5

Ryc. 8. Wybrane strony ze schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora ilustrujące wzory antygenowe niektórych serowarów *Salmonella*: kolumna 1 - nazwy serowarów podgatunku *enterica* lub symbole (II, IIIa, IIIb, IV, VI) oznaczające przynależność serowarów do pozostałych podgatunków gatunku *S. enterica* oraz do gatunku *S. bongori* (V); kolumna 2 - antygeny somatyczne i antygen otoczkowy Vi (jeżeli obecny); kolumna 3 i 4 - antygeny rzęskowe odpowiednio 1 i 2 fazy; kolumna 5 - inne antygeny rzęskowe, w tym R-fazy antygenów H (według [149])

Fig. 8. Selected pages of the White-Kauffmann-Le Minor scheme of *Salmonella* serological classification: names of subspecies *enterica* serovars and symbols (II, IIIa, IIIb, IV, VI) indicated serovars of the other subspecies of *S. enterica* as well as symbol (V) of all *S. bongori* serovars are presented in column 1; somatic antigens and capsular Vi antigen (if present) can be found in column 2; columns 3 and 4 include the flagellar antigens of phase 1 and 2, respectively; column 5 is devoted to other H antigens including R phases (according to [149])

Dawne grupy: C₄ (O:6,7,14), E₂ (O:3,15) oraz E₃ (O:3,15,34), zawierające odpowiednio serowary grupy C₁ (O:6,7) lizogenne fagiem 14 (O:6,7 → O:6,7,14) i serowary grupy E₁ (O:3,10) lizogenne fagiem ε₁₅ (O:3,10 → O:3,15) lub fagami ε₁₅ + ε₃₄ (O:3,10 → O:3,15,34), usunięto ze schematu, a serowary z tych grup włączono odpowiednio do grupy O:7 (dawniej grupa C₁) i grupy O:3,10 (dawniej grupa E₁). Również niektóre nazwy serowarów, występujące w poprzednich wydaniach schematu, zostały wyeliminowane. Wśród nich, nazwy nadane wariantom powstałym przez lizogenizację: np. Newhaw nosi obecnie nazwę Muenster war. 15⁺, Arkansas – nazwę Muenster war.

15⁺,34⁺, ponieważ oba te warianty powstały z serowaru Muenster w wyniku lizogennej konwersji odpowiednio fagiem ϵ_{15} i fagami $\epsilon_{15} + \epsilon_{34}$. Zmiany te wydają się logiczne i uzasadnione, ponieważ dla znajdujących się w podobnej sytuacji szczepów z grupy O:4 (dawniej grupa B), które na skutek lizogennej konwersji uzyskały faktor 1, nowych nazw nie proponowano. Obecność faktora O:27, którą do tej pory uważano za wynik lizogenizacji fagiem, jest w rzeczywistości uwarunkowana obecnością genu $wzy_{\alpha(1-6)}$, zlokalizowanego na chromosomie bakteryjnym, w obrębie głównego zespołu genów odpowiedzialnych za antygen O (*major O-antigen gene cluster*) [149, 392]. Fakt ten uwzględniono w najnowszej edycji schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora rezygnując z podkreślenia przy prezentowaniu faktora O:27. Faktory uzyskane w wyniku lizogenizacji fagiem wyróżnia się podkreśleniem. Ze schematu usunięto również nazwy, które do roku 1966 (International Congress of Microbiology w Moskwie) nadano serowarom nie należącym do podgatunku *enterica*. Wyeliminowane nazwy serowarów, umieszczone w dodatku specjalnym do schematu (*Alphabetic list of serovars names withdrawn from the scheme*), mają już tylko znaczenie historyczne. Na liście tej, znalazły się również nazwy serowarów, które były połączone z nazwami serowarów zachowanych w schemacie. Przykładem takiego połączenia był serowar *Salmonella gallinarum-pullorum*. Serowar *S. Pullorum*, posiadający identyczny wzór antygenowy (1,9,12:-:-) jak zachowany w schemacie serowar Gallinarum, uważany jest obecnie za jeden z biowarów Gallinarum (biowar – wariant biochemiczny; dawniej biotyp, typ biochemiczny). Nazwę Pullorum usunięto ze schematu.

1.2. GENETYCZNE PODSTAWY ZRÓŻNICOWANIA BAKTERII *SALMONELLA*

Genetyczną informację organizmów bakteryjnych stanowi sekwencja nukleotydów w ich DNA, zarówno chromosomalnym, jak i pozachromosomowym, często określana jako genotyp. Sekwencja ta decyduje, jakie białka lub cząsteczki RNA są wytwarzane przez organizm, jak mogą być regulowane oraz jak mają funkcjonować wytworzone już białka. Chromosom bakteryjny jest zbudowany z jednej, dwuniciowej helisy DNA. U większości bakterii ma on kształt kolisty i jest związany ze stosunkowo małą liczbą białek. Każdy chromosom ma jedno miejsce początku replikacji DNA. Geny bakteryjne są zorganizowane w operony lub występują jako pojedyncze kopie i stanowią około 75% sekwencji DNA. Pozostała część to niekodujący, międzygenowy DNA, który zawiera istotne sekwencje, np. odpowiedzialne za początek replikacji. Bakteryjne chromosomy różnią się wielkością, co odzwierciedla różnice w liczbie genów i wielkości międzygenowego DNA. Nowa era w genetyce bakterii rozpoczęła się w roku 1995, w momencie opublikowania sekwencji nukleotydowej genomu *Haemophilus influenzae*. Od tego czasu poznano całkowity zapis genetyczny ponad 260 szczepów różnych gatunków bakterii [140]. I chociaż nie jesteśmy jeszcze w stanie zrozumieć większości uzyskanych

w ten sposób informacji, ani ich w tej chwili wykorzystać, to z całą pewnością możemy stwierdzić, że badania te kryją w sobie potężne możliwości aplikacyjne i w przyszłości powinny zaowocować nowymi, skutecznymi metodami w diagnostyce, profilaktyce i terapii chorób zakaźnych.

1.2.1. Ogólna charakterystyka genomu *Salmonella*

Porównywanie genomów oraz transkryptomów szczepów klinicznych bakterii patogennych, możliwe dzięki coraz doskonalszym technologiom, ujawnia nie tylko ich różnorodność, ale może także przyczynić się do identyfikacji cech genetycznych bakterii związanych z konkretnymi objawami chorobowymi. Metody z użyciem mikromacierzy (mikropaneli) pozwalają porównywać całe genomy i transkryptomy bakteryjne. Umożliwiają w jednym eksperymencie hybrydyzacyjnym analizę procesów ekspresji wszystkich genów komórki bakteryjnej, a w przypadku bakterii patogennych, poszukiwanie genów biorących udział we wzajemnym oddziaływaniu pomiędzy patogenem a organizmem człowieka.

1.2.1.1. Analiza porównawcza sekwencji genomów *Salmonella*

Badania genomów przedstawicieli rodzaju *Salmonella* dostarczyły olbrzymiej ilości danych [11]. Analiza sekwencji nukleotydowych genów metabolizmu podstawowego oraz 16S rRNA spowodowały zmiany w systematyce tego rodzaju. Wykazano również, że wszystkie serowary gatunku *S. enterica* są identyczne pod względem informacji genetycznej w około 90%. Większość ich genów występuje także w komórkach *E. coli*, bakterii blisko spokrewnionych z *Salmonella*, a stopień zgodności sekwencji nukleotydowych pomiędzy odpowiadającymi sobie genami wynosi 80 – 85%. Chociaż różnorodne serowary *S. enterica* są tak zbliżone do siebie pod względem zawartości informacji genetycznej (geny metabolizmu podstawowego różnych serowarów wykazują od 97,6 do 99,5% zgodności), różnią się znacząco zakresem infekowanych gospodarzy i wywołwanymi objawami chorobowymi. W genomach większości serowarów *Salmonella* występują charakterystyczne fragmenty DNA, nieobecne w genomie *E. coli*, zwane wyspami patogenności *Salmonella* (SPI, *Salmonella pathogenicity island*), oznaczone symbolami od SPI-1 do SPI-14 [94, 267, 415].

Genomika porównawcza *in silico* szczepów o zsekwencjonowanych genomach oraz analiza genomów (z wykorzystaniem mikropaneli) różnych serowarów *S. enterica* wykazała, że geny specyficzne dla konkretnych szczepów stanowią około 10% genomu (ok. 500 kbp z 5 Mbp). Są one rozlokowane w obrębie całego chromosomu, a ich wielkość waha się od 1 do 50 kbp. Prawdopodobnie zostały wprowadzone do genomu na drodze

horyzontalnego transferu genów i pochodzą od organizmów zamieszkujących tą samą niszę ekologiczną. Te małe fragmenty DNA noszą nazwę wysepek (*islet*) lub wysepek jednogenowych (*singlet*, od *single gene islet*). W genomie *S. Typhimurium* LT2 zidentyfikowano, z wykorzystaniem mikropaneli, 50 jednogenowych wysepek, przeważnie o niezidentyfikowanej funkcji.

Znaczącą rolę w procesie ewolucji bakterii, w tym z rodzaju *Salmonella*, odgrywa proces transdukcji. Genomy *S. enterica* zawierają po kilka aktywnych i kilka niefunkcyjnych genów profagów, kodujących niekiedy białka efektorowe systemów sekrecji SPI-1 lub SPI-2. W genomach *Salmonella* zidentyfikowano dotychczas ponad 20 operonów kodujących biosyntezę różnych fimbrii adhezyjnych. Niektóre serowary *Salmonella* zawierają ponadto plazmid wirulencji, o wielkości od 50 do 100 kpz. Geny plazmidowe o istotnym znaczeniu dla procesu patogenezy to geny *spv*. W niektórych serowarach odnaleziono je w chromosomowym DNA, co wskazuje na zachodzący proces rearanżacji materiału genetycznego, w którym znaczącą rolę odgrywają również sekwencje insercyjnej oraz transpozony, licznie występujące w genomach pałeczek *Salmonella* [11].

1.2.1.2. Wyspy patogenności bakterii *Salmonella*

Analizy porównawcze sekwencji nukleotydowych genomów różnych szczepów tego samego gatunku wykazały, iż wiele z nich niesie pulę unikatowych informacji genetycznych, kodowanych w zwartych blokach DNA. Analogiczne segmenty DNA są również odnajdywane w genomach innych, odległych filogenetycznie organizmów, co sugeruje ich mobilność, a tym samym możliwość przekazywania drogą horyzontalnego transferu genów [140]. Elementy te określono mianem wysp genomowych. Wielkość ich jest bardzo zróżnicowana i zazwyczaj zawiera się w granicach 10 – 200 kpz. W zależności od determinowanej funkcji, elementy te podzielono na wyspy symbiotyczne, metaboliczne, opornościowe i wyspy patogenności (PAI, *pathogenicity islands*) [94, 267]. W wyniku badań porównawczych sekwencji kompletnych genomów *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* i *E. coli* K-12, wykazano mozaikową strukturę genomów bakterii *Salmonella* z proporcjonalnie dużą zawartością wysp genomowych w porównaniu do *E. coli* [11]. Chociaż wiele wysp genomowych bierze udział w patogenezie, to posiadanie przez wyspy patogenności pewnych szczególnych cech wyróżnia je spośród pozostałych wysp genomowych [94, 156, 163, 164]. Informacja genetyczna dotycząca wielu istotnych czynników niezbędnych do wywołania infekcji przez *S. enterica* zawiera się właśnie w wydzielonych, odosobnionych regionach chromosomu, zwanych wyspami patogenności bakterii *Salmonella*. Odgrywają one różną rolę w procesie patogenezy zakażeń *Salmonella*. Wyspa SPI-1 została wprowadzona do genomu *Salmonella* po procesie dywergencji od *E. coli*, a SPI-2 występuje w genomach gatunku *S. enterica*, a u *S. bongori* jedynie w wersji pozbawionej genów kodujących system

sekrecji typu III. Historia ewolucji pozostałych wysp patogenności nie jest tak jasna. W przeciwieństwie do pięciu konserwatywnych wysp (SPI-1 do SPI-5), nie występują one w genomach wszystkich serowarów. Szczegółowe wyjaśnienie roli jaką odgrywają w patogenezie zakażeń *Salmonella* wymaga jeszcze wielu dalszych badań.

Genomy *S. Typhimurium* i *S. Choleraesuis* zawierają 9 wysp patogenności podczas gdy *S. Typhi* nosi jeszcze 3 dodatkowe wyspy [57, 255, 294, 415]. Skład wysp patogenności różni się w zależności od serowaru i podgatunku *Salmonella*. Niektóre zawarte w nich geny, mające istotne znaczenie dla patogenyzy w określonym układzie serowar/gospodarz, są nieobecne lub zmutowane w innych serowarach. Ta heterogenność może częściowo tłumaczyć szczególne preferencje niektórych serowarów *Salmonella* do zakażenia wybranych gospodarzy. Cechy charakteryzujące wyspy patogenności bakterii *Salmonella* przedstawiono w tabeli 4.

1.2.2. Pozachromosomalne elementy genetyczne bakterii *Salmonella*

Oprócz różnic w zakresie występowania wysp patogenności, genomy bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella* oraz genomy różnych serowarów *Salmonella* różnią się również między sobą obecnością mobilnych elementów genetycznych takich jak plazmidy i bakteriofagi [33, 95, 273, 326, 364, 408]. Geny umiejscowione na plazmidach mogą warunkować patogenność bakterii wobec człowieka i zwierząt. Należą do nich np.: geny warunkujące zdolność do adhezji patogenu do powierzchni odpowiednich komórek atakowanej tkanki, penetracji do wnętrza komórki, zdolność do produkcji różnego rodzaju toksyn, oporność na przeciwbakteryjne czynniki obecne w surowicy (*serum resistance*), itp. Analiza sekwencji genomów bakteryjnych wykazała obecność wielu sekwencji profagowych, stanowiących w niektórych przypadkach aż do 10% całości genomu. Obecność aktywnych i defektywnych profagów stwierdzono w większości badanych szczepów. Na przykład, spośród 173 przebadanych szczepów *S. Typhimurium*, aż 136 zawierało profagi. Badania prowadzone z zastosowaniem takich metod jak hybrydyzacja DNA oraz analiza porównawcza sekwencji DNA genomów *S. enterica* serowar Typhi i *S. enterica* serowar Typhimurium wykazały, że to głównie zawartość genów pochodzących z plazmidów typu F i lambdoidalnych fagów decyduje o różnorodności obserwowanej pomiędzy tymi serowarami [33, 107].

1.2.2.1. Plazmidy

Prawie wszystkie geny występujące u bakterii znajdują się na chromosomie bakteryjnym. Kilka genów jest zlokalizowanych w małych, kolistych cząsteczkach DNA

zwanych plazmidami (u pewnych bakterii stwierdzono także obecność plazmidów liniowych), występujących dodatkowo u bakterii oprócz chromosomowego DNA. Są to głównie geny, które są przydatne bakteriom, ale nie są niezbędne do normalnego wzrostu i podziału komórki. Ulegają one niezależnej replikacji. Niektóre plazmidy integrują się z chromosomem bakteryjnym. Istnieje wiele różnych plazmidów, między innymi: plazmidy typu R, typu F, plazmidy kolicynowe, degradacyjne i plazmidy wirulencji. Nadają one bakteriom oporność na antybiotyki, umożliwiają przenoszenie genów między komórkami bakteryjnymi, kodują bakteriobójcze białka kolicyny i białka metabolizujące nietypowe związki oraz nadają zdolność wywoływania chorób. Bakterie mogą posiadać jednocześnie kilka typów plazmidów. Jednak nie wszystkie rodzaje plazmidów mogą współistnieć w bakterii.

Mapa genetyczna chromosomu *Salmonella* Typhimurium LT2 niewiele (29%) różni się od chromosomu *Escherichia coli* K-12 [255]. Aktywność niektórych genów bakterii *Salmonella* została zidentyfikowana dopiero po wcześniejszym ich odkryciu u *E. coli*. Plazmid koniugacyjny F, charakterystyczny dla *E. coli*, może być przekazywany w procesie koniugacji z *Escherichia coli* do *Salmonella* Typhimurium, a także do innych typów serologicznych *Salmonella* [22, 254, 342]. Izolowano szczepy *Salmonella* Typhimurium, posiadające plazmid F wbudowany do chromosomu; szczepy takie nazywane są szczepami Hfr (*high-frequency of recombination*) [342]. Istnieje więc możliwość przekazywania z wysoką częstością genów chromosomowych ze szczepów Hfr *S. Typhimurium* do szczepów *E. coli* i odwrotnie. Na przykład geny chromosomowe odpowiedzialne za syntezę antygenów O, H czy Vi bakterii *Salmonella*, mogą być przekazywane w procesie koniugacji, wraz z plazmidem F, bakteriom z rodzaju *Escherichia*.

Inne plazmidy bakterii *Salmonella* mogą również kodować oporność na antybiotyki, wytwarzanie bakteriocyn, niektóre cechy metaboliczne jak zdolność fermentacji laktozy czy sacharozy, a także powodować zmiany czynników antygenów somatycznych [68, 69, 152, 248, 307]. Popoff i Le Minor [307] wykazali, iż czynnik O:54 bakterii *Salmonella* jest determinowany obecnością plazmidu wielkości 7,5 kbp.

Tabela 4. Charakterystyka wysp patogenności bakterii *Salmonella* [94, 267]
 Table 4. Characteristics of *Salmonella* pathogenicity islands [94, 267]

Wyspa Island	Wielkość (kbp) ¹ Size (kb) ¹	% G+C ¹	Miejsce insercji Insertion point	Występowanie Distribution	Działanie wirulentne (kodowane funkcje lub czynniki wirulencji) / Virulence functions
SPI-1	38,8	45,9	flhA-mutS	<i>Salmonella</i> spp.	TTSS-1, inwazja, odpowiedź prozapalna; pobieranie jonów Fe ²⁺ i Mn ²⁺
SPI-2	39,8	47,4	tRNA valV	<i>Salmonella</i> spp.	TTSS-2, przeżywalność wewnątrzkomórkowa; redukcja czterotianianu / oddychanie beztlenowe
SPI-3 (I)	17,3	47,6	tRNA selC	<i>Salmonella</i> spp.	kolonizacja przewodu pokarmowego; pobieranie jonów Mg ²⁺
SPI-3 (II)	10,7	54,6		<i>S. enterica</i> subsp. I, <i>S. bongori</i>	
SPI-3 (III)	5,9	44,7		<i>S. enterica</i> subsp. I, II	
SPI-4	23,4	44,8	tRNA-podobne	<i>Salmonella</i> spp.	system sekrecji typu I, kolonizacja przewodu pokarmowego
SPI-5	7,6	43,6	tRNA serT	<i>Salmonella</i> spp.	cieląt
SPI-6	47,0 ² 58,9	51,5	tRNA aspV	<i>S. enterica</i> subsp. I, małe fragmenty SPI-6 u subsp. IIIb, IV, VI	białka efektorowe TTSS-1 i TTSS-2, odpowiedź enteropatogenna
SPI-7	133,6	49,7	tRNA pheU	<i>S. enterica</i> subsp. I (niektóre serowary)	fimbrie typu Saf i Tcf
SPI-8	6,8	38,1	tRNA pheV	<i>S. enterica</i> subsp. I (niektóre serowary)	
SPI-9	16,3	56,7	profag	niektóre serowary	antygen Vi, wirulencja serowaru Typhi; profag SopE, inwazja, enteropatogeneza; pille typu IV, inwazja nieznaną
SPI-10	32,9	46,6	tRNA leuX	<i>S. enterica</i> subsp. I (niektóre serowary)	tworzenie biofilmu; kolonizacja jelita
SPI-11	14,0 ³	41,3 ³	profag Gifsy-1	nieznane	fimbrie typu Sef, wirulencja przy zakażeniu drożdży
SPI-12	6,3 ³	49,92 ³	tRNA proL	nieznane	przeżywalność w makrofagach, oporność na bakteriofagowe działanie surowicy efektor TTSS-2

Wyspa <i>Island</i>	Wielkość (kbp) ¹ <i>Size (kb)</i> ¹	% G+C ¹	Miejsce insercji <i>Insertion point</i>	Występowanie <i>Distribution</i>	Działanie wirulentne (kodowane funkcje lub czynniki wirulencji) / <i>Virulence functions</i>
SPI-13	19,5 ²	48,1 ²	tRNA pheV	nieznane	wirulencja przy zakażaniu drobiu
SPI-14	8,7 ²	41,4 ²	–	nieznane	wirulencja przy zakażaniu drobiu

¹ Wielkość wysp patogenności oraz procentowy udział guaniny (G) i cytozyny (C) obliczono bazując na sekwencji nukleotydowej genomu *S. Typhi* (o ile nie wskazano innego serowaru); ² *S. Typhimurium*; ³ *S. Choleraesuis*; TTSS-1, TTSS-2 – systemy sekrecji typu III wysp patogenności *Salmonella*, odpowiednio SPI-1 i SPI-2

¹ All island sizes and %(G+C) calculations are based on the *S. Typhi* genome sequence unless otherwise indicated; ² *S. Typhimurium*; ³ *S. Choleraesuis*; TTSS-1, TTSS-2 – type three secretion system of *Salmonella pathogenicity island SPI-1 and SPI-2, respectively*

Część bakterii *Salmonella* zawiera duże plazmidy (50 – 100 kpz) kodujące niektóre cechy ich chorobotwórczości [326]. Tak zwane plazmidy wirulencji (*virulence plasmids*) bakterii *Salmonella* zawierają informację genetyczną na temat syntezy toksyn lub struktur błony zewnętrznej bakterii, które determinują ich właściwości patogenne. Plazmidy te nie uczestniczą bezpośrednio w procesach patologicznych zachodzących w organizmie w czasie infekcji, ale jako czynniki kontrolujące ekspresję właściwości patogennych zarazka, są pośrednimi wskaźnikami jego chorobotwórczości [264, 408]. Obecność plazmidów wirulencji typu F wykazano wśród wielu szczepów *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Gallinarum* biowar Pullorum i *S. Abortusovis*. Obecne były również w szczepach *S. Johannesburg*, *S. Kottbus*, *S. Give*, *S. Newport* oraz *S. Derby*. Plazmidów tego typu (i regionu *spv*) nie posiadają pałeczki *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* i *S. Sendai* [326]. Wyjątek w tej grupie stanowi *S. Paratyphi C*, chociaż udział plazmidu wirulencji (54 kpz) w przebiegu zakażenia tym drobnoustrojem jest nieznan. Większość plazmidów wirulencji może być przekazywana innym bakteriom, ale tylko niektóre z nich zachowały zdolności koniugacyjne [3].

Badania wykazały [266], że większość plazmidów wirulencji jest wzajemnie ze sobą spokrewnionych. Posiadają one wspólny region, wielkości ~8 kpz DNA, zawierający geny *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) [155], które u serowarów *Salmonella* z podgatunków *salamae* (II), *arizonae* (IIIa) i *indica* (VI) odnaleziono w chromosomowym DNA, co wskazuje na zachodzące rearanżacje materiału genetycznego. Plazmidy determinujące chorobotwórczość są niezbędne do ekspresji pełnego fenotypu wirulentnego *in vivo*. Na przykład, charakterystyczna dla pałeczek *S. Enteritidis* skłonność do wywołowania zakażeń głównie u drobiu, jest zredukowana u szczepów pozbawionych plazmidu wirulencji [387]. Owa wytrwałość w powodowaniu zakażeń tego właśnie gospodarza, jak i wzmożona wirulencja względem tego gospodarza, może mieć związek z obecnością genów *spv*. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że region wielkości ~8 kpz, zawierający wszystkie geny *spv* (*spvRABCD*), może przywrócić wirulencję szczepom *S. Typhimurium* nie posiadającym plazmidu wirulencji [155]. Co więcej, obecność tylko 2 genów *spvB* i *spvC* jest wystarczająca do uzyskania pełnej wirulencji do zakażenia myszy przez szczep *S. Typhimurium* pozbawiony pozostałej części plazmidu [252], a serowary gatunku *S. enterica* zmutowane w obrębie genu *spvR* wykazywały znaczące osłabienie właściwości chorobotwórczych dla cieląt [232]. Do F-plazmidowych genów należą również geny operonu *pef* [28], zawierające pełną informację genetyczną dotyczącą syntezy jednego z kilku rodzajów fimbrii (tzw. *plasmid-encoded fimbriae*) oraz gen *rck*, kodujący oporność na działanie komplementu [162]. Geny wykazujące podobieństwo do genów *faeH* i *faeI*, kodujących fimbrie *E. coli* K88, mogą wpływać na wirulencję *S. Gallinarum*. Obecność ich wykazano również w plazmidach wirulencji występujących u *S. Dublin* i *S. Gallinarum* biowar Pullorum; nie znaleziono ich jednak w plazmidach obecnych u *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* czy *S. Choleraesuis* [334].

Pozostałe to tzw. plazmidy kryptyczne (*cryptic*), czyli plazmidy bez określonej (jak do tej pory) funkcji, których obecność nie nadaje komórce żadnych szczególnych cech fenotypowych odróżniających ją od komórki bezplazmidowej [17, 147, 202]. Niektóre plazmidy bakterii *Salmonella* w pełni zsekwencjonowano. Należą do nich: dwa plazmidy pHCM1 i pHCM2 występujące u *S. Typhi* CT18 [294, 344, 389], plazmid wirulencji pSLT występujący u *S. Typhimurium* LT2 [255] oraz plazmid wirulencji pKDSC50, wielkości 50 kpz, znaleziony u *S. Choleraesuis* [158]. Dostępne są również mapy genetyczne i dane dotyczące częściowej sekwencji innych plazmidów bakterii *Salmonella*, takich jak plazmid wirulencji, wielkości 60 kpz, występujący u *S. Enteritidis* [327].

U pałeczek *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* zaobserwowano również pewną zależność pomiędzy obecnością plazmidu wirulencji i prezentowanym przez nie typem bakteriofagowym [408]. Typ bakteriofagowy pałeczek *S. Typhimurium* może być także determinowany przez niektóre plazmidy oporności.

1.2.2.2. Bakteriofagi

Do pozachromosomowych elementów genetycznych wzbogacających genom komórki bakteryjnej, należą również bakteriofagi, wirusy zdolne do infekowania bakterii, występujące także u pałeczek *Salmonella* [11, 33, 178]. Bakteriofagi pośredniczące w transdukcji materiału genetycznego izolowano zarówno z zawartości jelit, jak i ze środowiska. Wiele bakteriofagów jest zdolnych do wejścia w stan zwany lizogenią (fagi lizogeniczne, czasem zwane łagodnymi) poprzez integrację z chromosomem bakteryjnego gospodarza (z wyjątkiem faga Mu). Ma to szczególne znaczenie w sytuacji gdy bakteriofag jest nosicielem dodatkowych genów (*cargo genes*), nie odgrywających żadnej roli w procesie proliferacji faga [36]. Obecność aktywnych i nieaktywnych profagów w genomie gospodarza nadaje bakteriom różne szczególne właściwości. Znaczącą manifestacją tego stanu jest tzw. „lizogenna konwersja”, w wyniku której, np.: niechorobotwórczy szczep bakteryjny może stać się szczepem patogennym na skutek nabycia dodatkowych determinant wirulencji zawartych w bakteriofagu [49]. Jedną z najbardziej nieoczekiwanych rewelacji, będącą wynikiem przeprowadzanych ostatnio badań porównawczych sekwencji genomów bakterii *Salmonella*, była stosunkowo duża zawartość genów fagowych, co wskazywałoby na istotny udział bakteriofagów w procesie ewolucji *Salmonella* [213, 255, 294]. Analiza profagów bakterii *Salmonella* opierała się głównie na wynikach sekwencjonowania materiału genetycznego szczepów *S. Typhi* CT18 i *S. Typhimurium* LT2. Bakteriofagowy DNA zawarty w obu genomach występował głównie w dwóch odmiennych formach. W postaci krótkich fragmentów (mniej niż 5 genów), które często kodowały również transpozazy (enzymy katalizujące proces transpozycji) i które świadczą o mającym wcześniej miejsce zjawisku wycięcia bakteriofa-

gowego DNA z DNA komórki bakteryjnego przodka. Drugi rodzaj bakteriofagowego DNA zawiera większe zespoły genów kodujące kompletne profagi lub obszerne ich fragmenty. W przypadku *S. Typhi* CT18 geny te stanowiły około 4% genomu bakteryjnego [294]. Dwa lambdoidalne (*lambdoid-like*) profagi Gifsy 1 i Gifsy 2 wpływają na wirulencję swojego bakteryjnego gospodarza. Pozbawienie bakterii *S. Typhimurium* profaga Gifsy-2 stukrotnie obniża ich wirulencję przy zakażeniu myszy [117, 118]. Do nie-fagowych genów wykrywanych w obrębie profaga Gifsy-2 należy gen *sodCI*, kodujący dysmutazę ponadtlenkową (*superoxide dismutase*), mającą związek z przeżywalnością bakterii w makrofagach [252, 377]. Bakteriofag Gifsy-1 zawiera gen *gipA*, uczestniczący w procesie kolonizacji jelita cienkiego i gen *sseI*, kodujący białko efektorowe systemu sekrecji typu III, związane z wyspą patogenności 2 (SPI-2) [118]. *Salmonella Typhi* CT18 jest gospodarzem siedmiu regionów DNA pochodzenia bakteriofagowego, wykazujących silne podobieństwo do fagów z rodzin faga P2, P4, Lambda i faga Mu [366]. Badania porównawcze zawartości genów fagowych w szczepie *S. Typhi* CT18 i innych szczepach *S. Typhi* oraz innych serowarach *Salmonella* wskazują na ogromną różnorodność genów bakteriofagowych obecnych w genomach bakterii *Salmonella* warunkującą znaczne zróżnicowanie pomiędzy serowarami *Salmonella* (*inter-serovar variation*), ale również w obrębie przedstawicieli tego samego serowaru. Niektóre z tych profagowych regionów były specyficzne dla szczepu *S. Typhi* CT18, co sugeruje wewnątrzserowarową zmienność (*intra-serovar variation*) zachodzącą w obrębie pojedynczych szczepów *S. Typhi* [366]. To podważa opinię na temat pałeczek *S. enterica* serowaru Typhi powszechnie uznawanych za organizmy klonalnie spokrewnione („*clonal*” *organisms*). Owe różnice dotyczą na ogół regionów genomu skojarzonych z małymi wysepkami genowymi (*gene islets*), regionów znajdujących się w obrębie wysp patogenności i w bakteriofagach. Zatem chromosom *S. Typhi* może również posiadać pewne plastyczne regiony, spełniające rolę niestabilnego źródła genetycznego zróżnicowania w obrębie „*highly clonal*” populacji jaką stanowią pałeczki duru brzuszego. Regiony te zachwiały stabilność klonalnej ekspresji *Salmonella Typhi*.

Badania w dziedzinie typowania bakteriofagowego przyniosły wiele wniosków z zakresu lizogenii i dziedziczności oraz stały się podstawą interpretacji wyników lizotypii w dochodzeniach epidemiologicznych w przypadkach występowania zjawiska zmienności w obrębie tego samego typu bakteriofagowego [41, 59].

Fagi bakteryjne zdolne do lizogenizacji mogą również, w wyniku lizogennej konwersji, modyfikować strukturę części O-antygenowej LPS bakterii *Salmonella* [178]. Bakteriofag P22 jest odpowiedzialny za zmianę typu wiązania pomiędzy glukozą i galaktozą w podjednostce O-swoistego łańcucha LPS, z wiązania 1 – 4 na wiązanie 1 – 6, co w efekcie objawia się powstaniem nowego faktora O:1 [148]. Pojawienie się determinanty antygenowej O:27, będącej efektem zmiany rodzaju wiązania pomiędzy monomerami, z 1 – 2 na wiązanie typu 1 – 6, uważane do tej pory za wynik lizogenizacji fagiem $\Phi 27$, w rzeczywistości jest modyfikacją uwarunkowaną obecnością genu $wzy_{\alpha(1-6)}$ [149,

392]. Fagi ϵ_{15} oraz ϵ_{34} zmieniają O faktory w grupie O:3,10 (E_1). Znacząca liczba, jak i różnorodność profagów, których obecność wykazano w genomach pałeczek *Salmonella*, stanowi ważne źródło genetycznej zmienności i może odgrywać istotną rolę w ewolucji i specjalizacji tych bakterii.

1.3. PATOGENEZA ZAKAŻEŃ *SALMONELLA*

Pałeczki *Salmonella*, subepitelialne pasożyty, zdolne są do adhezji i penetracji w głąb ściany jelita gospodarza [10, 319]. Wytwarzane w czasie kolonizacji toksyny wraz z tzw. białkami inwazyjnymi, doprowadzają do dysfunkcji przewodu pokarmowego [20], a w sprzyjających warunkach do uogólnienia procesu chorobowego. Kolonizacja błony śluzowej jelita jest pierwszym etapem w procesie choroby. Do szczególnie aktywnych czynników kolonizacyjnych należą fimbrie. W procesie adhezji uczestniczą także inne struktury komórki bakteryjnej, tworzące skomplikowany system połączeń komórki bakteryjnej z komórką eukariotyczną. Przypuszcza się, że wzajemne oddziaływanie fimbrii z enterocytami inicjuje zmiany degeneracyjne w rąbku szczoteczkowym i uwalnianie substancji o charakterze chemoatraktantów. Można by więc założyć, że potęgują one kolonizację poprzez wzmoczoną koncentrację bakterii w tym rejonie. W procesie kolonizacji mogą być wykorzystane właściwości inwazyjne i hydrofobowe drobnoustroju. Zmiany degeneracyjne powstałe w komórkach nabłonkowych jelita doprowadzają do odsłonięcia nowych miejsc wiązania zarazka.

1.3.1. Ogólna charakterystyka mechanizmów zakażeń *Salmonella*

Zakażenia bakteriami *Salmonella* powodują schorzenia o wieloczynnikowej etiologii i podobnie jak w przypadku innych chorób zakaźnych zachorowania są wynikiem wzajemnego oddziaływania sił obronnych makroorganizmu i właściwości chorobotwórczych zarazka [32, 151]. W przypadku pałeczek *Salmonella*, podobnie jak i innych patogenów jelitowych, o możliwości chorobotwórczego działania decyduje ich zdolność do adhezji do tkanek makroorganizmu oraz do produkcji toksyn, powodujących zaburzenia funkcji oraz procesy degeneracyjne w komórkach żywiciela [10, 20, 46, 207, 319, 330]. Trwałe powiązanie drobnoustrojów z komórkami tkanek gospodarza inicjuje rozwój procesu chorobowego. „Przytwierdzenie” pałeczek *Salmonella* działa zapobiegawczo przeciw ich usuwaniu ze światła jelita przez ruchy perystaltyczne. Jedynie drobnoustroje, które pozostają w trwałym kontakcie z komórkami makroorganizmu mogą oddziaływać na nie destrukcyjnie oraz penetrować w głąb tkanek, doprowadzając w sprzyjających warunkach do infekcji o charakterze systemowym. Pałeczki *Salmonella*, po wprowadzeniu do przewodu pokarmowego, mogą zasiedlać błonę śluzową i powodować

objawy zatrucia pokarmowego. Mogą również forsować barierę jelitową i przedostawać się przy udziale komórek M w kępkach Peyera do węzłów chłonnych krezkowych i do przewodu piersiowego, a stąd do krwiobiegu (ryc. 9) [285]. Powoduje to przejściową, krótkotrwałą bakteremię. Bakterie są szybko wychwytywane przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego w śledzionie, czy w wątrobie. Jeżeli jednak czynniki wirulencji drobnoustroju przeważają siły obronne organizmu gospodarza, następuje jego namnażanie się w tych narządach, co doprowadzić może do kolejnego wysiewu drobnoustrojów do krwi i ich przenikania do tkanek oraz rozwoju posoczniczowego procesu chorobowego.

1.3.2. Udział czynników wirulencji w patogenezie zakażeń *Salmonella*

O wirulencji pałeczek *Salmonella* decyduje cały szereg czynników, których ekspresja zarówno co do ich ilości, jak i jakości, uzależniona jest w pierwszym rzędzie od genetycznych cech drobnoustroju [163, 164]. Prawdopodobnie jakość i ilość ujawnianych przez szczep czynników chorobotwórczych w stosunku do jego genetycznych możliwości zależy w znacznej mierze od zdolności obronnych makroorganizmu [186]. Badanie i analizowanie częstości występowania tych czynników u patogennych szczepów ma ogromne znaczenie dla opracowania skutecznych technik identyfikacyjnych oraz dla pełnego poznania schorzeń powodowanych przez bakterie *Salmonella*, a także dla wypracowania możliwie efektywnych metod ich zwalczania i zapobiegania [32, 151, 218, 219, 233, 371].

Decydującym momentem w rozwoju zakażenia jest kolonizacja nabłonka jelitowego przez szczepy *Salmonella* [9, 207]. Wszystkie serowary *Salmonella* są potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt. Inwazyjne szczepy indukują ostry stan zapalny błony śluzowej, chociaż nie wszystkie z nich stymulują przepływ elektrolitów do światła jelita. Wykazano, że szczepy *Salmonella* powodujące biegunkę nie zawsze wytwarzają enterotoksyny. W takich przypadkach, aktywacja cykazy adenylowej oraz mobilizacja cyklicznego monofosforanu adenozy (cAMP) jest prawdopodobnie indukowana przez prostaglandyny. Kontakt między komórkami drobnoustroju i żywiciela ułatwia ujemny ładunek elektryczny na powierzchni bakterii. Struktury powierzchniowe (zbudowane z białek i lipidów) decydują o jej właściwościach hydrofobowych. Umożliwia to bakteriom wiązanie się z komórkami eukariotycznymi za pośrednictwem swoistych wiązań hydrofobowych i elektrostatycznych. Dla efektywnej adherencji konieczne jest jeszcze połączenie receptorów komórek eukariotycznych z komplementarnymi ligandami bakteryjnymi.

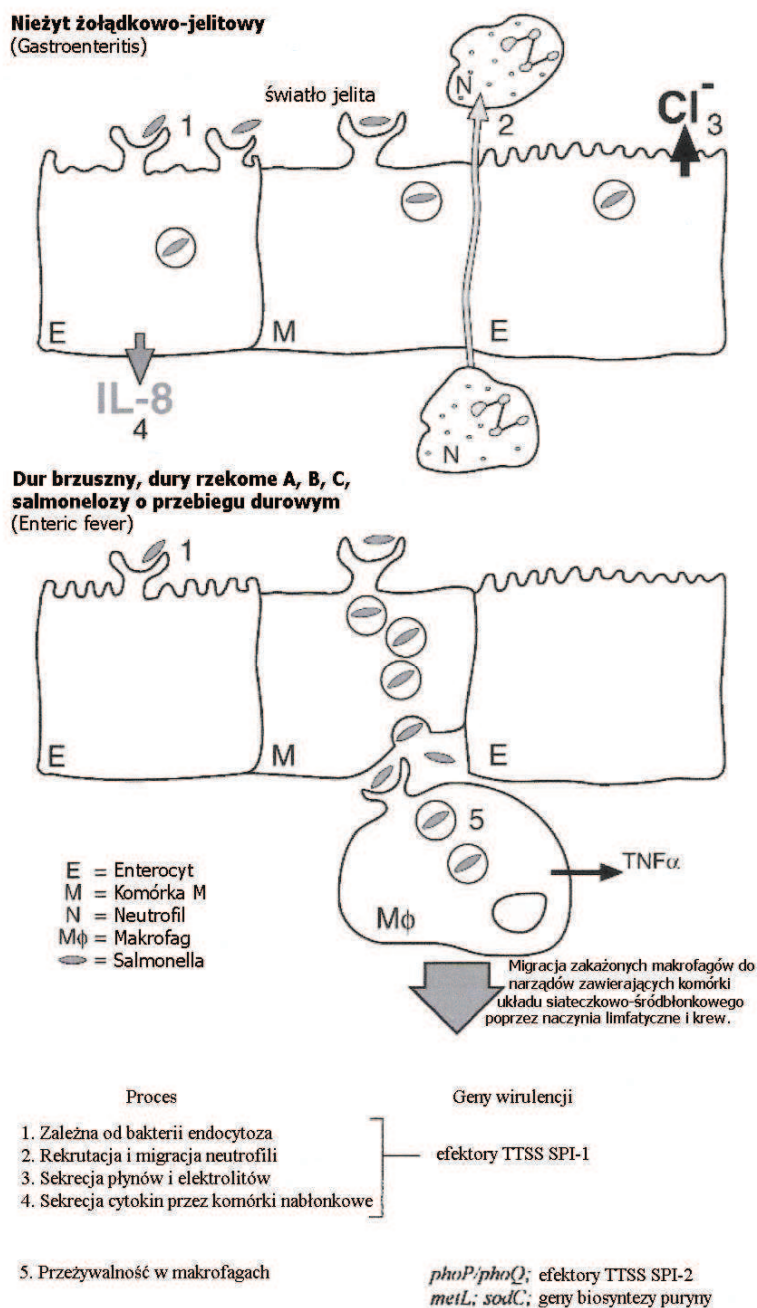
Ryc. 9. Uproszczony schemat patogenezy zakażeń *Salmonella* (według [285])

Fig. 9. Selected events in *Salmonella* pathogenesis and associated virulence genes (according to [285])

U bakterii *Salmonella* za główny czynnik adhezyjny uważane są fimbrie typu 1 [81, 207], struktury o kształcie cienkich włókienek, zlokalizowanych na powierzchni komórki bakteryjnej [367]. Do inicjacji adhezji niezbędne jest zbliżenie się adherentnej domeny fimbrii na odległość 35 nm do receptora tkankowego. Taka bliskość umożliwia reakcje między regionami hydrofobowymi prowadząc do wzmocnienia istniejącego wiązania [81, 207].

Kolejnym mechanizmem umożliwiającym pałeczkom *Salmonella* kontakt z tkankami gospodarza jest posiadana przez nie zdolność wiązania się z zewnątrzkomórkowymi białkami tkanek, takimi jak fibronektyna, witronektyna, trombospondyna, kolagen, fibrynogen, określanymi mianem macierzy tkankowej (*tissue-matrix*). Oprócz roli białek strukturalnych spełniają one również pewne funkcje w przebiegu procesów zapalnych, autoimmunizacji, odpowiedzi immunologicznej i powstawaniu nowotworów. Białkiem szczególnie aktywnym w mechanizmie wiązania się z drobnoustrojami jest fibronektyna. Receptory dla fibronektyny u pałeczek *Salmonella* zlokalizowane są głównie na fimbriach [207, 367].

W procesie zasiedlania błony śluzowej przewodu pokarmowego uczestniczy wiele białek tworzących strukturę błony zewnętrznej (OMPs, *outer membrane proteins*) bakterii *Salmonella* [46, 81, 319]. Białka OMPs zlokalizowane częściowo na powierzchni komórki bakteryjnej uczestniczą w procesie adhezji komórki bakterii do komórek gospodarza, są antygenami dla przeciwciał skierowanych przeciwko komórkom bakterii, pełnią także funkcję receptorów dla różnych cząsteczek i bakteriofagów. Część OMPs funkcjonuje jako poryny [46]. Poryny OmpD *S. Typhimurium* są zaangażowane w adhezję do komórek nabłonkowych jelita, a także niezbędne w procesie inwazji tych bakterii do komórek gospodarza. Białkami błony zewnętrznej potencjalnie zaangażowanymi w proces adhezji *S. Enteritidis* do komórek epitelialnych jelit są OMPs o masie cząsteczkowej 82,3kDa i 75,6kDa. Sforsowanie bariery rąbka szczoteczkowego jest wstępem do inwazji komórek nabłonkowych i dalszej penetracji tkanek. Proces ten wymaga współdziałania funkcjonalnego mikrorzęsek z inwazyjnymi drobnoustrojami. Zaadsorbowane bakterie uczestniczą w procesach przestrojenia funkcjonalnego komórek nabłonkowych [355], a efektem tej zmiany jest internalizacja drobnoustroju przez enterocyty, które normalnie nie spełniają funkcji komórek fagocytujących [418].

Białka szoku termicznego (Hsp, *heat shock protein*) drobnoustrojów odgrywają również ważną rolę w patogenezie chorób zakaźnych i odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Jak wynika z danych literaturowych, białko szoku termicznego klasy GroEL (z rodziny białek 60 kDa) bakterii zdolnych do jego transportu na powierzchnię błony cytoplazmatycznej albo na zewnątrz komórki może mieć związek z wirulencją drobnoustrojów [108, 127]. Białko szoku termicznego z rodziny białek 60 kDa (Hsp60) wytwarzane przez *Salmonella Typhimurium*, uważa się za czynnik wirulencji tych bakterii [108]. Jak wykazały badania *in vitro*, agregacja bakterii *Salmonella Typhimurium* w

jelicie, a w jej następstwie kolonizacja jelita, wydaje się zależeć od białka Hsp60, które wiąże się z glikoproteiną obecną w śluzie jelitowym [108, 240].

Wśród struktur komórkowych bakterii z rodzaju *Salmonella* znaczącą rolę w procesach patogennego oddziaływania przypisuje się lipopolisacharydom (LPS, endotoksyna) ich ściany komórkowej [324, 335, 406]. Lipopolisacharyd tworzy najbardziej zewnętrzną jej warstwę, a jego aktywność patogenna zależy od jego składu antygenowego. Wpływa na wirulencję pałeczek *Salmonella* przez zwiększenie ich oporności na fagocytozę. Przeciwdziała również litycznej akcji dopełniacza i defensyn oraz jako endotoksyna wywiera destrukcyjny wpływ na komórki żywiciela. Lipopolisacharyd uczestniczy również w procesie kolonizacji błony śluzowej jelit. Szczepy gładkie (w formie S) wykazują nawet tysiąckrotnie wyższą aktywność kolonizacyjną od ich szorstkich mutantów, chociaż dysocjacja LPS nie zawsze powoduje utratę chorobotwórczości [324]. Udowodniono też rolę LPS, jako antygeny ochronnego. Wraz z białkami błony zewnętrznej, LPS przeciwdziała powstawaniu kompleksów atakujących błony, umożliwiając tym samym przeżywanie drobnoustroju w organizmie gospodarza, chroniąc go przed bakteriobójczym działaniem surowicy.

W kolonizacji gospodarza przydatna jest między innymi zdolność drobnoustrojów do ruchu. Większość powierzchni zakażonego organizmu jest pokryta śluzem, aby więc bakterie mogły dostać się do samych komórek nabłonkowych, muszą pokonać tę barierę. Istnieją takie czynniki zakażenia, które umożliwiają drobnoustrojom obejście tej przeszkody, jak np. rzęski czy mucynazy (enzymy rozkładające śluz) [278]. Bakterie *Salmonella* poruszają się dzięki obrotowemu ruchowi rzęsek oraz wykazują zjawisko chemotaksji, tzn. mają zdolność poruszania się w kierunku substancji odżywczych i oddalania od substancji toksycznych. Rzęski spełniają rolę czynników wirulencji ułatwiających pałeczkom *Salmonella* kolonizację gospodarza [29, 278]. Antygen rzęskowy pełni istotną rolę w wirulencji bakterii *Salmonella* [324, 378, 414]. Flagellina indukuje produkcję tlenu azotu jako jednego z mediatorów prozapalnych. Aktywując odpowiednie receptory na powierzchni błon komórek makrofagów, wyzwalają reakcje prozapalne [263]. Stymulacja makrofagów dotyczy nie tylko całej cząsteczki flagelliny, ale również małych peptydów. Badania konserwatywnej części flagelliny *S. Muenchen* udowodniły, że sekwencje 14 aminokwasów zlokalizowanych w N-terminalnej części i 9 aminokwasów w części C-terminalnej decydowały o wywołaniu odpowiedzi prozapalnej przez te bakterie [269]. Zmienność antygenowa (flagellina fazy 1 i fazy 2) jest znakomitym sposobem unikania swoistej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dostępność dwóch systemów genetycznych, odpowiedzialnych za ekspresję różnego rodzaju flagelliny pomaga bakteriom *Salmonella* pokonać barierę immunologiczną gospodarza i przeżyć.

Kolonizacja nabłonka jelitowego jest wstępnym etapem procesu infekcyjnego pałeczek *Salmonella*, umożliwiającym tym bakteriom ujawnienie innych czynników wirulencji [96, 264]. Adhezyny, czynniki inwazyjne i antyfagocytarne umożliwiają bakteriom *Salmonella* przede wszystkim kolonizację, penetrację i przeżywanie w komórkach

makroorganizmu, natomiast procesy destrukcyjne w tkankach i większość zaburzeń funkcjonalnych powodowana jest aktywnością substancji o charakterze toksyn. O chorobotwórczości *Salmonella* i przebiegu klinicznym choroby decydują również w pewnym stopniu wytwarzane przez drobnoustroj toksyny [157, 210, 294]. Pałeczki *Salmonella* wytwarzają kilka różnych enterotoksyn i cytotoksyn [184, 324], których syntezę kontrolują zarówno geny chromosomalne, jak i plazmidowe. Cytotoksyny *Salmonella* są głównie egzotoksynami, wydzielanymi do środowiska w czasie wzrostu tych drobnoustrojów. Ich działanie patogenne jest bardzo podobne, jeżeli nie identyczne, ze zmianami powodowanymi przez toksynę pałeczek *Shigella* (toksyna Shiga) [206]. Enterotoksyny natomiast są emitowane poza komórkę bakteryjną tylko w śladowych ilościach [210]. W znacznej mierze związane są z komórką i dlatego też właściwości enterotoksyczne wielu szczepów *Salmonella* ujawniają się dopiero po ich dezintegracji ultradźwiękami i zagęszczeniu. Niektóre z nich są bardzo podobne do toksyn produkowanych przez *Escherichia coli* (enterotoksyny ciepłoopornej ST i ciepłowrażliwej LT) [210] i *Vibrio cholerae* (toksyny CT) [341], inne natomiast wykazują pewną odmienność. Szczepy *Salmonella* mogą również wytwarzać czynniki o działaniu dermonekrotycznym [340].

Ważne znaczenie dla wirulencji bakterii, i co za tym idzie ich aktywności patogenicznej, ma również obecność plazmidów w komórce bakteryjnej [33, 95, 324]. Zespół plazmidów znajdujących się w komórce *Salmonella* decyduje o jej chorobotwórczości. Tak zwane plazmidy wirulencji, o wielkości 50 – 100 kbp, zawierają między innymi informację genetyczną dotyczącą syntezy toksyn lub struktur błony zewnętrznej bakterii (na przykład tzw. *plasmid-encoded fimbriae*, kodowane przez plazmidowe geny *pefBACD*) determinujących ich właściwości patogenne. Kodują również oporność bakterii na bakteriobójcze działanie surowicy, ich właściwości inwazyjne, a także zmianę długości O-swoistego łańcucha LPS [324, 364]. Plazmidy te są niezbędne do ekspresji pełnego fenotypu wirulencji *in vivo*. Analiza zawartości plazmidów w komórce jest użytecznym kryterium oceny potencjalnej wirulencji badanego szczepu. Plazmidy stanowią pośredni wskaźnik chorobotwórczości pałeczek *Salmonella*.

Badania molekularne zmieniły w wielu aspektach spojrzenie na patogenezę zakażeń *Salmonella*. Wirulencja jest wypadkową wielu genów. Około 4% genomu *Salmonella* Typhimurium determinuje funkcje komórki bakteryjnej niezbędne do jej przeżycia w organizmie gospodarza [182]. DNA pałeczek *Salmonella* koduje syntezę wielu białek aktywnych w przeciwdziałaniu mechanizmom obronnym makroorganizmu. Genetycznie regulowana ekspresja tych białek umożliwia bakteriom *Salmonella* adaptację w nowym środowisku nisz anatomicznych oferowanych przez organizm gospodarza [32, 99, 324]. Większość białek odpowiedzialnych za wirulencję pałeczek *Salmonella* jest transportowana z cytoplazmy na powierzchnię komórki bakteryjnej lub emitowana do środowiska zewnętrznego. W fazie namnażania się w makrofagach, bakterie *Salmonella* produkują przynajmniej 35 różnych białek (MIP, *macrophage inducing proteins*), w tym białko szoku termicznego z rodziny GroEL. Do ekspresji większości z nich dochodzi wyłącznie

w makrofagach i nie mogą być one syntetyzowane przez drobnoustroje namnażające się w komórkach nabłonkowych [29, 40, 418]. Aktywność tych białek skierowana jest głównie przeciwko defensynom, niskocząsteczkowym białkom, produkowanym przez makrofagi i neutrofile w odpowiedzi na inwazję bakterii lub wirusów [324]. Ze względu na silną infiltrację błony śluzowej jelita przez leukocyty obojętnochłonne wytwarzające defensyny, oporność na nie wydaje się być szczególnie istotną w przebiegu zakażeń jelitowych. Synteza czynników MIPs, neutralizujących defensyny, odbywa się pod nadzorem genów regulatorowych *phoP* i *phoQ* (PhoP/PhoQ system), a także genu *ompR* odpowiedzialnego za osmoregulację (białko OmpR – regulator aktywacji genów SPI-2) [94, 99, 187, 268, 324].

1.4. ETIOLOGIA I CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA ZAKAŻEŃ *SALMONELLA*

Bakterie *Salmonella* powodują następujące zachorowania: salmonelozy, dur brzuszny i dury rzekome.

Salmonelozy, są to zachorowania wywoływane przez różne pałeczki *Salmonella* tzw. zwierzęcego pochodzenia, tj. przez różne serowary *Salmonella* z wyjątkiem *S. Typhi* i *S. Paratyphi* A, B i C. Od wielu lat, zarówno na świecie, jak i w Polsce, dominującą rolę w wywoływaniu zakażeń odgrywa serowar *Salmonella* Enteritidis [75, 76, 77, 78, 143, 144, 145, 165, 325]. Wyróżniamy dwie grupy schorzeń: zatrucia pokarmowe (klinicznie objawiające się jako ostry nieżyt żołądkowo-jelitowy), stanowiące najczęstszą postać salmonelozy oraz zakażenia poza zatruciami pokarmowymi, przebiegające w postaci stanów zapalnych lub uogólnionych infekcji. Zakażenie pałeczkami *Salmonella* wywołuje chorobę, której obraz kliniczny zależy od zjadliwości serowaru wywołującego schorzenie oraz wieku i osobniczej wrażliwości chorego [186, 251]. Zdarza się dosyć często, iż zakażenie przebiega bezobjawowo lub z objawami tylko nieznacznego nieżyty żołądkowo-jelitowego [20]. Niekiedy schorzenie może przebiegać pod postacią durową lub septyczną bez ścisłej, jak i ze ściśle określoną lokalizacją układową i narządową, np. ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, ropne zapalenie płuc, zapalenie wsierdzia, zapalenie przewodów żółciowych, zapalenie układu moczowego, ropne zapalenie nerek, a u dzieci często ropne zapalenie ucha środkowego. U ludzi dorosłych, z wyjątkiem osób starszych i z upośledzoną funkcją układu odpornościowego, rokowania na wyzdrowienie są dobre. U noworodków, zwłaszcza wcześniaków i niemowląt – poważne. Rezerwuarem zarazka są domowe i dzikie zwierzęta (ptaki, gryzoni, psy i koty). Źródło zakażenia stanowią zwierzęta, a także ludzie chorzy lub nosiciele. Mogą występować także zakażenia pierwotne produktami spożywczymi. Do zakażenia dochodzi najczęściej drogą pokarmową w następstwie spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego, skażonych pierwotnie (produkty pochodzące od chorych zwierząt) lub skażonych wtórnie kałem zwierząt albo ludzi chorych czy nosicieli. Rzadziej dochodzi do zakażenia

przez bezpośredni lub pośredni kontakt z zakażonymi ludźmi lub zwierzętami [351]. W środowisku szpitalnym do zakażenia pałeczkami *Salmonella* najczęściej dochodzi przez bezpośredni kontakt z chorymi dziećmi lub z zakażonym personelem szpitalnym (przejściowymi nosicielami), a także kontakt pośredni, np. poprzez bieliznę, termometry czy inny sprzęt. Pewną rolę w szerzeniu się zakażeń mogą odgrywać owady, np. karaluchy [30, 223, 398]. Jako czynnik szerzenia się zakażeń bierze się również pod uwagę pyłową drogę powietrzną (*air-borne transmission*), zwłaszcza w niewłaściwie sprzątanym pomieszczeniach. W przypadku salmonelozy, czynnik etiologiczny przenoszony jest głównie od zwierzęcia do człowieka, jak również (choć znacznie rzadziej) od człowieka do zwierzęcia [351]. Wrota zakażenia najczęściej stanowi przewód pokarmowy. Okres wylęgania zarazka wynosi przeciętnie 12-24 godzin. Zakażenie zaczyna się nagle i przebiega najczęściej pod postacią nieżytu żołądkowo-jelitowego, charakteryzującego się biegunką (często z domieszką śluzu i krwi), napadowymi bólami brzucha, wymiotami, odwodnieniem, obniżeniem ciśnienia krwi, czasami nawet zapaścią. Postaci uogólnione i narządowe choroby występują rzadko. Choroba zwykle trwa 2-6 dni i na ogół, jeżeli nie występują zaburzenia elektrolitowe, ustępuje bez leczenia. Okres choroby i wydalania pałeczek *Salmonella* pokrywa się z okresem zaraźliwości. Bakteriologiczne badanie kału, wymiocin, moczu, krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, podejrzonej żywności, umożliwia ustalenie etiologii. Istnieje możliwość, pochorobowego, najczęściej krótkotrwałego nosicielstwa pałeczek *Salmonella*.

Terminem dur brzuszny określamy zachorowanie wywołane pałeczkami *Salmonella Typhi* [297]. Są one chorobotwórcze tylko dla człowieka, który jest jedynym rezerwuarem tych zarazków. Człowiek chory, zakażony bezobjawowo lub nosiciel stanowi źródło zakażenia. Główną rolę w patogenezie duru przypisuje się endotoksynie (LPS) uwalnianej podczas rozpadu bakterii oraz antygenowi otoczkowemu Vi. Dur brzuszny jest chorobą zakaźną, którą cechuje toksemia, bakteriemia oraz zajęcie tkanki limfatycznej przewodu pokarmowego prowadzące do owrzodzeń jelita cienkiego. Początkowi choroby towarzyszy stopniowo narastająca temperatura, bezsenność, bóle głowy, bóle mięśniowe, bóle brzucha, zaparcie (częściej niż biegunka). Na skórze tułowia może pojawić się różyczka (wysypka durowa). W późniejszym okresie choroby mogą wystąpić również powikłania jelitowe (krwawienia, perforacja, zapalenie otrzewnej). Śmiertelność w przypadku nieleczonych pacjentów wynosi około 10%, a leczonych – poniżej 2%. Po upływie kilku lub kilkunastu dni okresu bezgorączkowego u niektórych chorych może dojść do nawrotu choroby, zwykle już o łagodniejszym przebiegu. Zakażenie szerzy się głównie poprzez skażoną wodę i żywność. Szczególnie niebezpiecznym nośnikiem są produkty białkowe (mleko i jego przetwory), które zapewniają długotrwałą przeżywalność pałeczkom *Salmonella Typhi*, a także umożliwiają ich namnażanie się. Zachorowania na dur brzuszny ze styczności mogą zdarzyć się wyjątkowo w warunkach bliskiego kontaktu z wydaliniami chorego. Również wyjątkowo może dojść do zakażenia drogą powietrzną np. w laboratoriach. Przewód pokarmowy stanowi wrota zakażenia. Okres

wylęgania choroby zależy od wielkości dawki zakażającej i wynosi przeciętnie 1 tydzień (przy skażonej żywności) lub 3 tygodnie, gdy mamy do czynienia z zakażeniem poprzez skażoną wodę. Najkrótszym obserwowanym okresem były 3 dni, a najdłuższym 56 dni. Okres zaraźliwości odpowiada okresowi wydalania pałeczek *Salmonella* Typhi z kałem lub moczem. U większości chorych kończy się w czasie rekonwalescencji. Część osób po przechorowaniu wydalą pałeczki przez okres około 3 miesięcy; 2 – 5% osób chorych staje się stałymi nosicielami pałeczek *Salmonella* Typhi. Objawy kliniczne zachorowania na dur brzuszny często nie pozwalają na zróżnicowanie z durami rzekomymi. Prawidłowe rozpoznanie zapewniają jedynie badania bakteriologiczne, przy czym pierwsze badanie należy wykonać przed rozpoczęciem leczenia antybiotykami. Największą wartość diagnostyczną ma dodatni wynik uzyskany z posiewu krwi. Wnikliwszej interpretacji wymagają wyniki badania kału, które mogą być dodatnie również w przebiegu innych chorób u nosicieli pałeczek *Salmonella* Typhi. Bakteriologiczne badanie próbek kału daje bardziej wiarygodne wyniki niż badanie wymazów. W diagnostyce zakażeń pałeczkami *Salmonella* Typhi zastosowanie praktyczne mają również testy serologiczne. Odczyny serologiczne odgrywają niemałą rolę w rozpoznawaniu duru brzusznego, a zwłaszcza odczyn aglutynacyjny Widala, który, mimo wielu zastrzeżeń klinicystów, jest powszechnie stosowany [63, 181, 228, 295]. W przypadku odczynów serologicznych konieczne jest wykonanie kilku badań w różnych fazach choroby dla uzyskania obrazu dynamiki narastania poziomu przeciwciał w czasie. Uzupełnieniem odczynu Widala w diagnostyce duru brzusznego jest czulszy od niego odczyn hemaglutynacji biernej z antygenami O i Vi *Salmonella* Typhi [181].

Wspólną nazwą dury rzekome określamy zachorowania spowodowane pałeczkami *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi B i *Salmonella* Paratyphi C. Patogeneza, zmiany anatomopatologiczne oraz objawy kliniczne są takie same jak w przypadku duru brzusznego, częściej jednak występują jako zakażenia bezobjawowe, postaci o lekkim przebiegu i objawach nieżytu żołądkowo-jelitowego. Człowiek jest jedynym rezerwuarem pałeczek rzekomodurowych i człowiek – chory, ozdrowieniec lub nosiciel – stanowi źródło zakażenia. Przewód pokarmowy stanowi wrota zakażenia. Zachorowania na dury rzekome szerzą się głównie poprzez skażoną żywność. Duża liczba zakażeń bezobjawowych i duże rozproszenie zarazka powoduje, że zachorowania występują głównie wśród dzieci i młodzieży. Najbardziej rozprzestrzeniony jest dur rzekomy typu B i on dominuje w Europie. Zachorowania na dur rzekomy A występują najczęściej w południowo-wschodniej Azji, a na dur rzekomy typu C – na Bliskim Wschodzie. Dury rzekome, znacznie częściej niż dur brzuszny, mają przebieg kliniczny podobny do zatrucia pokarmowego. O rozpoznaniu czynnika etiologicznego decydują wyniki badań laboratoryjnych, przy czym największą wartość diagnostyczną mają badania bakteriologiczne krwi, kału i moczu. Testy serologiczne (odczyn Widala), mają raczej znaczenie pomocnicze [181], bowiem dla części przypadków przebiegających pod postacią nieżytu żołądkowo-jelitowego wypadają ujemnie lub dla duru rzekomego typu C mogą dawać

wyniki fałszywie dodatnie, ze względu na wspólne antygeny z pałeczką *Salmonella Choleraesuis*, częściej występującą na terenie Polski niż *Salmonella Paratyphi C*.

1.5. IZOLACJA I IDENTYFIKACJA BAKTERII *SALMONELLA*

Diagnostyka mikrobiologiczna stanowi podstawowy element w wykryciu czynnika etiologicznego zakażenia oraz wyborze właściwego leczenia. Podstawowymi metodami diagnostyki bakteriologicznej są: hodowla i izolacja drobnoustrojów, oznaczenie lekooporności oraz badania serologiczne i molekularne [21]. 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 [185, 391]. Wiarygodność wyniku mikrobiologicznego w dużej mierze zależy również od prawidłowego pobrania właściwego materiału przeznaczonego do badania i przesłanie go do laboratorium mikrobiologicznego [365]. Sposoby pobierania i przygotowywania materiału do transportu różnią się w zależności od planowanego sposobu przeprowadzenia badań mikrobiologicznych.

Materiał diagnostyczny przeznaczony do badań w kierunku obecności pałeczek *Salmonella* jest bardzo różnorodny. Najczęściej jest to kał (może być też wymaz z odbytu), krew, mocz, rzadziej żółć, wymiociny, sporadycznie ropa, szpik kostny lub płyn mózgowo-rdzeniowy. W dochodzeniach epidemiologicznych badana może być także żywność, produkty używane do sporządzania pokarmów, woda, ścieki, pasze, wydaliny zwierzęce, produkty pochodzenia zwierzęcego, czy tzw. próby środowiskowe mające związek z miejscem bytowania ludzi i zwierząt. W masowych badaniach na nosicielstwo pałeczek *Salmonella* przeprowadzanych u osób zdrowych, materiałem diagnostycznym jest oczywiście kał, który ma także istotne znaczenie w ostrych niezżytach żołądkowo-jelitowych (sporadyczne przypadki zakażeń lub ogniska zatruc pokarmowych – chorzy, ozdrowieńcy, nosiciele, osoby z kontaktu). Mniejsze znaczenie ma natomiast w rozpoznawaniu duru brzuszego i durów rzekomych. W tym przypadku najważniejszym materiałem do badania bakteriologicznego jest krew. Wykrycie pałeczek *Salmonella* we krwi decyduje o rozpoznaniu. W celu wykluczenia nosicielstwa pałeczek duru brzuszego, przy ujemnych wynikach badania kału – materiałem diagnostycznym jest żółć. Badanie moczu w przypadkach duru i durów rzekomych ma znaczenie rozpoznawcze. Pałeczki *Salmonella* pojawiają się w moczu od trzeciego tygodnia choroby. Ma ono znaczenie również przy wykrywaniu ich nosicielstwa.

W codziennej praktyce laboratoryjnej, nieznanne 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 O i H. Rozpoznanie serologiczne wyosobnionego szczepu polega na określeniu jego struktury antygenowej. O różnicach w wykrywalności pałeczek *Salmonella* decyduje wiele parametrów: rodzaj i wielkość badanej próbki, źródło jej pochodzenia, rodzaj i skład zastosowanych podłoży, czas i temperatura namnażania selektywnego, czy liczba kolonii pobranych do badania. A zatem wybór właściwej metody i odpowiednich podłoży decyduje o skuteczności wykrywania bakterii *Salmonella* [391]. Stosowane są płynne podłoża nieselektywne, płynne i półpłynne podłoża wybiórczo-namnażające, stałe podłoża wybiórczo-różnicujące oraz podłoża (tzw. szeregi biochemiczne) pozwalające na określenie cech biochemicznych izolowanych drobnoustrojów, czyli zdolności do metabolizowania różnych substancji lub wytwarzania określonych enzymów [55].

Wybiórczość używanych do badania podłoży polega na hamowaniu wzrostu drobnoustrojów Gram-dodatnich i znakomitej większości Gram-ujemnych pałeczek niechorobotwórczych przy intensywnym wzroście niektórych chorobotwórczych drobnoustrojów. W przypadku bakterii *Salmonella* zależy ona od wielu składników takich jak żółć bydłęca czy sole żółci (np. dezoksycholan sodu), barwniki anilinowe (np. zieleń brylantowa, zieleń malachitowa) czy też sole bizmutu. Z każdego podłoża izoluje się co najmniej po dwie kolonie uwzględniając kolonie podejrzane i wątpliwe. Wybrane kolonie poddaje się badaniom za pomocą testów biochemicznych. Właściwe odczytanie cech biochemicznych jest możliwe tylko w przypadku czystych hodowli bakteryjnych. Dalszemu diagnozowaniu poddaje się szczepy o cechach biochemicznych przedstawionych w tabeli 5. Każdy szczep, podejrzany o przynależność do rodzaju *Salmonella* na podstawie prezentowanych właściwości biochemicznych, potwierdza się serologicznie metodą aglutynacji szkiełkowej. 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*. Przedstawiony cykl postępowania diagnostycznego stanowi optymalną metodę szybkiego uzyskiwania wyników dla omawianego typu badań. Zaprezentowana metodyka, dzięki odpowiedniemu doborowi podłoży do namnażania i izolowania, uwzględnia na każdym etapie badań możliwość wyhodowania bakterii *Salmonella* z badanej próbki, jak również możliwość określenia cech mających znaczenie przy rozpoznawaniu tych drobnoustrojów. Część etapów diagnostyki bakteriologicznej, oczywiście poza koniecznością uzyskania czystej hodowli (najczęściej o określonym mianie), można zautomatyzować. Obecnie coraz więcej laboratoriów wprowadza automatyczne metody diagnostyki [284].

Tabela 5. Zespół cech biochemicznych odróżniających w postępowaniu diagnostycznym pałeczki z rodzaju *Salmonella* od innych przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* oraz cech umożliwiających identyfikację serowarów *S. Typhi* i *S. Paratyphi A* [35]

Table 5. Biochemical tests useful in differentiating *Salmonella* from other members of the family *Enterobacteriaceae* and identifying *Salmonella* serovars *Typhi* and *Paratyphi A* [35]

Test (podłoże, odczyn, substrat) <i>Test</i>	Reakcja ¹ / Reaction ¹		
	“niedurowe” pałeczki <i>Salmonella</i> subsp. I / <i>nontyphoidal Salmonella</i> subsp. I	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Paratyphi A</i>
TSI	K/Ag	K/A	K/Ag
H ₂ S (TSI)	+	+ słabo	- lub + słabo
Indol	-	-	-
Methyl Red (czerwień metylowa)	+	+	+
Voges-Proskauer (acetylo-metylo-karbinol)	-	-	-
Simmons	+	-	-
Mocznik	-	-	-
Lizyna	+	+	-
Arginina	+	d	(+)
Ornityna	+	-	+
Ruch	+	+	+
Mucynian	+	-	-
Malonian sodu	-	-	-
d-winian sodowo-potasowy	+	+	-
KCN	-	-	-
Glukoza	Ag	A	Ag
Laktoza	-	-	-
Sacharoza	-	-	-
Salicyna	-	-	-
Dulcytol	Ag	-	Ag ^{2 dni}
Inozytol	d	-	-
Sorbitol	Ag	A	Ag
ONPG	-	-	-
Galakturonian	-	-	-

¹ Wyniki reakcji odczytywane po inkubacji w temperaturze 37°C. K = alkalizacja części skośnej podłoża; A = kwas; g = gaz; + = 90% lub więcej reakcji dodatnich (1 – 2 dni); (+) = reakcja dodatnia po 3 dniach (lub później); - = 90% lub więcej reakcji ujemnych (do 7 dni); d = różne reakcje [+ , (+), -]; TSI = podłoże trójcukrowe z żelazem (agar TSI); H₂S = siarkowodór; KCN = cyjanek potasu; ONPG = *ortho*-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd (wykrywanie β-galaktocydazy). Biochemizm pałeczek *Salmonella enterica* z pozostałych podgatunków i *S. bongori* przedstawiono w tabeli 2

¹ Reactions after incubation at 37°C. K = alkaline slant; A = acid; g = gas; + = 90% or more positive within 1 or 2 days; (+) = positive reaction after 3 or more days; - = no reaction (90% or more) in 7 days; d = different reactions [+ , (+), -]; TSI = Triple Sugar Iron Agar; H₂S = hydrogen sulfide; KCN = potassium cyanide; ONPG = *ortho*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside for detection of β-galactoside activity. See table 2 for reactions of the other *Salmonella enterica* subspecies and *S. bongori*

Zarówno bezpośrednią identyfikację bakterii w badanym materiale, jak i pośrednią identyfikację w oparciu o czystą hodowlę, a także wykazywanie charakterystycznych

typów oporności na leki można prowadzić również metodami molekularnymi [4, 21, 286, 305]. Wybór metody molekularnej należy dostosować do problemu, który zamierzamy rozwiązać: wykrywanie, identyfikacja, różnicowanie, badania taksonomiczne [25, 212, 246, 247, 280, 379]. 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 pracy Krawczyk [212].

W diagnostyce zakażeń pałeczkami z rodzaju *Salmonella* zastosowanie praktyczne ma również określanie poziomu przeciwciał we krwi, czy w żółtkach jaj kurzych [23, 91, 181, 410]. W przypadku niektórych zakażeń *Salmonella* obecność swoistych przeciwciał dla antygenów czynnika etiologicznego może być wykazana równoległe z izolacją bakterii w metodach hodowlanych. Niekiedy jednak, badanie takie stanowi jedynie dostępną metodę diagnostyczną [67].

W typowaniu na potrzeby dochodzeń epidemiologicznych wykorzystuje się znaczne zróżnicowanie, zarówno fenotypowe, jak i genotypowe populacji drobnoustrojów w obrębie gatunku [93, 116, 169, 224, 333, 253]. Typowanie oparte na poszukiwaniu markerów pojawiających się fenotypowo polega na: określaniu biotypu, analizie lekooporności, typowaniu bakteriofagowym, typowaniu bakteriocynowym, serotypowaniu, elektroforetycznej ocenie profili białkowych uzupełnianych niekiedy techniką immunoblottingu czy elektroforetycznej analizie izoenzymów. Metody fenotypowe spełniają swoje zadanie, chociaż większość z nich obarczona jest cechą niepełnej stabilności klonalnej ekspresji markerów. Najlepiej oceniane są metody immunologiczne i elektroforetyczna analiza izoenzymów. Metody molekularne wykorzystujące genetyczną analizę kwasów nukleinowych (genotypowanie) sięgają po wiele technik [140], z których powszechne zastosowanie znalazły: analiza chromosomowego lub 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*”. Ze względu na ogromne możliwości jakie daje biologia molekularna, techniki te szybko się rozwijają i ulepszają. Obecnie za najlepsze dla potrzeb epidemiologii uważa się: technikę PFGE – elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym (*pulsed field gel electrophoresis*), rybotypowanie oraz sekwencjonowanie fragmentów DNA. Do celów dochodzeń epidemiologicznych stosowana jest również metoda z użyciem mikromacierzy DNA (*DNA microarrays*), pozwalająca na jednoczesną ekspresję wielu tysięcy genów [11, 298, 395, 396]. Sondy przydatne w tej dziedzinie już znajdują zastosowanie do badania wewnątrzgatunkowego polimorfizmu genów niektórych gatunków bakterii. Dla poszczególnych drobnoustrojów metody wykorzystywane do dochodzeń epidemiologicznych mogą wykazywać różną

skuteczność i dlatego zazwyczaj rekomendowane są techniki i metody wypróbowane dla określonego rodzaju czy gatunku. Metody najczęściej stosowane do identyfikacji bakterii z rodzaju *Salmonella* oraz dla celów epidemiologii przedstawiono w tabeli 6, z uwzględnieniem ich pozytywnych i negatywnych aspektów w diagnostyce *Salmonella*. Jednak 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.

Tabela 6. Metody najczęściej stosowane do typowania bakterii z rodzaju *Salmonella* [69, 93]
 Table 6. Common *Salmonella* typing methods [69, 93]

Technika <i>Technique</i>	Krótki charakterystyka <i>Brief description</i>	Zalety <i>Advantages</i>	Wady <i>Disadvantages</i>
Fenotypowa (Phenotypic)			
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 badania obecności pałeczek <i>Salmonella</i> , jak i do serotypowania	Oparta na markerach, które można wybrać (<i>selectable markers</i>) 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 przydatne, biologicznie użyteczne dane epidemiologiczne	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 (Genotypic)			
Losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA (RAPD ¹)	Amplifikacja z wykorzystaniem losowych starterów	Łatwa do wykonania. Użyteczna do badania ognisk	Międzylaboratoryjne wyniki badań nie są porównywalne

Technika <i>Technique</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>	Zalety <i>Advantages</i>	Wady <i>Disadvantages</i>
Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR ²) dla wybranych genów lub wysp	PCR dla genów lekooporności, czynników patogenności lub markerów metabolicznych	Bezpośrednie zastosowanie 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 genowego 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 zamplikowanych 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 wyłącznie próbki stanowiące małe frakcje genomu wyznaczone 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> . Próby standaryzacji metody do typowania <i>E. coli</i>	Wymaga zdefiniowania dla każdego obecnie znanego serowaru, może nie różnicować tak dobrze jak PFGE

Technika <i>Technique</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>	Zalety <i>Advantages</i>	Wady <i>Disadvantages</i>
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	Różnicowanie 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 (Sequence-based)			
Sekwencjonowanie określonych fragmentów kilku wybranych genów odznaczających się pewnym stopniem polimorfizmu (MLST ¹⁰)	Porównanie sekwencji 7 genów kodujących enzymy metabolicznego 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. Wykazywanie obecności określonych genów w badanych fragmentach DNA	Obecność (lub brak) określonych genów może być wykazywana dla całych genomów kilku izolatów. Doskonala do określania genetycznego zróżnicowania	Bardzo kosztowna. Wykrycie mutacji punktowych trudne. Może wykrywać jedynie cechy reprezentowane na płytkach, nie może rozpoznawać nowo pojawiających się insercji

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

1.5.1. Typowanie serologiczne

Typowanie serologiczne (serotypowanie) jest ważnym etapem postępowania diagnostycznego. Identyfikacja wszystkich odmian serologicznych pałeczek z rodzaju *Salmonella* odbywa się na drodze serologicznej. W celu oznaczenia grupy serologicznej można się posłużyć testem lateksowym. Umożliwia on wykrycie i identyfikację grupowych antygenów pałeczek *Salmonella* w pierwotnych hodowlach bakteryjnych na podłożu seleninowo-fosforanowym już w ciągu jednej doby od dostarczenia materiału diagnostycznego. Postępowanie służące pełnej identyfikacji serowarów z użyciem zestawów surowic diagnostycznych zawierających przeciwciała dla antygenów somatycznych i rzęskowych jest wyznaczane przez schemat White'a-Kauffmanna-Le Minora. Badanie serologiczne wykonuje się z 24-godzinnej hodowli na podłożu agarowym, metodą aglutynacji szkiełkowej. Jest to szybki test, który znalazł powszechne zastosowanie do identyfikacji nieznanymi antygenów, przy użyciu swoistych surowic odpornościowych. Jest powszechnie wykorzystywany w bakteriologii do serologicznego typowania szczepów bakteryjnych. W przypadku niektórych bakterii stanowi wręcz końcowy etap ich identyfikacji. Badanie rozpoczyna się od wykluczenia szczepów szorstkich „R”, tzn. szczepów wykazujących zdolność do autoaglutynacji (aglutynacja z 0,85% lub 3% roztworem NaCl). Właściwe badanie serologiczne, prowadzone w oparciu o schemat diagnostyczny White'a-Kauffmanna-Le Minora, polega na przeprowadzeniu aglutynacji z odpowiednimi surowicami służącymi do identyfikacji antygenów pałeczek z rodzaju *Salmonella*. Ponad 90% wykrywanych szczepów *Salmonella* należy do grup O:4 (B), O:7 (C₁), O:8 (C₂ – C₃), O:9 (D₁), O:3,10 (E₁) i O:1,3,19 (E₄). Po ustaleniu przynależności grupowej szczepu, wykonuje się dalsze badania serologiczne, polegające na określeniu antygenów rzęskowych badanego drobnoustroju. Dla rozpoznania drobnoustrojów o dwufazowym antygenie rzęskowym, konieczne jest wykazanie obecności obu faz. Zdarza się, nieodwracalna utrata jednej z faz przez niektóre szczepy *Salmonella* – są one wtedy określane jako warianty jednofazowe. Zwykle w hodowli występują jednocześnie komórki bakteryjne w fazie 1 i 2. Zdarza się jednak, że bakterie, które prezentują serowary dwufazowe, wytwarzają antygeny tylko jednej z faz – pierwszej lub drugiej. Praktycznie zjawisko to może dotyczyć wszystkich dwufazowych serowarów. Najprostszym sposobem określenia brakującej fazy, jest badanie pojedynczych kolonii. Można także indukować brakującą fazę antygeny rzęskowego przez zahamowanie fazy dominującej. Indukcję przeprowadza się, hodując szczep jednofazowy na płytce z podłożem agarowym, które zawiera domieszkę surowicy skierowanej przeciwko fazie dominującej. Czasami oznaczenie dokładnego składu antygenowego pałeczek *Salmonella* jest niewystarczające do ich zidentyfikowania. Zachodzi potrzeba dodatkowego różnicowania biochemicznego szczepów prezentujących taki sam wzór antygenowy. Na przykład w grupie O:7, sytuacja taka dotyczy szczepów *S. Paratyphi C* (Vi-ujemnych), *S. Choleraesuis* i *S. Typhisuis*. Dodatkowe różnicowanie biochemiczne wymagane jest również w przypadku ko-

nieczności 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 różnych serowarów w obrębie danej grupy serologicznej) nie definiuje jednoznacznie ich statusu taksonomicznego.

1.5.2. Typowanie bakteriofagowe

Niebezpieczeństwo wynikające ze zwiększonej inwazyjności niektórych serowarów *Salmonella* stało się problemem na skalę światową – przykładem może być *Salmonella* Enteritidis. Notuje się także gwałtowny wzrost zatruc pokarmowych spowodowanych innymi serotypami z rodzaju *Salmonella*, które dawniej izolowano sporadycznie. W związku z zaistniałą sytuacją, metody bardziej szczegółowego różnicowania szczepów *Salmonella*, do których zaliczana jest również metoda typowania bakteriofagowego, okazały się niezwykle przydatne dla celów praktycznych [220]. Typowanie bakteriofagowe umożliwia przeprowadzenie wnikliwych obserwacji nad ustaleniem związku pomiędzy źródłem zakażenia i przypadkiem chorobowym oraz podjęcie skutecznych środków w zwalczaniu źródeł i dróg szerzenia się zakażeń. Celowość typowania bakteriofagowego w dochodzeniach epidemiologicznych i epizootologicznych uzasadnia również fakt możliwości śledzenia zwiększania się liczby typów bakteriofagowych oraz obserwacji zmian w występowaniu tych typów na danym obszarze geograficznym. Zastosowanie jedynie metod serologicznych do wykrywania i identyfikacji pałeczek *Salmonella* nie jest wystarczające do uzyskania pełnej orientacji epidemiologicznej. Najlepsze wyniki w rozpoznawaniu zarazka uzyskujemy stosując metody kompleksowe [217]. Choć różnie nowe metody typowania molekularnego szczepów (*ribotyping*, *IS200 typing*, *plasmid and microrestriction analysis*) wydają się być przydatne w badaniach epidemiologicznych, ciągle jeszcze szczególne usługi epidemiologii oddaje lizotypia [211, 222, 281, 370, 380, 393]. 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. Powtarzalność wyników typowania fagowego przy użyciu specjalnie opracowanych schematów została potwierdzona zarówno przez uzyskiwanie jednakowych wyników przy wielokrotnym typowaniu tych samych szczepów, jak i przez określanie jednego typu fagowego dla szczepów pochodzących z jednego ogniska epidemicznego. Typowanie bakteriofagowe według określonych schematów może więc być nadal polecane jako standardowa, szybka i tania metoda do prowadzenia badań epidemiologicznych zakażeń wywołanych przez pałeczki *Salmonella*. Różne zestawy fagów wykorzystywane są do typowania różnych serowarów. Typowanie bakteriofagowe *Salmonella* głównie przeprowadzane jest z zastosowaniem zestawów fagów, które są bardziej lub mniej specyficzne dla serowaru, do którego należą typowane izolaty. Bakteriofagi wykorzystano po raz pierwszy do subty-

powania bakterii *Salmonella* w latach trzydziestych ubiegłego wieku. Metoda typowania bakteriofagowego i pierwszy schemat typowania bazujący na fagach Vi (*Vi-phage typing system*) został opracowany przez Craigie i Yen'a dla szczepów *S. Typhi* posiadających antygen Vi [7]. Stał się on inspiracją dla Felix'a i Callow do opracowania kolejnego schematu typowania bakteriofagowego, tym razem dla pałeczek *S. Paratyphi B*. Oba schematy odegrały zasadniczą rolę w identyfikacji stałych nosicieli pałeczek *S. Typhi* i *S. Paratyphi B* oraz skażonych produktów spożywczych. Badania prowadzone w latach 40 i 50 ubiegłego stulecia zaowocowały następnym schematem typowania bakteriofagowego. Dotyczył on różnicowania szczepów *S. Typhimurium* i początkowo umożliwił wyróżnienie 80 różnych typów fagowych. Obecnie stosowany, rozszerzony zestaw składający się z 34 fagów pozwala określić aż 207 różnych typów bakteriofagowych (DTs) (*definitive phage types*) w obrębie serowaru *S. Typhimurium*. Opracowano również kilka schematów typowania fagowego pałeczek *S. Enteritidis*, spośród których najbardziej popularnym stał się schemat zaproponowany przez Ward i współpracowników [393]. Pozwalał na określenie 27 typów fagowych przy pomocy zestawu 10 fagów. Stosowany obecnie, rozszerzony schemat Ward i wsp., obejmuje 16 fagów typujących i umożliwia rozpoznanie 77 różnych typów fagowych. Inni autorzy komunikowali również o sukcesach w opracowywaniu kolejnych zestawów preparatów fagowych i schematów typowania dla innych serowarów *Salmonella*, głównie lokalnie stosowanych we własnych laboratoriach. Większość z nich bazuje na fagach wirulentnych. Bardziej szczegółowe dane zarówno techniczne, jak i historyczne dotyczące ich powstawania przedstawiono w publikacji Guinée i van Leeuwen [153]. Umożliwiają one subtypowanie 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. Potsdam*, *S. Thompson*, *S. Virchow*, *S. Waycross* i *S. Weltevreden* [153, 185]. Celowość stosowania metody typowania bakteriofagowego została powszechnie uznana, czego wyrazem było powołanie ośrodków międzynarodowych i krajowych, których zadaniem jest czuwanie nad prawidłowością rozpoznań, porównywalnością wyników i dalsza praca badawcza nad doskonaleniem tej metody. Standardowa technika typowania bakteriofagowego zaproponowana przez Craigie i Felix'a w 1947 roku [73] została zatwierdzona przez Międzynarodowy Komitet Typowania Bakteriofagowego Drobnoustrojów Jelitowych, utworzony przez Międzynarodowe Towarzystwo Mikrobiologów i jest stosowana do dziś we wszystkich ośrodkach typowania bakteriofagowego. Wszystkie szczegóły związane z typowaniem bakteriofagowym, dotyczące podłoża, warunków wzrostu, namnażania i sprawdzania fagów, metod typowania, odczytywania i zapisywania wyników, zostały szczegółowo opisane przez Andersona i Williama [6]. Metoda typowania bakteriofagowego opisywana jest również przez wielu autorów w różnych przeglądowych opracowaniach dotyczących fagotypowania bakterii *Salmonella* [56, 153, 213, 317]. Obecnie do schematów o zasięgu międzynarodowym,

powszechnie stosowanych w ośrodkach referencyjnych na świecie, należą schematy typowania fagowego *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* (również *S. Paratyphi B* biowar Java), *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* [185]. Wiele schematów typowania fagowego (w tym dla *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*) oraz związanych z nim technik opracowano w Central Public Health Laboratory w Colindale (Londyn, Wielka Brytania). Ten współpracujący ze Światową Organizacją Zdrowia ośrodek jest międzynarodowym, referencyjnym laboratorium typowania fagowego bakterii *Salmonella* [213]. 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.

1.6. ZAPOBIEGANIE, ZWALCZANIE I KONTROLA ZAKAŻEŃ SPOWODOWANYCH BAKTERIAMI *SALMONELLA*

Zwalczanie salmoneloz jest zadaniem trudnym i wymaga likwidacji wszystkich czynników sprzyjających rozprzestrzenianiu się tych zakażeń. Ogólne zasady zapobiegania i kontroli bakteryjnych zatruc pokarmowych mają zastosowanie także w odniesieniu do salmoneloz. Przed salmonelozą chroni przede wszystkim odpowiednia higiena sanitarna i immunizacja zwierząt domowych przeznaczonych do spożycia przez ludzi [15, 16, 276]. Dzisiejszy poziom nauki, techniki i technologii pozwala na uzyskanie żywności wolnej od skażenia pałeczkami *Salmonella*. Są one wrażliwe na wiele czynników fizyko-chemicznych, które umiejętnie wykorzystane, gwarantują pełną eliminację tych drobnoustrojów z żywności. Właściwa obróbka termiczna produktów i mięsa, w tym szczególnie drobiowego, jest ważnym czynnikiem zmniejszającym ryzyko zakażenia. Stosunkowo nową metodą jest radiacyjne utrwalanie żywności. Polega ona na traktowaniu żywności promieniowaniem jonizującym. Jej zaletą jest zapobieganie zatruciom pokarmowym, poprzez niszczenie szkodliwych bakterii, np. takich jak *Salmonella*, w niektórych produktach spożywczych, np. mięsie drobiowym, jajach, czy serach wytworzonych z niepasteryzowanego mleka lub innych produktach przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji. Kodeks żywnościowy FAO/WHO podaje, iż utrwalaniu radiacyjnemu mogą być poddawane między innymi kurczaki, w celu przedłużenia okresu przechowywania i/lub zredukowania liczby bakterii patogennych, takich jak *Salmonella*. W Unii Europejskiej radiacyjne utrwalanie żywności jest dozwolone w Belgii, Francji, Włoszech, Holandii i Wielkiej Brytanii. Dotyczy tylko niektórych produktów, wśród nich mięsa kurczaków, drobiu (kaczki, gęsi, indyki, perliczki, przepiórki), podrobów drobiowych, czy białka jaj. W Polsce, zgodnie z obowiązującą Ustawą z dnia 11 maja 2001 roku o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia [101], napromieniowanie jest dozwolone, jeżeli nie powoduje żadnych zagrożeń zdrowotnych i jest korzystne dla

konsumenta. Nie może jednak zastępować podstawowych wymagań sanitarno-higienicznych zawartych w funkcjonujących systemach zapewniania jakości.

Niezwykła intensywność i dynamizm rozwoju populacji ludzkiej stworzyły konieczność wytwarzania coraz większej ilości żywności. Zmieniły się więc metody hodowli zwierząt. W warunkach obecnej hodowli pojawienie się pojedynczych zakażeń *Salmonella* w stadzie, może w konsekwencji doprowadzić do wybuchu epidemii. Dlatego w nowoczesnej hodowli o powodzeniu decyduje profilaktyka zakażeń, często za pomocą środków dezynfekcyjnych, a także swoistych surowic oraz szczepionek [24, 137, 401], a nawet eliminacji patogenów poprzez wprowadzanie konkurencyjnej mikroflory. Naturalną metodą ochrony drobiu przed zakażeniem jest zjawisko kompetencyjnego wykluczania (*competitive exclusion*) drobnoustrojów [258, 346, 373]. Stosowanie tzw. preparatów zasiedlających, stanowiących fizjologiczną florę bakteryjną jelit ptaków, ma na celu zapobieganie kolonizacji przewodu pokarmowego przez przypadkową mikroflorę, w tym pałeczki *Salmonella*. Należy unikać stosowania antybiotyków w celach profilaktycznych oraz do przyspieszenia wzrostu drobiu i bydła, ponieważ powodują pojawianie się coraz większej ilości szczepów opornych [68, 69]. Szczególny problem stanowią obecnie wielooporne szczepy *S. Typhimurium* DT104. Bardzo niepokojące wiadomości dotyczące zjawiska lekooporności pałeczek *Salmonella* napływają niemal z całego świata. Lekooporne pałeczki *Salmonella* izolowane są zarówno od ludzi, jak i zwierząt. Zakażenia *Salmonella*, które występują na farmach zwierzęcych, są badane przez odpowiednie służby oraz podlegają zgłoszeniu nadzorowi weterynaryjnemu.

W Polsce stada hodowlane i rzeźne drobiu oraz stada towarowe są monitorowane w kierunku gatunkowo specyficznych i niespecyficznych pałeczek *Salmonella* od lipca 1999 roku. Stosownie do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady, wszystkie kraje członkowskie, zgodnie z nowymi wymaganiami dotyczącymi salmoneloz, miały obowiązek zatwierdzić nowe narodowe programy dotyczące stad hodowlanych i stad kur niosek. Programy te dostosowują dotychczasowe metody monitoringu i zwalczania bakterii *Salmonella* do aktualnych wymogów. Komisja Europejska zatwierdziła programy przedstawione przez 26 państw, w tym również polski program. Zadaniem krajowych programów jest osiągnięcie odpowiedniego celu wspólnotowego – ograniczenie występowania niektórych serowarów *Salmonella* w stadach hodowlanych i w stadach niosek gatunku kura (*Gallus gallus*). Rozporządzenie Komisji Europejskiej wyznaczyło cel wspólnotowy w odniesieniu do serowarów *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* i *S. Virchow* dla stad hodowlanych, liczących przynajmniej 250 ptaków oraz serowarów *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* dla stad kur niosek. W Polsce, cel wspólnotowy zostanie osiągnięty w odniesieniu do stad hodowlanych gatunku *Gallus gallus* w przypadku ograniczenia na terytorium naszego kraju maksymalnej wartości procentowej dorosłych stad z dodatnim wynikiem badań do 1% lub mniej [103]. Dla stad kur niosek – gdy w każdym roku realizacji programu liczba stad dorosłych niosek towarowych z

wynikiem dodatnim będzie się zmniejszać co najmniej o 40%, albo gdy docelowo odsetek stad z dodatnim wynikiem badań zostanie zredukowany do nie więcej niż 2% [104].

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, *European Food Safety Authority*,) czuwa nad wszystkimi sprawami mającymi bezpośredni lub pośredni związek z bezpieczeństwem żywności, łącznie z ochroną zdrowia i warunków życia zwierząt i roślin. Gromadzi i analizuje dane naukowe, identyfikuje pojawiające się zagrożenia, udziela naukowego wsparcia Komisji Europejskiej. Nadzoruje również prawidłowość funkcjonowania systemu monitorowania i zwalczania salmoneloz w stadach kur *Gallus gallus* w ramach krajowych programów [110, 111]. Oceny ryzyka dokonywane przez EFSA umożliwiają opracowywanie środków prawnych lub wykonawczych, koniecznych do zapewnienia wysokiego poziomu ochrony konsumenta w kontekście bezpieczeństwa żywności.

Nowoczesny przemysł spożywczy nastawiony jest na wytwarzanie przetworów żywnościowych w dużych ilościach i o długim okresie trwałości. A zatem proces produkcji wymaga szczególnej czystości mikrobiologicznej maszyn, urządzeń, pojemników i pomieszczeń, uzyskiwanej za pomocą dezynfekcji. Podobne wymagania ma transport surowców i przetworów w dużych pojemnikach na znaczne odległości oraz długoterminowe magazynowanie żywności. Produkcji bezpiecznej żywności w Polsce służy wdrażany od 2004 roku [101, 102] specjalny system analizy zagrożeń i krytycznych punktów kontroli – zwany systemem HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*). To rekomendowany przez Światową Organizację Zdrowia najtańszy, najprostszy i najefektywniejszy sposób gwarantowania bezpieczeństwa żywności, który ma na celu zapewnienie czystości higienicznej produktów spożywczych przeznaczonych dla konsumentów. Jest systemowym postępowaniem zapobiegającym chorobom w ogóle; kluczową rolę odgrywa również we wszystkich programach zwalczania salmonelozy. Jego zastosowanie umożliwia dokładne określenie procesów produkcyjnych, mających na celu zwalczanie bakterii *Salmonella* na każdym etapie wytwarzania żywności, począwszy od gospodarstwa rolnego aż do stołu konsumenta.

Żywnienie zbiorowe natomiast wymaga nie tylko wysokiego poziomu higieny, ale skutecznej sanityzacji, dezynfekcji urządzeń oraz pomieszczeń. Ważne jest również mycie i sterylizacja naczyń kuchennych i stołowych.

Zagrożenie epidemiczne stwarza również koncentracja lecznictwa w wielkich zespołach ambulatoryjnych i szpitalnych, któremu przeciwstawić się może tylko codzienna, staranna dezynfekcja. Ostatnio zwraca uwagę jatrogenny sposób zakażeń bakteriami *Salmonella* poprzez cewniki, endoskopy, respiratory i inny sprzęt medyczny czy poprzez pieluszki, obok uznanej od dawna roli, jaką odgrywają ręce personelu szpitalnego [100].

W zwalczaniu duru brzuszego i jego zapobieganiu konieczne jest zlokalizowanie i unieszkodliwienie źródła zakażenia, przecięcie dróg szerzenia się infekcji oraz czynne uodpornianie poprzez szczepienie. Istotnym jest również właściwe postępowanie podczas epidemii, przy czym czynności przeciwepidemiczne są takie same jak przy opraco-

wywaniu małych ognisk, inny jest tylko zakres dochodzenia epidemiologicznego [31]. Obecnie w Polsce nie prowadzi się powszechnych szczepień przeciwko durowi brzuszemu. Wraca się do nich w przypadku zagrożenia wybuchem epidemii. Znaczenie dla zapobiegania ma właściwe przestrzeganie higieny osobistej, prawidłowe zaopatrzenie w wodę, właściwie przeprowadzana utylizacja śmieci i nieczystości. Zapobieganiu i zwalczaniu służy kontrola warunków pracy w przemyśle spożywczym i gastronomii. Istotnym jest leczenie i kontrola nosicieli duru brzuszego, dezynfekcja bieżąca i końcowa wydaliny chorego, pomieszczeń i przedmiotów, z którymi stykał się chory, badanie ozdrowieńców na nosicielstwo [16]. Poszukuje się także skutecznej szczepionki. Szczepionka zawierająca zabite pałeczki *S. Typhi* jest używana od wielu lat, ale jej skuteczność jest dyskusyjna [188]. Zarejestrowana jest także szczepionka zawierająca atenuowany szczep *S. Typhi* – Ty21a. Stopień ochrony otrzymany po szczepieniu Ty21a jest różny [385]. Ciągłe opracowywane są nowe szczepionki, które wydają się być coraz bardziej skuteczne, bazujące między innymi na oczyszczonym polisacharydzie Vi [18], a także na genetycznie zdefiniowanych szczepach *S. Typhi* atenuowanych poprzez różne pojedyncze lub wielokrotne, nieodwracalne mutacje w wybranych genach wirulencji – między innymi mutacje (trwałe delecje atenuujące) w zakresie genów *aro* (*aroA*, *aroC*, *aroD*) odpowiedzialnych za biosyntezę aromatycznych aminokwasów [200].

Działania mające na celu zapobieganie durom rzekomym i ich zwalczanie są podobne jak w przypadku duru brzuszego, z wyjątkiem szczepień ochronnych [142]. Istniejące bowiem szczepionki są mało skuteczne i dają duże odczyny poszczepienne (stosowane są w nielicznych krajach).

Najskuteczniejsza jest jednak edukacja potencjalnych pacjentów dostosowana do różnych grup społecznych i wiekowych, która powinna zmierzać do eliminacji często spotykanych, niekorzystnych zachowań, prowadzących do zakażenia. Opisane przez Cianciarę i wsp. [61] zróżnicowania zachowań higienicznych Polaków, wskazują na istnienie grup społecznych wymagających szczególnego wsparcia w podnoszeniu stanu higienicznego i kultury zdrowotnej. Oświata zdrowotna, dotycząca zasad higieny osobistej i sposobów zapobiegania zakażeniom jelitowym oraz ciągle monitorowanie występowania pałeczek *Salmonella* na wszystkich szczeblach kontroli stanowi najlepszy sposób prewencji.

1.7. SEROWARY *SALMONELLA* WYSTĘPUJĄCE W POLSCE W LATACH 1946 – 1994

Salmonelozę stanowią nadal ogromny problem, z jakim borykają się wszystkie państwa na świecie. Polska nie jest krajem odosobnionym. Dane przedstawiające sytuację epidemiologiczną związaną z występowaniem pałeczek *Salmonella* u ludzi w Polsce opracowywał do roku 1978 Krajowy Ośrodek *Salmonella*, oficjalnie powołany do dzia-

łania na terenie naszego kraju przez Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej w 1957 roku (faktycznie działający już od 1946 roku) i zarejestrowany przez Światową Organizację Zdrowia. Następnie zobowiązania te, z ramienia Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej, przejął Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w ramach urzędowego nadzoru epidemiologicznego nad zachorowaniami na choroby zakaźne. Dane epidemiologiczne po opracowaniu są publikowane w dwutygodniowych, kwartalnych, półrocznych i rocznych edycjach „Meldunków o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach w Polsce” oraz w zbiorowych opracowaniach ukazujących się w formie biuletynów rocznych „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce”.

W latach 1946 – 1956 potwierdzono bakteriologicznie salmonelowe zakażenia pojedynczymi typami serologicznymi u ponad 13 500 osób [42, 43, 44]. W ciągu kolejnych 10 lat (1957 – 1966) liczba ta wzrosła ponad czterokrotnie do 52 461 osób [306]. W okresie od 1967 do 1978 roku rozpoznano u ludzi w Polsce 165 198 przypadków zakażeń pałeczkami *Salmonella*, w tym 416 przypadków infekcji mieszanych, spowodowanych dwoma, trzema, a nawet czterema serowarami [84]. Tak znaczny wzrost liczby zakażeń w porównaniu z minionym dziesięcioleciem tylko częściowo można by wytłumaczyć lepszą wykrywalnością tych drobnoustrojów niż w latach poprzednich. W 1978 roku potwierdzono bakteriologicznie zakażenia *Salmonella* u 19 229 osób, co stanowiło największą liczbę zakażeń zarejestrowanych od 1946 roku. Znaczną liczbę infekcji spowodowanych pałeczkami *Salmonella* zanotowano również w 1969 roku. Zakażeniu uległo 17 014 osób.

Do chwili obecnej opisano 2 579 serowarów *Salmonella* [149] potencjalnie chorobotwórczych zarówno dla ludzi, jak i zwierząt. Niemal we wszystkich państwach, w tym również w Polsce, obserwuje się występowanie istotnych i szybko zachodzących zmian w strukturze populacji niektórych serowarów. Epidemiczne serowary *Salmonella* różnią się w poszczególnych krajach. Z biegiem lat zmienia się również ich dystrybucja w każdym kraju. W Polsce w latach 1946 – 1956 wyizolowano od ludzi chorych i zdrowych łącznie 30 serowarów *Salmonella* (19 od osób chorych i 29 od zdrowych), poza pałeczkami duru brzuszego i durów rzekomych [42, 43]. Za osoby chore uznawano osoby z objawami ze strony przewodu pokarmowego, od których wyhodowano pałeczki *Salmonella* z kału, rzadziej z moczu, żółci lub wymiocin, z krwi, szpiku kostnego, płynu mózgowo-rdzeniowego, płynów wysiękowych czy ognisk ropnych, jak również osoby, które chorowały w bakteriologicznie potwierdzonych ogniskach zatruc pokarmowych o etiologii salmonelowej. Za osoby zdrowe uznawano natomiast te, które w okresie pobierania prób do badania nie wykazywały objawów chorobowych wzbudzających podejrzenie o zakażenie pałeczkami *Salmonella*. Na pierwszym miejscu, wśród serowarów dominujących u ludzi w naszym kraju znalazły się pałeczki *S. Typhimurium* (tab. 7). U prawie 9 800 osób potwierdzono bakteriologicznie zakażenie spowodowane tym serowarem, co stanowiło ponad 72% wszystkich przypadków zakażeń *Salmonella* w tym okresie.

Kolejne miejsca na liście najczęściej izolowanych serowarów *Salmonella* zajmowały odpowiednio *S. Enteritidis* (12,9%), *S. Heidelberg*, *S. Bovismorbificans*, *S. Dublin*, *S. Derby*, *S. Choleraesuis* (war. kunzendorf), *S. Brandenburg* i *S. Newport*. Wśród pozostałych [43] rejestrowano między innymi *S. Anatum*, *S. Butantan*, *S. Choleraesuis* (wariant dwufazowy), *S. Cubana*, *S. Haifa*, *S. London*, *S. Meleagridis*, *S. Saarbruecken*, *S. Saintapaul*, *S. Senftenberg* oraz nie figurujący już dzisiaj w schemacie, a występujący dawniej serowar *S. abortusbovis*, obecnie połączony z *S. Abony*. Poza wyżej wspomnianymi serowarami, szczególnie miejsce w tym powojennym okresie czasu zajmowały pałeczki *S. Typhi* oraz *S. Paratyphi* A, B i C. Dane dotyczące zakażeń tymi serowarami prezentowane były zwykle w oddzielnych opracowaniach.

Tabela 7. Serowary *Salmonella* izolowane od ludzi chorych i zdrowych w Polsce w latach 1946 – 1956 [42, 43]

Table 7. *Salmonella* serovars isolated from ill and healthy persons, Poland, 1946 – 1956 [42, 43]

Serowar <i>Serovar</i>	Liczba osób, u których wykryto zakażenie <i>Number of infected persons</i>			Ogółem <i>Total</i>
	chorzy / <i>ill</i>	zdrowi / <i>healthy</i>	nieznany stan zdrowia <i>unknown health status</i>	
<i>S. Typhimurium</i>	8739	913	121	9773
<i>S. Enteritidis</i>	1488	234	21	1743
<i>S. Heidelberg</i>	333	168	10	511
<i>S. Bovismorbificans</i>	270	143	26	439
<i>S. Dublin</i>	386	23	9	418
<i>S. Derby</i>	98	125	3	226
<i>S. Choleraesuis</i> (war. kunzendorf)	172	–	2	174
<i>S. Brandenburg</i>	41	29	9	79
<i>S. Newport</i>	20	11	–	31
Pozostałe / <i>Others</i>	37	96	8	141
Ogółem / <i>Total</i>	11584	1742	209	13535

Jak kształtowały się zachorowania i zapadalność na dur brzuszny i dury rzekome A, B i C w Polsce w latach 1947 – 1961 przedstawiono w tabeli 8. Do roku 1950 włącznie przypadki zachorowań z powodu zakażenia pałeczkami *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B i C rejestrowano łącznie.

W ciągu kolejnych 10 lat (1957 – 1966) wyizolowano już 56 różnych serowarów, przy czym 31 spośród nich oznaczono wśród objawowych przypadków zakażeń, a 55 – dotyczyło przypadków bezobjawowych [306]. Nastąpiła również zmiana w dystrybucji serowarów najczęściej izolowanych z materiałów pochodzących od ludzi (tab. 9). Pałeczki *S. Enteritidis* znalazły się na pierwszym miejscu przed *S. Typhimurium*, do czego przyczyniła się rosnąca od 1962 roku liczba zakażeń spowodowanych tym patogenem.

Występujący sporadycznie w latach poprzednich serowar *S. Anatum* był przyczyną prawie 5 300 przypadków bakteriologicznie potwierdzonych zakażeń u ludzi, łącznie z war. 15+, stanowiącym dawniej odrębny serowar *S. newington*. Znakomitą większość stanowiły przypadki bezobjawowe. Przyczyną znacznej liczby zakażeń były również pałeczki *S. Give* i *S. Bovismorbificans*. Po raz pierwszy w tym okresie izolowano pałeczki *S. Kottbus*, *S. Muenster* war. 15+ (dawniej *S. newhaw*) i *S. Saintapaul*. Inne serowary izolowano sporadycznie. Pewna część spośród nich wystąpiła w Polsce po raz pierwszy.

Tabela 8. Liczba zachorowań i zapadalność (na 100 tys.) na dur brzuszny i dury rzekome A, B, C, Polska, 1947 – 1961¹ [216]

Table 8. Typhoid fever and paratyphoid fevers A, B, C – number of cases and morbidity rate per 100,000 population, Poland, 1947 – 1961¹ [216]

Rok <i>Year</i>	Dur brzuszny <i>Typhoid fever</i>		Dury rzekome A, B, C <i>Paratyphoid fevers A, B, C</i>	
	Liczba zachorowań <i>Number of cases</i>	Zapadal. na 100 tys. <i>Morb. rate per 100,000</i>	Liczba zachorowań <i>Number of cases</i>	Zapadal. na 100 tys. <i>Morb. rate per 100,000</i>
1947	11748	49,3		
1948	7975	33,5		
1949	6191	25,6		
1950	7215	29,1		
1951	5984	23,9	373	1,48
1952	5317	20,8	558	2,18
1953	6174	23,7	1151	4,41
1954	5541	20,5	790	2,99
1955	6201	22,6	921	3,3
1956	4797	17,0	619	2,2
1957	5717	18,3	713	2,5
1958	4633	16,0	750	2,6
1959	4254	14,5	448	1,5
1960	3464	11,7	422	1,4
1961	2904	9,4	400	1,3

¹ W latach 1947 – 1950 przypadki zachorowań na dur brzuszny i dury rzekome rejestrowano łącznie

¹ *In 1947 – 1950 typhoid and paratyphoid fever cases were notified together*

Tabela 9. Serowary *Salmonella* izolowane od ludzi chorych i zdrowych w Polsce w latach 1957 – 1966 [306]Table 9. *Salmonella* serovars isolated from ill and healthy persons, Poland, 1957 – 1966 [306]

Serowar <i>Serovar</i>	Liczba osób, u których wykryto zakażenie <i>Number of infected persons</i>			Ogółem <i>Total</i>
	chorzy <i>ill</i>	zdrowi <i>healthy</i>	nieznany stan zdrowia <i>unknown health status</i>	
<i>S. Enteritidis</i>	20777	2468	205	23450
<i>S. Typhimurium</i>	10241	5253	136	15630
<i>S. Anatum</i>	231	2541	11	2783
<i>S. Anatum</i> var. 15+ (*)	251	2233	30	2514
<i>S. Give</i>	156	2182	22	2360
<i>S. Bovismorbificans</i>	571	789	11	1371
<i>S. Brandenburg</i>	181	778	9	968
<i>S. Heidelberg</i>	238	450	10	698
<i>S. Dublin</i>	433	114	8	555
<i>S. Derby</i>	53	457	4	514
<i>S. Kottbus</i>	55	356	9	420
<i>S. Choleraesuis</i>	269	47	11	327
<i>S. Muenster</i> var. 15+ (**)	38	105	2	145
<i>S. Saintpaul</i>	24	80	2	106
Pozostałe / <i>Others</i>	122	486	12	620
Ogółem / <i>Total</i>	33640	18339	482	52461

(*) dawniej *S. newington* / formerly *S. newington*(**) dawniej *S. newhaw* / formerly *S. newhaw*

Niemal dwukrotnie wzrosła liczba serowarów (102 serowary) wyizolowanych od ludzi w latach 1967 – 1978 w porównaniu z poprzednim okresem czasu [84]. Sześćdziesiąt serowarów wyizolowano od chorych, 80 zaś od osób zdrowych. Pałeczki *S. Enteritidis* były najliczniej izolowane do roku 1972. W 1973 roku ustąpiły miejsca pałeczkom *S. Typhimurium*, a w 1976 roku również pałeczkom *S. Agona*. Rekordową liczbę przypadków zakażeń spowodowanych pałeczkami *S. Typhimurium* zanotowano w 1978 roku – 8 125 przypadków, z czego 6 017 dotyczyło osób chorych. Zarejestrowano kolejną zmianę dystrybucji serowarów będących przyczyną największych liczb zakażeń u ludzi w omawianym okresie (tab. 10).

Tabela 10. Najliczniej reprezentowane serowary *Salmonella* wyizolowane od ludzi chorych i zdrowych w Polsce w latach 1967 – 1978 [84]Table 10. The most frequent *Salmonella* serovars isolated from ill and healthy persons, Poland, 1967 – 1978 [84]

Serowar <i>Serovar</i>	Liczba osób, u których wykryto zakażenie <i>Number of infected persons</i>		Ogółem <i>Total</i>
	chorzy / <i>ill</i>	zdrowi / <i>healthy</i>	
<i>S. Typhimurium</i>	35888	13441	49329
<i>S. Enteritidis</i>	34402	5466	39868
<i>S. Anatum</i>	1813	17949	19762
<i>S. Agona</i>	6907	7811	14718
<i>S. Bovismorbificans</i>	2647	4613	7260
<i>S. Derby</i>	1148	5291	6439
<i>S. Brandenburg</i>	785	4116	4901
<i>S. Heidelberg</i>	819	2223	3042
<i>S. Newport</i>	1017	1178	2195
<i>S. Kottbus</i>	529	1642	2171
<i>S. Panama</i>	417	1311	1728
<i>S. Stanleyville</i>	833	588	1421
<i>S. Anatum</i> var. 15+ (*)	219	1193	1412
<i>S. Give</i>	154	1189	1343
<i>S. Oranienburg</i>	469	548	1017
Pozostałe serowary / <i>Other serovars</i>	2548	4894	7442
Inne ¹ / <i>Others</i>	385	349	734
Zakażenia mieszane / <i>Mixed infections</i>	368	48	416
Ogółem / <i>Total</i>	91348	73850	165193

(*) dawniej *S. newington* / formerly *S. newington*¹ *Salmonella* nieokreślone (tylko z rozpoznaniem przynależności do danej grupy serologicznej lub jedynie przynależności do rodzaju *Salmonella*)¹ *Undetermined Salmonella* (recognized only just as members of particular serogroups or only as members of the genus *Salmonella*)

Pierwsze miejsce wśród najliczniej występujących serowarów w tym czasie zajmuje *S. Typhimurium* – czynnik etiologiczny ponad 49 tysięcy przypadków zakażeń, z czego 72,8% stanowiły przypadki objawowe. Liczby rejestrowanych przypadków w poszczególnych latach kształtowały w granicach od 2 do 8 tysięcy rocznie. Ogólnie w latach 1967 – 1978 obserwowano tendencję wzrostową liczby przypadków zakażeń spowodowanych tym serowarem. Liczba osób chorych, od których izolowano pałeczki *S. Typhimurium* prawie trzykrotnie przewyższała liczbę osób zdrowych. Fakt, iż w Polsce, w okresie od 1967 do 1978 roku, liczba przypadków objawowych wszystkich zakażeń *Salmonella* przekroczyła prawie o 20 tysięcy liczbę przypadków bezobjawowych, należy tłumaczyć wzrostem zachorowań spowodowanych przede wszystkim pałeczkami *S. Typhimurium*. Kolejne na liście dominujących serowarów były pałeczki *S. Enteritidis*. Łączna liczba zarejestrowanych przypadków wynosiła prawie 40 tysięcy. Ponad 86%

dotyczyło zakażeń objawowych przekraczających sześciokrotnie liczbę przypadków bezobjawowych. Liczba osób chorych przewyższała znacznie liczbę zdrowych w poszczególnych latach, a obserwowana tendencja spadkowa liczby zakażeń w tym okresie spowodowanych pałeczkami *S. Enteritidis* nie zakłóciła tych proporcji. Szczególnie niebezpiecznym okazał się również serowar *S. Agona*, wyizolowany w Polsce po raz pierwszy w 1969 roku z kału osoby chorej (ujęty w sprawozdaniu za rok 1970). Zaobserwowano dla tego serowaru wyraźną tendencję wzrostową i niepokojąco rosnącą liczbę zachorowań: od 2 przypadków w 1970 roku, co stanowiło zaledwie 0,03% wszystkich objawowych przypadków zakażeń w tym roku, do 2 847 (23,2%) w roku 1978. W latach 1976 – 1978 najwięcej przypadków zakażeń spowodowanych tym serowarem zarejestrowano właśnie w Polsce – 7 657 przypadków.

Z podobną gwałtownością, jak mająca miejsce w latach 1962 – 1976 epidemia *S. Enteritidis*, zaczęła rozwijać się nowa epidemia – epidemia *S. Agona*. Pałeczki *S. Agona* stanowiły główną przyczynę zakażeń wewnątrzszpitalnych, szczególnie na oddziałach dziecięcych [12, 13]. Były bardzo licznie izolowane o okresie od 1972 aż do 1985 roku. Podejrzewa się znacznie większe liczby zakażeń niż faktycznie rejestrowane w tym czasie, głównie ze względu na trudności diagnostyczne związane z ich identyfikacją. Zastosowanie antybiotyków do leczenia dzieci nie pozostawało bez wpływu na „jakość” izolowanych szczepów, których ostateczna identyfikacja serologiczna, zmierzająca do określenia typu serologicznego była często niemożliwa. Ponadto część z izolowanych w tym okresie szczepów *S. Agona* wykazywała nietypową dla większości pałeczek *Salmonella* zdolność fermentowania laktozy [131], co z pewnością obniżało znacznie poziom ich wykrywalności w laboratoriach diagnostycznych. Zaobserwowano tendencję wzrostową liczb bakteriologicznie potwierdzonych przypadków infekcji spowodowanych pałeczkami *S. Newport*, *S. Kottbus*, *S. Stanleyville* i *S. Oranienburg*. Zmniejszyła się znacznie w porównaniu z poprzednim dziesięcioleciem liczba zakażeń pałeczkami *S. Give*. Bardzo licznie występujący wówczas w wielu państwach serowar *S. Panama*, w Polsce izolowano w niewielkich ilościach. W 1967 i 1968 roku, *S. Panama* była dominującym serowarem w niektórych państwach na świecie. We Francji przez wiele lat występowała endemia związana z tym patogenem [403]. Ciągłe licznie izolowano je jeszcze na świecie w latach 1976 – 1978. W naszym kraju, od 1967 do 1978 roku, zarejestrowano łącznie 1 728 przypadków, z czego najwięcej odnotowano w roku 1970. W rezultacie pałeczki *S. Panama* zajmowały jedenaste miejsce w Polsce wśród serowarów izolowanych z materiału od ludzi w ciągu omawianego przedziału czasu.

W okresie od 1967 do 1978 roku, od 416 osób (w tym od 368 osób chorych) wyizolowano z jednej badanej próby więcej niż jeden serowar *Salmonella* [84]. Występowanie zakażeń mieszanych *Salmonella* w poprzednich latach należało do rzadkości. W latach 1946 – 1956 zarejestrowano 56 takich przypadków, a w kolejnym dziesięcioleciu (1957 – 1966) zaledwie 18 [42, 306].

Szczególną uwagę należy zwrócić na coraz liczniej pojawiające się serowary *Salmonella*, których dotychczas nie izolowano w naszym kraju. W latach 1967 – 1978 z materiału pochodzącego od ludzi wyizolowano 55 serowarów *Salmonella*, które wystąpiły po raz pierwszy w Polsce. Szczegółowy ich wykaz przedstawiono w pracy Dera-Tomaszewskiej [84]. Niektóre z nich zostały zaimportowane z innych rejonów świata, np. *S. Lodz* – z Nigerii, *S. Gaminara* – z Laosu, *S. Kisangani* – z Zambii. Ze względu na znaczenie jakie posiada pojawienie się „nowych” (w sensie: po raz pierwszy) serowarów *Salmonella* w kraju, istotnym jest rejestrowanie wszystkich takich przypadków, niezależnie od rodzaju materiału z jakiego je izolowano. Należy wspomnieć, iż w omawianym okresie czasu wyizolowano również 9 takich serowarów z innych źródeł. Należały do nich: *S. Adamstua*, *S. Pomona*, *S. II 1,4,12, 27:b:e,n,x* (dawniej *S. II sofia*) i *S. Stendal* – wyizolowane od zółwi, *S. Worthington* – z moczu trzody chlewnej, *S. Oslo* – wyhodowany z padłej jaszczurki oraz *S. Bornum*, *S. Havana* i *S. Rissen* – wyhodowane z mączki rybnej [84].

Lata 80 XX wieku zapisały się nieprawdopodobną wręcz ekspansją pałeczek *Salmonella* Enteritidis. Mająca miejsce w Polsce druga epidemia związana z tym serowarem, której szczyt (83 748 przypadków zakażeń) przypadł na rok 1988, rozpoczęła się prawdopodobnie już w 1980 lub 1981 roku [134]. Stała się przyczyną zarejestrowania w naszym kraju w 1988 roku największej od 1946 roku liczby zakażeń spowodowanych pałeczkami *Salmonella* (95 160 przypadków). Pałeczki *S. Enteritidis* przez wszystkie kolejne lata utrzymywały się na pierwszym miejscu wśród dominujących serowarów *Salmonella* izolowanych od ludzi w Polsce, stanowiąc średnio ponad 85,0% wszystkich zakażeń *Salmonella* rejestrowanych rocznie i pozostają na czele tej listy aż do dzisiaj. Kolejnym epidemicznym serowarem w Polsce po *S. Enteritidis* od wielu lat jest *S. Typhimurium*. Oba te serowary zajmowały niezmiennie odpowiednio pierwsze i drugie miejsce wśród pałeczek *Salmonella* najczęściej izolowanych w naszym kraju w latach 1982 – 1994. Dystrybucja pozostałych typów serologicznych uległa w tym czasie ponownej zmianie (tab. 11). Zarejestrowano znaczny wzrost liczby zakażeń spowodowanych pałeczkami *Salmonella* izolowanymi do tej pory okazjonalnie, takimi jak *S. Infantis*, *S. Hadar* i *S. Virchow*. Serowary te w ciągu następnych lat zajmować będą zamiennie kolejne miejsca na liście epidemicznych serowarów *Salmonella* w Polsce po *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Wzrosła prawie trzykrotnie liczba infekcji, których czynnikiem etiologicznym były pałeczki *S. Oranienburg*.

Tabela 11. Serowary *Salmonella* najczęściej wykrywane u ludzi w Polsce, 1982 – 1994 [288, 289, 290, 291, 404]
 Table 11. *Salmonella* serovars most frequently identified in humans, Poland, 1982 – 1994 [288, 289, 290, 291, 404]

Serowar Serovar	Liczba osób, u których wykryto zakażenie Number of infected persons															
	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1982 – 1994		
1. <i>S. Enteritidis</i>	9053	11808	27656	41757	54893	59825	83754	70599	66276	72124	57570	42425	47746	645486		
2. <i>S. Typhimurium</i>	9951	10575	11408	11831	9171	9640	7146	5416	3613	2154	1956	1280	1884	86025		
3. <i>S. Agona</i>	5566	4337	6193	7323	3028	2431	1123	644	133	152	325	136	160	31551		
4. <i>S. Infantis</i>	189	205	174	310	388	590	663	499	575	573	822	762	1269	7019		
5. <i>S. Hadar</i>	–	–	282	299	121	192	106	151	316	250	381	491	830	3419		
6. <i>S. Virchow</i>	–	–	–	–	–	41	48	–	22	269	461	1150	1154	3145		
7. <i>S. Oranienburg</i>	221	160	282	635	373	363	364	103	170	130	138	97	97	3133		
8. <i>S. Heidelberg</i>	173	219	272	347	398	314	279	73	63	51	53	41	55	2338		
9. <i>S. Newport</i>	178	111	169	125	63	107	109	182	153	155	273	332	324	2281		
10. <i>S. Anatum</i> (*)	177	726	92	135	101	168	328	156	83	42	52	36	76	2172		
11. <i>S. Thompson</i>	403	40	184	40	17	59	110	–	15	16	24	10	164	1082		
12. <i>S. Saintpaul</i>	–	21	–	73	70	102	88	130	85	78	101	90	81	919		
13. <i>S. Isangi</i> (**)	48	71	66	74	50	71	30	22	15	24	85	170	36	762		

Liczba osób, u których wykryto zakażenie
Number of infected persons

Serowar Serovar	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1982 – 1994
14. <i>S. Bovismorbificans</i>	24	58	117	102	39	42	41	29	25	63	28	37	77	682
15. <i>S. Manhattian</i>	87	164	101	35	32	63	28	21	16	51	24	22	21	665
Inne serowary ¹ / Others	384	574	803	1962	841	643	940	639	571	759	1007	801	841	10836
Ogółem / Total	26522	29069	47799	65048	69585	74651	95160	78664	72131	76891	63300	47880	54815	801515

(*) łącznie z występującym dawniej serowarem *S. newington* (obecnie *S. Anatum* var. 15+), wyszczególnianym wśród dominujących serowarów w 1987, 1988, 1999 roku) / together with *S. newington* (formerly being a separate serovar, now occurring as *S. Anatum* var. 15+) present among the most prevalent serovars in 1987, 1988, 1999)

(**) łącznie z występującym dawniej serowarem *S. mission* (obecnie połączonym z *S. Isangi*), wyszczególnianym wśród dominujących serowarów w 1983, 1985, 1996, 1997 roku) / together with formerly occurring serovar *S. mission* (now combined with *S. Isangi*) present among the most prevalent serovars in 1983, 1985, 1996, 1997)

„–” dany serowar nie występował wśród serowarów dominujących w danym roku / “–” indicates that a given serovar was not among prevalent serovars for that year

¹ *S. Albany*, *S. Braenderup*, *S. Brandenburg*, *S. Chester*, *S. Choleraesuis*, *S. Derby*, *S. Dublin*, *S. Give*, *S. Goldcoast*, *S. Kottbus*, *S. Livingstone*, *S. London*, *S. Mbandaka*, *S. Meleagridis*, *S. Molade*, *S. Montevideo*, *S. Muenchen*, *S. Orion*, *S. Panama*, *S. Paratyphi B*, *S. Reading*, *S. Sandiego*, *S. Senftenberg*, *S. Stanley*, *S. Stanleyville*, *S. Tennessee*, *S. Tshiongwé*, *S. Typhi* oraz inne rzadko występujące serowary z grup O:4, O:7, O:8, O:9, O:3,10, O:1,3,19 i innych / and other rarely occurring serovars from groups O:4, O:7, O:8, O:9, O:3,10, O:1,3,19 and others

Wśród serowarów najliczniej występujących u ludzi w latach 1982 – 1994 utrzymały się pałeczki *S. Heidelberg* i *S. Newport*. Tylko nieznacznie zmniejszyła się liczba osób, od których je izolowano. Pałeczki *S. Derby*, *S. Brandenburg*, *S. Kottbus*, *S. Panama*, *S. Stanleyville* i *S. Give*, często występujące u ludzi w poprzednim okresie, w latach 1982 – 1994 izolowano już tylko w niewielkich ilościach. Zanotowano również ponad dziesięciokrotnie mniej zakażeń wywołanych przez *S. Bovismorbificans*.

Na sytuację epidemiologiczną salmoneloz u ludzi w Polsce główny wpływ miały zakażenia wśród zwierząt gospodarskich. W latach 1945 – 1960 najczęściej zakażone były świnie, ptactwo, cielęta i bydło [259]. Generalnie, w Polsce, od 1947 do 1961 roku, od zwierząt najliczniej izolowano *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* var. *kunzendorf* i *S. Dublin* [216]. Dostępnym często rejestrowano pałeczki *S. Gallinarum*, *S. Gallinarum* biowar *Pullorum* oraz *S. Enteritidis*. Rzadko i sporadycznie u zwierząt występowały takie serowary jak: *S. Abortusequi*, *S. Abortusovis*, *S. Bispebjerg*, *S. Brandenburg*, *S. Derby*, *S. Bovismorbificans*, *S. Newport*, *S. Typhisuis*, *S. Anatum* var. 15+ (dawniej *S. newington*), nie figurujący już dzisiaj w schemacie, a występujący dawniej serowar *S. abortusbovis*, połączony obecnie z *S. Abony* i inne. Na terenie kraju w latach 1946 – 1947 u świń występowały pałeczki *S. Choleraesuis*, a u ptaków *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum* i *S. Gallinarum* biowar *Pullorum* [124]. W latach 1966 – 1974 w poszczególnych województwach od drobiu grzebiącego izolowano przede wszystkim serowar *S. Gallinarum* i jego biochemiczny wariant *Pullorum* (przy czym w latach 1973 – 1974 nastąpił spadek ich liczby), a od drobiu wodnego – najczęściej *S. Typhimurium* i rzadziej *S. Enteritidis* [190, 265, 360]. Jak wynika z badań Krajowego Ośrodka *Salmonella* prowadzonych nad zakażeniami *Salmonella* u zwierząt w latach 1965 – 1969 [45], największy stopień zakażenia w tym okresie stwierdzono u świń. Świnie tuczu przemysłowego najczęściej były zakażone przez *S. Choleraesuis* var. *kunzendorf*, natomiast z gospodarstw indywidualnych przez *S. Anatum*. Na drugim miejscu znajdowały się kaczki, od których (podobnie jak od kur-brojlery) izolowano przede wszystkim *S. Typhimurium*. Od bydła natomiast izolowano głównie pałeczki *S. Derby*, *S. Dublin* i *S. Typhimurium*. W latach siedemdziesiątych obserwowano wzrost liczby zachorowań na salmonelozy u bydła, świń i drobiu. W okresie od 1977 do 1978 roku wzrost ten był szczególnie wyraźny wśród drobiu [14]. W początkach lat osiemdziesiątych od brojlerów, kur niosek, kaczek i gęsi (narządy wewnętrzne, jaja, kał) oraz ze ściółki, pasz i komponentów paszowych najczęściej izolowano *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Gallinarum* biowar *Pullorum* oraz *S. Enteritidis* [331]. W drugiej połowie lat osiemdziesiątych od drobiu rzeźnego oraz z próbek cieczy pobranych z pojemników z drobiem znajdującym się w sprzedaży detalicznej najczęściej izolowano *S. Enteritidis*, następnie *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Saintpaul* oraz inne serowary [189, 287]. W latach dziewięćdziesiątych w patologii salmoneloz ptaków w Polsce w dalszym ciągu znaczącą rolę odgrywa *S. Enteritidis* [336, 337]. Na występowanie salmoneloz u zwierząt gospodarskich największy wpływ ma jakość mikrobiologiczna pasz oraz warunki higieniczno-sanitarne panujące w otoczeniu zwierząt. Od wymienionych czynników zależy

jakość żywności pochodzenia zwierzęcego. Jakość mikrobiologiczna surowców pochodzących od zwierząt ma podstawowe znaczenie w zapobieganiu zachorowaniom spowodowanym przez odzwierzęce pałeczki *Salmonella*.

Obecność odzwierzęcych pałeczek *Salmonella* wśród czynników etiologicznych zatruc i zakażeń pokarmowych notowano w Polsce od lat powojennych [42, 216, 230]. Od 1946 do 1956 roku zarejestrowano łącznie 173 ogniska zatruc pokarmowych spowodowanych przez pałeczki *Salmonella*. Za 129 (74,5%) spośród nich odpowiedzialne były pałeczki *S. Typhimurium*. Pałeczki *S. Enteritidis* i *S. Dublin* stanowiły czynnik etiologiczny odpowiednio 12,0% i 5,8% wszystkich ognisk. W przypadku pozostałych ognisk rozpoznano takie serowary jak: *S. Choleraesuis* var. *kunzendorf*, *S. Bovismorbificans*, *S. Newport*, *S. Heidelberg*. Skażone mięso i produkty mięsne stanowiły nośnik zatruc pokarmowych w 65,3% ognisk (31,2% ognisk – źródło zakażenia nieznane). W kolejnych latach sukcesywnie zwiększała się liczba ognisk zatruc pokarmowych o etiologii *Salmonella*. Obserwowano również rosnące liczby zachorowań w poszczególnych ogniskach, rosnącą liczbę serowarów *Salmonella* odpowiedzialnych za zachorowania w ogniskach i coraz większy udział sporadycznych przypadków zatruc pokarmowych. W okresie 1957 – 1966 zanotowano 336 ognisk, a w latach 1967 – 1978 już 1 075 ognisk [84, 306]. Nadal dominowały pałeczki *S. Typhimurium* odpowiedzialne odpowiednio za 258 (76,8%) i 810 (75,4%) ognisk w wyżej wspomnianych przedziałach czasowych. Zarejestrowany dla pałeczek *S. Enteritidis* procentowy udział w powodowaniu ognisk zatruc pokarmowych był zbliżony do notowanego w okresie powojennym i wynosił 13,1% (44 ogniska) oraz 12,0% (129 ognisk) ogólnej liczby salmonelowych ognisk zatruc pokarmowych odpowiednio w latach 1957 – 1966 i 1967 – 1978.

Wśród pałeczek *Salmonella* odpowiedzialnych za pozostałe ogniska zatruc pokarmowych identyfikowano *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* var. *kunzendorf*, *S. Bovismorbificans*, *S. Anatum*, *S. Heidelberg*, *S. Derby*, *S. Haifa*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Kottbus* i inne. Nadal przeważały ogniska, w których bezpośrednią przyczynę zachorowań ludzi stanowiło mięso i jego przetwory skażone pałeczkami *Salmonella*. W okresie od 1957 do 1966 roku, chorowało 5 155 osób z powodu zakażenia pałeczkami *Salmonella* za pośrednictwem mięsa i przetworów mięsnych, a w latach 1967 – 1978 chorowały 8 682 osoby, co stanowiło odpowiednio 69,8% i 34,0% ogólnej liczby chorych w salmonelowych ogniskach zatruc pokarmowych w poszczególnych przedziałach czasu. Należy jednak zwrócić uwagę na wyraźnie malejącą tendencję w powodowaniu zatruc obserwowaną dla tego nośnika, co przy ciągle rosnącej liczbie salmonelowych ognisk zatruc pokarmowych świadczyć może o pojawieniu się nowych źródeł będących przyczyną zakażeń. Lata 80 i 90 przyniosły kolejny wzrost liczby zatruc pokarmowych w Polsce [312]. Na wzrost ten rzutowała ogromna liczba odzwierzęcych salmoneloz ze szczytem w 1988 roku. Liczba ognisk, w których czynnikiem etiologicznym były odzwierzęce pałeczki *Salmonella* wahały się od 854 w roku 1988 do 266 w 1999 roku. Wśród czynników etiologicznych w ogniskach zbiorowych zachorowań dominowały pałeczki

S. Enteritidis. Zmalał udział pałeczek *S. Typhimurium*. Wśród innych serowarów odpowiedzialnych za zachorowania ludzi w ogniskach zatruc pokarmowych rejestrowano między innymi *S. Isangi*, *S. Hadar*, *S. Indiana*, *S. Virchow* i *S. Infantis*. Głównym nośnikiem zatruc pokarmowych były potrawy z jaj (głównie ciastka z kremem) produkowane w mieszkaniach prywatnych. W latach 1985 – 1999, procentowy udział zachorowań w ogniskach z powodu potraw z jaj skażonych pałeczkami *Salmonella*, w kolejnych pięcioletnich okresach czasu, wynosił odpowiednio 55,4%, 56,8% i 55,4%.

Obserwowany obecnie w Polsce spadek zachorowań na salmonelozy [274, 293], może świadczyć o skuteczności działań wszystkich placówek nadzorujących w zapobieganiu salmonelozom i ich zwalczaniu. Jednakże pojawianie się nowych, zanikanie lub zmiana postaci współcześnie istniejących chorób zakaźnych jest stałym i nieuniknionym zjawiskiem przyrodniczym. Dlatego problem salmoneloz nigdy nie zostanie całkowicie zlikwidowany, chociaż ich kontrola i opanowanie jest możliwe. Wymaga to jednak zaangażowania i międzynarodowej współpracy naukowej, organizacyjnej i ekonomicznej. W tym celu, służba zdrowia i służba weterynaryjna muszą współpracować ze sobą. Współpraca ta – oprócz przestrzegania istniejących przepisów – powinna polegać między innymi na gromadzeniu bieżących informacji o potwierdzonych przypadkach zakażeń *Salmonella* wśród ludzi i zwierząt oraz na organizowaniu badań nad stopniem chorobotwórczości poszczególnych typów *Salmonella*. Wynikiem tej współpracy powinno być również publikowanie wniosków na powyższe tematy w celu ukształtowania racjonalnej opinii międzynarodowej poprzedzającej określoną działalność legislacyjną. Ciągłe monitorowanie występowania pałeczek *Salmonella* i dystrybucji serowarów stanowi istotny wkład w te działania. Ważnym jest nie tylko monitorowanie występowania epidemicznych serowarów, zajmujących czołowe miejsca na liście najliczniej izolowanych w danym kraju, w określonych przedziałach czasu, ale również tych pojawiających się sporadycznie, z których każdy, w sprzyjających warunkach, może stać się przyczyną wybuchu zwykle groźnej w skutkach epidemii. Krajowy Ośrodek *Salmonella* prowadzi unikalny w skali kraju rejestr wszystkich serowarów *Salmonella*, które występowały w Polsce w ciągu ostatnich 50. lat. Do 1994 roku zarejestrowano łącznie 158 różnych typów serologicznych. Badania referencyjne prowadzone w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1995 – 2007 przyczyniły się do określenia 52 kolejnych serowarów, których do tej pory nie rejestrowano w Polsce. Wyniki przeprowadzonych badań, które pozwoliły na ich identyfikację będą stanowiły, między innymi, przedmiot rozważań zawartych w niniejszej pracy.

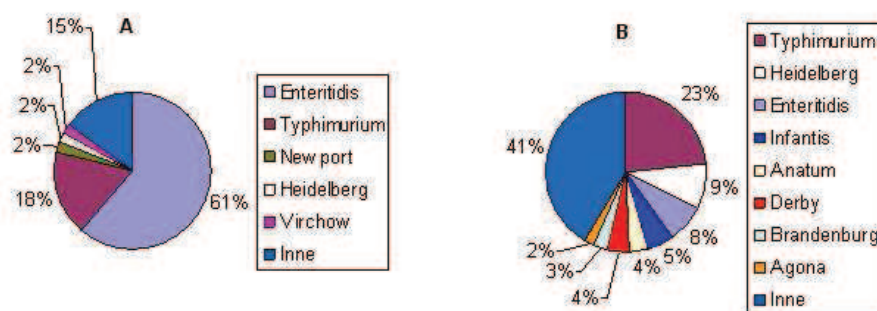
1.8. *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SEROWAR *ENTERITIDIS*

Niebezpieczeństwo wynikające ze zwiększonej inwazyjności niektórych serowarów *Salmonella* stało się problemem na skalę światową – przykładem może być *Salmonella* *Enteritidis*. Problem ten stał się jeszcze bardziej złożony z powodu, rejestrowanego w wielu kra-

jach, dramatycznego wzrostu liczby zakażeń u ludzi spowodowanych *Salmonella* Enteritidis [48, 114, 262, 310]. Ten alarmujący wzrost zakażeń potwierdził pandemiczny charakter ekspansji tego serowaru. Zaobserwowana przez Rodrigue'a i wsp. [325], ogólnosiwiatowa epidemia *Salmonella* Enteritidis posiadała więcej niż jeden molekularny wyznacznik epidemiologiczny. W niektórych krajach *Salmonella* Enteritidis stanowiły przyczynę przynajmniej 50% wszystkich zakażeń u ludzi spowodowanych pałeczkami *Salmonella*. Pałeczki *Salmonella* Enteritidis są również ważnym czynnikiem zakażeń u ludzi w Polsce [134, 274, 291, 292, 293]. Stanowią przyczynę średnio ponad 85,0% wszystkich zakażeń u ludzi spowodowanych pałeczkami *Salmonella* w skali roku. Są czynnikiem etiologicznym znakomitej większości salmonelowych ognisk zatruc pokarmowych. Spośród 15 największych ognisk zarejestrowanych w Polsce w latach 1985 – 1999, w których chorowało łącznie 4 627 osób, siedem spowodowały pałeczki *S. Enteritidis* (2 104 osoby chore). W przypadku dwóch innych ognisk (641 osób chorych), w produktach spożywczych odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe, oprócz pałeczek *S. Enteritidis* obecne były również inne bakterie [312].

1.8.1. Występowanie pałeczek *Salmonella* Enteritidis

Wszystkie bakterie *Salmonella* są potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka. Większość zachorowań u ludzi powodują przede wszystkim serowary z gatunku *Salmonella enterica*. Epidemiologia zakażeń *Salmonella* u ludzi zdominowana jest jednak przez niewielką ich liczbę. Obecnie głównie przez *S. enterica* serowar Enteritidis i *S. enterica* serowar Typhimurium. Rozpatrując zjawisko globalnie, w skali świata, pałeczki *S. Enteritidis* były odpowiedzialne za 61% zakażeń u ludzi w latach 2000 – 2004. Pałeczki *Salmonella* Typhimurium zaś, powodując 18% zakażeń u ludzi na świecie, stanowiły serowar numer jeden wśród izolacji pochodzących z innych źródeł (zwierzęta, żywność, pasze, środowisko) (ryc. 10).

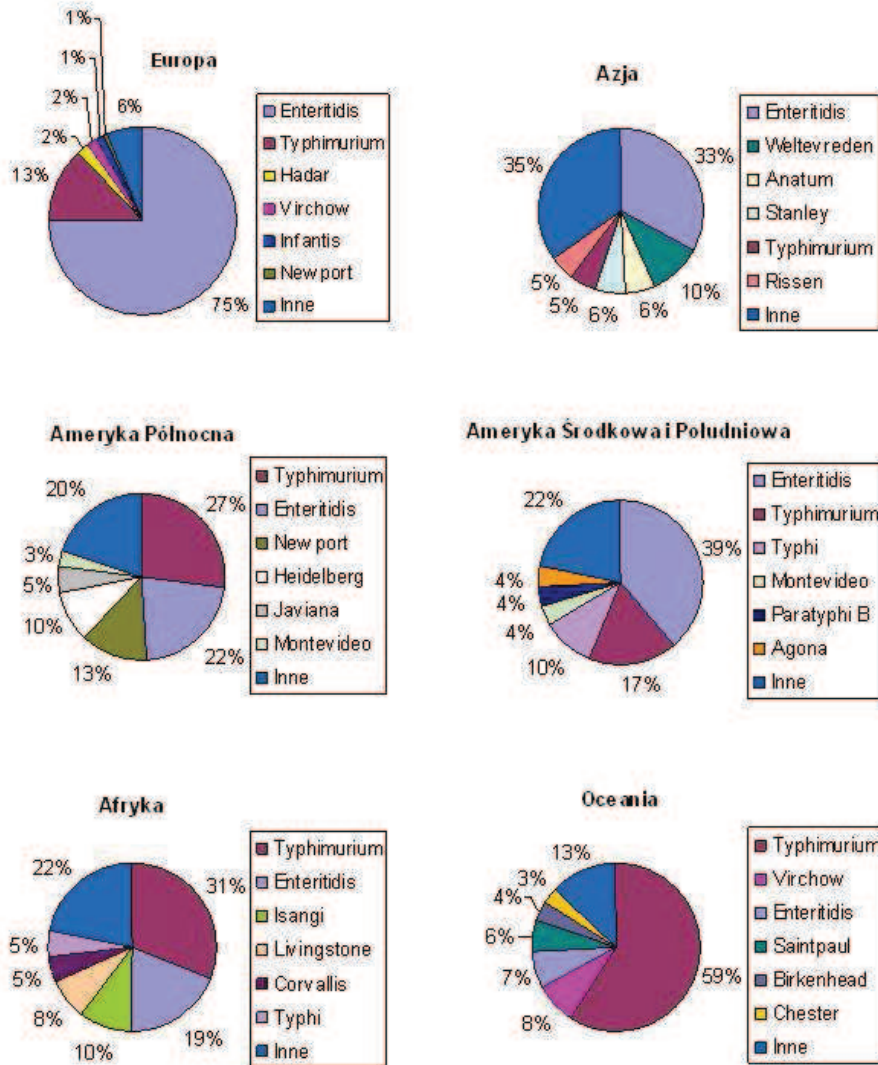


Ryc. 10. Serowary *Salmonella* dominujące na świecie, izolowane od ludzi (A) i z innych źródeł (B), 2000 – 2004 (opracowano na podstawie danych umieszczonych w bazie WHO Global Salm-Surv. Country Databank [405])

Fig. 10. Worldwide distribution of human (A) and non-human (B) *Salmonella* serovars, 2000 – 2004 (based on data of WHO Global Salm-Surv. Country Databank [405])

Zarówno sporadyczne, jak i rodzinne zakażenia *Salmonella* u ludzi oraz małe i duże epidemie są rejestrowane w wielu krajach we wszystkich częściach świata. I chociaż ogólnie na świecie, wśród przypadków zakażeń u ludzi dominuje *S. Enteritidis*, obserwowane jest jednak pewne zróżnicowanie geograficzne udziału poszczególnych serowarów w tych zakażeniach (ryc. 11).

Uwzględnienie regionu geograficznego zmienia nieco ich dystrybucję. Pałeczki *S. Typhimurium* dominują w Ameryce Północnej, Afryce i Oceanii. *Salmonella* Enteritidis jest najczęściej izolowanym serowarem z materiałów pochodzących od ludzi w Europie, Ameryce Środkowej i Południowej oraz w Azji. Odpowiada aż za 3/4 wszystkich przypadków salmonelozy u ludzi w państwach europejskich. W Anglii i Walii, w roku 2002, współczynnik zakażeń spowodowanych pałeczką *S. Enteritidis* wynosił 18,8 przypadków na 100 tysięcy mieszkańców, podczas gdy dla *S. Typhimurium* wynosił on 3,7 i 0,5 dla zakażeń spowodowanych przez *S. Virchow* – kolejny serowar najczęściej izolowany od ludzi. Zakażenia *S. Enteritidis*, zarówno sporadyczne, jak i będące przyczyną ognisk zatruc pokarmowych, wykazują szczególny związek ze spożywaniem mięsa drobiowego i jaj. W ciągu ostatnich 20 lat (do 2004 roku), w większości krajów rozwiniętych, rejestrowano znaczący wzrost liczby zakażeń *Salmonella* w ogóle.



Ryc. 11. Dominujące serowary *Salmonella* izolowane od ludzi na świecie, z uwzględnieniem regionu geograficznego, 2000 – 2004 (opracowano na podstawie danych umieszczonych w bazie WHO Global Salm-Surv. Country Databank [405])

Fig. 11. Distribution of human *Salmonella* serovars by geographic region, 2000 – 2004 (based on data of WHO Global Salm-Surv. Country Databank [405])

1.8.2. Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis

W Anglii i Walii, prezentujących wzorzec zakażeń *Salmonella* u ludzi typowy dla większości pozostałych państw Europy Zachodniej, liczba zarejestrowanych przypadków zakażeń wzrosła z 10 tysięcy w 1981 roku do około 33 tysięcy przypadków w 1997 roku. Pamiętać jednak należy, iż dane te reprezentują tylko niewielką część faktycznej liczby przypadków. W 1981 roku, serowar *S. Enteritidis* był odpowiedzialny tylko za 10% wszystkich przypadków zakażeń *Salmonella* u ludzi w Anglii i Walii, a w 1997 zarejestrowano udział tego serowaru już na poziomie 70%. Dopiero w okresie ostatnich 7 lat, do 2004 roku, zarówno w Anglii i Walii, jak i w niektórych pozostałych państwach, zaobserwowano spadek liczby zakażeń spowodowanych tym serowarem. W roku 2001 zarejestrowano 14 427 przypadków, co stanowiło już tylko około 45% liczby odnotowanej w 1997 roku. Ogólny spadek zakażeń *Salmonella* ma związek ze zmniejszającą się liczbą zakażeń spowodowanych przez *S. Enteritidis*, chociaż serowar ten jeszcze ciągle ponosi odpowiedzialność za znaczącą liczbę infekcji u ludzi wywołanych pałeczkami *S. enterica*. Podobną sytuację obserwujemy również w Polsce [274, 292, 293].

W przypadku epidemii, jak i sporadycznych zachorowań spowodowanych pałeczkami *S. Enteritidis*, ważnym staje się wykrycie źródła zakażenia. Ustalenie, czy dana grupa pozornie pokrewnych przypadków jest jednorodna, czy powiązana z więcej niż jednym źródłem zakażenia, może sprawiać trudności. Wyniki badań uzyskane za pomocą metod serologicznych są niewystarczające dla identyfikacji źródła zakażenia. Z metod bakteriologicznych, obecnie stosowanych w dochodzeniach epidemiologicznych, cenną okazała się metoda bakteriofagowego typowania szczepów. Fagotypowanie opiera się na różnicowaniu szczepów na podstawie ich wrażliwości lub oporności na lizę przez swoisty dla określonego gatunku (serowaru) zestaw bakteriofagów. W 1950 roku, Lilleengen, po raz pierwszy, zaproponował różnicowanie szczepów *Salmonella* Enteritidis przy użyciu bakteriofagów [234]. Zastosowane, do wytypowania 116 szczepów, 4 preparaty fagowe, pozwoliły na wyróżnienie ośmiu typów bakteriofagowych. W późniejszych latach, inni autorzy [8, 153] informowali o sukcesach w opracowaniu kolejnych zestawów preparatów fagowych i schematów typowania *S. Enteritidis*, lokalnie stosowanych przez nich wyłącznie we własnych laboratoriach. W Polsce stosuje się system różnicowania pałeczek *Salmonella* Enteritidis za pomocą bakteriofagów uzyskanych we własnym zakresie, opracowany przez Macierewicz i wsp. [241], udoskonalony przez Lalko [222]. Niektóre laboratoria na świecie, stosują zestaw preparatów fagowych i schemat opracowany w WHO Collaborating Centre for Phage Typing and Resistance of Enterobacteria przez Ward i wsp. [393]. *Salmonella* Enteritidis, w szczególności szczepy prezentujące 4 typ bakteriofagowy (PT4, phage type 4) według schematu Ward i wsp., były głównie odpowiedzialne za wzrost liczby przypadków salmonelozy u ludzi w Europie Zachodniej, chociaż rejestrowano również inne typy bakteriofagowe. W Europie Wschodniej dominował PT1, a w Ameryce

Północnej typu PT8, PT13 i PT13a były częściej izolowane z przypadków zakażeń u ludzi niż pozostałe typy bakteriofagowe.

Typowanie bakteriofagowe szczepów *Salmonella* Enteritidis według schematu Ward i wsp. przeprowadzono w Polsce po raz pierwszy w Krajowym Ośrodku *Salmonella* [86, 135, 136]. Typowaniu bakteriofagowemu poddano szczepy *Salmonella* Enteritidis wyizolowane na terenie Polski w latach 1986 – 1995 przez stacje sanitarno-epidemiologiczne, laboratoria weterynaryjne, przyszpitalne i inne. Szczepy pochodziły z ognisk zatruc pokarmowych, sporadycznych przypadków zakażeń ludzi i z innych źródeł. Uzyskane wyniki badań (tab. 12) pozwoliły na orientacyjną analizę porównawczą sytuacji epidemiologicznej w kraju z rejestrowaną w innych państwach. Występowanie typu 8 (wg schematu Ward i wsp.) na pierwszym miejscu w Polsce przypomina sytuację obserwowaną w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie. W Kanadzie, większość szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych od ludzi należała do typu 8 (56,8%), na drugim miejscu znalazł się typ fagowy 4 (18,3%), trzecie i czwarte miejsce zajęły odpowiednio typy 13 (8,3%) i 13a (5,1%) [310]. W Stanach Zjednoczonych dominowały głównie typy 8, 13 i 13a, z obserwowaną już od 1987 roku, znakomitą przewagą typu 8, zarówno wśród izolacji od osób z ognisk zatruc pokarmowych, w przypadkach sporadycznych zakażeń ludzi, jak i izolacji uzyskanych z ferm drobiu, z których pochodziły jaja uznane za przyczynę zakażeń *Salmonella* Enteritidis u ludzi [250, 263]. Ten typ fagowy znalazł się również na pierwszym miejscu wśród szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych w 1995 roku na terenie Czech [193] i Słowacji [244]. Obserwowana ciągłość występowania w Polsce typu PT8 (wg schematu Ward i wsp.) w omawianym okresie czasu, mogłaby sugerować obecność w kraju, własnych, stałych źródeł zakażeń i zatruc pokarmowych pałeczką *Salmonella* Enteritidis, okresowo wspomaganych przypadkami importowanymi. Część rejestrowanych izolacji *Salmonella* Enteritidis typu 8 (wg schematu Ward i wsp.), może mieć związek z importem zakażonego drobiu z regionów geograficznych zdominowanych przez ten typ fagowy. Z materiałów Krajowego Ośrodka *Salmonella* wynika, iż Polska importuje pisklęta, między innymi, z Kanady i z Czech.

Tabela. 12. Wyniki typowania bakteriofagowego szczepów *Salmonella* Enteritidis według schematu Ward i wsp. (szczepy izolowane z ognisk zatruc pokarmowych i z innych źródeł, Polska, 1986 – 1995) [86, 135, 136]

Table 12. Results of *Salmonella* Enteritidis strains phage typing according to the Ward et al. scheme (strains were isolated from food-poisoning outbreaks and other common sources, Poland, 1986 – 1995) [86, 135, 136]

Liczba szczepów Number of strains	Typy fagowe według schematu Ward i wsp. Phage types according to the Ward et al. scheme															
	1	2	3	4	4a	6	6a	8	9	10	11	13	15	21	AT ¹	NT ²
312 (z 46 ognisk zatruc pokarmowych/ from 46 food-poisoning outbreaks)	16	5	1	33	14	—	—	103	7	1	1	1	2	—	113	15
205 (z innych źródeł/ from other common sources)	—	—	—	3	2	2	—	17	2	—	—	—	—	—	17	3
46 (od ludzi/ from humans)	—	—	—	3	2	2	—	17	2	—	—	—	—	—	17	3
88 (zwierzęta, żywność, pasze, środki dowisko / animals, food, feed, environment)	2	—	—	14	4	2	1	11	—	—	—	1	—	1	46	6
71 (nieznanego pochodzenia/ unknown sources)	12	1	—	6	1	—	1	22	4	—	—	1	—	1	16	9
Łącznie:	14	1	—	23	7	4	1	50	6	—	—	1	—	1	79	18
Ogółem / Total:	30	6	1	56	21	4	1	153	13	1	1	2	2	1	192	33

¹ Szczepy atpowe (nietypowo reagujące z fagami typującymi) / Strains that react with typing phages but do not conform to any of the current recognized patterns

² Szczepy nie typujące się (nie reagujące z fagami typującymi) / Untypable strains (do not react with typing phages)

Badania przeprowadzone przez Głońnicką i Dera-Tomaszewską [136] wykazały, że 7 typowi fagowemu schematu Lalko i wsp., odpowiada typ fagowy 8 schematu Ward i wsp. Znaczącą liczebnie przewagę szczepów typu 8 (wg schematu Ward i wsp.), w przebadanym materiale bakteryjnym, można wyjaśnić jego tożsamością z dominującym w kraju typem fagowym 7 (wg schematu Lalko i wsp.), który wraz z typem fagowym 1 (wg Lalko i wsp.) był najliczniej izolowany w Polsce, w omawianym okresie czasu [85]. Korelacji pomiędzy niektórymi pozostałymi typami fagowymi obu schematów, wykazanych dla szczepów wzorcowych schematu Lalko i wsp., nie udało się potwierdzić badaniami szczepów bieżących. Szczególnie znaczne rozbieżności reakcji litycznych z fagami Ward i wsp. zaobserwowano dla szczepów, które zgodnie ze schematem Lalko, należały do typu 1.

Typ bakteriofagowy 4 wg schematu Ward i wsp., uplasował się w Polsce, podobnie jak w Kanadzie wśród izolacji od ludzi, na drugim miejscu wśród badanych przez nas szczepów. Pewną nieznaczną, liczbową przewagę typu 4, nad zdecydowanie dominującym typem 8, zarejestrowano w roku 1988, 1992, 1993 oraz 1995. Nieznane jest na razie źródło pochodzenia szczepów tego typu fagowego w naszym kraju. Możliwe, iż obecność jego związana jest z importem skażonych produktów lub zakażonego drobiu, z Anglii, czy innych krajów Europy Zachodniej (Niemcy, Holandia, Francja – dane Krajowego Ośrodka *Salmonella*), gdzie dominującym typem fagowym był typ 4 wg schematu Ward i wsp. [325]. W Kanadzie, na przykład, wykazano, że znaczna ilość, rejestrowanych u ludzi, przypadków izolacji *Salmonella* Enteritidis typu 4 (wg Ward i wsp.), była wynikiem zakażeń nabytych podczas pobytu zagranicą, ponieważ z drobiu, który uznano w Kanadzie za najważniejsze źródło zakażeń u ludzi, izolowano go sporadycznie – zaledwie 2 przypadki na 318 przebadanych szczepów [310]. Podobnie w Stanach Zjednoczonych, zarejestrowane nieliczne przypadki zakażeń u ludzi typem PT4 (wg Ward i wsp.) zostały uznane za „importowane” [250]. Badania przeprowadzone na fermach drobiu, który, podobnie jak w Kanadzie, uznano za źródło zakażenia ludzi, nie wykazały obecności typu 4, stąd sugestia, że te nieliczne izolacje od ludzi były również wynikiem nabycia ich zagranicą [250, 262].

Typ fagowy 1 (wg schematu Ward i wsp.), który zajął 3 miejsce wśród najliczniej izolowanych szczepów w Polsce, był typem fagowym dominującym w Europie Wschodniej [261]. W 1993 roku, wyparł on typ fagowy 4 (wg Ward i wsp.), dominujący w Japonii w latach 1990 – 1992. W latach 1986 – 1992 znajdował się również na drugim miejscu, po typie fagowym 4, wśród szczepów *Salmonella* Enteritidis, izolowanych od ludzi i z produktów spożywczych, we Włoszech [114]. Typ fagowy 13 wg schematu Ward i wsp., najliczniej izolowany w Kanadzie i Stanach Zjednoczonych wraz z typem 8 i 13a, w badanym przez nas materiale bakteryjnym prezentowany był tylko przez 2 szczepy.

Reasumując – znaczny odsetek szczepów (37,1%) reagujących z fagami Ward i wsp., w sposób uniemożliwiający określenie typu fagowego oraz dość duży odsetek szczepów (6,4%) nie reagujących z fagami, wskazuje na ograniczoną przydatność tego schematu w badaniach epidemiologicznych zakażeń wywołanych tym serowarem w naszym kraju. Szczegółowa ocena użyteczności schematu Ward i wsp. i stosowanego w Polsce schematu

Lalko i wsp., do prowadzenia analizy epidemiologicznej, została przedstawiona przez Głównicką i Dera-Tomaszewską [86, 136]. Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, iż w Polsce, w latach 1986 – 1995, dominującym był typ fagowy 8 (wg schematu Ward i wsp.). Pałeczki *Salmonella* Enteritidis typu 4, nie występowały tak licznie jak w innych krajach europejskich. Można by również zasugerować, iż druga epidemia *Salmonella* Enteritidis, która rozpoczęła się w Polsce we wczesnych latach 80 i która praktycznie trwa do dzisiaj (procentowy udział pałeczek *S.* Enteritidis w zakażeniach ludzi jest nadal wysoki: 2004 r. – 84,4%, 2005 r. – 80,0%, 2006 r. – 77,6%, 2007 r. – 76,6%) nie jest spowodowana 4-tym typem fagowym. Nieco większą liczbę szczepów tego typu zarejestrowano dopiero w 1988 roku. Jest ona prawdopodobnie związana z innymi źródłami zakażeń niż epidemia w krajach Europy Zachodniej.

W Krajowym Ośrodku *Salmonella* od ponad trzydziestu lat prowadzone jest rutynowo typowanie bakteriofagowe szczepów *S.* Enteritidis według schematu Lalko i wsp. W oparciu o materiały zgromadzone w Krajowym Ośrodku *Salmonella*, przeprowadzono analizę występowania typów bakteriofagowych *Salmonella* Enteritidis w Polsce w latach 1986 – 1995 [85, 135]. Uzyskane wyniki (tab. 13) pozwoliły oszacować sytuację epidemiologiczną w kraju związaną z występowaniem tego patogenu w omawianym okresie czasu oraz zapoznać się z dystrybucją typów bakteriofagowych. W badanym materiale bakteryjnym wyróżniono 7 typów fagowych. Dominującymi typami okazały się: typ 1, typ 6 oraz typ 7. Najliczniej występujące szczepy typu 1 i 7 izolowano prawie w takich samych ilościach. Określone typy fagowe *Salmonella* Enteritidis pokrywały się prawie z typami występującymi w Polsce w latach 1981 – 1990 opisanymi przez Głównicką i wsp. [132]. Zarejestrowano jednak pewną różnicę – dominujący liczebnie w Polsce, w latach 1981 – 1990, typ bakteriofagowy 7 (64%), w omawianym okresie czasu (1986 – 1995), izolowano prawie w takich samych ilościach jak typ fagowy 1 (typ 7 – 39,1%, typ 1 – 38,9%). W okresie od 1981 do 1995 roku, nie zaobserwowano poważniejszych zmian dotyczących występowania typów fagowych *Samonella* Enteritidis w Polsce. Dominującymi typami fagowymi *Salmonella* Enteritidis pozostają nadal typy 1, 6 i 7, z najliczniej izolowanymi szczepami typu 1 i 7. Wyniki typowania bakteriofagowego szczepów *S.* Enteritidis badanych od 1996 do 2007 roku zgodnie ze schematem Lalko i wsp., zostaną przedstawione w niniejszej pracy.

Tabela. 13. Wyniki typowania bakteriofagowego szczepów *Salmonella* Enteritidis według schematu Lalko i wsp. (szczepy izolowane z ognisk zatruc pokarmowych i z innych źródeł, Polska, 1986 – 1995) [88]

Table 13. Results of *Salmonella* Enteritidis strains phage typing according to the Lalko et al. scheme (strains were isolated from food-poisoning outbreaks and other common sources, Poland, 1986 – 1995) [88]

Liczba szczepów Number of strains	Typy fagowe według schematu Lalko i wsp. Phage types according to the Lalko et al. scheme										
	1	3	5	6	7	9	16	20	AT ¹	NT ²	
312 (z 46 ognisk zatruc pokarmowych/from 46 food-poisoning outbreaks)	132	5	45	124	3	—	—	—	—	3	
205 (z innych źródeł/from other common sources)	5	1	14	23	—	—	1	2	—	—	
46 (od ludzi/from humans)	32	—	24	30	1	—	—	1	—	—	
88 (zwierzęta, żywność, pasze, środowisko/animals, food, feed, environment)	32	4	10	25	—	—	—	—	—	—	
71 (nieznanego pochodzenia/unknown sources)	69	5	48	78	1	—	1	3	—	—	
Łącznie:	201	10	93	202	1	3	1	3	3	3	
Ogółem / Total: 517											

¹ Szczepy atypowe (nietypowo reagujące z fagami typującymi) / Strains that react with typing phages but do not conform to any of the current recognized patterns

² Szczepy nie typujące się (nie reagujące z fagami typującymi) / Untypable strains (do not react with typing phages)

1.8.3. Białko szoku termicznego Hsp60 bakterii *Salmonella* Enteritidis

Białka szoku termicznego (Hsp, *heat shock proteins*), zwane także białkami szoku cieplnego, białkami stresu, białkami opiekuńczymi lub chaperonami (*chaperones*), stanowią wysoce konserwatywną grupę białek występujących u wszystkich organizmów [154]. Białka Hsp znaleziono we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych [121, 237, 271, 329]. Obecne w niewielkich ilościach, odgrywają życiową rolę w normalnie funkcjonujących komórkach. Stanowiące populację heterogenną białka o ciężarze cząsteczkowym, między innymi 40, 60, 70 i 90 kDa, kontrolują właściwe związanie przestrzenne innych białek oraz ich wewnątrzkomórkową dystrybucję i transport [358, 407].

W obrębie każdej z rodzin obserwuje się wysoką homologię sekwencji aminokwasowej białek należących do różnych organizmów. Badania wykazały, że geny odpowiedzialne za syntezę niektórych białek szoku termicznego są takie same u bakterii, drożdży i u organizmów wyższych [129]. Świadczy to o tym, że białka stresu pełnią istotną rolę i podobną funkcję u wszystkich organizmów i że nie ulegały one wielu zmianom ewolucyjnym [39]. Wzmoczona synteza tych białek jest odpowiedzią na czynniki “stresujące” środowiska, takie jak zmiany temperatury (zjawisko to opisano początkowo jako wynik stresu cieplnego, stąd nazwa – białka szoku termicznego lub cieplnego), ograniczenie dostępu tlenu, glukozy, żelaza, obecność metabolicznie szkodliwych substancji takich jak etanol, antybiotyki, metale ciężkie, zmiany pH lub osmolarności, czy inne czynniki uszkadzające i toksyczne, a nawet infekcja wirusowa. W sytuacjach stresowych dla komórki mogą stać się jej dominującymi białkami [314, 328, 357]. Wewnątrzkomórkowa ilość niektórych białek szoku cieplnego, takich jak GroEL i DnaK, w czasie ich maksymalnej indukcji zbliża się do 20% ilości wszystkich białek w komórce [407]. Podczas inkubacji pałeczek *E. coli* w wyższej temperaturze, na przykład 50°C, w której *E. coli* nie może już normalnie funkcjonować, białka szoku termicznego są jedynymi syntetyzowanymi białkami [357].

Drobnoustroj, po wnikięciu do organizmu gospodarza, podlega natychmiastowej konfrontacji z różnymi, niekorzystnymi dla niego czynnikami [194, 195]. Mikroorganizmy pochodzące ze środowiska (z żywności, patogenny z wody) np.: pałeczki *Salmonella*, muszą natychmiast dostosować swoją fizjologię do niesprzyjających bodźców, z jakimi spotykają się w przewodzie pokarmowym gospodarza, między innymi zmianami temperatury, pH, pO₂ i innymi parametrami. Dodatkowo, mikroorganizmy poddane są konfrontacji z wysoce toksycznymi mechanizmami efektorowymi we wnętrzu makrofagów, takimi jak reaktywne związki tlenowe i azotowe, czy działaniu enzymów lizosomalnych. Odpowiedzią drobnoustrojów na działanie niesprzyjających warunków jest zwiększona synteza białek Hsp, co pozwala im przeżyć w niekorzystnym środowisku.

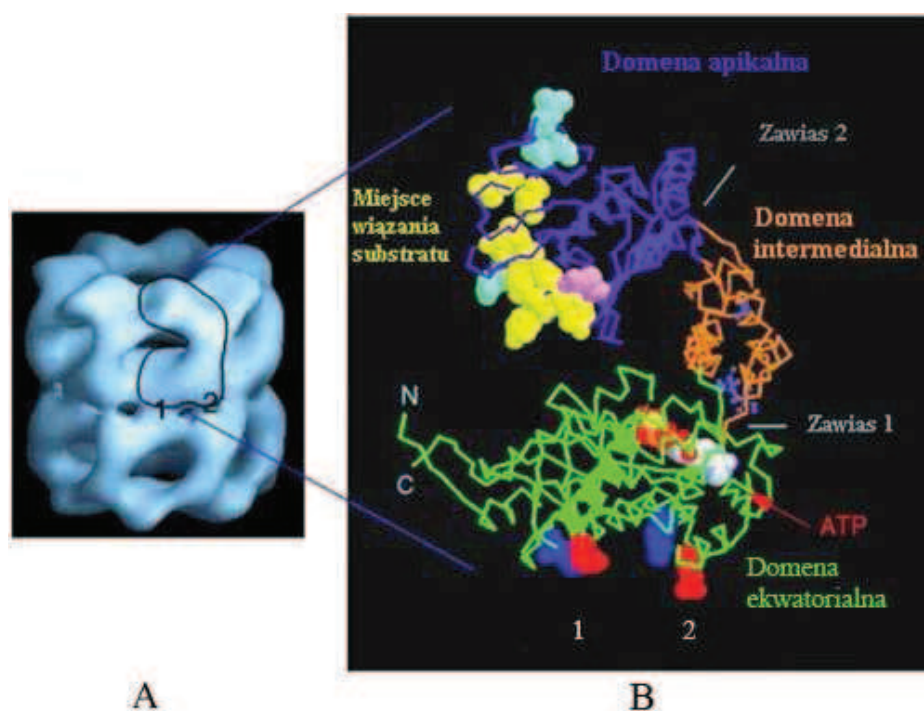
Białka szoku termicznego drobnoustrojów odgrywają ważną rolę w patogenezie chorób zakaźnych i odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Jak wynika z danych

literaturowych, białko Hsp60 szczepów zdolnych do jego transportu na powierzchnię błony cytoplazmatycznej albo na zewnątrz komórki może mieć związek z wirulencją drobnoustrojów [108, 121, 127]. Pałeczki *Salmonella* posiadają wiele czynników wirulencji, pomagających im pokonać działania obronne podejmowane przez zakażony organizm [240]. Białka szoku termicznego z rodziny białek Hsp60 wytwarzane przez *Salmonella* Typhimurium, uważa się za czynnik wirulencji tych bakterii [108]. Jak wykazały badania *in vitro*, agregacja bakterii *Salmonella* Typhimurium w jelicie, a w jej następstwie kolonizacja jelita, wydaje się zależeć od białka szoku termicznego z rodziny białek Hsp60, które wiąże się z glikoproteiną obecną w śluzie jelitowym [108, 240]. Ponadto, zgodnie z przypuszczeniem, że jedną z funkcji białek Hsp jest zapewnienie drobnoustrojom możliwości przeżycia we wnętrzu fagocytów, wykazano, iż mutanty *Salmonella* Typhimurium, defektywne w zakresie genów kodujących białka szoku termicznego, ulegały znacznie szybciej zabiciu *in vitro* przez aktywowane makrofagi niż pałeczki *S. Typhimurium* z prawidłową ekspresją genów *hsp*, nie były również wirulentne dla myszy [195]. Jak wykazano dla białka Hsp60 *Legionella pneumophila*, zjawisko to może polegać na uniemożliwieniu fuzji fagosomów z lizosomami mającej normalnie miejsce we wczesnym etapie degradacji fagocytarnej [127].

Nazwę chaperoniny użyto po raz pierwszy w odniesieniu do molekularnych chaperonów, wykazujących strukturalne podobieństwo do białka GroEL (ryc. 12) występującego u *Escherichia coli* [129]. W grupie tej znalazły się chaperony Hsp60 oraz współpracujące z niektórymi z nich białka Hsp10 [315, 322]. Białka należące do tej rodziny występują u wszystkich organizmów prokariotycznych oraz w organellach komórek eukariotycznych, takich jak: mitochondria i chloroplasty. Ze względu na różnice istniejące w regionie wiążącym substrat, klasę tych białek opiekuńczych podzielono na dwie podrodziny [37, 129, 161]. Podrodzina pierwsza – GroE – obejmuje chaperoniny odkryte w bakteryjnym cytozolu (GroEL), w matriksie mitochondrialnym (Hsp60) oraz w chloroplastach (RBP- białko wiążące rubisco, *rubisco-binding protein*). Do drugiej podrodziny należą białka TCP-1 (*t-complex polypeptide*), znane jako TriC (*TCP-1 ring complex*) lub CCT (*chaperonin containing t-complex polypeptide*), obecne w eukariotycznym cytozolu oraz u *Archaea* [37, 161, 231, 304]. Chaperoniny charakteryzuje wspólna cecha: tworzenie dwupierścieniowych kompleksów wiążących niesfałdowane substraty w centralnej komorze pierścienia, w której poprzez szereg ATP-zależnych reakcji wiązania i uwalniania polipeptydów następuje ich fałdowanie. W przypadku podrodziny GroE w procesie tym dodatkowo udział bierze jednopierścieniowe białko zbudowane z siedmiu jednakowych podjednostek o masie około 10 kDa (Hsp10) [37, 129, 161, 322, 369]. Białko GroEL występujące w cytozolu *E. coli* jest, jak dotąd, najlepiej poznanym chaperoninem.

Białka szoku termicznego klasy GroEL (z rodziny białek Hsp60), stanowią dominujący antygen, odgrywający znaczącą rolę w zakażeniach spowodowanych różnymi patogenami, np.: takimi jak *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*,

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium leprae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydia psittaci* [125, 191, 350, 363].



Ryc. 12. Białko GroEL *Escherichia coli*. (A) Struktura krystaliczna podwójnego pierścienia oraz lokalizacja indywidualnej podjednostki (58 kDa) wewnątrz oligomeru. Numerami 1 i 2 oznaczono miejsca, poprzez które poszczególne podjednostki jednego pierścienia łączą się z odpowiadającymi im podjednostkami drugiego pierścienia. (B) Schematyczny rysunek przedstawiający konformację indywidualnej podjednostki, z uwzględnieniem poszczególnych domen, łączących je zawiasów oraz miejsc wiązania odpowiednio białka GroES, substratu i nukleotydu (cząsteczka ATP widoczna w miejscu wiązania) (według [322])

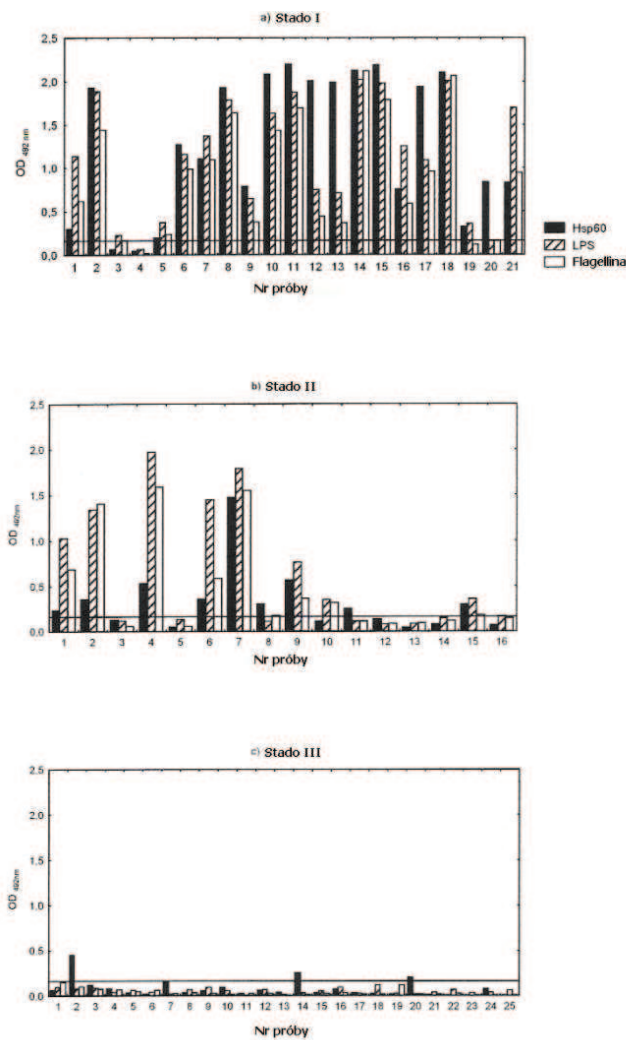
Fig. 12. *Escherichia coli* GroEL protein. (A) Crystal structure of the GroEL showing the double-ring structure and the location of an individual subunit (58 kDa) within the oligomer. The inter-ring contacts (numbered 1 and 2) are formed by the base of each subunit with its neighbours in the opposite ring. (B) Backbone structure of the outlined subunit with the three domains colour-coded: purple – the apical domain with the substrate (yellow space-filling residues) and GroES (yellow and blue residues) binding sites; orange – the intermediate domain; green – the equatorial domain with inter-ring contacts and nucleotide-binding site (ATP molecule is shown bound in that site) (according to [322])

Obecnie, niewiele wiadomo, na temat immunologicznej odpowiedzi zakażonego organizmu na białka szoku termicznego syntetyzowane przez pałeczki *Salmonella* w czasie trwania infekcji. Białka szoku termicznego z rodziny białek Hsp60, wytwarzane przez

pałeczki *Salmonella* Typhi, wykrywane zarówno we frakcji błon zewnętrznych lizatów komórek bakteryjnych, jak i w cytozolu, wywoływały silną, humoralną odpowiedź immunologiczną u pacjentów chorych na dur brzuszny [363]. Białko Hsp60 syntetyzowane przez pałeczki *Salmonella* Typhimurium wykrywano w środowisku zewnętrznym bakterii – w supernatantach; a zatem, jest ono również wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej [108]. Przeciwciała przeciwko białku Hsp60 wytwarzanemu przez *Salmonella* Typhimurium powodują, zależne od dawki, hamowanie agregacji pałeczek *Salmonella* Typhimurium przez nie oczyszczone preparaty śluzowe (*crude mucus preparations*), otrzymane z jelita świnki morskiej [108].

Dane dotyczące rozpoznania białka Hsp60 jako czynnika wirulentnego, a także dotyczące odporności organizmu na zakażenie pałeczkami *Salmonella*, są ciągle niewystarczające. Do tej pory niewiele wiadomo na temat białka Hsp60 wytwarzanego przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis i jego ewentualnej roli w procesie infekcyjnym. Pałeczki *Salmonella* Enteritidis stanowią obecnie dominującą przyczynę salmoneloz ludzi i zwierząt, zarówno w Polsce, jak i na świecie. Poważny problem zdrowotny i ekonomiczny związany z tym patogenem był podstawą do przeprowadzenia badań nad rolą białka Hsp60 w zakażeniach spowodowanych pałeczkami *Salmonella* Enteritidis. Dera-Tomaszewska i wsp. [90] wykazali, iż białko Hsp60 tych bakterii jest silnie immunogenne. Wywołuje znaczną odpowiedź immunologiczną gospodarza w przebiegu infekcji, porównywalną z odpowiedzią na LPS i flagellinę – antygeny pełniące znamienne rolę w zakażeniach bakteriami *Salmonella*. W żółtkach jaj kur naturalnie zakażonych pałeczkami *S. Enteritidis* zaobserwowano, w ostrej fazie zakażenia, obecność przeciwciał specyficznych dla białka Hsp60 w ilościach odpowiadających poziomowi przeciwciał dla LPS i flagelliny (ryc. 13).

Jaja do przeprowadzonych badań pochodziły z trzech stad kur niosek z wybranych ferm województwa pomorskiego objętych monitoringiem bakteriologicznym w kierunku obecności *S. Enteritidis*. Określenie poziomów specyficznych przeciwciał w żółtkach jaj przeprowadzono z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego ELISA. Jaja pochodzące z dwóch stad kur niosek naturalnie zakażonych *S. Enteritidis* (stado I – ostra faza zakażenia, stado II – sporadyczne wydalanie bakterii) oraz stada kontrolnego (III) badano w kierunku obecności przeciwciał żółtkowych (IgY) dla Hsp60, LPS i flagelliny. W przypadku stada III stwierdzono niskie stężenia IgY. Podwyższone poziomy przeciwciał specyficznych dla wszystkich badanych antygenów wykryto w jajach pochodzących z dwóch zakażonych stad, przy czym szczególnie wysokie poziomy stwierdzono w jajach pochodzących ze stada I. Największą różnicę między stadami I (ostre objawy salmonelozy) i II (bezobjawowe nosicielstwo) w poziomach specyficznych IgY odnotowano dla przeciwciał anty-Hsp60.



Ryc. 13. Poziom przeciwciał IgY specyficznych dla Hsp60, LPS i flagelliny bakterii *S. Enteritidis* w żółtkach jaj kur naturalnie zakażonych (a – ostra faza zakażenia, b – sporadyczne wydalenie bakterii) i kur zdrowych (c), badany w teście ELISA. Linie poziome wyznaczają wartość graniczną (odcięcia) rozdzielającą wyniki dodatnie od wyników uznanych za ujemne [90]

Fig. 13. The levels of antibodies against S. Enteritidis Hsp60, LPS and flagellin detected by ELISA in the egg yolks of infected (a – outbreak of acute infection, b – occasional bacteria excretion) and control (c) hens. Vertical lines indicate the positive/negative cut-off value [90]

Uzyskane wyniki wskazują na potencjalnie ważną rolę białka Hsp60 w patogenezie procesów infekcyjnych i odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu [90]. Przeciwciała anti-Hsp60 pozostają w ścisłej korelacji ze stopniem zakażenia kur. Ich

obecność nie tylko wskazuje na aktualnie występującą infekcję, ale może być również wskaźnikiem przebytego zakażenia i sporadycznego wydalania pałeczek *S. Enteritidis*.

Zjawisko mimikry molekularnej polega na występowaniu homologii strukturalnej, serologicznej lub biologicznej pomiędzy antygenami mikroorganizmu a antygenami obecnymi u gospodarza. Mechanizmy autoimmunizacyjne leżą u podstaw wielu chorób narządowo swoistych i układowych. W patogenezie chorób autoimmunizacyjnych istotną rolę przypisuje się czynnikom genetycznym, czy środowiskowym, jednak istotna w rozwoju wielu chorób jest również reakcja krzyżowa bakteria-gospodarz [46]. Związek pomiędzy mimikrą molekularną a rozwojem choroby autoimmunizacyjnej odkryto na początku lat osiemdziesiątych XX wieku [123]. Bakteryjne białka Hsp homologiczne z sekwencją aminokwasową ludzkich białek szoku termicznego mogą być źródłem wielu immunologicznych reakcji krzyżowych sprzyjających chorobom o podłożu autoimmunizacyjnym [58, 167, 313, 329, 419, 420]. Wiele prac naukowych wskazuje na związek pomiędzy niektórymi chorobami a pewnymi bakteryjnymi zakażeniami. W przebiegu infekcji bakteryjnej, powstające przeciwciała anty-Hsp oraz limfocyty T uczulone na bakteryjne białko Hsp, mogą zwrócić się przeciwko autologicznemu białku szoku termicznego gospodarza.

W odporności na zakażenia biorą również udział dwa typy „nieswoistych” limfocytów T najprawdopodobniej pochodzenia pozagasiczego – $T \gamma\delta^+$ i podwójnie negatywne ($CD4^-$, $CD8^-$) limfocyty $T \alpha\beta^+$ [125, 314]. Limfocyty te związane są głównie ze śluzówkami i na określonej śluzówce reprezentują jeden lub ograniczoną ilość typów receptora. Wśród rozpoznawanych przez nie antygenów są białka Hsp, zarówno zakażonych komórek śluzówki, jak i bakterii. W przypadku Hsp najprawdopodobniej istnieją naturalne komórki pamięci, tak że odpowiedź jest bardzo szybka. Wykazanie ewentualnej homologii bakteryjnego białka Hsp60 *Salmonella* Enteritidis oraz ludzkiego białka Hsp60 wydaje się być ważnym celem poznawczym. Badania przeprowadzone z zastosowaniem siedmiu syntetycznych fragmentów ludzkiego białka Hsp60 miały na celu określenie podobieństwa immunologicznego i ewentualnych rejonów podobieństwa molekularnego pomiędzy tymi białkami. Uzyskane wyniki, przedstawione w ramach niniejszej pracy, stanowią ważny wkład w badania nad białkami szoku termicznego. Generują także wartą zainteresowania hipotezę istnienia możliwości wystąpienia immunologicznych reakcji krzyżowych pomiędzy białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* a jego ludzkim homologiem, indukowanych w przebiegu zakażenia pałeczkami *S. Enteritidis*, które mogłyby stanowić również istotną komponentę w procesach patogenetycznych innych chorób.

2. CELE PRACY

Założenia pracy

Pierwszym zadaniem programu zapobiegania chorobom zakaźnym oraz ich zwalczania jest stworzenie sprawnie działającego systemu informacji dotyczącej rozmieszczenia tych chorób, częstości ich występowania oraz dynamiki zmian epidemiologicznych w poszczególnych krajach, regionach i w skali światowej. Dla wypełnienia tego zadania stworzono system informacji epidemiologicznej, zwany epidemiologicznym nadzorem. W Polsce, w ramach ochrony zdrowia oraz zwalczania chorób zakaźnych, obowiązkiem monitorowania objęta jest również salmoneloza i jej czynniki chorobotwórcze. Liczby rejestrowanych przypadków zakażeń *Salmonella* przedstawia się zwykle w postaci pewnych stałych współczynników, często ogólnie dostępnych w różnych bazach danych, pozwalających oszacować faktyczną sytuację epidemiologiczną. Założeniem niniejszej pracy była chęć przedstawienia zakażeń *Salmonella* w Polsce w sposób mniej konwencjonalny (pozwalający na uzyskanie unikalnych danych epidemiologicznych), poprzez prezentację wszystkich typów serologicznych pałeczek *Salmonella* (w tym nowo pojawiających się w kraju), ze szczególnym uwzględnieniem *Salmonella* Enteritidis. Serowar ten, stanowiący ze względu na pandemiczny charakter ekspansji swoistego rodzaju fenomen na skalę światową, zostanie zaprezentowany poprzez liczbę zakażeń, typy bakteriofagowe oraz jeden z jego czynników chorobotwórczych, jakim w wyniku podjętych badań naukowych (niezbędnych dla należytego postępu we wszystkich dziedzinach ochrony zdrowia), okazało się być białko szoku termicznego Hsp60. Przy formułowaniu celów pracy wzięto również pod uwagę fakt obowiązku monitorowania salmonelozy na każdym szczeblu nadzoru, prowadzonego również przez Krajowy Ośrodek *Salmonella*, co stanowiło podstawę przeprowadzonych badań. Nadzór epidemiologiczny oparty na wynikach rutynowych badań prowadzonych w różnych laboratoriach (*laboratory-based surveillance*) dostarcza informacji pozwalających na ocenę aktualnej sytuacji epidemiologicznej, informacji niezbędnych do podejmowania odpowiednich akcji przeciwepidemicznych oraz dla planowania zapobieganiu chorobom i ich zwalczanie. Obowiązek monitorowania obejmuje także zbieranie, przechowywanie, analizowanie, opracowywanie i rozpowszechnianie danych dotyczących występowania salmonelozy i jej czynników chorobotwórczych, w szeroko pojętym zakresie takich działań, których wynikiem, między innymi, jest również niniejsza praca.

Celem pracy było:

1. Opracowanie i zestawienie danych epidemiologicznych dotyczących występowania pałeczek *Salmonella*, na podstawie badań prowadzonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1995 – 2007.

-
2. Przedstawienie nowych serowarów *Salmonella*, które pojawiły się w Polsce po raz pierwszy w latach 1995 – 2007.
 3. Przedstawienie wyników badań prowadzonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella* na tle sytuacji epidemiologicznej *Salmonella* w Polsce, 1995 – 2007.
 4. Opracowanie sytuacji epidemiologicznej występowania serowarów *Salmonella* w Polsce latach 1957 – 2007, ze szczególnym uwzględnieniem pałeczek *Salmonella* Enteritidis.
 5. Określenie podobieństwa immunologicznego i ewentualnych rejonów podobieństwa molekularnego pomiędzy białkiem szoku termicznego Hsp60 bakterii *Salmonella* Enteritidis (będącym czynnikiem wirulencji tych bakterii) i ludzkim białkiem Hsp60 oraz ocena wynikających z tego konsekwencji.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. TYPOWANIE BIOCHEMICZNE I SEROLOGICZNE

3.1.1. Szczepy bakteryjne

Przedmiotem badań było 2038 szczepów *Salmonella* wyizolowanych w Polsce w latach 1995 – 2007, trudnych do identyfikacji, otrzymywanych przez Krajowy Ośrodek *Salmonella* w ramach prowadzonych badań referencyjnych. Szczepy pochodziły z terenu całego kraju; nadesłane przez stacje sanitarno-epidemiologiczne, zakłady higieny weterynaryjnej, laboratoria przyszpitalne, prywatne laboratoria służby zdrowia i weterynaryjne i inne. Dziewięćset siedemdziesiąt dwa spośród nich wyizolowano od ludzi; 254 szczepy pochodziły z żywności; 678 szczepów wyizolowano od zwierząt, z pasz i z innych źródeł; 134 szczepy – z materiałów nieznanego pochodzenia. Badania prowadzono sukcesywnie, w miarę napływania szczepów *Salmonella*, które do momentu przeprowadzenia badań, przechowywano na podłożu agarowym, w szczelnie zamkniętych próbkach, w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła (zgodnie z zaleceniem WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* odnośnie przechowywania szczepów *Salmonella* w klimacie umiarkowanym). Badanie referencyjne szczepów *Salmonella* prowadzono w oparciu o standardowe metody identyfikacji biochemicznej i serologicznej [105].

3.1.2. Hodowla szczepów

Wszystkie badania biochemiczne i serologiczne prowadzono w oparciu o „czyste”, 24-godzinne hodowle na podłożu agarowym. Materiał do badania cech biochemicznych oraz określania antygenów somatycznych stanowiły hodowle na stałym podłożu agarowym (1,5% agar odżywczy zawierający ekstrakt mięsny, pepton, chlorek sodu oraz agar). Antygeny rzęskowe oznaczano w oparciu o hodowle rosnące na podłożu Garda (0,75% agar odżywczy, tzw. agar miękki); badaniu serologicznemu poddawano obwodowe obszary hodowli uzyskiwanych na płytkach w wyniku dokonywanego uprzednio punktowego posiewu materiału bakteryjnego odpowiednio w centrum każdej płytki. W celu wzbudzenia bardziej efektywnej produkcji rzęsek u szczepów nieznacznie urzęsionych (sprawiających trudności w identyfikacji antygenów H) i uzyskania lepiej rozwiniętego elementu rzęskowego, bakterie posiewano na podłożu Edwards Motility Medium (EMM) – półpłynne, 0,3% podłoże agarowe z żelatyną (ekstrakt mięsny, pepton, żelatyna, agar), z którego po 24-godzinnej inkubacji w 37°C dokonywano przesiewu na podłoże Garda w celu przeprowadzenia ponownej analizy antygenowej. Dodając do podłoża Garda surowicę skierowaną przeciw elementowi rzęskowemu jednej fazy, można badany

szczep przeprowadzić w fazę drugą (*phase inversion*). W przypadku szczepów dwufazowych, prezentujących w chwili badania antygeny rzęskowe tylko jednej z faz (pierwszej lub drugiej), brakującą fazę indukowano przez zahamowanie fazy dominującej poprzez hodowlę szczepu jednofazowego na podłożu Garda z domieszką surowicy zawierającej przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi fazy dominującej.

3.1.3. Testy biochemiczne

Właściwości biochemiczne potwierdzające przynależność badanych bakterii do rodzaju *Salmonella* oraz pozwalające na określenie przynależności odpowiednio do gatunku lub podgatunku, sprawdzano przy pomocy testów biochemicznych (tzw. szeregow izolacyjnych i różnicujących), przygotowywanych we własnym zakresie, według receptur i technik opracowanych przez PZH [413]. Różnicowanie biochemiczne wykonywano tylko w odniesieniu do rzeczywiście „czystych” hodowli bakteryjnych. W przypadku podejrzenia o zanieczyszczenie, hodowlę rozsiewano na odpowiednim podłożu wybiórczo-różnicującym i dokonywano ponownej izolacji. W podłożach płynnych zawierających odpowiedni substrat (cukier lub alkohol), badano między innymi zdolność do rozkładania (z wytworzeniem gazu lub bezgazowo) laktozy, glukozy, sacharozy, mannitolu i maltozy oraz fermentację salicyny, arabinozy, dulcytolu, inozytolu, ramnozy, trehalozy i ksylozy. Zdolność do fermentacji glukozy, laktozy i wytwarzania H₂S testowano na podłożu Kliglera. Na podłożu cytrynianowo-amonowym według Simmons badał możliwość wykorzystywania cytrynianu sodu i fosforanu amonu, odpowiednio jako jedyne źródła węgla i azotu. Istotną cechą biochemicznej identyfikacji była także zdolność badanych bakterii do wytwarzania indolu, degradacji mocznika, zużycia malonianu, mucynianu i d-winianu sodowo-potasowego, zdolność do dekarboksylacji lizyny, rozrzedzania żelatyny, wytwarzania β-galaktozydazy oraz wrażliwość na działanie faga O1. Zachowanie się badanych szczepów po posianiu na szeregi biochemiczne oceniano po 18 – 24h inkubacji w temperaturze 37°C, z wyjątkiem cech, których ujawnienie się wymagało inkubacji przedłużonej w czasie i/lub w innej temperaturze. Rozszerzonego zakresu badań biochemicznych wymagał szczep prezentujący zupełnie nowy typ serologiczny, nie występujący do tej pory na świecie, którego ostatecznej identyfikacji dokonano we współpracy z WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (Instytut Pasteur, Paryż, Francja), Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA) i Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg, Niemcy). W wyniku wspólnych badań przeprowadzonych we wszystkich laboratoriach uczestniczących w jego identyfikacji, oprócz wyżej wymienionych cech biochemicznych, dodatkowo przetestowano jego zdolność do metabolizmu adonitolu, sorbitolu, sorbozy, rafinozy, mannozy, celobiozy, melobiozy i glicerolu, zdolność rozkładania galakturonianu oraz zdol-

ność wytwarzania dekarboksylazy ornityny, dezaminazy tryptofanu, dihydrolazy argininy, nitratazy, γ -glutamyltransferazy i β -glukuronidazy.

3.1.4. Surowice diagnostyczne do identyfikacji serologicznej bakterii *Salmonella*

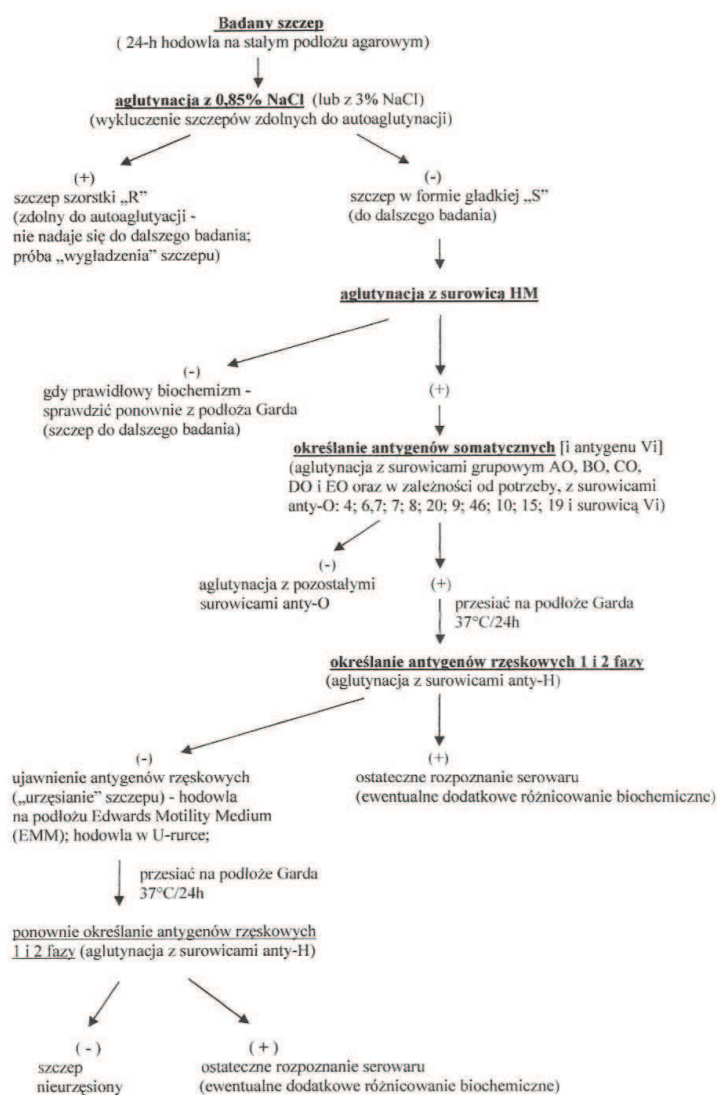
Serologiczną identyfikację szczepów przeprowadzano za pomocą odczynu aglutynacji szkiełkowej, przy użyciu poliwalentnych i monowalentnych, surowic diagnostycznych *Salmonella* anty-O i anty-H (króliczych surowic odpornościowych), wytwarzanych w Krajowym Ośrodku *Salmonella* (1995 – 1999), a także surowic komercyjnych (2000 – 2007) produkcji Zakładu Badawczo-Wdrożeniowego „IMMUNOLAB” Sp. z o. o. (Gdynia, Polska) oraz Statens Serum Institut (Kopenhaga, Dania). Typy serologiczne określano w oparciu o zmodyfikowany schemat Kauffmanna-White’a (obecnie zwany schematem White’a-Kauffmanna-Le Minora) [308, 309, 149].

3.1.5. Aglutynacja szkiełkowa

Aglutynacja szkiełkowa jest to szybki test, w którym wynik, obserwowany gołym okiem lub przy pomocy lupy, odczytuje się po upływie 30 sekund. Odczyn aglutynacji szkiełkowej wykonywano w następujący sposób. Na czystym szkiełku podstawowym umieszczano niewielką kroplę 0,85% roztworu NaCl lub odpowiedniej surowicy rozpoznawczej. Eżę nabierano małą ilość badanej hodowli i przenoszono na szkiełko podstawowe, pozostawiając tuż przy każdej kropli niewielką ilość masy bakteryjnej. Następnie, za każdym razem opalając eżę, rozcierano kolejno w każdej kropli masę bakteryjną aż do uzyskania jednolitej zawiesiny. Przed odczytaniem wyniku, poruszano szkiełkiem w sposób umożliwiający krążenie płynu w poszczególnych kroplach. Wszystkie krople obserwowano przy pomocy lupy (6 \times), na ciemnym tle, przy dodatkowym oświetleniu. Przy odczytywaniu wyniku zwracano uwagę na wystąpienie kłaczków względnie ziarnistości i na mniejszą lub większą przejrzystość płynu. W wyniku uwzględniano intensywność odczynu oceniając go przy pomocy znaku + lub jego wielokrotności (+, ++, +++). Odczyn aglutynacji szkiełkowej o intensywności ++ i +++ przyjmowano za wynik dodatni.

3.1.6. Schemat typowania serologicznego szczepów *Salmonella*

Oznaczenie serologiczne badanych szczepów *Salmonella* pozwalające na ostateczne rozpoznanie serowarów przeprowadzono według schematu przedstawionego na rycinie 14.



Ryc. 14. Schemat typowania serologicznego szczepów bakteryjnych podejrzanych o przynależność do rodzaju *Salmonella*

Fig. 14. Scheme of serological identification of bacterial strains suspected to be members of genus *Salmonella*

3.2. TYPOWANIE BAKTERIOFAGOWE

3.2.1. Szczepy bakteryjne

Typowaniu bakteriofagowemu poddano 750 szczepów *Salmonella* Enteritidis wyizolowanych w laboratoriach całego kraju w latach 1996 – 2007. Czterysta dziewięćdziesiąt osiem szczepów wyhodowano od osób (chorych, ozdrowieńców, zdrowych, ze styczności) z ognisk zatruc pokarmowych i sporadycznych przypadków zakażeń, 236 szczepów wyosobniono od zwierząt, z żywności, pasz, otoczenia i z innych źródeł. Pochodzenie 16 szczepów było nieznane. Sprawdzone „czystość” otrzymanych szczepów oraz określono ich właściwości biochemiczne i serologiczne. Szczepy *Salmonella*, do momentu przeprowadzenia badań, przechowywano na podłożu agarowym, w szczelnie zamkniętych probówkach, w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła.

3.2.2. Podłoża do typowania bakteriofagowego

Do typowania bakteriofagowego używano podłoży Difco Laboratories (Detroit, USA). Każdy szczep poddawany typowaniu namnażano najpierw w 5 ml płynnego podłoża namnażającego (2% Difco Nutrient Broth w wodzie destylowanej z dodatkiem 0,85% NaCl) do momentu otrzymania wyraźnego zmętnienia (37°C/2-2,5 h), uzyskując miano $\sim 5 \times 10^8$ jtk/ml. Następnie hodowlę szczepu kontynuowano na płytkach Petri’ego ze stałym podłożem agarowym (płynne podłoże namnażające z dodatkiem 1,5% Difco Bacto Agar). Zamknięte płytki, ze świeżo wylanym podłożem agarowym (30ml na płytkę o średnicy 9 cm), pozostawiano w temperaturze 37°C przez 2 – 4 h, w celu wysuszenia podłoża, a następnie tuż przed użyciem dosuszano, pozostawiając otwarte płytki w temperaturze 37°C przez 1,5 h.

3.2.3. Zestaw bakteriofagów typujących

Stosowany w Polsce zestaw preparatów służących do typowania fagowego pałeczek *Salmonella* Enteritidis składa się z 8 bakteriofagów. Fagi te są namnażane w Krajowym Ośrodku *Salmonella* zgodnie z metodą Adamsa [1]. Przechowywane są w postaci stężonych preparatów, z których następnie przygotowuje się odpowiednie rozcieńczenia (RTD, *routine test dilution*) służące bezpośrednio do typowania. Rozcieńczenie RTD oznacza najwyższe rozcieńczenie preparatu fagowego pozwalające uzyskać całkowitą lub prawie całkowitą lizę ze szczepem homologicznym.

3.2.4. Metoda typowania bakteriofagowego

Szczepy *Salmonella* Enteritidis poddawano typowaniu bakteriofagowemu (sukcesywnie, w miarę napływania szczepów) według metody i techniki Craigie i wsp. [71, 72, 73], powszechnie stosowanej w międzynarodowych i krajowych ośrodkach typowania bakteriofagowego, opisaną dokładnie w pracy Głońskiej i Dera-Tomaszewskiej [136]. Technicznie typowanie bakteriofagowe wykonywano w następujący sposób. Płynną hodowlę szczepu poddanego typowaniu wylewano na płytkę ze stałym podłożem agarowym. Po dokładnym rozprowadzeniu po powierzchni podłoża, nadmiar hodowli zbierano pipetą, pozostawiając wieczko płytki lekko uchylone, umożliwiając jej szybkie wyschnięcie. Tak przygotowana hodowla na podłożu stałym pozwala na otrzymanie jednolitej murawy bakteryjnej na powierzchni płytki po okresie inkubacji. Następnie, na powierzchnię podłoża z hodowlą наносono w postaci kropli odpowiednio rozcieńczone (RTD) preparaty bakteriofagowe przy pomocy wykalibrowanej (~0,01 ml) ezy platynowej. Po wyschnięciu wszystkich kropli, płytki zamykano i inkubowano w pozycji odwróconej (37°C/24 h). Efekt lizy obserwowano po okresie inkubacji oglądając płytki (od spodu, po uprzednim zdjęciu wieczka) przy pomocy lupy (10×), z wykorzystaniem dodatkowego oświetlenia. Stopień lizy oznaczano za pomocą symboli używanych w International Reference Laboratory for Enteric Phage Typing (Londyn), stosowanych również w polskim schemacie typowania *Salmonella* Enteritidis (CL = całkowita liza, <CL = mniej niż całkowita liza, SCL = prawie całkowita liza, <SCL = mniej niż prawie całkowita liza, OL = mętna liza, ±, +, ++, +++ = wzrastająca liczba łysinek, – = brak lizy). Typy bakteriofagowe badanych szczepów *Salmonella* Enteritidis określano zgodnie ze stosowanym w Polsce schematem Lalko i wsp. [222].

3.3. DANE EPIDEMIOLOGICZNE O ZAKAŻENIACH *SALMONELLA* W POLSCE

Dane epidemiologiczne służące do opracowań prezentowanych w niniejszej pracy pochodziły z różnych źródeł. Szczegółowy ich wykaz przedstawiono w tabeli 14. Zgromadzone dane epidemiologiczne, uzupełnione wynikami badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, zostaną przedstawione w postaci opracowań (tabel, wykresów, schematów, diagramów) ilustrujących:

1. materiały diagnostyczne pochodzące od ludzi i z innych źródeł, z których izolowano pałeczki *Salmonella*, Polska 1995 – 2007
2. szczegółową charakterystykę i analizę epidemiologiczną szczepów *Salmonella* prezentujących 52 serowary wyizolowane po raz pierwszy w Polsce w latach 1995 – 2007

3. liczbę osób ogółem oraz osób chorych i zdrowych, u których wykryto zakażenia *Salmonella*, z uwzględnieniem najczęściej izolowanych serowarów, Polska, 1995 – 2007
4. typy bakteriofagowe *S. Enteritidis* (wg schematu Lalko i wsp.) występujące w Polsce, 1970 – 2007
5. liczbę zakażeń *S. Enteritidis* u ludzi w Polsce (i zakażeń pozostałymi serowarami) na tle ogólnej liczby zakażeń *Salmonella*, 1946 – 2007
6. dystrybucję dominujących serowarów *Salmonella* izolowanych od ludzi w Polsce w kolejnych latach od 1957 do 2007 roku (ze szczególnym uwzględnieniem pozycji zajmowanej przez pałeczki *S. Enteritidis*)
7. serowary *Salmonella* wyizolowane w Polsce od ludzi i z innych źródeł, określone w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1957 – 2007, z uwzględnieniem:
 - a. grup serologicznych i liczby serowarów w obrębie każdej grupy
 - b. procentowego udziału serowarów z poszczególnych grup serologicznych
8. wzory antygenowe wszystkich wariantów serologicznych *Salmonella* rozpoznanych do tej pory w Polsce (1957 – 2007), określonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella*, opracowane na podstawie najnowszej edycji schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora.

Tabela 14. Zestawienie źródeł danych epidemiologicznych wykorzystanych w pracy
 Table 14. Origin of epidemiological data presented in the paper

Przedmiot danych <i>Subject of data</i>	Rok <i>Year</i>	Źródło danych <i>Source of data</i>
źródło izolacji szczepów; rodzaj materiału diagnostycznego; wywiady epidemiologiczne (szczególnie dokładne w przypadku określenia serowarów niezwykle rzadko lub po raz pierwszy występujących w Polsce)	1995 – 2007	informacje towarzyszące otrzymanym do badania szczepom pochodzące ze stacji sanitarno-epidemiologicznych, laboratoriów weterynaryjnych, laboratoriów przyszpitalnych i innych laboratoriów służby zdrowia, laboratoriów zakładów produkcyjnych i innych; archiwa terenowych laboratoriów i niektórych szpitali (możliwość uzyskania szczegółowych informacji uzupełniających dane KOS)
liczba zakażeń <i>S. Enteritidis</i> (i innymi serowarami) u ludzi w Polsce na tle ogólnej liczby zakażeń <i>Salmonella</i> oraz dystrybucja serowarów <i>Salmonella</i> dominujących wśród zakażeń u ludzi w kolejnych latach	1946 – 1956	materiały archiwalne KOS; opublikowane dane KOS [43, 44]
	1957 – 1966	materiały archiwalne KOS; niepublikowane dane KOS; opublikowane dane KOS [306]
	1967 – 1978	opublikowane dane opracowane w KOS [83, 84]
	1982 – 1985	Raporty PZH (na podstawie sprawozdań WSSE); WHO <i>Salmonella</i> Surveillance Reports [404]
	1986 – 1998	Biuletyny roczne PZH i MZiOs: Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce [289, 290, 291]
	1999 – 2007	Biuletyny roczne PZH i GIS, NIZP-PZH i GIS: Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce [274, 292, 293]
typy bakteriofagowe <i>S. Enteritidis</i> (wg schematu Lalko i wsp.) występujące w Polsce	1970 – 1975	materiały archiwalne KOS; opublikowane dane KOS [221, 222]
	1981 – 1990	materiały archiwalne KOS; opublikowane dane KOS [132]
	1986 – 1995	materiały archiwalne KOS; opublikowane dane KOS [88, 135]
liczba osób, u których wykryto zakażenia <i>Salmonella</i> , z uwzględnieniem serowarów najczęściej izolowanych od ludzi w Polsce oraz liczba osób chorych i zdrowych zakażonych pałeczkami <i>Salmonella</i> z uwzględnieniem 15 serowarów dominujących w poszczególnych latach	1995 – 1998	Biuletyny roczne PZH i MZiOs: Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce [291]
	1999 – 2007	Biuletyny roczne PZH i GIS, NIZP-PZH i GIS: Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce [274, 292, 293]
serowary <i>Salmonella</i> wyizolowane w Polsce, określone w KOS	1946 – 1994	materiały archiwalne i niepublikowane dane KOS; wyniki badań prowadzonych we współpracy z WHO Collaborating Centre for Reference and Research on <i>Salmonella</i> ; opublikowane dane KOS [43, 44, 84, 133, 306]

3.4. ANALIZA STATYSTYCZNA EPIDEMIOLOGICZNYCH WSKAŹNIKÓW ZAKAŻEŃ *SALMONELLA* U LUDZI W POLSCE W LATACH 1995 – 2007

Dane o zakażeniach pałeczkami *Salmonella* u ludzi w Polsce w okresie od 1995 do 2007 roku, przedstawione w postaci współczynników wyrażających stosunek liczby wszystkich potwierdzonych przypadków zakażeń *Salmonella* (ogółem oraz zakażeń spowodowanych przez kilka wybranych serowarów) do liczby ludności w danym roku, w przeliczeniu na 100 tysięcy mieszkańców, poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu trzech różnych testów: testu chi-kwadrat dla trendu [65], testu t-Studenta dla trendu liniowego [19] i regresji Poissona [122, 275]. W każdym teście weryfikowano następujący zestaw hipotez:

$$H_0 : \beta = 0$$

$$H_1 : \beta \neq 0$$

gdzie β oznacza współczynnik regresji (bądź trendu) w odpowiedniej dla danego testu funkcji regresji.

Hipoteza zerowa mówi o tym, że współczynnik ten nie jest istotnie różny od zera, a zatem, że nie występuje statystycznie istotny trend wzrostowy bądź spadkowy. W hipotezie alternatywnej natomiast stwierdza się, że współczynnik jest statystycznie istotnie różny od zera, a zatem występuje statystycznie istotny trend spadkowy (przy współczynniku ujemnym) lub wzrostowy (przy współczynniku dodatnim). Dla każdego testu przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Poziom istotności oznacza prawdopodobieństwo popełnienia błędu pierwszego rodzaju, polegającego na odrzuceniu hipotezy zerowej gdy jest ona prawdziwa. Tendencja zwykła/spadkowa zostanie uznana za znamienne jeżeli wykaże cechy istotności statystycznej dla wszystkich trzech testów ($p < \alpha$). Wszystkie obliczenia wykonano z wykorzystaniem programu Excel (test chi-kwadrat dla trendu; trend liniowy) i programu Gretl (regresja Poissona). Gretl jest otwartym programem ekonometrycznym udostępnianym na warunkach Powszechnej Licencji Publicznej GNU (*GNU General Public License*) [139].

Dane dotyczące liczb potwierdzonych przypadków zakażeń *Salmonella* (ogółem i dla wybranych serowarów) w kolejnych latach pochodziły z biuletynów rocznych „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce”, wydanych przez PZH i MZiOS (1995 – 1998) oraz PZH i GIS (1999 – 2007) [274, 291, 292, 293]. Wybrano dane uwzględniające zarówno serowary pałeczek *Salmonella* najczęściej izolowane u ludzi w Polsce, jak i liczbę osób u których wykryto zakażenia (dane Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH opracowane na podstawie zestawień obejmujących szczepy pałeczek *Salmonella* izolowane w laboratoriach stacji sanitarno-epidemiologicznych oraz nadesłane do WSSE z innych laboratoriów w celu identyfikacji). Są one również zamieszczane w ogólnie dostępnych, światowych bazach danych

(np.: WHO Global Salm-Surv Country Databank) i traktowane przez ich użytkowników jako reprezentatywne dla Polski. Dane na temat wielkości populacji w poszczególnych latach (ludność wg faktycznego miejsca zamieszkania w danym roku – stan w dniu 30.VI. każdego roku) pochodziły z opracowań statystycznych wydawanych przez Główny Urząd Statystyczny (GUS) [138].

3.5. OKREŚLANIE PODOBIEŃSTWA IMMUNOLOGICZNEGO I MOLEKULARNEGO POMIĘDZY BIAŁKIEM HSP60 BAKTERII *S. ENTERITIDIS* I LUDZKIM BIAŁKIEM HSP60

3.5.1. Otrzymywanie endogennego białka Hsp60 *Salmonella* Enteritidis

Metodę izolacji i oczyszczania endogennego białka Hsp60 bakterii *Salmonella* Enteritidis, przedstawioną po raz pierwszy na Międzynarodowej Konferencji „Infectious Immunity & Vaccines” w 2000 roku [409], opisano dokładnie w publikacji Dera-Tomaszewskiej i wsp. [90]. Technicznie izolację i oczyszczanie białka wykonywano w następujący sposób:

3.5.1.1. Szczep bakteryjny

Do uzyskania endogennego białka Hsp60 wybrano szczep KOS 1663 *Salmonella* Enteritidis należący do Kolekcji Krajowego Ośrodka *Salmonella*. Szczep pochodził z ogniska zatrucia pokarmowego i prezentował typ bakteriofagowy 1 (według schematu Lalko). Wyizolowany z produktu spożywczego (zupa „Niespodzianka”) uznanego za bezpośrednią przyczynę zakażenia.

3.5.1.2. Hodowla bakterii

Bulionową hodowlę *Salmonella* Enteritidis posiano na płytce z 1,5% podłożem agarowym (Difco Bacto Nutrient Agar). Po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C bakterie zmyto 0,85% roztworem NaCl i poddano działaniu podwyższonej temperatury (stworzenie warunków szoku termicznego) w łaźni wodnej z wytrząsaniem (50°C/30min) w celu uzyskania wzmożonej produkcji białka Hsp60.

3.5.1.3. Liza komórek bakteryjnych

Po okresie inkubacji w temperaturze 50°C hodowlę bakteryjną odwirowano (3000×g/30 min/4°C). Otrzymany osad bakteryjny zawieszono w buforze lizującym Laemmli [0,0625 M Tris-HCl (pH 6,8), 3% siarczan 1-dodecylosodowy (SDS), 10% gliceryna, 5% 2-merkaptoetanol] w celu zniszczenia osłon komórkowych oraz poddano sonifikacji. Następnie lizat bakteryjny odwirowano (8000×g/10 min/4°C). Otrzymany supernatant poddano dializie względem wody destylowanej.

3.5.1.4. Precypitacja białek bakteryjnych

Wydializowany supernatant poddano wysalaniu nasyconym roztworem siarczanu (VI) amonu [(NH₂)₂SO₄] o końcowym stopniu nasycenia 20% i odwirowano (11000×g/1 h/4°C). Supernatant ponownie poddano wysoleniu o końcowym stopniu nasycenia 35% i odwirowano (11000×g/1 h/4°C). Otrzymany osad zawieszono w buforze (0,05 M Tris-HCl, pH 8,0) i poddano dalszym etapom oczyszczania.

3.5.1.5. Oczyszczanie białka z zastosowaniem złoża Sepharose 4B

Dalsze oczyszczanie białka wymagało wstępnego przygotowania złoża Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Szwecja) według zaleceń producenta. Złoże upakowano do kolumny i przepłukano buforem (0,05 M Tris-HCl, pH 8,0). Po 5-krotnym przepuszczeniu oddializowanej i odwirowanej frakcji lizatu przez kolumnę przeprowadzono elucję (gradient liniowy 0 – 0,1 M NaCl w 0,05 M Tris-HCl o pH 8,0). Zebrane frakcje przeanalizowano pod względem zawartości białka Hsp60 *Salmonella* Enteritidis metodą elektroforezy w 10% żelu poliakrylamidowym (PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis*) w obecności SDS (SDS-PAGE). Frakcje, w których stwierdzono obecność białka i najmniej „zanieczyszczeń” posłużyły do otrzymywania czystego Hsp60 *S. Enteritidis* metodą elucji preparatywnej według Szewczyka i Summers'a [359].

3.5.1.6. Elucja preparatywna białka Hsp60 *S. Enteritidis*

W tym celu dokonano rozdziału wybranej frakcji w 10% żelu poliakrylamidowym z SDS w obecności wzorców masowych (High Molecular Weight Range MW 36 – 205 kDa, Sigma-Aldrich, USA) i wzorcowego białka GroEL *E. coli* (SPP-610, Sressgen, Kanada). Następnie przeprowadzono elektrotransfer z żelu poliakrylamidowego na błonę PVDF (*polyvinylidene difluoride membrane*) o nazwie handlowej Immobilon-P (Millipore Corpo-

ration, Bedford, MA, USA). Błona ta ma zdolność do trwałego, niespecyficznego wiązania białek, innego niż na nitrocelulozie. Jeśli replika żelu poliakrylamidowego zostanie wykonana na Immobilonie, to warunki elucji białek są znacznie łagodniejsze. Przed użyciem, błonę PVDF aktywowano przez zanurzenie w 100% metanolu (1min), a następnie w buforze do transferu. Elektrotransfer prowadzono przy 18 V przez noc w buforze do transferu Tris-glicyna (25 mM Tris, 192 mM glicyna, pH 8,3). Po transferze, membranę barwiono roztworem do barwienia białek [0,5% Ponceau S (Sigm-Aldrich) w 1% kwasie octowym] przez 30 minut. Nadmiar barwnika usunięto przez płukanie membrany w wodzie destylowanej (3×). Wycięty prążek, który zawierał białko Hsp60 *S. Enteritidis* umieszczono w probówce Eppendorfa z buforem do elucji białka (1% Triton X-100 w 50 mM Tris-HCl, pH 9,5) w objętości 0,5 ml eluentu/cm² Immobilonu. Eluent wraz z Immobilonem wytrząsano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, następnie odwirowano (500×g/10 – 20 min) i zebrano supernatant. Proces rozdziału i elucji przeprowadzono wielokrotnie. Elucja z tej membrany jest prawie niezależna od masy cząsteczkowej białka i pozwala odzyskać 70 – 90% białka naniesionego na żel. Eluat zawierający białko może być bezpośrednio użyty do szczepienia zwierząt.

3.5.2. Określanie czystości, masy cząsteczkowej i swoistości białka Hsp60 *S. Enteritidis*

W celu oszacowania stopnia czystości, masy cząsteczkowej i swoistości wyeluowanego białka Hsp60 wykonano elektroforezę i immunobloting. Elektroforeza w połączeniu z techniką Western-blot jest obecnie powszechnie stosowana w identyfikacji białek. Elektroforezę przeprowadzono w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Próby (wzorce masowe, białko GroEL *E. coli*, badane białko) nakładano w trzech powtórzeniach. Jedną trzecią część żelu wybarwiono [0,125% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich), 50% metanol, 10% kwas octowy] w celu sprawdzenia stopnia czystości badanego antygeny i oszacowania masy cząsteczkowej, dla pozostałej części wykonano elektrotransfer na membranę nitrocelulozową (NC 45, Serva, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg) przy 18 V przez noc, by przy pomocy specyficznych przeciwciał potwierdzić tożsamość otrzymanego białka. Po transferze, nitrocelulozę podzielono na 2 części, płukano w buforze TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 M NaCl) przez około 5 minut, a następnie inkubowano w roztworze 3% mleka odtłuszczonego w TBS przez 1 godzinę, w celu zablokowania miejsc wiążących białko i uniemożliwienia niespecyficznego łączenia się przeciwciał z membraną. Tak przygotowane repliki nitrocelulozowe, zawierające obraz rozdziału identyczny z uzyskanym na żelu, poddano inkubacji z roztworem odpowiednich przeciwciał w celu wykazania obecności antygeny. Jedną część nitrocelulozy przeniesiono do roztworu 3% mleka odtłuszczonego w TBS zawierającego surowicę króliczą anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (1:500), a drugą do roztworu 3% mleka odtłuszczonego w TBS

zawierającego przeciwciała monoklonalne anti-GroEL *E. coli* (SPS 870, Stressgen, Kanada) rozcieńczone w stosunku 1:500. Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę z wytrząsaniem. Po inkubacji, nitrocelulozę przemywano w roztworze 3% mleka w TBS (3×10 min), a następnie umieszczono w roztworze 3% mleka w TBS zawierającego przeciwciała anti-IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (DAKO, Dania), odpowiednio kozie skierowane przeciwko immunoglobulinom króliczym (1:2000) oraz kozie przeciwko immunoglobulinom mysim (1:1000). Inkubowano przez 1 godzinę z wytrząsaniem. Po tym czasie nitrocelulozę przemywano (3×10 min) w 3% mleku odtłuszczonym w TBS ($1 \times$) i w samym buforze TBS ($2 \times$). Tak przygotowaną nitrocelulozę umieszczono w roztworze odpowiedniego substratu (układ H_2O_2 i 4-chloro-1-naftol) i inkubowano przez około 30 minut w celu uwidocznienia kompleksu antygen-przeciwciało, następnie płukano wodą redestylowaną (2×10 min) w celu zahamowania reakcji barwnej i suszono na powietrzu. Pojawienie się prążków wybarwionych na kolor ciemnoniebieski, stanowiących nierozpuszczalny produkt osadzający się na membranie, świadczyć będzie o swoistości badanego antygeny.

W warunkach SDS-PAGE ruchliwość elektroforetyczna (droga migracji) łańcuchów polipeptydowych w żelu zależy liniowo od logarytmu ich masy. Masę cząsteczkową otrzymanego białka wyznaczono poprzez porównanie jego ruchliwości elektroforetycznej z ruchliwością wzorców masy cząsteczkowej w oparciu o krzywą wzorcową wzajemnej zależności \log_{10} masy białek wzorcowych i odległości na którą nastąpiła ich migracja w żelu.

3.5.3. Oznaczanie stężenia białka Hsp60 *S. Enteritidis*

Przed przystąpieniem do oznaczania stężenia białka Hsp60 *Salmonella Enteritidis* próby otrzymanego białka dodatkowo oczyszczono, wydializowano względem buforu umożliwiającego bezpieczne przechowywanie białka (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl) i zagęszczono. W tym celu odwirowywano otrzymany eluat ($4000 \times g/8$ min \times 5) stosując specjalne probówki (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, Millipore, USA) z filtrem o określonej przepuszczalności (30000 Nominal Molecular Weight Limit). Dodając po każdym kolejnym wirowaniu 15 ml buforu (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl), dokonywano swoistej dializy poprzez sukcesywne „przenoszenie” białka z roztworu użytego do elucji do buforu pozwalającego je przechowywać, jednocześnie zagęszczając próbę. Oznaczenie stężenia białka Hsp60 *S. Enteritidis* wykonano metodą barwienia czernią amidową. Po naniesieniu odpowiedniej ilości prób białka badanego i wzorcowego (Bovine Serum Albumin – BSA, stężenie wyjściowe 1 mg/ml) na krążki nitrocelulozowe, przeniesiono je do roztworu czerni amidowej (0,1% czerni amidowa, 50% metanol, 10% kwas octowy). Po odbarwieniu tła (20% metanol, 10% kwas octowy), nitrocelulozę przeniesiono do roztworu 80% kwasu mrówkowego i inkubowano przez 10 minut. Po tym czasie zmierzono ekstynkcję eluatu dla próby białka badanego oraz dla wszystkich prób wzorcowego

białka przy długości fali 630 nm. Stężenie białka badanego wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej otrzymanej dla BSA.

3.5.4. Otrzymywanie surowic króliczych anti-Hsp60 *Salmonella* Enteritidis

Otrzymane drogą elucji preparatywnej białko Hsp60 *S. Enteritidis* wykorzystano jako antygen do szczepienia królika w celu uzyskania specyficznych przeciwciał (zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach na wykorzystanie zwierząt do badań w ramach realizowanego projektu – Opinia nr 14 z dnia 17.04.2001 r.). Badania kontrolne, wykonane przed rozpoczęciem szczepień, nie wykazały obecności przeciwciał anti-Hsp60 w surowicy królika wybranego do immunizacji. Antygen do szczepień wyjaławiano stosując odpowiednie filtry bakteriologiczne (Millipore). Antygen (20 – 30 µg czystego białka) w emulsji (1:1) z adjuwantem Freund'a (kompletnym – pierwsze szczepienie, niekompletnym – pozostałe szczepienia) podawano królikowi w 4 iniekcjach podskórnych według ogólnie przyjętego schematu szczepień [160]. Do celów kontrolnych, niewielkie objętości krwi pobierano z żyły brzeżnej ucha królika po 2, 3 i 4 szczepieniu. Krew inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min, a następnie, po uprzednim schłodzeniu (4°C/24 h), wirowano (2000×g/15 min). Po zakończeniu szczepień, w wyniku całkowitego skrwawienia królika przez punkcję serca, uzyskano dodatkową objętość surowicy. Łącznie otrzymano ponad 160 ml surowicy odpornościowej zawierającej przeciwciała anti-Hsp60 *Salmonella* Enteritidis. Surowicę przechowywano w temp. – 20°C do momentu wykorzystania w testach.

3.5.5. Syntetyczne fragmenty ludzkiego białka Hsp60

Do badań wykorzystano 7 zsyntetyzowanych chemicznie fragmentów ludzkiego białka Hsp60 o różnej długości i sekwencji aminokwasowej (tab. 15). Syntezę peptydowych fragmentów ludzkiego białka Hsp60 przeprowadzono na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (Katedra Syntezy Organicznej, Zakład Chemii Polipeptydów). Na podstawie znanej z piśmiennictwa sekwencji nukleotydowej ludzkiego białka Hsp60 [383] i komputerowej analizy [301] profili hydrofilowości i akrofilowości, wytypowano potencjalnie immunogenne fragmenty, a następnie zsyntetyzowano metodą Merrifielda z zastosowaniem procedury Fmoc/Bu^t. Opis wszystkich zastosowanych metod i przebiegu samej syntezy peptydów przedstawiono szczegółowo w pracy Karawajczyk [192].

Tabela 15. Syntetyczne peptydy ludzkiego białka Hsp60
Table 15. Synthetic peptides of human Hsp60 protein

Peptyd <i>Peptide</i>	Sekwencja aminokwasowa ¹ <i>Amino acid sequences¹</i>
Hsp60 (25 – 36)	Ala-Tyr-Ala-Lys-Asp-Val-Lys-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala
Hsp60 (83 – 95)	Ser-Ile-Asp-Leu-Lys-Asp-Lys-Tyr-Lys-Asn-Ile-Gly-Ala
Hsp60 (119 – 131)	Leu-Ala-Arg-Ser-Ile-Ala-Lys-Glu-Gly-Phe-Glu-Lys-Ile
Hsp60 (238 – 251)	Glu-Phe-Gln-Asp-Ala-Tyr-Val-Leu-Leu-Ser-Glu-Lys-Lys-Ile
Hsp60 (301 – 314)	Lys-Ala-Pro-Gly-Phe-Gly-Asp-Asn-Arg-Lys-Asn-Gln-Leu-Lys
Hsp60 (357 – 371)	Leu-Leu-Lys-Gly-Lys-Gly-Asp-Lys-Ala-Gln-Ile-Glu-Lys-Arg-Ile
Hsp60 (409 – 424)	Thr-Ser-Asp-Val-Glu-Val-Asn-Glu-Lys-Lys-Asp-Arg-Val-Thr-Asp-Ala

¹ Dla ułatwienia zapisu wzorów peptydów i białek wprowadzono międzynarodowe kody aminokwasów: kody trójliterowe i jednoliterowe (jednoliterowe tylko dla aminokwasów kodowanych) [179]. W niniejszej pracy poszczególne aminokwasy w syntetycznych oligopeptydach nazywano stosując kod trójliterowy. Zgodnie z rekomendacją IUPAC-IUB jednoliterowy system polecany jest w przypadku porównań długich sekwencji prezentowanych na przykład w tabelach lub w postaci różnego rodzaju list i w innych przypadkach, gdzie skrócona forma zapisu jest uzasadniona ¹ *The one-letter and three-letter codes for amino acids are adopted by the Commission on Biochemical Nomenclature of the IUPAC-IUB [179]. In this paper three-letter cod was used to name amino acids. The one-letter system is recommended for comparison of long sequences in tables and lists, and in other special uses where brevity is important*

3.5.6. Porównywanie reakcji serologicznych białka Hsp60 *S. Enteritidis*, ludzkiego białka Hsp60 i jego syntetycznych fragmentów metodą ELISA

3.5.6.1. Antygeny

Do opłaszczania płytek mikrotitracyjnych zastosowano następujące antygeny: białko szoku termicznego Hsp60 bakterii *Salmonella* Enteritidis, rekombinowane ludzkie białko szoku termicznego z rodziny białek 60 kDa (Recombinant Human Hsp60, SPP-740, Sressgen, Kanada) oraz 7 syntetycznych peptydów stanowiących fragmenty ludzkiego białka Hsp60 (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański).

3.5.6.2. Test ELISA

Polistyrenowe, płaskodenne płytki mikrotitracyjne (Maxisorp, Nunc, Dania) opłaszczano odpowiednio antygenami (syntetyczne peptydy – 10 µg/ml, białko Hsp60 *S. Enteritidis* – 0,1 µg/ml, rekombinowane białko ludzkie Hsp60 – 0,1 µg/ml) rozpuszczonymi w buforze węglanowym (0,05M buforujący układ węglanowy H₂CO₃/NaHCO₃) o

pH 9,6 (100 µl/ dołek). Płytkę inkubowano 16 godzin, w komorze wilgotnej, w temperaturze 4°C, następnie przemywano trzykrotnie PBS (fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami) o pH 7,4 z dodatkiem 0,05% Tween 20 (PBS-Tween 20). Wolne miejsca na powierzchni płytki, nie związane z antygenem, blokowano 2,5% roztworem kazeiny (Sigma – Aldrich) o pH 7,0 (150 µl/ dołek) w ciągu 3 godzin w temperaturze 37°C. Ponownie przemywano płytkę trzykrotnie PBS-Tween 20, a następnie наносono po 100 µl surowicy króliczej anti-Hsp60 *S. Enteritidis* rozcieńczonej w roztworze blokującym w stosunku 1:1000, z wyjątkiem dołków stanowiących kontrole ujemne antygenów. Tak przygotowane płytki inkubowano 16 godzin, w temperaturze 4°C, w komorze wilgotnej. Po inkubacji płytki przemywano trzykrotnie PBS-Tween 20, po czym do każdego dołka dodawano po 100 µl znakowanych peroksydazą chrzanową przeciwciał kozich przeciwko immunoglobulinom króliczym (Dako, Dania) rozpuszczonych w roztworze blokującym (1:500). Płytki inkubowano przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, przemywano trzykrotnie PBS-Tween 20 i do każdego dołka dodawano po 200 µl substratu dla peroksydazy – dichlorowodoru *o*-fenylenodiaminy (Sigma Fast OPD, Sigma – Aldrich). Po około 30 minutach wywoływania reakcji barwnej (bez dostępu światła), dodawano po 50 µl 3 M kwasu siarkowego do każdego dołka i mierzono absorbancję za pomocą czytnika testów ELISA (microELISA Reader Expert Plus, ASYS Hitach GmbH, Austria) przy długości fali 492 nm. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości otrzymane z 6 pomiarów OD uzyskanych dla każdego antygeny w dwóch niezależnych doświadczeniach, pomniejszone o tzw. wartość *cut-off*, czyli średnią wartość OD kontroli ujemnych antygenów z uwzględnieniem trzykrotnej wartości odchylenia standardowego.

3.5.6.3. Zahamowanie reakcji immunoenzymatycznej w teście ELISA

W celu zahamowania reakcji immunoenzymatycznej w teście ELISA, surowicę króliczą anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (1:1000), przed naniesieniem na płytkę, inkubowano (37°C/3 h) z nadmiarem odpowiedniego białka (5 µg/ml) lub syntetycznego peptydu (10 µg/ml). Pozostałe warunki testu jak w punkcie 3.5.6.2. Wyniki, podobnie jak dla testu opisanego powyżej, przedstawiono jako średnie wszystkich wartości OD otrzymanych dla poszczególnych antygenów (w reakcjach z surowicą anti-Hsp60 *S. Enteritidis* testowaną odpowiednio przed i po absorpcji odpowiednim białkiem lub syntetycznym peptydem) w dwóch niezależnych doświadczeniach dla każdego wariantu, pomniejszone o średnią wartość OD kontroli ujemnych i trzykrotne odchylenie standardowe.

3.5.6.4. Standaryzacja metody

Standaryzację metody ELISA wykonano poprzez dobór właściwego miana surowicy odpornościowej anty-Hsp60 *S. Enteritidis*, optymalnego stężenia antygenów oraz koniugatu przy zastosowaniu wstępnych warunków ELISA. Optymalne stężenie antygenów do opłaszczania płytek polistyrenowych, wyznaczono poprzez analizę odczytów absorbancji przy zastosowaniu różnych rozcieńczeń antygenów i przy zmiennych rozcieńczeniach koniugatu.

4. WYNIKI

4.1. BADANIA SEROLOGICZNE I EPIDEMIOLOGICZNE – WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH I OPRACOWAŃ DOKONANYCH NA PODSTAWIE OPUBLIKOWANYCH DANYCH EPIDEMIOLOGICZNYCH DOTYCZĄCYCH SEROWARÓW *SALMONELLA* WYSTĘPUJĄCYCH U LUDZI W POLSCE

W ramach niniejszej pracy, typowaniu serologicznemu poddano łącznie 2 038 szczepów, wyizolowanych z różnych materiałów diagnostycznych w latach 1995 – 2007. Materiały pochodzące zarówno od ludzi, jak i z innych źródeł, z których izolowano szczepy *Salmonella* będące przedmiotem badań przedstawiono w tabeli 16. Spośród wszystkich przebadanych szczepów, znakomita większość należała do gatunku *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Dla około 87% szczepów, udało się określić wszystkie antygeny somatyczne i rzęskowe, rozpoznając w sumie 145 różnych typów serologicznych (tab. 17). Pozostałe szczepy reprezentowały warianty jednofazowe i nieurzęsione pałeczek *Salmonella* oraz formy szorstkie (R). Dominującym był serowar *S. Enteritidis*, reprezentowany przez 191 szczepów. Na drugim miejscu zarejestrowano serowar *S. Mbandaka*, określony dla 146 szczepów. Sto trzydzieści jeden szczepów reprezentowało typ serologiczny *S. Hadar*, który znalazł się na trzecim miejscu pod względem częstości występowania w badanym materiale. Serowar *S. Thompson* określono w przypadku 128 szczepów, co sprawiło, że znalazł się on na czwartym miejscu. Kolejne miejsce zajął wariant serologiczny *S. Typhimurium* (104 szczepy), a następnie odpowiednio *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. Saintpaul*, *S. Senftenberg*, *S. Albany*, *S. Livingstone*, *S. Bredeney* i inne.

Uwzględnienie rodzaju materiału, z którego wyizolowano badane szczepy, zmienia nieznacznie dystrybucję rozpoznanych typów serologicznych. W okresie od 1995 do 2007 roku przebadano 972 szczepy wyizolowane z materiałów klinicznych pochodzących od ludzi, takich jak krew, kał pobrany od osób zdrowych i pacjentów z biegunką, mocz, płyn z opłucnej oraz różnego rodzaju wymazy (z ran pooperacyjnych, powłok brzusznych, ropni i z odbytu), określając 92 różne warianty serologiczne. Najczęściej reprezentowanymi serowarami były: *S. Thompson*, *S. Mbandaka*, *S. Enteritidis* i *S. Hadar* (odpowiednio 90, 88, 87 i 86 szczepów). Następnie kolejno *S. Virchow*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Albany*, *S. Typhi*, *S. Indiana*, *S. Saintpaul*, *S. Anatum*, *S. Choleraesuis*, *S. Newport*, *S. Derby*, *S. Livingstone*, *S. Paratyphi B*, *S. Agona*, *S. Senftenberg*, *S. Kottbus*, *S. Tennessee*, *S. Worthington*, *S. Bredeney*, *S. Heidelberg*, *S. Cubana* i inne.

Tabela 16. Materiały diagnostyczne pochodzące od ludzi i z innych źródeł, z których izolowano pałeczki *Salmonella*, Polska, 1995 – 2007Table 16. Human and non-human samples the *Salmonella* had been isolated from, Poland, 1995 – 2007

Pochodzenie materiału / <i>Origin of sample</i>			
od ludzi <i>humans</i>	z innych źródeł / <i>non-human</i>		
	zwierzęta / <i>animals</i>	żywność / <i>food</i>	pasze i inne <i>feed and others</i>
kał; mocz; żółć; pęcherzyk żółciowy; krew; płwocina; płyn mózgowo-rdzeniowy; płyn z jamy opłucnej; wymazy: z kału, z odbytu, z pooperacyjnych, z powłok brzusznych, z ropni	mięso, kał, narządy wewnętrzne oraz wymazy z kału, odbytu i kloaki, pochodzące od: piskląt kurzych, indyckich, gęsich, kaczych oraz dorosłych ptaków, w tym kur niosek (pochodzenia krajowego i imp.: USA, Czechy Niemcy, Anglia, Kanada, Francja, Holandia), gołębi, psa, oposów, niebieskich lisów, ryb, dzika, nutrii, prosiąt, świń, cieląt, krów, żółwi, węża boa, żmii gabońskiej i sykliwej, papug, kameleona, strusia australijskiego (imp. RPA)	różne gatunki wędlin; różne rodzaje mięs (wołowe, drobiowe, wieprzowe) i podroby, w tym mięsa mielone oraz przedzoładki wołowe, surowe (imp. USA); pizza; makaron (produkcji krajowej i imp.: Włochy, Grecja); mleko pełne w proszku; odżywka dla dzieci „Bebiko”; produkty mleczne; jaja kurze; proszek jajeczny (imp. Holandia); wyroby garmażeryjne (garmaż drobiowy; pasta jajeczna; pyzy z mięsem; kotlet panierowany); wyroby cukiernicze; czekolada; papryka świeża; mąka pszenna i ryżowa; zupy w proszku; sosy w proszku (imp. Belgia); herbata czarna; pieprz zielony (imp. Chiny); pieprz czarny (imp. Brazylia, Wietnam); chili w proszku; kminek mielony (imp. Pakistan); papryka mielona ostra i słodka (imp. Francja, Hiszpania); przyprawa do produkcji wędlin (imp. Niemcy); liść senesu; bazylia suszona (imp. Austria); gałka muszkatołowa (imp. Indonezja); susz cebulowy (imp. Indie); mieszanki przyprawowe; grzyby suszone; kakao; miazga kakaowa; figi (imp. Iran); ziarno sezamowe (imp. Indie, Indonezja); wiórki kokosowe; krewetki (imp. Tajlandia)	różne rodzaje pasz i mieszanek paszowych (produkcji krajowej i imp.: Niemcy, Dania, Brazylia, Holandia, Anglia), w tym suszona karma dla psów (uszy wieprzowe, gofry mięsne) i pasza dla pstrągów; komponenty paszowe: mączka zwierzęca, mączka mięsno-kostna, mączka mięsna, mączka krwista, mączka rybna, śruta sojowa, śruta rzepakowa, śruta słonecznikowa, makuchy i wytloki rzepakowe; bielmo ostropestu; woda morska; woda jeziorna; woda z rzeki Wkra i San; skratki ¹ z oczyszczalni ścieków; piasek z piaskownika z oczyszczalni ścieków; osad ściekowy ze zbiornika retencyjnego oczyszczalni ścieków; zmiotki z linii produkcyjnej wytwórni pasz; woda z poidel dla drobiu; wymazy z sali klujnikowej kurcząt i z powierzchni tzw. linii wybierania kurcząt; wymazy podszwowe z kurników, z płyty gnojowej w obejściu kurników, z paszociągu; śmieci z odkurzacza; zmiotki z podłogi i ze stołu produkcyjnego w kuchni

¹ Największe zanieczyszczenia mechaniczne znajdujące się w ściekach płynące lub wleczone po dnie kanału, które jako pierwsze są usuwane w oczyszczalni ścieków; nazwa ich pochodzi od krat, na których są zatrzymywane / *Waste found flowing in sewage being caught by grating and firstly removed in a sewage treatment plant*

Biorąc pod uwagę pozostałe materiały diagnostyczne – pochodzące od zwierząt, a także żywność (w tym pochodzenia zwierzęcego), pasze oraz tzw. próby środowiskowe, z których wyizolowano łącznie 932 szczepy *Salmonella* stanowiące przedmiot niniejszych badań, wykazano iż zdecydowanie dominującym i najliczniej reprezentowanym był serowar *S. Enteritidis* (95 szczepów). Drugie miejsce zajął typ serologiczny *S. Typhimurium* (51 szczepów), trzecie *S. Mbandaka* (46 szczepów), kolejne – *S. Hadar* (41 szczepów), *S. Agona* (41 szczepów), a następnie *S. Infantis*, *S. Derby*, *S. Thompson*, *S. Anatum*, *S. Bredeney*, *S. Senftenberg*, *S. Saintpaul*, *S. Virchow*, *S. Heidelberg*, *S. Livingstone* i inne. Szczepy te pochodziły głównie w laboratoriów weterynaryjnych. Wyizolowano je w wyniku rutynowo prowadzonej przez nie działalności z zakresu ochrony zdrowia zwierząt i profilaktyki chorób zwierzęcych, higieny i toksykologii żywności pochodzenia zwierzęcego i środków żywienia zwierząt oraz ochrony środowiska.

Tabela 17. Serowary *Salmonella* występujące w Polsce, określone w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1995 – 2007

Table 17. *Salmonella* serovars identified by the National Salmonella Centre, Poland, 1995 – 2007

	Serowar <i>Serovar</i>	Liczba szczepów wyizolowanych <i>Number of strains isolated from</i>			Ogółem <i>Total</i>	
		od ludzi <i>humans</i>	z innych źródeł <i>other sources</i>			
			żywność <i>food</i>	zwierzęta, pasze i inne / <i>animals,</i> <i>feed and others</i>		nieznane <i>unknown</i>
1.	<i>S. Enteritidis</i>	87	27	68	9	191
2.	<i>S. Mbandaka</i>	88	12	34	12	146
3.	<i>S. Hadar</i>	86	21	20	4	131
4.	<i>S. Thompson</i>	90	5	26	7	128
5.	<i>S. Typhimurium</i>	41	17	34	12	104
6.	<i>S. Infantis</i>	52	10	27	4	93
7.	<i>S. Virchow</i>	65	4	12	8	89
8.	<i>S. Agona</i>	8	5	36	-	49
9.	<i>S. Derby</i>	11	5	27	5	48
10.	<i>S. Anatum</i>	13	2	29	1	45
11.	<i>S. Saintpaul</i>	15	2	18	1	36
12.	<i>S. Senftenberg</i>	5	-	23	5	33
13.	<i>S. Albany</i>	26	4	1	2	33
14.	<i>S. Livingstone</i>	11	3	12	6	32
15.	<i>S. Bredeney</i>	3	1	23	2	29
16.	<i>S. Indiana</i>	16	2	7	3	28
17.	<i>S. Choleraesuis</i>	12	2	8	4	26
18.	<i>S. Newport</i>	12	1	7	4	24
19.	<i>S. Typhi</i>	23	-	-	-	23
20.	<i>S. Worthington</i>	4	1	11	4	20
21.	<i>S. Heidelberg</i>	2	-	16	2	20
22.	<i>S. Kottbus</i>	5	2	9	-	16
23.	<i>S. Tennessee</i>	5	1	10	-	16

Serowar <i>Serovar</i>	Liczba szczepów wyizolowanych <i>Number of strains isolated from</i>				Ogółem <i>Total</i>
	od ludzi <i>humans</i>	z innych źródeł <i>other sources</i>			
		żywność <i>food</i>	zwierzęta, pasze i inne / <i>animals,</i> <i>feed and others</i>	nieznane <i>unknown</i>	
24. <i>S. Cubana</i>	2	3	11	-	16
25. <i>S. Paratyphi B</i>	11	1	1	1	14
Pozostałe serowary ¹ / <i>Other serovars</i>	141	81	137	18	377
Inne ² / <i>Others</i>	138	42	71	20	271
Ogółem / <i>Total</i>	972	254	678	13	2038

¹ *S. Abony, S. Adelaide, S. Agama, S. Agbeni, S. Alachua, S. Alger, S. Altona, S. Amsterdam, S. Bardo, S. Bareilly, S. Bergen, S. Berlin, S. Bispebjerg, S. Blockley, S. Bovismorbificans, S. Bracknell, S. Braenderup, S. Brandenburg, S. Cannstatt, S. Cerro, S. Chester, S. Corvallis, S. Cubana, S. Dessau, S. Dublin, S. Eastbourne, S. Falkensee, S. Finkenwerder, S. Fischerkietz, S. Galiema, S. Gallinarum, S. Gaminara, S. Give, S. Goldcoast, S. Grumpensis, S. Haifa, S. Halle, S. Havana, S. Hindmarsh, S. Hull, S. Hvittingfoss, S. Ibadan, S. Idikan, S. Inverness, S. Isangi, S. Isaszeg, S. Istanbul, S. Javiana, S. Jerusalem, S. Kapemba, S. Kedougou, S. Kentucky, S. Kiambu, S. Kibusi, S. Kisangani, S. Lexington, S. Lille, S. Lindern, S. Litchfield, S. Liverpool, S. Llandoff, S. London, S. Manhattan, S. Meleagridis, S. Miami, S. Minnesota, S. Mississippi, S. Molade, S. Montevideo, S. Morehead, S. Muenchen, S. Muenster, S. Nyborg, S. Ohio, S. Oranienburg, S. Orion, S. Oslo, S. Othmarschen, S. Ouakam, S. Panama, S. Paratyphi A, S. Plymouth, S. Pomona, S. Poona, S. Potsdam, S. Rissen, S. Salford, S. San Diego, S. Schleissheim, S. Schwarzengrund, S. Stanley, S. Stanleyville, S. Stockholm, S. Suelldorf, S. Taksony, S. Telekebir, S. Telhashomer, S. Tilene, S. Uganda, S. Urbana, S. Uzaramo, S. Weltevreden, S. Yoruba, S. Zanzibar, S.II (1,9,12:b:e,n,x), S.II (13,22:z₂₉:1,5), S.II (41:z:1,5), S.II (42:b:e,n,x,z₁₅), S.II (42:g,t:-), S.II (47:a:1,5), S.II (48:d:z₆), S.IIIb (35:i:z₃₅), S.IIIb (38:r:z), S.IIIb (48:k:z₅₃), S.IIIb (48:k:z₅₇), S.IIIb (58:z₅₂:z₃₅), S.IIIb (60:z₅₂:z₅₃), S.IIIb (61:k:1,5,7), S.IV (11:z₄:z₂₃:-), S.VI (45:a:e,n,x)*

² Szczepy jednofazowe z grup / *monophasic strains from groups*: O:4; O:7; O:9; O:3,10; O:11; O:13; O:16; O:47; szczepy niurzędzone z grup / *nonflagellated strains from groups*: O:7; O:8; O:9; O:3,10; O:1,3,19; O:53; O:65; szczepy szorstkie „R” / *rough strains “R”*; szczepy nie należące do rodzaju *Salmonella* / *strains that are not members of the genus Salmonella*

Niezależnie od rodzaju i źródła pochodzenia badanego materiału, szczególną uwagę należy zwrócić na coraz liczniej pojawiające się serowary *Salmonella*, które dotychczas nie występowały w Polsce. Rozpoznanie każdej pierwszej izolacji takiego serowaru potwierdzano w WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* w Paryżu. Izolowano je zarówno od ludzi, jak i z innych źródeł. Niektóre z nich zostały zaimportowane z innych rejonów świata w wyniku prowadzenia ożywionego handlu i transportu międzynarodowego oraz rozwoju masowej turystyki. W okresie od 1995 do 2007 roku, w wyniku badań biochemicznych i serologicznych przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, rozpoznano w sumie 52 takie serowary. Jeden z nich jest zupeł-

nie nowym, nie znanym jeszcze na świecie wariantem serologicznym, prezentującym formułę antygenową, która do tej pory nie występowała w schemacie White'a-Kauffmanna-Le Minora. Charakterystykę epidemiologiczną (uwzględniającą wszystkie dostępne dane) 52 serowarów *Salmonella* pierwszy raz określonych w Polsce w omawianym przedziale czasu zaprezentowano w tabeli 18.

Tabela 18. Charakterystyka i analiza epidemiologiczna szczepów *Salmonella* prezentujących serowary, które określono w Polsce po raz pierwszy w okresie od 1995 do 2007 roku
Table 18. Epidemiological description of Salmonella serovars first occurring in Poland between 1995 and 2007

	Serowar <i>Serovar</i>	Rodzaj materiału <i>Sample</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>
1.	<i>S. Agbeni</i>	kał (dziecko; osoba dorosła)	pojedynczy szczep wyizolowano po raz pierwszy od chorego dziecka w 1996 r. (Opole); kolejny przypadek izolacji tego serowaru od dorosłego pacjenta zarejestrowano w 2006 r. (Warszawa)
2.	<i>S. Alger</i>	kał (zółw)	po raz pierwszy wyizolowano w 1997 r. (Poznań); do 2007 r. izolowano tylko raz w kraju
3.	<i>S. Bardo</i>	wątroba (dzik)	wyizolowano po raz pierwszy w 1998 r. (Warszawa); izolowano tylko raz w Polsce
4.	<i>S. Bergen</i>	kał (osoba dorosła)	pojedynczy szczep wyizolowano w 2002 r. (Toruń) od pacjentki w zaawansowanej ciąży z objawami biegunki; nie była hospitalizowana; pierwszy i jedyny przypadek wyizolowania tego serowaru w Polsce do 2007 r.
5.	<i>S. Berlin</i>	henna	zarejestrowano po raz pierwszy w 1998 r. (Skierniewice); pierwszy i jedyny przypadek izolacji tego serowaru w okresie 1995 – 2007
6.	<i>S. Bracknell</i>	wytłoki rzepakowe	pierwszy i jedyny szczep wyizolowany w 2001 r. (Chełmno-Osnowo)
7.	<i>S. Cannstatt</i>	mączka mięsno-kostna; papryka (imp. Hiszpania)	izolowano w Polsce dwukrotnie: z mączki mięsno-kostnej (Zielona Góra, 1997 r.) i z importowanej, czerwonej, słodkiej papryki (Kalisz, 1998 r.); z tej samej próbki papryki wyhodowano również <i>S. Miami</i> (serowar izolowany już wcześniej w Polsce)
8.	<i>S. Finkenwerder</i>	woda	wyizolowano 2 szczepy w 2002 r. (Warszawa)
9.	<i>S. Fischerkietz</i>	pisklęta indyjskie (imp. Anglia)	wyizolowano po raz pierwszy i jedyny w 2000 r. (Łódź)

	Serowar <i>Serovar</i>	Rodzaj materiału <i>Sample</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>
10.	<i>S. Galiema</i>	wymaz z odbytu (dziecko; osoba dorosła)	pierwszej, pojedynczej izolacji serowaru dokonano w 1998 r. od 11-miesięcznego, chorego dziecka, hospitalizowanego z powodu gorączki, wymiotów i biegunki (Skierniewice); szczep rozkładał inozytol – szczepy prezentujące ten serowar są zwykle inozytolo-ujemne [198]; kolejny raz, pojedynczy szczep (inozytol +) wyizolowano od 41-letniego pacjenta z objawami nieżytu żołądkowo-jelitowego w 2005 r. (Płock)
11.	<i>S. Grumpensis</i>	żółć (osoba dorosła)	wyizolowano po raz pierwszy w 1995 r. (Bielsko-Biała) od osoby chorej; obecność patogenu w żółci sugeruje salmonellozę o przebiegu durowym; w omawianym przedziale czasu serowar ten izolowano w Polsce tylko jeden raz
12.	<i>S. Halle</i>	żółw lądowy	pojedyncza i jedyna izolacja – 2002 r. (Toruń)
13.	<i>S. Hvitvingfoss</i>	kał (osoba dorosła); suszone grzyby (uszak gęstowłosa – <i>Auricularia polytricha</i> , grzyby jadalne, uprawiane w Azji; w Polsce znane jako grzyby Mun); ziarno sezamowe	po raz pierwszy wyizolowano z kału osoby chorej w kwietniu 1998 r. (Piła); w tym samym roku, w maju, dokonano trzech kolejnych izolacji z suszonych grzybów (Warszawa); w 2002 r. – pojedynczy szczep wyizolowano z ziarna sezamowego (Warszawa)
14.	<i>S. Hull</i>	kał (osoba dorosła)	po raz pierwszy i jedyny wyizolowano w 2005 r. (Gniezno) od osoby zdrowej (mężczyzna, 17 lat) w wyniku badań niezbędnych do wystawienia świadectwa zdrowia (praktyczna nauka zawodu)
15.	<i>S. Idican</i>	mączka zwierzęca	wyizolowano po raz pierwszy w 1998 r. (Poznań); pojedynczej izolacji dokonano również w 2000 r. z mączki importowanej z Belgii (Szczecin); 7 kolejnych szczepów wyizolowano w 2001 r. (Poznań); to jedyne izolacje tego serowaru zarejestrowane do 2007 r.
16.	<i>S. Invernes</i>	kał	3 szczepy wyizolowane od 3 osób z rodzinnego ogniska zatrucia pokarmowego – 2004 r. (Opole)
17.	<i>S. Isaszeg</i>	woda (z jeziora); kał (osoba dorosła)	pierwszej izolacji dokonano w 2003 r. (Otwock) z wody z jeziora Osieck przy ośrodku konferencyjno-rekreacyjnym; kolejny raz, w tym samym roku, od pacjentki (Warszawa)
18.	<i>S. Istanbul</i>	gęsi zarodowe	pojedyncza i jedyna izolacja – 1997 r. (Poznań)
19.	<i>S. Javiana</i>	czarny pieprz	serowar ten izolowano w Polsce dwukrotnie: w 1996 i w 1999 roku (Warszawa)
20.	<i>S. Kiambu</i>	pasza	pojedynczej i jedynej izolacji dokonano w 1996 r. (Puławy)

Serowar <i>Serovar</i>	Rodzaj materiału <i>Sample</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>
21. S. Kibusi	papryka w proszku	pojedyncza izolacja w 2000 r. (Poznań); sproszkowana, słodka papryka pochodziła z Francji; to jedyny przypadek wyizolowania tego serowaru w latach 1995 – 2007
22. S. Lindern	kał (chore dziecko); ziarno sezamowe	pojedynczy szczep wyizolowany w 2003 r. (Lublin) od 4-miesięcznego dziecka płci żeńskiej; choroba o ciężkim przebiegu; leczenie różnymi antybiotykami; w momencie pobierania próby do badania dziecko przebywało w Dziecięcym Szpitalu Klinicznym (Klinika Patologii Niemowląt); wywiad epidemiologiczny z matką dziecka – w domu 2 ładowe żółwie przywiezione z Grecji (żółw stepowy – <i>Testudo horsfieldii</i>) przebywające poza terrarium i pies; możliwy pośredni kontakt ze zwierzętami lub ich odchodami poprzez starszego brata (8 lat); w 2004 r. (Gdańsk) wyizolowano 2 kolejne szczepy z ziarna sezamu łuszczonego (imp. Indonezja)
23. S. Liverpool	ziarno sezamowe; pasza dla pstrągów	po raz pierwszy wyizolowano w 1999 r. (Warszawa) – ziarno sezamowe pochodziło z Indii; pojedynczy szczep wyhodowano również w 2000 r. (Gdańsk) z paszy importowanej z Danii
24. S. Llandoff	mączka zwierzęca; mączka rybna	po raz pierwszy wyizolowano w 2000 r. (Poznań); szczep posiadał zdolność rozkładania inozytoli – szczepy prezentujące ten serowar są zwykle inozytolumne [198]; pojedynczy szczep (inozytol →) wyhodowano również w 2003r (Szczecin) z importowanej mączki rybnej – szczep ten posiadał tzw. R-fazę antygenową rzęskowego: [z ₃₇]
25. S. Mississippi	kał (osoba dorosła); miazga kakaowa	pojedynczy szczep wyizolowano w 1997 r. (Gdynia) od pacjenta, który powrócił z Nigerii (pobył służbowy); pacjent skarżył się na bóle brzucha i bóle głowy; podczas pobytu w Nigerii był hospitalizowany 4 dni z powodu biegunki; szczep inozytolo-dodatni (szczepy prezentujące ten serowar są zwykle inozytolumne [198]); pojedynczej izolacji dokonano również w 2001 r. (Poznań) – z miazgi kakaowej
26. S. Nyborg	suszona bazylija (imp. Austria)	pojedynczy szczep wyizolowano po raz pierwszy w 1996 r. (Warszawa) podczas rutynowej kontroli, jakiej poddawane są importowane przyprawy przed dopuszczeniem do obrotu; trzy kolejne szczepy wyhodowano później, w tym samym roku; z jednej z prób, obok S. Nyborg, wyizolowano również S. Cerro (serowar ten już wcześniej występował w kraju)

	Serowar <i>Serovar</i>	Rodzaj materiału <i>Sample</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>
27.	<i>S. Oukam</i>	mączka mięsna	po raz pierwszy i jedyny wyizolowano w 1996 r. (Szczecin); z jednej próby obok <i>S. Oukam</i> wyizolowano również <i>S. Rissen</i> (serowar już wcześniej występujący w Polsce) – izolacja więcej niż jednego serowaru z tej samej próby jest zjawiskiem dosyć często obserwowanym zwłaszcza w przypadku pasz
28.	<i>S. Plymouth</i>	kał (osoba dorosła)	wyizolowano tylko raz w 1996 r. (Gdynia) od 40-letniego pacjenta podczas badań kontrolnych po powrocie z Nigerii; w czasie pobytu w Afryce pacjent skarżył się na bóle w górnych drogach oddechowych; brak objawów świadczących o zakażeniu przewodu pokarmowego; szczep nie posiadał zdolności rozkładania inozytoli
29.	<i>S. Salford</i>	kał (dziecko)	pojedyncza izolacja w 1996 r. – noworodek płci męskiej urodzony w jednym z polskich szpitali (Warszawa); pierwszy i jedyny przypadek wyizolowania tego serowaru w Polsce do 2007 r.
30.	<i>S. Schleissheim</i>	woda (z rzeki)	wyizolowano tylko raz w 2003 r. (Warszawa) z próbki wody pobranej z kąpieliska na rzece Wkra
31.	<i>S. Stockholm</i>	miazga kakaowa	pojedynczej izolacji dokonano w 2001 r. (Poznań) – pierwszy i jedyny raz do 2007 r.
32.	<i>S. Suelldorf</i>	ziarno sezamowe	po raz pierwszy i jedyny wyizolowano w 2001 r. (Warszawa)
33.	<i>S. Teitelkebir</i>	mieszanka paszowa	izolowano tylko raz, 1998r (Poznań) – mieszanka paszowa R 208 (pełnoporcjowa dla kur mięsnych)
34.	<i>S. Telhashomer</i>	mieszanka paszowa	pojedynczy szczep wyhodowano po raz pierwszy w 2000 r. (Poznań)
35.	<i>S. Tilene</i>	nie opisany dokładnie materiał kliniczny	wyhodowano tylko jeden raz z materiału klinicznego od pacjenta, 2007 r. (Warszawa)
36.	<i>S. Uzaramo</i>	kał (osoba dorosła)	pojedynczej izolacji dokonano w 2005 r. (Tarnów) od osoby zdrowej
37.	<i>S. Yoruba</i>	czekolada	wyizolowano tylko raz w 2006 r. (Warszawa)
38.	<i>S. II (1,9,12:b:e,n,x)</i>	papryka	tylko jedna izolacja, 1998 r. (Kalisz) – czerwona papryka ostra „Astra”, imp. Hiszpania

Serowar <i>Serovar</i>	Rodzaj materiału <i>Sample</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>
39. S. II (13:22:z ₂₉ :1,5)	kał (dziecko; osoba dorosła); wymaz z odbytu (dziecko)	od 1995 r. do 2007 r. wyizolowano 4 szczepy; pierwszej izolacji dokonano w październiku 2002 r. (Szczecin) z kału chorego, 8-miesięcznego chłopca; w styczniu 2003 r. wyhodowano ponownie z wymazu z odbytu od tego samego dziecka (chory; wiek – 11 miesięcy); w tym samym roku (styczeń) wyizolowano również szczep z kału od chorego, 40-letniego mężczyzny (Szczecin); kolejnej izolacji dokonano w 2005 r. (Częstochowa) z kału chorego, rocznego dziecka płci żeńskiej
40. S. II (41:z:1,5)	makaron (imp. Włochy)	pojedyncza izolacja szczepu w 2001 r. (Lublin)
41. S. II (42:b:e,n,x,z ₁₅)	figi (imp. Iran)	wyizolowano tylko raz w 2003 r. (Biała Podlaska)
42. S. II (42:g:t:–)	henna	wyizolowano w 1998r (Skierniewice); szczep posiadał zdolność wytwarzania indolu i rozkładania salicyny
43. S. II (48:d:z ₆)	odchody (żółw)	pojedyncza izolacja w 1996 r. (Gorzów Wielkopolski); pierwszy i jedyny przypadek wyizolowania tego serowaru w Polsce do 2007 r.
44. S. IIIb (35:i:z ₃₅)	narządy (żmija)	wyizolowano tylko raz, 1998 r. (Puławy); szczep fermentował laktozę, glukozę, mannitol i maltozę bez wytwarzania gazu
45. S. IIIb (38:r:z)	kał (dziecko)	pojedynczej izolacji szczepu dokonano w 1995 r. od 13-miesięcznej dziewczynki z objawami biegunki, wymiotów i z gorączką; laktoza+
46. S. IIIb (48:k:z ₅₃)	kał (dziecko)	wyizolowano tylko raz w 2007 r. (Częstochowa) z kału chorej, rocznej dziewczynki, hospitalizowanej z objawami biegunki, odwodnienia i ogólnego osłabienia; źródło zakażenia – nieustalone; dziecko ostatnie 2 tygodnie przed zachorowaniem przebywało w miejscu zamieszkania; kontakt tylko z najbliższą rodziną (rodzice + dziadkowie); ujemny wynik badania osób z otoczenia chorego dziecka; laktoza+
47. S. IIIb (48:k:z ₅₇)	woda (z rzeki)	pojedynczej izolacji szczepu dokonano w 2007 r. (Myślenice) z próbki wody pobranej z rzeki Raba (dzikie kąpielisko); zupełnie nowy wariant serologiczny o nie znanej do tej pory formule antygenowej; zostanie uwzględniony w nowej edycji schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora; laktoza–; ONPG+ (2 h)
48. S. IIIb (58:z ₅₂ :z ₅₃)	narządy wewnętrzne (żmija sykliwa – <i>Bitis arietans</i>); wymaz z kału (bóbr kanadyjski – <i>Castor canadensis</i>)	rozpoznano w Polsce dwukrotnie; pierwszy raz w 1998 r. – żmija (Puławy); kolejny raz w tym samym roku (bóbr); laktoza+
49. S. IIIb (60:z ₅₂ :z ₅₃)	narządy wewnętrzne (żmija)	po raz pierwszy i jedyny wyizolowano w 1998 r. (Puławy); laktoza+

	Serowar <i>Serovar</i>	Rodzaj materiału <i>Sample</i>	Krótką charakterystyka <i>Brief description</i>
50.	S. IIIb (61:k:1,5,7)	płyn mózgowo-rdzeniowy (osoba dorosła)	wyizolowano po raz pierwszy i jedyny w 2007 r. (Gniezno) od chorego, 22-letniego mężczyzny z ropnym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych; główne objawy chorobowe: gorączka i bóle głowy; przyjęty do szpitala w stanie ogólnym ciężkim z powodu drgawek i niewydolności oddechowej; po zastosowaniu leczenia (biotoksym, wankomycyna, metronidazol, biseptol) stan pacjenta uległ poprawie; czas hospitalizacji – miesiąc; obok pałeczek <i>Salmonella</i> (laktoza+) wyhodowano również <i>Streptococcus pneumoniae</i>
51.	S. IV (11:Z ₄ ,Z ₂₃ : –)	jelito (kameleon); narządy wewnętrzne (żmija gabońska – <i>Bitis gabonica</i>); kał (osoba dorosła)	po raz pierwszy wyizolowano w 1997 r. – kameleon (Puławy); kolejny raz w 1998 r. – żmija (Puławy); następnym dwóch izolacji dokonano odpowiednio w 2004 r. (Warszawa) i w 2005 r. (Szczecin) z kału osób chorych
52.	S. VI (45:a:e,n,x)	ziarno sezamowe	pojedynczej izolacji dokonano w 2002 r. (Warszawa); to jedyny przypadek wyizolowania tego serowaru w Polsce do 2007 r.

Wszystkie serowary *Salmonella* wyizolowane po raz pierwszy w Polsce w latach 1995 – 2007 należały do gatunku *Salmonella enterica*. Trzydzieści siedem spośród nich wykazało przynależność do podgatunku *enterica* (I), sześć – do podgatunku *salamae* (II), siedem (w tym wspomniany wyżej nowy serowar, wyizolowany z wody) – do podgatunku *diarizonae* (IIIb) oraz pojedyncze serowary odpowiednio do podgatunków *houeanae* (IV) i *indica* (VI). Trzydzieści spośród nich wyizolowano wyłącznie od ludzi, 34 z innych źródeł, a w przypadku pięciu serowarów izolacji dokonano zarówno z kału od pacjentów, jak i z próbek pochodzących z pozostałych źródeł. Szczegółowy wykaz tych serowarów, z uwzględnieniem ich statusu taksonomicznego oraz źródła izolacji przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Serowary *Salmonella* wyizolowane w Polsce po raz pierwszy w latach 1995 – 2007, z uwzględnieniem ich przynależności taksonomicznej i źródła izolacji

Table 19. *Salmonella* serovars first isolated in Poland during the period 1995 – 2007 (with their taxonomic status and source of isolation)

Rok / year	<i>Salmonella enterica</i>					
	podgatunek / subspecies					
	<i>enterica</i> (I)	<i>salamae</i> (II)	serowar (źródło izolacji) / serovar (source of isolation)	<i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>houtenae</i> (IV)	<i>indica</i> (VI)
1995	Grumpensis	—		38 : r : z	(I)	—
1996	Agbeni	48 : d : z ₆	(i)			—
	Javiana					
	Kiambu					
	Nyborg					
	Oukam					
	Plymouth					
	Salford					
1997	Alger	—			11 : z ₄ , z ₂₄ : —	(I, i)
	Cannstatt					
	Istanbul					
	Mississippi					
1998	Bardo	1,9,12 : b : e,n,x	(i)	35 : 1 : z ₃₅	(i)	—
	Berlin	42 : g,t : —	(i)	58 : z ₅₂ : z ₃₅	(i)	
	Galiema			60 : z ₅₂ : z ₅₃	(i)	
	Hvittingfoss					
	Idican					
1999	Telekebir	—				—
	Liverpool					
2000	Fischerkietz	—				—
	Kibusi					
	Llandoff					
	Telhashomer					
2001	Bracknell	41 : z : 1,5	(i)			—
	Stockholm					
	Suelldorf					

<i>Salmonella enterica</i>						
Rok / year	<i>enterica</i> (I)	podgatunek / subspecies		<i>houtenae</i> (IV)	<i>indica</i> (VI)	
		<i>salamae</i> (II)	<i>diarizonae</i> (IIIb)			
		serowar (źródło izolacji) / serovar (source of isolation)				
2002	Bergen Finkenwerder Halle (i)	13,22 : z ₂₉ : 1,5 (i)	—	—	45 : a : e,n,x (i)	
2003	Isaszeg Lindern (i, i)	42 : b : e,n,x,z ₁₅ (i)	—	—	—	
2004	Schleissheim Inverness (i)	—	—	—	—	
2005	Uzaramo Hull (i)	—	—	—	—	
2006	Yoruba (i)	—	—	—	—	
2007	Tilene (i)	—	48 : k : z ₅₃ 48 : k : z ₅₇ ³ 61 : k : 1,5,7 (i)	—	—	

¹ i – ludzie / humans;

² i – inne (zwierzęta, żywność, pasze, woda) / non-human sources (animals, food, feed, water);

³ czerwoną czcionką wyróżniono nowy serowar, prezentujący nieznana do tej pory formułę antygenową (zostanie on uwzględniony w kolejnej edycji schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora) / serovar of the new antigenic formula is written in red (it will be described in the next issue of the White-Kauffmann-Le Minor scheme)

Zmiany w taksonomii rodzaju *Salmonella* oraz zmiany reorganizacyjne w obrębie samego schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora spowodowały wyeliminowanie niektórych serowarów ze schematu. Uwzględniając te zmiany, zgodnie z prowadzoną przez Krajowy Ośrodek *Salmonella* ewidencją wszystkich występujących w Polsce serowarów *Salmonella*, do 1994 roku zarejestrowano ich łącznie 158. Wyniki badań będących między innymi celem niniejszej pracy, pozwoliły na uzupełnienie tej listy o kolejne 52 i sporządzenie aktualnego wykazu typów serologicznych pałeczek *Salmonella* wyizolowanych w Polsce w ciągu ostatnich 50 lat. W latach 1957 – 2007, w ramach badań prowadzonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella*, określono ogółem 210 serowarów *Salmonella* (tab. 20).

Tabela 20. Serowary *Salmonella* wyizolowane w Polsce od ludzi i z innych źródeł, określone w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1957 – 2007^{1,2}

Table 20. *Salmonella* serovars isolated in Poland from human and non-human sources, identified by the National *Salmonella* Centre during the period from 1957 to 2007^{1,2}

Grupa Group	Serowar(y) Serovar(s)	Liczba serowarów Number of serovars
O:2	Paratyphi A	1
O:4	Kisangani, Bispebjerg, Paratyphi B, Abony (<i>S. abortusovis</i> obecnie połączona z <i>S. Abony</i>), II (1,4,12,27:b:e,n,x), Schleissheim , Stanley, Schwarzengrund, Disburg, Saintpaul, Reading, Chester, San Diego, Derby, Agona, Essen, Hato, California, Kingston, Banana, Typhimurium, Agama, Ljubliana, Bredeney, Brandenburg, Kunduchi, Heidelberg, Coeln, Kiambu , Indiana, Stanleyville, Haifa, Abortusequi	33
O:7	Oslo, Coleypark, Brazzaville, Ohio (oraz war. 14+), Paratyphi C, Choleraesuis, Isangi (<i>S. mission</i> obecnie połączony z <i>S. Isangi</i>), Livingstone, Norwich, Braenderup, Rissen, Montevideo, Oranienburg, Galiema , Thompson, Singapore, Concord, Potsdam, Gdansk, Virchow, Infantis, Bareilly, Hartford, Oakland, Mbandaka, Jerusalem, Tennessee, Lille (oraz war. 14 ⁺)	28
O:8	Tado, Virginia, Muenchen, Manhattan, Bardo , Newport, Kottbus, Tshiongwe, Emek, Yokoe, Takoradi, Bonariensis, Kentucky, Blockley, Haardt, Lichfield, Manchester, Breukelen, Hindmarsh, Bovismorbificans, Goldcoast, Altona, Inchpark, Chailey, Corvallis, Albany, Istanbul , Hadar, Glostrup, Molade	30
O:9	Miami, Saarbruecken, II (1,9,12:b:e,n,x) , Durban, Typhi, Eastbourne, Berta, Enteritidis, Blegdam, Dublin, Kapemba, Javiana , Gallinarum (oraz biowar Pullorum)	16
O:9,46	Plymouth , India, Oukam , Fresno	4
O:3,10	Oxford, Butantan (oraz war. 15 ⁺), Onireke, Vejle, Muenster (oraz war. 15 ⁺), Anatum (oraz war. 15 ⁺), Nyborg , Newlands, Meleagridis (oraz war. 15 ⁺), Amsterdam (oraz war. 15 ⁺), Westhampton (oraz war. 15 ⁺), Falkensee, Zanzibar, Nchanga, London (oraz war. 15 ⁺), Give (oraz war. 15 ⁺), Uganda (oraz war. 15 ⁺), Elizabethville, Weltevreden, Orion (oraz war. 15 ⁺ i war. 15 ⁺ ,34 ⁺), Stockholm , Lexington	22
O:1,3,19	Liverpool , Senftenberg, Cannstatt , Taksony, Westerstede, Krefeld, Llandoff , Dessau	8

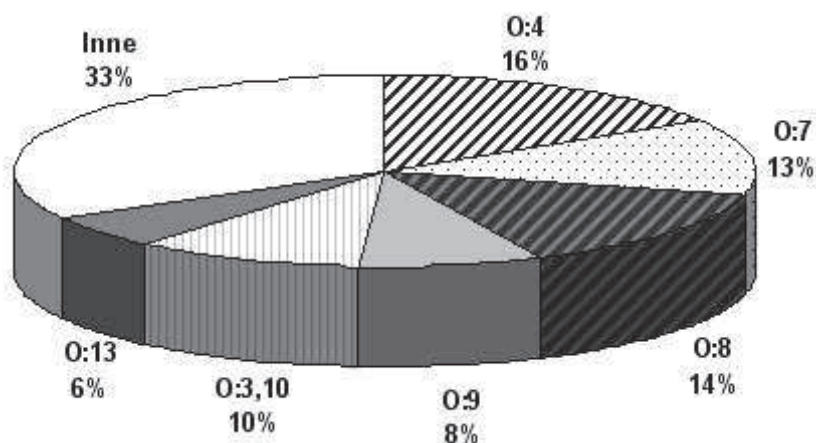
Grupa <i>Group</i>	Serowar(y) <i>Serovar(s)</i>	Liczba serowarów <i>Number of serovars</i>
O:11	Adamstua, Stendal, Rubislaw, IV (11:z₄z₂₃:-) , Telhashomer	5
O:13	Ibadan, Mississippi , Bracknell , Grumpensis , Teitelkebir , Havana, Agbeni , Idican , Kedougou, Poona, Worthington, II (13,22:z₂₉:1,5) , Cubana	13
O:6,14	Heves, Finkenwerder , Lindern , Fischerkietz , Uzaramo	5
O:16	Brazil, Hull , Hvittingfoss , Yoruba , Gaminara, Salford	6
O:17	Berlin	1
O:18	Cerro	1
O:21	Minnesota	1
O:28	Halle , Kibusi , Pomona	3
O:30	Urbana, Morehead	2
O:35	Adelaide, Anecho, IIIb (35:i:z₃₅) , Alachua	4
O:38	Thiaroye, Inverness , Alger , IIIb (38:r:z)	4
O:40	Johannenburg, Tilene	2
O:41	II (41:z:1,5) , Waycross, Lodz	3
O:42	II (42:b:e,n,x,z₁₅) , II (42:g:t:-)	2
O:43	IV (43:z ₄ z ₂₃ :-)	1
O:45	VI (45:a:e,n,x) , Suellendorf	2
O:47	II (47:a:1,5), Bergen , Alexanderplatz	3
O:48	II (48:d:z₆) , IIIb (48:k:z₅₃) , IIIb (48:k:z₅₇) , IIIb (48:r:e,n,x,z ₁₅), IV (48:z ₄ z ₂₃ :-), Isaszeg	6
O:50	IIIb (50:k:z ₅₃)	1
O:58	IIIb (58:z₅₂:z₃₅)	1
O:60	IIIb (60:z₅₂:z₅₃)	1
O:61	IIIb (61:k:1,5,7)	1
Ogółem <i>Total</i>	30 grup serologicznych / 30 <i>serological groups</i>	210

¹ Kolejność grup serologicznych i serowarów w grupach – zgodnie ze zmodyfikowanym schematem White’a-Kauffmanna-Le Minora; war. = wariant. ² Serowary wyizolowane w Polsce po raz pierwszy w latach 1995–2007, zidentyfikowane w wyniku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy, zostały wyszczególnione poprzez pogrubienie czcionki i podkreślenie (nowy serowar wyróżniono czerwoną czcionką; zostanie on uwzględniony w kolejnej edycji schematu White’a-Kauffmanna-Le Minora)

¹ *The order of groups and serovars within the groups – according to the listing in the modified White-Kauffmann-Le Minor scheme; war. = variant.* ² *Serovars isolated for the first time in Poland between 1995 and 2007 (and identified as a result of this work) are underlined and written in bold (new serovar is written in red; it will be described in the next issue of the White-Kauffmann-Le Minor scheme)*

Najliczniej, pod względem liczby serowarów, prezentowane były grupy – O:4 (33 serowary), O:8 (30 serowarów), O:7 (28 serowarów), O:3,10 (22 serowary), O:9 (16 serowarów) i O:13 (13 serowarów). Należało do nich prawie 70% wszystkich wyizolowanych serowarów (ryc. 15). Pozostałe 24 grupy serologiczne reprezentowane były odpowiednio każda przez niewielką liczbę (od 1 do 8) serowarów. Szczegółowy wykaz serowarów *Salmonella* występujących w Polsce, określonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1957 – 2007, przygotowany w oparciu o najnowszą edycję zmody-

fikowanego schematu, nazywanego obecnie schematem White'a-Kauffmanna-Le Minora, przedstawiono w postaci Aneksu do niniejszej pracy. Ten skrócony schemat, uwzględniający wzory antygenowe wszystkich wariantów serologicznych rozpoznanych do tej pory w kraju, potwierdzonych przez uprawnione do tego instytucje międzynarodowe, jest dokumentem referencyjnym przeznaczonym do celów identyfikacyjnych. Może stanowić istotną (wręcz rekomendowaną) pomoc w pracy dla wszystkich laboratoriów zajmujących się diagnostyką serologiczną pałeczek *Salmonella* w Polsce. Uwzględniono w nim również, w przypisach umieszczonych pod odpowiednimi grupami serologicznymi, informacje o tych serowarach *Salmonella*, które dawniej występowały w Polsce, a których nazwy zostały usunięte ze zmodyfikowanego schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora, z jednoczesnym podaniem ich aktualnych odpowiedników. Opublikowanie tego wykazu ułatwi dostęp zainteresowanym laboratoriom do zawartych w nim informacji. Stanowi on również cenne źródło danych prowadzących do pogłębienia wiedzy w zakresie epidemiologii pałeczek z rodzaju *Salmonella* izolowanych w Polsce w ciągu ostatniego półwiecza.



Ryc.15. Serowary *Salmonella* występujące w Polsce, określone w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w okresie od 1957 do 2007 roku – procentowy udział serowarów z poszczególnych grup serologicznych

Fig. 15. *Salmonella* serovars isolated in Poland, identified by the National *Salmonella* Centre during the period from 1957 to 2007 – the percentage share of serovars belonging to the particular O-groups

Do celów porównawczych dla wyników badań otrzymanych w ramach niniejszej pracy i dla uzyskania możliwości pełnego oszacowania sytuacji epidemiologicznej *Salmonella* w Polsce obserwowanej w ciągu ostatnich lat, opracowano na podstawie do-

stępnych danych epidemiologicznych (źródło danych – tab. 14, Materiały i metody, punkt 3.3.) zestawienia przedstawiające serowary *Salmonella* najczęściej izolowane od ludzi w kraju w latach 1995 – 2007 oraz liczbę osób, u których wykryto zakażenia – ogółem (tab. 21) i z wyszczególnieniem osób chorych i zdrowych w poszczególnych latach (tab. 22). W okresie od 1995 do 2007 roku zakażeniu pałeczkami *Salmonella* uległo w Polsce około 380 tysięcy osób. Dominującym serowarem, najczęściej wykrywanym u ludzi, były pałeczki *Salmonella* Enteritidis. W omawianym okresie czasu pałeczki te spowodowały zakażenie u ponad 320 tysięcy osób (ok. 86% wszystkich bakteriologicznie potwierdzonych przypadków zakażeń *Salmonella*), szczęśliwie z obserwowaną w kolejnych latach wyraźną tendencją spadkową. Kolejne miejsca zajęły odpowiednio: *S. Typhimurium* (ok. 5% wszystkich zakażeń *Salmonella*), a następnie *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport* i *S. Mbandaka*. W poszczególnych latach (od 1995 do 2007 roku) zajmowały one naprzemiennie miejsca od 2 do 7 na liście serowarów najczęściej wykrywanych u ludzi w Polsce. Uwagę zwraca również *S. Agona*, z ogólną liczbą 1 183 zarejestrowanych przypadków, a także serowary *S. Kottbus*, *S. Oranienburg*, *S. Thompson*, *S. Derby*, *S. Indiana*, *S. Senftenberg* i *S. Anatum*, z których każdy stanowił przyczynę znacznej liczby zakażeń u ludzi (od ok. 400 do ponad 800 osób) w omawianym przedziale czasu.

Salmonella Enteritidis to wyjątkowy serowar i załuguje na szczególną uwagę. W Polsce, już od dawna, serowar ten jest wśród pałeczek *Salmonella* epidemicznym „numerem jeden” (tab. 23). W ciągu ostatnich 25 lat (1983 – 2007) zajmował niezmiennie pierwsze miejsce wśród serowarów najczęściej izolowanych od ludzi w Polsce, przy zmieniającej się dystrybucji pozostałych serowarów. Dane przedstawione na rycinie 16 pozwolą prześledzić jak kształtowała się liczba zakażeń u ludzi w naszym kraju spowodowanych bakteriami *S. Enteritidis* (i innymi serowarami) na tle ogólnej liczby zakażeń *Salmonella* w ciągu ostatnich 50 lat.

Tabela 21. Serowary *Salmonella* najczęściej występujące u ludzi w Polsce, 1995 – 2007
 Table 21. *Salmonella* serovars most frequently identified in humans, Poland, 1995 – 2007

Serowar Serovar	Liczba osób, u których wykryto zakażenie / Number of infected persons														
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	1995 – 2007	
1. <i>S. Enteritidis</i>	40341	34969	30544	34007	30233	28444	23088	24328	19892	17254	16256	12919	11119	323394	
2. <i>S. Typhimurium</i>	1358	1196	1260	1521	1196	1050	1140	1293	921	854	1232	1128	1144	15293	
3. <i>S. Hadar</i>	830	475	457	472	332	550	583	1406	1194	568	702	649	303	8521	
4. <i>S. Infantis</i>	949	645	701	506	519	495	412	523	659	520	739	471	410	7549	
5. <i>S. Virchow</i>	914	860	551	677	301	449	609	504	459	420	451	413	451	7059	
6. <i>S. Newport</i>	210	154	152	122	85	91	86	97	132	71	83	136	88	1507	
7. <i>S. Mbandaka</i>	68	79	293	168	130	153	97	86	103	68	65	89	74	1473	
8. <i>S. Agona</i>	179	172	104	60	82	69	87	71	82	97	72	47	61	1183	
9. <i>S. Kottbus</i>	69	84	106	236	36	38	65	61	50	–	60	17	–	822	
10. <i>S. Oranienburg</i>	81	158	63	49	39	100	133	58	24	19	21	15	7	767	
11. <i>S. Thompson</i>	64	65	53	91	49	110	71	90	41	–	46	41	–	721	
12. <i>S. Derby</i>	84	68	52	45	63	62	68	52	55	40	45	38	26	698	
13. <i>S. Indiana</i>	–	–	130	75	33	23	23	27	27	59	79	59	32	567	
14. <i>S. Saintpaul</i>	40	61	35	35	16	16	20	25	22	15	49	30	46	410	
15. <i>S. Anatum</i>	60	45	27	46	22	43	26	16	28	13	24	24	22	396	
Inne serowary / Others	721	651	922	597	469	572	436	448	333	433	256	564	415	6817	
Ogółem / Total	45968	39682	35450	38707	33605	32265	26944	29085	24022	20431	20180	16640	14198	377177	

„–” dany serowar nie występował wśród serowarów dominujących w danym roku / „–” indicates that a given serovar was not among prevalent serovars for that year

¹ *S. Albany*, *S. Amsterdam*, *S. Bareilly*, *S. Blegdam*, *S. Blockley*, *S. Bovismorbificans*, *S. Braenderup*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Chester*, *S. Choleraesuis*, *S. Djugu*, *S. Goldcoast*, *S. Heidelberg*, *S. Isangi*, *S. Kentucky*, *S. Livingstone*, *S. London*, *S. Manhattan*, *S. Muenchen*, *S. Munster*, *S. Orion*, *S. Panama*, *S. Paratyphi B*, *S. Sandiego*, *S. Schleissheim*, *S. Schwarzengrund*, *S. Senftenberg*, *S. Tennessee*, *S. Tshiongwé*, *S. Typhi* oraz inne rzadko występujące serowary z grup O:4, O:7, O:8, O:9, O:10, O:1,3,19 i innych/ as well as other rarely occurring serovars from groups O:4, O:7, O:8, O:9, O:3,10, O:1,3,19 and others

Tabela 22. Serowary *Salmonella* najczęściej wykrywane u osób chorych i zdrowych w Polsce w kolejnych latach, od 1995 do 2007 roku
 Table 22. *Salmonella* serovars most frequently isolated from ill and healthy persons, Poland, 1995 – 2007

	Liczba osób, u których wykryto zakażenie / Number of infected persons											
	1995		1996		1997		1998(*)		1999		2000	
	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy
1. <i>S. Enteritidis</i>	31918	8423	20535	14434	23382	7162	25951	8056	23382	7162	25951	8056
2. <i>S. Typhimurium</i>	1358	923	614	582	828	432	1012	509	828	432	1012	509
3. <i>S. Infantis</i>	567	382	359	501	379	322	359	318	379	322	359	318
4. <i>S. Virchow</i>	626	288	261	384	328	223	275	231	328	223	275	231
5. <i>S. Hadar</i>	529	301	182	293	276	181	259	213	276	181	259	213
6. <i>S. Newport</i>	119	91	64	108	130	163	132	104	130	163	132	104
7. <i>S. Agona</i>	94	85	39	119	87	65	81	87	87	65	81	87
8. <i>S. Derby</i>	29	55	41	113	5	126	71	51	5	126	71	51
9. <i>S. Oranienburg</i>	46	35	27	57	110	20	57	34	110	20	57	34
10. <i>S. Kottbus</i>	41	28	26	53	45	61	40	35	45	61	40	35
11. <i>S. Mbandaka</i>	35	33	14	54	50	54	51	30	50	54	51	30
12. <i>S. Typhi</i>	20	45	21	44	39	44	30	30	39	44	30	30
13. <i>S. Thompson</i>	41	23	30	31	34	29	18	33	34	29	18	33
14. <i>S. Livingstone</i>	29	34	11	34	31	22	23	26	31	22	23	26
15. <i>S. Anatum</i>	21	39	10	26	22	30	13	33	22	30	13	33

		2000				2001				2002			
		chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy
1.	<i>S. Enteritidis</i>	22829	7404	21133	7311	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Enteritidis</i>	17146	5942	<i>S. Enteritidis</i>	18432	5896	
2.	<i>S. Typhimurium</i>	752	444	704	346	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	801	339	<i>S. Hadar</i>	898	508	
3.	<i>S. Infantis</i>	335	184	314	236	<i>S. Virchow</i>	<i>S. Virchow</i>	388	221	<i>S. Typhimurium</i>	944	349	
4.	<i>S. Hadar</i>	200	132	262	233	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Hadar</i>	364	219	<i>S. Infantis</i>	265	258	
5.	<i>S. Virchow</i>	194	107	288	161	<i>S. Virchow</i>	<i>S. Infantis</i>	255	157	<i>S. Virchow</i>	306	198	
6.	<i>S. Mbandaka</i>	58	72	73	80	<i>S. Mbandaka</i>	<i>S. Oranienburg</i>	56	77	<i>S. Newport</i>	47	50	
7.	<i>S. Newport</i>	50	35	56	54	<i>S. Thompson</i>	<i>S. Mbandaka</i>	47	50	<i>S. Thompson</i>	45	45	
8.	<i>S. Agona</i>	45	37	53	47	<i>S. Agona</i>	<i>S. Agona</i>	38	49	<i>S. Mbandaka</i>	41	45	
9.	<i>S. Derby</i>	29	34	36	55	<i>S. Newport</i>	<i>S. Newport</i>	47	39	<i>S. Agona</i>	19	52	
10.	<i>S. Thompson</i>	31	18	40	29	<i>S. Thompson</i>	<i>S. Thompson</i>	38	33	<i>S. Kottbus</i>	38	23	
11.	<i>S. Oranienburg</i>	13	26	29	33	<i>S. Derby</i>	<i>S. Derby</i>	35	33	<i>S. Oranienburg</i>	23	35	
12.	<i>S. Kottbus</i>	20	16	30	27	<i>S. Braenderup</i>	<i>S. Kottbus</i>	38	27	<i>S. Isangi</i>	16	36	
13.	<i>S. Heidelberg</i>	24	11	34	17	<i>S. Heidelberg</i>	<i>S. Braenderup</i>	30	27	<i>S. Derby</i>	13	39	
14.	<i>S. Indiana</i>	15	18	11	32	<i>S. Anatum</i>	<i>S. Isangi</i>	20	9	<i>S. Heidelberg</i>	19	14	
15.	<i>S. Livingstone</i>	11	19	20	18	<i>S. Kottbus</i>	<i>S. Anatum</i>	14	12	<i>S. Indiana</i>	5	22	

		Liczba osób, u których wykryto zakażenie / Number of infected persons													
		2003				2004				2005				2006	
		chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy	chorzy ill	zdrowi healthy		
1.	<i>S. Enteritidis</i>	14674	5218	<i>S. Enteritidis</i>	12645	4609	<i>S. Enteritidis</i>	11925	4331	<i>S. Enteritidis</i>	9049	3870			
2.	<i>S. Hadar</i>	639	555	<i>S. Typhimurium</i>	533	321	<i>S. Typhimurium</i>	849	383	<i>S. Typhimurium</i>	716	412			
3.	<i>S. Typhimurium</i>	615	306	<i>S. Hadar</i>	279	289	<i>S. Infantis</i>	446	293	<i>S. Hadar</i>	348	301			
4.	<i>S. Infantis</i>	337	322	<i>S. Infantis</i>	212	308	<i>S. Hadar</i>	354	348	<i>S. Infantis</i>	235	236			
5.	<i>S. Virchow</i>	246	213	<i>S. Virchow</i>	246	174	<i>S. Virchow</i>	247	204	<i>S. Virchow</i>	227	186			
6.	<i>S. Newport</i>	62	70	<i>S. Agona</i>	37	60	<i>S. Newport</i>	39	44	<i>S. Newport</i>	71	65			
7.	<i>S. Mbandaka</i>	38	65	<i>S. Newport</i>	29	42	<i>S. Indiana</i>	36	43	<i>S. Mbandaka</i>	30	59			
8.	<i>S. Agona</i>	28	54	<i>S. Mbandaka</i>	26	42	<i>S. Agona</i>	34	38	<i>S. Indiana</i>	18	41			
9.	<i>S. Derby</i>	23	32	<i>S. Indiana</i>	23	36	<i>S. Mbandaka</i>	23	42	<i>S. Agona</i>	18	29			
10.	<i>S. Kottbus</i>	30	20	<i>S. Derby</i>	19	21	<i>S. Kottbus</i>	35	25	<i>S. Thompson</i>	15	26			
11.	<i>S. Thompson</i>	16	25	<i>S. Bredeney</i>	20	18	<i>S. Saintpaul</i>	23	26	<i>S. Derby</i>	11	27			
12.	<i>S. Anatum</i>	5	23	<i>S. Oranienburg</i>	7	12	<i>S. Thompson</i>	21	25	<i>S. Saintpaul</i>	11	19			
13.	<i>S. Indiana</i>	11	16	<i>S. Orion</i>	3	12	<i>S. Derby</i>	21	24	<i>S. Blockley</i>	12	14			
14.	<i>S. Oranienburg</i>	13	11	<i>S. Saintpaul</i>	9	6	<i>S. Albany</i>	14	18	<i>S. Anatum</i>	5	19			
15.	<i>S. Tshiongwe</i>	14	9	<i>S. Isangi</i>	9	5	<i>S. Chester</i>	9	19	<i>S. Chester</i>	11	12			
2007															
	<i>S. Enteritidis</i>	7183	3936	<i>S. Hadar</i>	105	198	<i>S. Saintpaul</i>	16	30	<i>S. Chester</i>	9	5			
	<i>S. Typhimurium</i>	682	462	<i>S. Newport</i>	24	64	<i>S. Indiana</i>	6	26	<i>S. Bredeney</i>	3	9			
	<i>S. Virchow</i>	191	260	<i>S. Mbandaka</i>	18	56	<i>S. Derby</i>	6	20	<i>S. Livingstone</i>	1	11			
	<i>S. Infantis</i>	168	242	<i>S. Agona</i>	13	48	<i>S. Anatum</i>	9	13						

(*) począwszy od 1998 roku, liczby prezentowane w rubryce „chorzy”, uwzględniają osoby chore i ozdrowieńców łącznie

(*) since 1998 numbers presented in column “ill” indicate ill and convalescent persons together

Tabela 23. Serowary *Salmonella* dominujące wśród przypadków zakażeń u ludzi, Polska, 1957 – 2007 (kolejność wg liczby osób, u których wykryto zakażenia)
 Table 23. Spectrum of *Salmonella* serovars most frequently isolated from humans, Poland, 1957 – 2007 (rank according to the number of infected persons)

	1957				1958				1959				1960				1961			
1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	<i>S. Typhimurium</i>			
2.	<i>S. Anatum</i>	2.	<i>S. Give</i>	2.	<i>S. Give</i>	2.	<i>S. Newington</i>	2.	<i>S. Newington</i>	2.	<i>S. Enteritidis</i>	2.	<i>S. Enteritidis</i>	2.	<i>S. Give</i>	2.	<i>S. Give</i>			
3.	S. Enteritidis	3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Give</i>	3.	<i>S. Give</i>	3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Newington</i>			
4.	<i>S. Newington</i>	4.	S. Enteritidis	4.	S. Enteritidis	4.	S. Enteritidis	4.	S. Enteritidis	4.	<i>S. Dublin</i>	4.	<i>S. Dublin</i>	4.	<i>S. Brandenburg</i>	4.	<i>S. Brandenburg</i>			
5.	<i>S. Choleraesuis</i>	5.	<i>S. Anatum</i>	5.	<i>S. Anatum</i>	5.	<i>S. Bovismorbificans</i>	5.	<i>S. Bovismorbificans</i>	5.	<i>S. Brandenburg</i>	5.	<i>S. Brandenburg</i>	5.	<i>S. Bovismorbificans</i>	5.	<i>S. Bovismorbificans</i>			
6.	<i>S. Heidelberg</i>	6.	<i>S. Choleraesuis</i>	6.	<i>S. Choleraesuis</i>	6.	<i>S. Heidelberg</i>	6.	<i>S. Heidelberg</i>	6.	<i>S. Anatum</i>	6.	<i>S. Anatum</i>	6.	<i>S. Enteritidis</i>	6.	<i>S. Enteritidis</i>			
7.	<i>S. Dublin</i>	7.	<i>S. Heidelberg</i>	7.	<i>S. Heidelberg</i>	7.	<i>S. Brandenburg</i>	7.	<i>S. Brandenburg</i>	7.	<i>S. Bovismorbificans</i>	7.	<i>S. Bovismorbificans</i>	7.	<i>S. Kottbus</i>	7.	<i>S. Kottbus</i>			
8.	<i>S. Bovismorbificans</i>	8.	<i>S. Sainpaul</i>	8.	<i>S. Sainpaul</i>	8.	<i>S. Anatum</i>	8.	<i>S. Anatum</i>	8.	<i>S. Choleraesuis</i>	8.	<i>S. Choleraesuis</i>	8.	<i>S. Dublin</i>	8.	<i>S. Dublin</i>			
9.	<i>S. Sainpaul</i>	9.	<i>S. Bovismorbificans</i>	9.	<i>S. Bovismorbificans</i>	9.	<i>S. Dublin</i>	9.	<i>S. Dublin</i>	9.	<i>S. Heidelberg</i>	9.	<i>S. Heidelberg</i>	9.	<i>S. Anatum</i>	9.	<i>S. Anatum</i>			
10.	<i>S. Brandenburg</i>	10.	<i>S. Dublin</i>	10.	<i>S. Dublin</i>	10.	<i>S. Muenster 15+</i>	10.	<i>S. Muenster 15+</i>	10.	<i>S. Give</i>	10.	<i>S. Give</i>	10.	<i>S. Haifa</i>	10.	<i>S. Haifa</i>			
11.	<i>S. Muenster 15+ (*)</i>	11.	<i>S. Muenster 15+</i>	11.	<i>S. Muenster 15+</i>	11.	<i>S. Choleraesuis</i>	11.	<i>S. Choleraesuis</i>	11.	<i>S. Kottbus</i>	11.	<i>S. Kottbus</i>	11.	<i>S. Heidelberg</i>	11.	<i>S. Heidelberg</i>			
12.	<i>S. Derby</i>	12.	<i>S. Brandenburg</i>	12.	<i>S. Brandenburg</i>	12.	<i>S. Derby</i>	12.	<i>S. Derby</i>	12.	<i>S. Haifa</i>	12.	<i>S. Haifa</i>	12.	<i>S. Meleagridis</i>	12.	<i>S. Meleagridis</i>			
13.	<i>S. Give</i>	13.	<i>S. Derby</i>	13.	<i>S. Derby</i>	13.	<i>S. Kottbus</i>	13.	<i>S. Kottbus</i>	13.	<i>S. Muenster 15+</i>	13.	<i>S. Muenster 15+</i>	13.	<i>S. Choleraesuis</i>	13.	<i>S. Choleraesuis</i>			
(*)	dawniej <i>S. new-haw</i>	14.	<i>S. Kottbus</i>	14.	<i>S. Kottbus</i>	14.	<i>S. Sainpaul</i>	14.	<i>S. Sainpaul</i>	14.	<i>S. Montevideo</i>	14.	<i>S. Montevideo</i>	14.	<i>S. Muenster 15+</i>	14.	<i>S. Muenster 15+</i>			

	1962				1963				1964				1965				1966			
1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	<i>S. Typhimurium</i>	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis			
2.	S. Enteritidis	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>			
3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Anatum</i>	3.	<i>S. Anatum</i>	3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Newington</i>	3.	<i>S. Anatum</i>	3.	<i>S. Anatum</i>	3.	<i>S. Heidelberg</i>	3.	<i>S. Heidelberg</i>			
4.	<i>S. Bovismorbificans</i>	4.	<i>S. Newington</i>	4.	<i>S. Newington</i>	4.	<i>S. Dublin</i>	4.	<i>S. Dublin</i>	4.	<i>S. Bovismorbificans</i>	4.	<i>S. Bovismorbificans</i>	4.	<i>S. Newington</i>	4.	<i>S. Newington</i>			
5.	<i>S. Give</i>	5.	<i>S. Brandenburg</i>	5.	<i>S. Brandenburg</i>	5.	<i>S. Anatum</i>	5.	<i>S. Anatum</i>	5.	<i>S. Anatum</i>	5.	<i>S. Newington</i>	5.	<i>S. Anatum</i>	5.	<i>S. Anatum</i>			
6.	<i>S. Brandenburg</i>	6.	<i>S. Give</i>	6.	<i>S. Give</i>	6.	<i>S. Give</i>	6.	<i>S. Give</i>	6.	<i>S. Kottbus</i>	6.	<i>S. Kottbus</i>	6.	<i>S. Bovismorbificans</i>	6.	<i>S. Bovismorbificans</i>			
7.	<i>S. Anatum</i>	7.	<i>S. Derby</i>	7.	<i>S. Derby</i>	7.	<i>S. Bovismorbificans</i>	7.	<i>S. Bovismorbificans</i>	7.	<i>S. Give</i>	7.	<i>S. Give</i>	7.	<i>S. Derby</i>	7.	<i>S. Derby</i>			
8.	<i>S. Dublin</i>	8.	<i>S. Bovismorbificans</i>	8.	<i>S. Bovismorbificans</i>	8.	<i>S. Kottbus</i>	8.	<i>S. Kottbus</i>	8.	<i>S. Derby</i>	8.	<i>S. Derby</i>	8.	<i>S. Dublin</i>	8.	<i>S. Dublin</i>			
9.	<i>S. Derby</i>	9.	<i>S. Dublin</i>	9.	<i>S. Dublin</i>	9.	<i>S. Brandenburg</i>	9.	<i>S. Brandenburg</i>	9.	<i>S. Choleraesuis</i>	9.	<i>S. Choleraesuis</i>	9.	<i>S. Brandenburg</i>	9.	<i>S. Brandenburg</i>			
10.	<i>S. Heidelberg</i>	10.	<i>S. Heidelberg</i>	10.	<i>S. Heidelberg</i>	10.	<i>S. Choleraesuis</i>	10.	<i>S. Choleraesuis</i>	10.	<i>S. Heidelberg</i>	10.	<i>S. Heidelberg</i>	10.	<i>S. Give</i>	10.	<i>S. Give</i>			
11.	<i>S. Kottbus</i>	11.	<i>S. Stanleyville</i>	11.	<i>S. Stanleyville</i>	11.	<i>S. Haifa</i>	11.	<i>S. Haifa</i>	11.	<i>S. Muenster 15+</i>	11.	<i>S. Muenster 15+</i>	11.	<i>S. Kottbus</i>	11.	<i>S. Kottbus</i>			
12.	<i>S. Choleraesuis</i>	12.	<i>S. Choleraesuis</i>	12.	<i>S. Choleraesuis</i>	12.	<i>S. Choleraesuis</i>	12.	<i>S. Muenster 15+</i>	12.	<i>S. Muenster 15+</i>	12.	<i>S. Brandenburg</i>	12.	<i>S. Muenster 15+</i>	12.	<i>S. Muenster 15+</i>			
13.	<i>S. Saintpaul</i>	13.	<i>S. Kottbus</i>	13.	<i>S. Kottbus</i>	13.	<i>S. Derby</i>	13.	<i>S. Derby</i>	13.	<i>S. Derby</i>	13.	<i>S. Dublin</i>	13.	<i>S. Gallinarum</i>	13.	<i>S. Gallinarum</i>			
14.	<i>S. Meleagridis</i>	14.	<i>S. London</i>	14.	<i>S. London</i>	14.	<i>S. Montevideo</i>	14.	<i>S. Montevideo</i>	14.	<i>S. Montevideo</i>	14.	<i>S. London</i>	14.	<i>S. Choleraesuis</i>	14.	<i>S. Choleraesuis</i>			

	1967	1968	1969	1970	1971
1.	S. Enteritidis	1. S. Enteritidis	1. S. Enteritidis	1. S. Enteritidis	1. S. Enteritidis
2.	<i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>
3.	<i>S. Anatum</i>	3. <i>S. Anatum</i>	3. <i>S. Anatum</i>	3. <i>S. Anatum</i>	3. <i>S. Anatum</i>
4.	<i>S. Heidelberg</i>	4. <i>S. Heidelberg</i>	4. <i>S. Derby</i>	4. <i>S. Derby</i>	4. <i>S. Derby</i>
5.	<i>S. Brandenburg</i>	5. <i>S. Bovismorbificans</i>	5. <i>S. Bovismorbificans</i>	5. <i>S. Bovismorbificans</i>	5. <i>S. Bovismorbificans</i>
6.	<i>S. Bovismorbificans</i>	6. <i>S. Derby</i>	6. <i>S. Heidelberg</i>	6. <i>S. Panama</i>	6. <i>S. Heidelberg</i>
7.	<i>S. Newington</i>	7. <i>S. Meleagridis</i>	7. <i>S. Panama</i>	7. <i>S. Heidelberg</i>	7. <i>S. Give</i>
8.	<i>S. Derby</i>	8. <i>S. Newington</i>	8. <i>S. Newington</i>	8. <i>S. Newington</i>	8. <i>S. Newington</i>
9.	<i>S. Dublin</i>	9. <i>S. Panama</i>	9. <i>S. Kapemba</i>	9. <i>S. Brandenburg</i>	9. <i>S. Panama</i>
10.	<i>S. Meleagridis</i>	10. <i>S. Give</i>	10. <i>S. Give</i>	10. <i>S. Agona</i>	10. <i>S. Agona</i>
11.	<i>S. Give</i>	11. <i>S. Brandenburg</i>	11. <i>S. Isangi</i>	11. <i>S. Give</i>	11. <i>S. Brandenburg</i>
12.	<i>S. Choleraesuis</i>	12. <i>S. Senftenberg</i>	12. <i>S. Dublin</i>	12. <i>S. Stanleyville</i>	12. <i>S. Kottbus</i>
13.	<i>S. Senftenberg</i>	13. <i>S. Choleraesuis</i>	13. <i>S. Muenster 15+</i>	13. <i>S. Kottbus</i>	13. <i>S. Newport</i>
14.	<i>S. Muenster 15+</i>	14. <i>S. Muenster 15+</i>	14. <i>S. Meleagridis</i>	14. <i>S. Newport</i>	

	1972	1973	1974	1975	1976
1.	S. Enteritidis	1. <i>S. Typhimurium</i>	1. <i>S. Typhimurium</i>	1. <i>S. Typhimurium</i>	1. <i>S. Typhimurium</i>
2.	<i>S. Typhimurium</i>	2. S. Enteritidis	2. <i>S. Agona</i>	2. S. Enteritidis	2. <i>S. Agona</i>
3.	<i>S. Anatum</i>	3. <i>S. Anatum</i>	3. S. Enteritidis	3. <i>S. Anatum</i>	3. S. Enteritidis
4.	<i>S. Agona</i>	4. <i>S. Agona</i>	4. <i>S. Anatum</i>	4. <i>S. Agona</i>	4. <i>S. Brandenburg</i>
5.	<i>S. Derby</i>	5. <i>S. Derby</i>	5. <i>S. Brandenburg</i>	5. <i>S. Brandenburg</i>	5. <i>S. Anatum</i>
6.	<i>S. Bovismorbificans</i>	6. <i>S. Bovismorbificans</i>	6. <i>S. Bovismorbificans</i>	6. <i>S. Bovismorbificans</i>	6. <i>S. Bovismorbificans</i>
7.	<i>S. Brandenburg</i>	7. <i>S. Brandenburg</i>	7. <i>S. Kottbus</i>	7. <i>S. Kottbus</i>	7. <i>S. Kottbus</i>
8.	<i>S. Give</i>	8. <i>S. Give</i>	8. <i>S. Derby</i>	8. <i>S. Panama</i>	8. <i>S. Oranienburg</i>
9.	<i>S. Manhattan</i>	9. <i>S. Manhattan</i>	9. <i>S. Manhattan</i>	9. <i>S. Newport</i>	9. <i>S. Newport</i>
10.	<i>S. Meleagridis</i>	10. <i>S. Newington</i>	10. <i>S. Newport</i>	10. <i>S. Oranienburg</i>	10. <i>S. Stanleyville</i>
11.	<i>S. Panama</i>	11. <i>S. Moscow</i>	11. <i>S. Give</i>	11. <i>S. Derby</i>	11. <i>S. Newington</i>
12.	<i>S. Heidelberg</i>	12. <i>S. Livingstone</i>	12. <i>S. Newington</i>	12. <i>S. Newington</i>	12. <i>S. Derby</i>
13.	<i>S. Reading</i>	13. <i>S. Isangi</i>	13. <i>S. Meleagridis</i>	13. <i>S. Stanleyville</i>	13. <i>S. Panama</i>
14.	<i>S. Newington</i>	14. <i>S. Dublin</i>	14. <i>S. Livingstone</i>	14. <i>S. Heidelberg</i>	14. <i>S. Give</i>
15.	<i>S. Isangi</i>	15. <i>S. Choleraesuis</i>	15. <i>S. Isangi</i>	15. <i>S. Give</i>	15. <i>S. Heidelberg</i>

	1977	1978	1982	1983	1984
1.	<i>S. Typhimurium</i>	1. <i>S. Typhimurium</i>	1. <i>S. Typhimurium</i>	1. S. Enteritidis	1. S. Enteritidis
2.	<i>S. Agona</i>	2. <i>S. Agona</i>	2. S. Enteritidis	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>
3.	S. Enteritidis	3. S. Enteritidis	3. <i>S. Agona</i>	3. <i>S. Agona</i>	3. <i>S. Agona</i>
4.	<i>S. Newport</i>	4. <i>S. Newport</i>	4. <i>S. Thompson</i>	4. <i>S. Anatum</i>	4. <i>S. Hadar</i>
5.	<i>S. Anatum</i>	5. <i>S. Stanleyville</i>	5. <i>S. Oranienburg</i>	5. <i>S. Heidelberg</i>	5. <i>S. Oranienburg</i>
6.	<i>S. Stanleyville</i>	6. <i>S. Anatum</i>	6. <i>S. Infantis</i>	6. <i>S. Infantis</i>	6. <i>S. Heidelberg</i>
7.	<i>S. Bovismorbificans</i>	7. <i>S. Oranienburg</i>	7. <i>S. Newport</i>	7. <i>S. Manhattan</i>	7. <i>S. Thompson</i>
8.	<i>S. Oranienburg</i>	8. <i>S. Bovismorbificans</i>	8. <i>S. Anatum</i>	8. <i>S. Oranienburg</i>	8. <i>S. Infantis</i>
9.	<i>S. Brandenburg</i>	9. <i>S. Brandenburg</i>	9. <i>S. Heidelberg</i>	9. <i>S. Newport</i>	9. <i>S. Newport</i>
10.	<i>S. Kottbus</i>	10. <i>S. Infantis</i>	10. <i>S. Manhattan</i>	10. <i>S. Isangi</i>	10. <i>S. Bovismorbificans</i>
11.	<i>S. Infantis</i>	11. <i>S. Saintpaul</i>	11. <i>S. Isangi</i>	11. <i>S. Bovismorbificans</i>	11. <i>S. Manhattan</i>
12.	<i>S. Dublin</i>	12. <i>S. Livingstone</i>	12. <i>S. Livingstone</i>	12. <i>S. Thompson</i>	12. <i>S. Anatum</i>
13.	<i>S. Senftenberg</i>	13. <i>S. London</i>	13. <i>S. Bovismorbificans</i>	13. <i>S. Kottbus</i>	13. <i>S. Isangi</i>
14.	<i>S. Isangi</i>	14. <i>S. Kottbus</i>	14. <i>S. Panama</i>	14. <i>S. Meleagridis</i>	14. <i>S. London</i>
15.	<i>S. Livingstone</i>	15. <i>S. Derby</i>	15. <i>S. Derby</i>	15. <i>S. Livingstone</i>	15. <i>S. Kottbus</i>

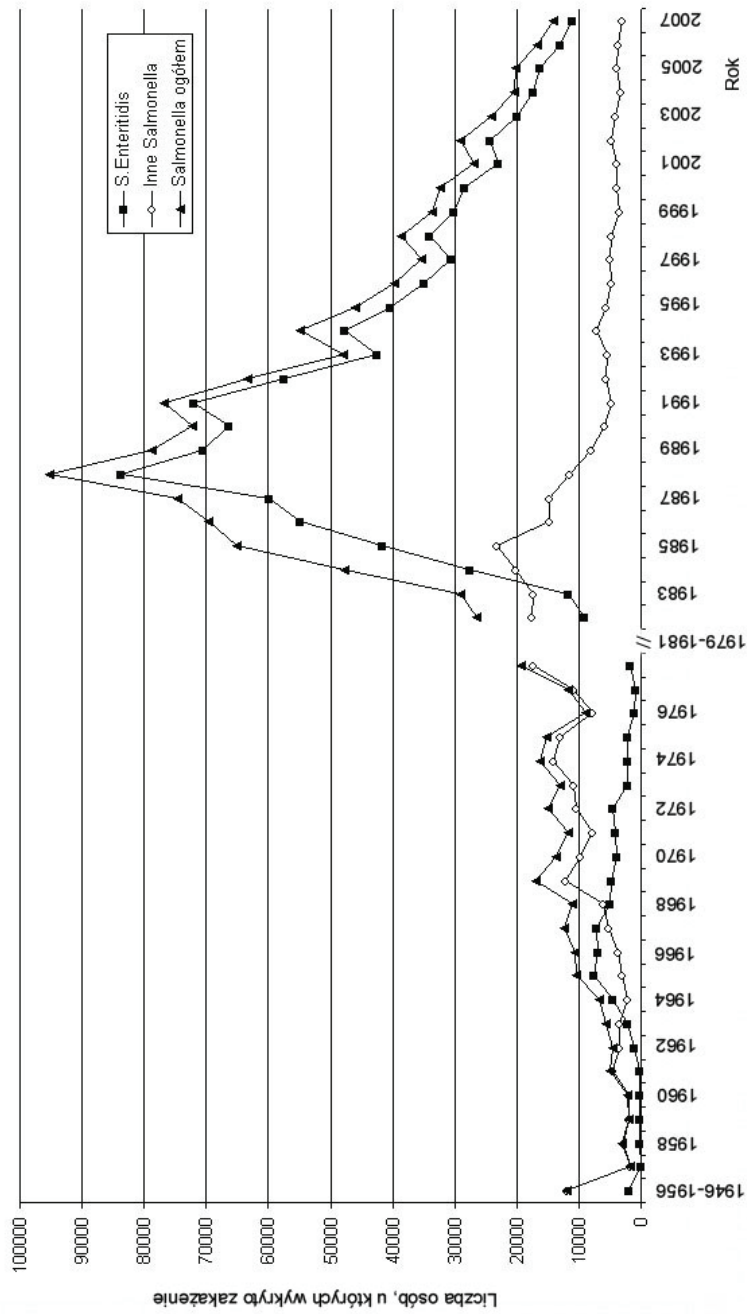
	1985	1986	1987	1988	1989
1.	S. Enteritidis	1. S. Enteritidis	1. S. Enteritidis	1. S. Enteritidis	1. S. Enteritidis
2.	<i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>
3.	<i>S. Agona</i>	3. <i>S. Agona</i>	3. <i>S. Agona</i>	3. <i>S. Agona</i>	3. <i>S. Agona</i>
4.	<i>S. Oranienburg</i>	4. <i>S. Infantis</i>	4. <i>S. Infantis</i>	4. <i>S. Infantis</i>	4. <i>S. Infantis</i>
5.	<i>S. Heidelberg</i>	5. <i>S. Oranienburg</i>	5. <i>S. Oranienburg</i>	5. <i>S. Oranienburg</i>	5. <i>S. Newport</i>
6.	<i>S. Infantis</i>	6. <i>S. Heidelberg</i>	6. <i>S. Heidelberg</i>	6. <i>S. Anatum</i>	6. <i>S. Hadar</i>
7.	<i>S. Hadar</i>	7. <i>S. Anatum</i>	7. <i>S. Hadar</i>	7. <i>S. Heidelberg</i>	7. <i>S. Anatum</i>
8.	<i>S. Anatum</i>	8. <i>S. Hadar</i>	8. <i>S. Anatum</i>	8. <i>S. Livingstone</i>	8. <i>S. Saintpaul</i>
9.	<i>S. Newport</i>	9. <i>S. Newport</i>	9. <i>S. Newport</i>	9. <i>S. Thompson</i>	9. <i>S. Oranienburg</i>
10.	<i>S. Bovismorbificans</i>	10. <i>S. Saintpaul</i>	10. <i>S. Saintpaul</i>	10. <i>S. Newport</i>	10. <i>S. Livingstone</i>
11.	<i>S. Kottbus</i>	11. <i>S. Manhattan</i>	11. <i>S. Livingstone</i>	11. <i>S. Hadar</i>	11. <i>S. Heidelberg</i>
12.	<i>S. Saintpaul</i>	12. <i>S. Bovismorbificans</i>	12. <i>S. Manhattan</i>	12. <i>S. Saintpaul</i>	12. <i>S. Albany</i>
13.	<i>S. Isangi</i>	13. <i>S. Livingstone</i>	13. <i>S. Thompson</i>	13. <i>S. Virchow</i>	13. <i>S. Chester</i>
14.	<i>S. Livingstone</i>	14. <i>S. Isangi</i>	14. <i>S. Isangi</i>	14. <i>S. Albany</i>	14. <i>S. Goldcost</i>
15.	<i>S. Thompson</i>	15. <i>S. Brandenburg</i>	15. <i>S. Kottbus</i>	15. <i>S. Bovismorbificans</i>	15. <i>S. Bovismorbificans</i>

	1990	1991	1992	1993	1994
1.	<i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>
2.	<i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>
3.	<i>S. Infantis</i>	3. <i>S. Infantis</i>	3. <i>S. Infantis</i>	3. <i>S. Virchow</i>	3. <i>S. Infantis</i>
4.	<i>S. Hadar</i>	4. <i>S. Hadar</i>	4. <i>S. Virchow</i>	4. <i>S. Infantis</i>	4. <i>S. Virchow</i>
5.	<i>S. Oranienburg</i>	5. <i>S. Virchow</i>	5. <i>S. Hadar</i>	5. <i>S. Hadar</i>	5. <i>S. Hadar</i>
6.	<i>S. Newport</i>	6. <i>S. Newport</i>	6. <i>S. Agona</i>	6. <i>S. Newport</i>	6. <i>S. Newport</i>
7.	<i>S. Agona</i>	7. <i>S. Agona</i>	7. <i>S. Newport</i>	7. <i>S. Isangi</i>	7. <i>S. Thompson</i>
8.	<i>S. Saintpaul</i>	8. <i>S. Oranienburg</i>	8. <i>S. Oranienburg</i>	8. <i>S. Agona</i>	8. <i>S. Agona</i>
9.	<i>S. Anatum</i>	9. <i>S. Kottbus</i>	9. <i>S. Saintpaul</i>	9. <i>S. Oranienburg</i>	9. <i>S. Kottbus</i>
10.	<i>S. Heidelberg</i>	10. <i>S. Saintpaul</i>	10. <i>S. Kottbus</i>	10. <i>S. Saintpaul</i>	10. <i>S. Oranienburg</i>
11.	<i>S. Goldcost</i>	11. <i>S. Bovismorbificans</i>	11. <i>S. Isangi</i>	11. <i>S. Kottbus</i>	11. <i>S. Saintpaul</i>
12.	<i>S. Bovismorbificans</i>	12. <i>S. Heidelberg</i>	12. <i>S. Typhi</i>	12. <i>S. Typhi</i>	12. <i>S. Bovismorbificans</i>
13.	<i>S. Livingstone</i>	13. <i>S. Manhattan</i>	13. <i>S. Heidelberg</i>	13. <i>S. Derby</i>	13. <i>S. Anatum</i>
14.	<i>S. Virchow</i>	14. <i>S. Anatum</i>	14. <i>S. Anatum</i>	14. <i>S. Heidelberg</i>	14. <i>S. Heidelberg</i>
15.	<i>S. Chester</i>	15. <i>S. Senftenberg</i>	15. <i>S. Mbandaka</i>	15. <i>S. Bovismorbificans</i>	15. <i>S. Typhi</i>

	1995	1996	1997	1998	1999
1.	<i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>	1. <i>S. Enteritidis</i>
2.	<i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>	2. <i>S. Typhimurium</i>
3.	<i>S. Infantis</i>	3. <i>S. Virchow</i>	3. <i>S. Infantis</i>	3. <i>S. Virchow</i>	3. <i>S. Infantis</i>
4.	<i>S. Virchow</i>	4. <i>S. Infantis</i>	4. <i>S. Virchow</i>	4. <i>S. Infantis</i>	4. <i>S. Hadar</i>
5.	<i>S. Hadar</i>	5. <i>S. Hadar</i>	5. <i>S. Hadar</i>	5. <i>S. Hadar</i>	5. <i>S. Virchow</i>
6.	<i>S. Newport</i>	6. <i>S. Agona</i>	6. <i>S. Mbandaka</i>	6. <i>S. Kottbus</i>	6. <i>S. Mbandaka</i>
7.	<i>S. Agona</i>	7. <i>S. Oranienburg</i>	7. <i>S. Newport</i>	7. <i>S. Mbandaka</i>	7. <i>S. Newport</i>
8.	<i>S. Derby</i>	8. <i>S. Newport</i>	8. <i>S. Typhi</i>	8. <i>S. Newport</i>	8. <i>S. Agona</i>
9.	<i>S. Oranienburg</i>	9. <i>S. Kottbus</i>	9. <i>S. Indiana</i>	9. <i>S. Thompson</i>	9. <i>S. Derby</i>
10.	<i>S. Kottbus</i>	10. <i>S. Mbandaka</i>	10. <i>S. Kottbus</i>	10. <i>S. Indiana</i>	10. <i>S. Thompson</i>
11.	<i>S. Mbandaka</i>	11. <i>S. Derby</i>	11. <i>S. Agona</i>	11. <i>S. Heidelberg</i>	11. <i>S. Oranienburg</i>
12.	<i>S. Typhi</i>	12. <i>S. Thompson</i>	12. <i>S. Braenderup</i>	12. <i>S. Agona</i>	12. <i>S. Kottbus</i>
13.	<i>S. Thompson</i>	13. <i>S. Saintpaul</i>	13. <i>S. Oranienburg</i>	13. <i>S. Agona</i>	13. <i>S. Heidelberg</i>
14.	<i>S. Livingstone</i>	14. <i>S. Anatum</i>	14. <i>S. Thompson</i>	14. <i>S. Oranienburg</i>	14. <i>S. Indiana</i>
15.	<i>S. Anatum</i>	15. <i>S. Choleraesuis</i>	15. <i>S. Derby</i>	15. <i>S. Anatum</i>	15. <i>S. Livingstone</i>

2000		2001		2002		2003		2004	
1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis
2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Hadar</i>	2.	<i>S. Hadar</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>
3.	<i>S. Hadar</i>	3.	<i>S. Virchow</i>	3.	<i>S. Typhimurium</i>	3.	<i>S. Typhimurium</i>	3.	<i>S. Hadar</i>
4.	<i>S. Infantis</i>	4.	<i>S. Hadar</i>	4.	<i>S. Infantis</i>	4.	<i>S. Infantis</i>	4.	<i>S. Infantis</i>
5.	<i>S. Virchow</i>	5.	<i>S. Infantis</i>	5.	<i>S. Virchow</i>	5.	<i>S. Virchow</i>	5.	<i>S. Virchow</i>
6.	<i>S. Mbandaka</i>	6.	<i>S. Oranienburg</i>	6.	<i>S. Newport</i>	6.	<i>S. Newport</i>	6.	<i>S. Agona</i>
7.	<i>S. Thompson</i>	7.	<i>S. Mbandaka</i>	7.	<i>S. Thompson</i>	7.	<i>S. Mbandaka</i>	7.	<i>S. Newport</i>
8.	<i>S. Oranienburg</i>	8.	<i>S. Agona</i>	8.	<i>S. Mbandaka</i>	8.	<i>S. Agona</i>	8.	<i>S. Mbandaka</i>
9.	<i>S. Newport</i>	9.	<i>S. Newport</i>	9.	<i>S. Agona</i>	9.	<i>S. Derby</i>	9.	<i>S. Indiana</i>
10.	<i>S. Agona</i>	10.	<i>S. Thompson</i>	10.	<i>S. Kottbus</i>	10.	<i>S. Kottbus</i>	10.	<i>S. Derby</i>
11.	<i>S. Derby</i>	11.	<i>S. Derby</i>	11.	<i>S. Oranienburg</i>	11.	<i>S. Thompson</i>	11.	<i>S. Bredney</i>
12.	<i>S. Braenderup</i>	12.	<i>S. Kottbus</i>	12.	<i>S. Isangi</i>	12.	<i>S. Anatum</i>	12.	<i>S. Oranienburg</i>
13.	<i>S. Heidelberg</i>	13.	<i>S. Braenderup</i>	13.	<i>S. Derby</i>	13.	<i>S. Indiana</i>	13.	<i>S. Orion</i>
14.	<i>S. Anatum</i>	14.	<i>S. Isangi</i>	14.	<i>S. Heidelberg</i>	14.	<i>S. Oranienburg</i>	14.	<i>S. Saintpaul</i>
15.	<i>S. Kottbus</i>	15.	<i>S. Anatum</i>	15.	<i>S. Indiana</i>	15.	<i>S. Tshiongwé</i>	15.	<i>S. Isangi</i>

2005		2006		2007	
1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis	1.	S. Enteritidis
2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>	2.	<i>S. Typhimurium</i>
3.	<i>S. Infantis</i>	3.	<i>S. Hadar</i>	3.	<i>S. Virchow</i>
4.	<i>S. Hadar</i>	4.	<i>S. Infantis</i>	4.	<i>S. Infantis</i>
5.	<i>S. Virchow</i>	5.	<i>S. Virchow</i>	5.	<i>S. Hadar</i>
6.	<i>S. Newport</i>	6.	<i>S. Newport</i>	6.	<i>S. Newport</i>
7.	<i>S. Indiana</i>	7.	<i>S. Mbandaka</i>	7.	<i>S. Mbandaka</i>
8.	<i>S. Agona</i>	8.	<i>S. Indiana</i>	8.	<i>S. Agona</i>
9.	<i>S. Mbandaka</i>	9.	<i>S. Agona</i>	9.	<i>S. Saintpaul</i>
10.	<i>S. Kottbus</i>	10.	<i>S. Thompson</i>	10.	<i>S. Indiana</i>
11.	<i>S. Saintpaul</i>	11.	<i>S. Derby</i>	11.	<i>S. Derby</i>
12.	<i>S. Thompson</i>	12.	<i>S. Saintpaul</i>	12.	<i>S. Anatum</i>
13.	<i>S. Derby</i>	13.	<i>S. Blockley</i>	13.	<i>S. Chester</i>
14.	<i>S. Albany</i>	14.	<i>S. Anatum</i>	14.	<i>S. Bredney</i>
15.	<i>S. Chester</i>	15.	<i>S. Chester</i>	15.	<i>S. Livingstone</i>



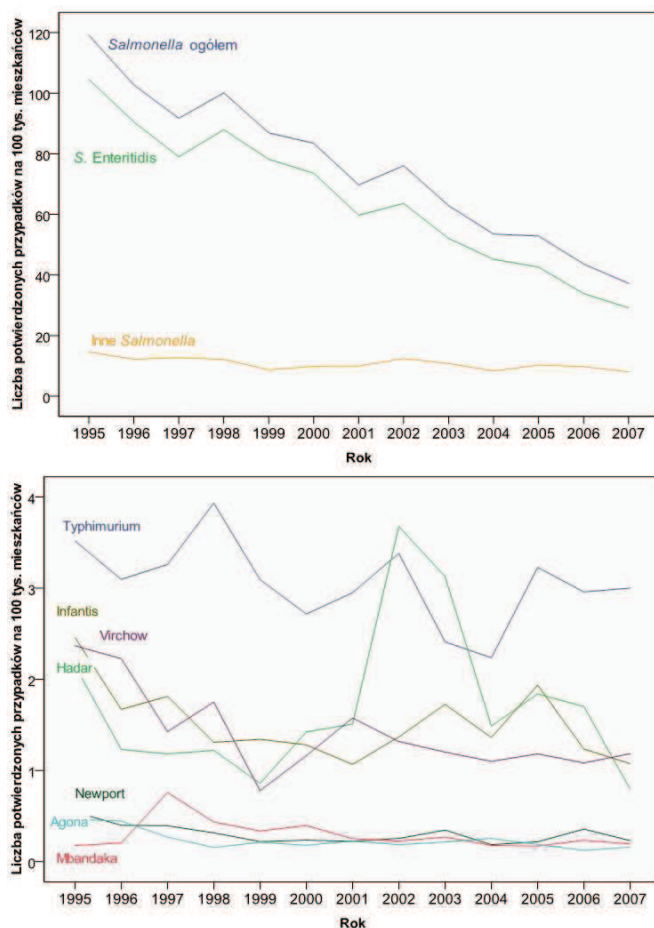
Ryc. 16. Zakażenia *Salmonella* Enteritidis i innymi serowarmi *Salmonella* u ludzi w Polsce na tle ogólnej liczby zakażeń *Salmonella*, 1946 – 2007
 Fig. 16. *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* infections in humans in comparison with the total number of infections caused by *Salmonella*, Poland 1946 – 2007 (closed squares – *S. Enteritidis*; open rhombs – other *Salmonella*; closed triangles – all *Salmonella*)

4.2. ANALIZA EPIDEMIOLOGICZNYCH WSKAŹNIKÓW ZAKAŻEŃ *SALMONELLA* (OGÓŁEM I DLA WYBRANYCH SEROWARÓW) U LUDZI W POLSCE W LATACH 1995 – 2007

Liczba osób, które uległy zakażeniu pałeczkami *Salmonella* w Polsce w okresie od 1995 do 2007 roku, sukcesywnie zmniejszała się, z około 46 tys. w roku 1995, do nieco ponad 14 tys. w roku 2007 (tab. 20). Zmniejszająca się w kolejnych latach ogólna liczba zakażeń *Salmonella* pozostaje w bezpośredniej korelacji z malejącą liczbą zakażeń wywołanych przez pałeczki *S. Enteritidis*. Sytuację epidemiologiczną salmoneloz u ludzi w Polsce w kolejnych latach, zilustrowano szczegółowo przy pomocy współczynników wyrażających liczbę potwierdzonych przypadków zakażeń *Salmonella* (ogółem i dla wybranych serowarów) w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców. Następnie przeprowadzono analizę statystyczną zaobserwowanych zmian w poziomie zakażeń pałeczkami *Salmonella* w Polsce w latach 1995 – 2007. W szczególności starano się zbadać, czy obserwowany ogólny spadek zakażeń można uznać za istotny w sensie statystycznym oraz czy zmiany w zakażeniach najczęściej występującymi serowarami na przestrzeni badanego okresu mają charakter wyraźnej tendencji, tj. czy można mówić o stałym spadku lub wzroście tych zakażeń.

4.2.1. Rozkład współczynników zakażeń *Salmonella* w czasie

Coraz mniejsza liczba osób zakażonych bakteriami *Salmonella* napawa optymizmem, jednak przy równocześnie malejącej w kolejnych latach liczebności populacji, może nie wystarczająco dokładnie ilustrować prawdziwą dynamikę zjawiska. Powyższą sytuację można zobrazować bardziej precyzyjnie, przy pomocy pewnych wielkości względnych, dla których istnieje możliwość statystycznego przebadania zmian ich wartości w czasie. Najlepiej przedstawią to współczynniki wyrażające stosunek liczby potwierdzonych przypadków zakażeń pałeczkami *Salmonella* (*Salmonella* ogółem i dla wybranych serowarów) do liczby ludności w danym roku w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców (ryc. 17). Wartości tych współczynników dla zakażeń *Salmonella* ogółem wyraźnie zmniejszają się ze 119,1 (liczba przypadków/100 tys.) w roku 1995 do 37,2 w roku 2007. Podobny spadek obserwuje się dla współczynników zakażeń spowodowanych przez pałeczki *S. Enteritidis* (od 104,5 do 29,2/100 tys., odpowiednio w 1995 i 2007 roku). Współczynniki dla pozostałych, wybranych serowarów (z których każdy w okresie od 1995 do 2007 roku spowodował ponad tysiąc i więcej zakażeń) kształtowały się w omawianym przedziale czasu w zakresie bardzo niskich wartości: *S. Typhimurium* (2,2 – 3,9/100 tys.), *S. Hadar* (0,8 – 3,7/100 tys.), *S. Infantis* (1,1 – 2,5/100 tys.), *S. Virchow* (0,8 – 2,4/100 tys.), *S. Newport* (0,2 – 1,8/100 tys.), *S. Mbandaka* (0,2 – 0,8/100 tys.) i *S. Agona* (0,1 – 0,5/100 tys.). W przypadku tych serowarów tendencje zmian w czasie nie są wyraźnie widoczne.



Ryc. 17. Liczba potwierdzonych przypadków zakażeń pałeczkami *Salmonella* u ludzi w Polsce w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców, 1995 – 2007

Fig. 17. *Salmonellosis* notification rates in humans (confirmed cases per 100,000 population) in Poland, 1995 – 2007

4.2.2. Analiza statystyczna trendu współczynników zakażeń *Salmonella*

Powyższe współczynniki (ryc. 17) poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu trzech testów: chi-kwadrat dla trendu, t-Studenta dla trendu liniowego i testu regresji Poissona (Materiał i metody, punkt 3.4). Dla każdego testu założono poziom istotności $\alpha = 0,05$. Wyniki wszystkich zastosowanych testów potraktowane łącznie w odniesieniu do poszczególnych grup współczynników zakażeń *Salmonella* (tj. zakażeń *Salmonella* ogółem i zakażeń spowodowanych odpowiednio przez każdy z ośmiu wybranych serowarów), stanowiły podstawę do wnioskowania o wystąpieniu określonej tendencji epi-

demiologicznej. Tendencję zwykłą/spadkową ocenianych współczynników uznano za znamienne jeżeli wykazała ona cechy istotności statystycznej dla wszystkich trzech testów równocześnie, tzn. jeżeli poziom istotności p był mniejszy od wartości założonej ($p < \alpha$) w każdym z nich.

4.2.2.1. Test chi-kwadrat dla trendu

Rozpatrywana jest tablica kontyngencji o wymiarach $k \times 2$, w której kolumny reprezentują odpowiednio liczbę jednostek wyróżnionych oraz liczbę jednostek nie wyróżnionych w rozpatrywanej zbiorowości, wiersze zaś przedstawiają kolejne okresy obserwacji. W niniejszym badaniu liczbę jednostek wyróżnionych stanowiła liczba potwierdzonych przypadków zakażeń w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców. Weryfikowane było przypuszczenie, że frakcja jednostek wyróżnionych w kolejnych latach rozkłada się zgodnie z pewnym trendem.

Test chi-kwadrat dla trendu (bądź regresji) jest wzmocnieniem zwykłego testu niezależności chi-kwadrat dla przypadku, gdy warianty czynnika (wiersze tablicy kontyngencji) można przedstawić na skali porządkowej, tak jak w przypadku szeregu czasowego. Testowanie polega na weryfikacji hipotezy zerowej, mówiącej o nieistotności współczynnika ważonej regresji frakcji elementów wyróżnionych względem czasu (reprezentowanego przez sztuczną zmienną z). Brak podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej oznaczać będzie zatem, że rozkład badanej frakcji w czasie nie cechuje istotna statystycznie tendencja zmian (wzrostowa bądź spadkowa).

Postać statystyki testowej jest następująca:

$$\chi^2 = \frac{Num^2}{\hat{p} \cdot \hat{q} \cdot Den}$$

gdzie:

$$Num = \sum_i a_i z_i - \frac{\sum_i a_i \sum_i n_i z_i}{\sum_i n_i}$$

$$Den = \sum_i n_i z_i^2 - \frac{\left(\sum_i n_i z_i \right)^2}{\sum_i n_i}$$

$$\hat{p} = \frac{\sum_i a_i}{\sum_i n_i} \quad \hat{q} = 1 - \hat{p}$$

a_i – liczba jednostek wyróżnionych,

n_i – liczebność próby (w każdym przypadku 100 000)

z_i – zmienna reprezentująca czas (1,2,...,N)

Statystyka ta, przy prawdziwości hipotezy zerowej, ma rozkład chi-kwadrat z 1 stopniem swobody. Wyniki testu chi-kwadrat na istotność trendu zawarto w tabeli 24.

Jeżeli krytyczny poziom istotności (wartość p) jest mniejsza od przyjętego poziomu istotności $\alpha = 0,05$ oznacza to, że statystyka testowa χ^2 znalazła się w obszarze krytycznym, a więc należy odrzucić hipotezę zerową na rzecz hipotezy alternatywnej. Sytuacja taka ma miejsce w przypadku liczby wyrażającej zakażenia *Salmonella* ogółem oraz liczby zakażeń spowodowanych pałeczkami *S. Enteritidis* (tab. 24). Oznacza to, że tylko w tych dwóch przypadkach test chi-kwadrat wskazuje na statystycznie istotny trend spadkowy. W przypadku pozostałych serowarów poddanych analizie zaobserwowana tendencja (wzrostowa dla *S. Hadar* oraz spadkowa dla pozostałych serowarów) nie jest istotna statystycznie.

Tabela 24. Wyniki testu chi-kwadrat na istotność trendu współczynników zakażeń pałeczkami *Salmonella* (liczba potwierdzonych przypadków na 100 tys. mieszkańców) u ludzi w Polsce, 1995 – 2007

Table 24. Chi-square test results of significance of trend in salmonellosis notification rates in humans (confirmed cases per 100,000 population) in Poland, 1995 – 2007

	Num	Den	\hat{p}	χ^2	p
<i>Salmonella</i> ogółem	-1 137,50	18 200 000	0,000754	94,37	2,62E-22 ¹
<i>S. Enteritidis</i>	-1 076,00	18 200 000	0,000648	98,28	3,63E-23 ²
<i>S. Typhimurium</i>	-9,72	18 200 000	0,000031	0,17	0,6805
<i>S. Hadar</i>	4,44	18 200 000	0,000017	0,06	0,8011
<i>S. Infantis</i>	-8,97	18 200 000	0,000015	0,29	0,5884
<i>S. Virchow</i>	-14,76	18 200 000	0,000014	0,85	0,3573
<i>S. Newport</i>	-2,91	18 200 000	0,000003	0,15	0,6942
<i>S. Mbandaka</i>	-3,17	18 200 000	0,000003	0,19	0,6647
<i>S. Agona</i>	-3,45	18 200 000	0,000002	0,28	0,5994

¹ $p = 2,62\text{E-}22 = 0,000000000000000000000000262$

² $p = 3,63\text{E-}23 = 0,000000000000000000000000363$

4.2.2.2. Trend liniowy

Rozpatrywana jest liniowa funkcja trendu postaci:

$$\hat{y}_t = a + bt$$

gdzie:

\hat{y}_t – teoretyczna liczba osób zakażonych na 100 tys. mieszkańców w okresie t ,
 t – zmienna czasowa (1,2,3,...N)

Model szacowany jest zgodnie z Klasyczną Metodą Najmniejszych Kwadratów, a więc współczynniki obliczane są zgodnie z poniższymi wzorami:

$$b = \frac{n \sum_t t y_t - \sum_t t \sum_t y_t}{n \sum_t t^2 - \left(\sum_t t \right)^2}$$

$$a = \frac{\sum_t y_t - b \sum_t t}{n}$$

Jeżeli badany wskaźnik wykazuje statystycznie istotną tendencję spadkową bądź zwyżkową, współczynnik kątowy prostej (b) powinien być statystycznie istotnie różny od zera.

Do testowania tej hipotezy wykorzystuje się test t-Studenta, w którym postać statystyki testowej jest następująca:

$$t^* = \frac{b}{S_e} \sqrt{\sum_t (t - \bar{t})^2}$$

gdzie:

b – współczynnik kątowy prostej,

S_e – odchylenie standardowe składnika resztowego funkcji trendu,

\bar{t} – średnia wartość zmiennej czasowej.

Powyższa statystyka, przy prawdziwości hipotezy zerowej, ma rozkład t-Studenta z $N-2$ stopniami swobody. Wyniki testu t-Studenta na istotność współczynnika kąтового prostej (b) dla trendu liniowego przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Wyniki testu t-Studenta na istotność współczynnika kąowego prostej (b) dla trendu liniowego współczynników zakażeń pałeczkami *Salmonella* (liczba potwierdzonych przypadków na 100 tys. mieszkańców) u ludzi w Polsce, 1995 – 2007

Table 25. T-Student test results of significance of linear trend coefficient (b) in salmonellosis notification rates in humans (confirmed cases per 100,000 population) in Poland, 1995 – 2007

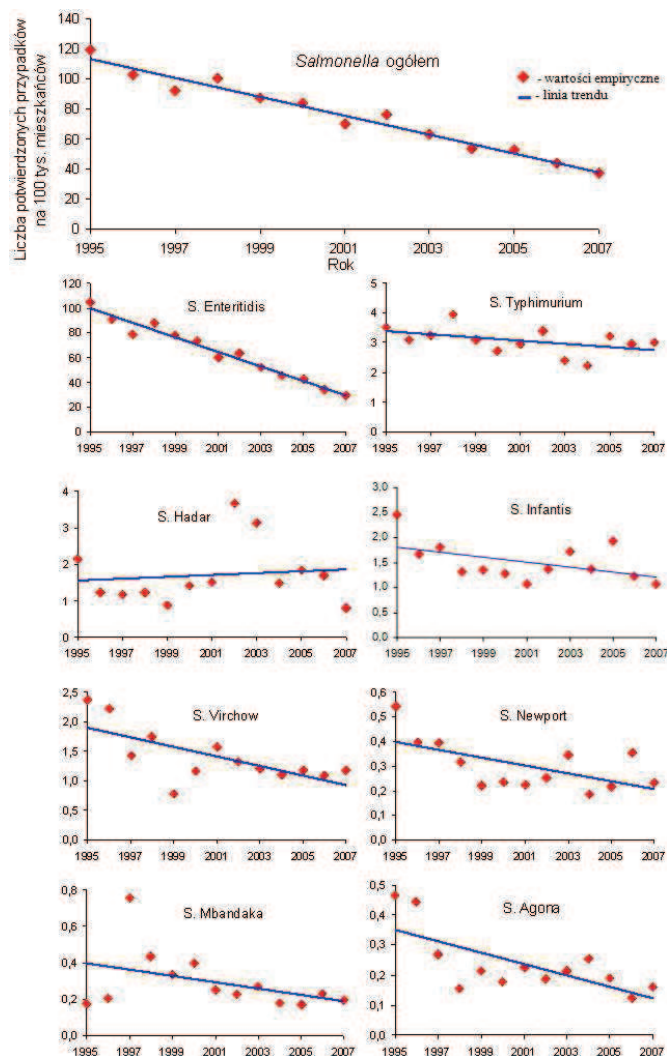
	b	a	R^2	S_e	t^*	p
<i>Salmonella</i> ogółem	-6,2500	119,1430	0,9640	4,9160	-17,1516	2,76E-09¹
<i>S. Enteritidis</i>	-5,8892	105,8542	0,9667	4,4468	-17,8665	2,05E-09²
<i>S. Typhimurium</i>	-0,0534	3,4345	0,2171	0,4125	-1,7466	0,1085
<i>S. Hadar</i>	0,0244	1,5370	0,0127	0,8770	0,3754	0,7145
<i>S. Infantis</i>	-0,0493	1,8562	0,2364	0,3605	-1,8453	0,0921
<i>S. Virchow</i>	-0,0811	1,9796	0,4695	0,3506	-3,1199	0,0098
<i>S. Newport</i>	-0,0160	0,4136	0,3673	0,0854	-2,5273	0,0281
<i>S. Mbandaka</i>	-0,0174	0,4164	0,1735	0,1548	-1,5197	0,1568
<i>S. Agona</i>	-0,0189	0,3692	0,4966	0,0775	-3,2943	0,0071

¹ $p = 2,76E-09 = 0,00000000276$

² $p = 2,05E-09 = 0,00000000205$

W przypadku liczby zakażeń *Salmonella* ogółem oraz dla 4 poszczególnych serowarów, to jest: *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Newport* i *S. Agona*, wartość p jest mniejsza od 0,05, co oznacza, że należy odrzucić hipotezę zerową na rzecz hipotezy alternatywnej, mówiącej o tym, że współczynnik kąowy prostej (b) jest statystycznie istotnie różny od zera, a więc występuje statystycznie istotny trend.

Wyniki powyższej analizy należy jednak traktować z rezerwą z tego względu, że w większości przypadków oszacowana funkcja trendu w niewielkim stopniu wyjaśnia zmienność badanej cechy w czasie. Pokazuje to współczynnik determinacji R^2 zawarty w tabeli 25. Współczynnik ten przyjmuje wartości z przedziału $<0,1>$. Im wartość współczynnika wyższa, tym lepsze dopasowanie funkcji trendu do danych empirycznych. O akceptowalnym poziomie współczynnika można mówić jedynie w przypadku zakażeń *Salmonella* ogółem oraz zakażeń wywołanych przez pałeczki *S. Enteritidis*. W pozostałych przypadkach występuje zbyt duża zmienność aby uznać dany proces za liniowy, co pokazują poniższe wykresy wartości empirycznych i teoretycznych (ryc.18).



Ryc. 18. Współczynniki wyrażające liczbę potwierdzonych przypadków zakażeń *Salmonella* u ludzi w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców w kolejnych latach wraz z oszacowanymi wartościami teoretycznymi trendu liniowego, Polska, 1995 – 2007

Fig. 18. *Salmonellosis notification rates in humans (confirmed cases per 100,000 population) with fitted linear regression lines, Poland, 1995 – 2007* (♦ – empirical values; — – trend line)

4.2.2.3. Regresja Poissona

Regresja Poissona należy do grupy uogólnionych modeli liniowych. Jest szczególnie przydatna przy modelowaniu danych dyskretnych, takich jak rozpatrywana liczba zaka-

zonych w kolejnych latach. W modelu tym zakłada się, że zmienna zależna ma rozkład Poissona, natomiast funkcją wiążącą wpływ predyktorów na zmienną zależną jest funkcja logarymiczna. Ogólną postać modelu przedstawić można następująco:

$$\ln(\hat{y}_t) = a + bt$$

Przy modelowaniu wskaźnika, tzn. liczby zakażeń na 100 tys. mieszkańców, uwzględniana jest również zmienna: liczba ludności, która wchodzi do modelu w postaci logarytmu naturalnego z ustalonym współczynnikiem równym 1. Parametry modelu szacowane są Metodą Największej Wiarygodności, z wykorzystaniem iteracyjnej metody Newtona-Raphsona. Istotność współczynników zbadana została za pomocą testu t-Studenta (tab. 26).

Tabela 26. Wyniki testu t-Studenta na istotność współczynnika regresji Poissona (b) współczynników zakażeń pałeczkami *Salmonella* (liczba potwierdzonych przypadków na 100 tys. mieszkańców) u ludzi w Polsce, 1995 – 2007

Table 26. T-Student test results of significance of Poisson regression coefficient (b) in salmonellosis notification rates in humans (confirmed cases per 100,000 population) in Poland, 1995 – 2007

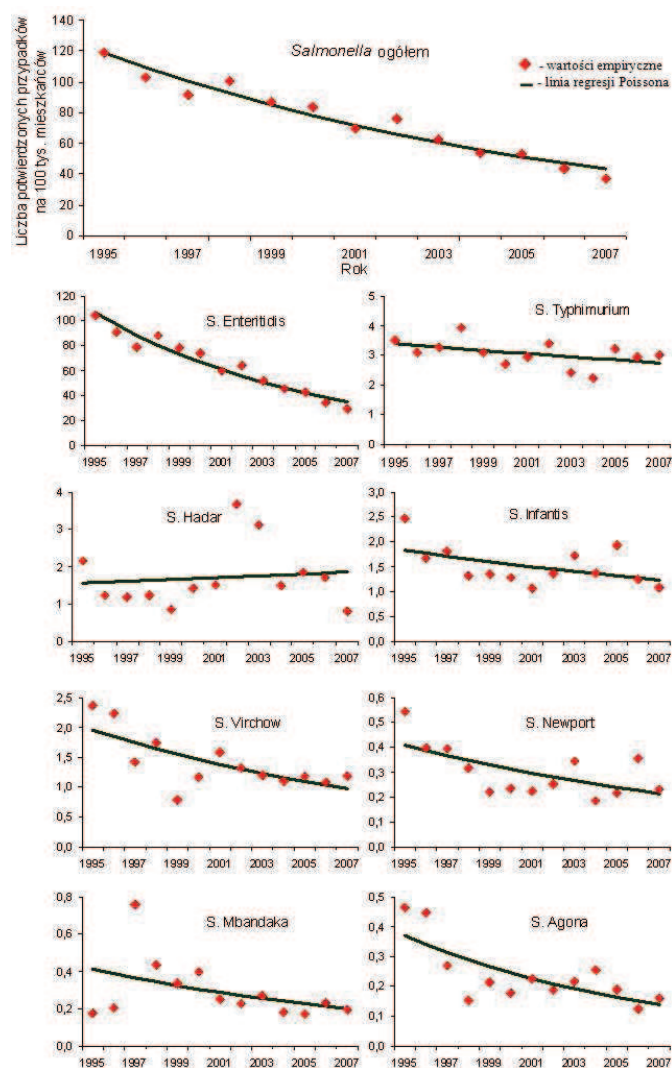
	b	R^2	t^*	p
<i>Salmonella</i> ogółem	-0,0845	0,9447	-188,20	0
<i>S. Enteritidis</i>	-0,0933	0,9401	-191,10	0
<i>S. Typhimurium</i>	-0,0175	0,1463	-8,08	6,52E-16¹
<i>S. Hadar</i>	0,0145	0,0115	5,00	5,72E-07
<i>S. Infantis</i>	-0,0328	0,1966	-10,60	2,83E-26
<i>S. Virchow</i>	-0,0581	0,4268	-17,97	3,55E-72
<i>S. Newport</i>	-0,0537	0,2362	-7,69	1,47E-14
<i>S. Mbandaka</i>	-0,0598	0,1611	-8,44	3,15E-17
<i>S. Agona</i>	-0,0816	0,3812	-10,20	1,96E-24

¹ np.: $p = 6,52E-16 = 0,000000000000000652$

Wynik testu istotności dla współczynnika b w każdym przypadku daje podstawy do odrzucenia hipotezy zerowej i przyjęcia hipotezy alternatywnej, mówiącej o tym, że występuje statystycznie istotny trend (wzrostowy dla *S. Hadar*, spadkowy dla pozostałych).

Jednak podobnie jak w przypadku trendu liniowego, powyższe wyniki należy traktować z rezerwą, ze względu na niskie poziomy współczynnika determinacji (R^2). Jedynie dla szeregów przedstawiających liczbę zakażeń *Salmonella* ogółem oraz zakażeń wywołanych przez *S. Enteritidis* można mówić o dobrym dopasowaniu modelu do danych empirycznych, a więc tylko w tych przypadkach wnioskowanie o istotności współczynnika b jest w pełni uzasadnione. Istotną statystycznie tendencję (spadkową)

wykazano dla zakażeń *Salmonella* ogółem i dla zakażeń spowodowanych przez pałeczki *S. Enteritidis* (ryc. 19).



Ryc. 19. Współczynniki wyrażające liczbę potwierdzonych przypadków zakażeń *Salmonella* u ludzi w przeliczeniu na 100 tys. mieszkańców w kolejnych latach wraz z oszacowanymi wartościami teoretycznymi regresji Poissona, Polska, 1995 – 2007

Fig. 19. Salmonellosis notification rates in humans (confirmed cases per 100,000 population) with fitted Poisson regression lines, Poland, 1995 – 2007 (♦ – empirical values; — – Poisson regression line)

Podsumowując wyniki powyższych analiz można stwierdzić, że jedynie wartości współczynników wyrażających zakażenia *Salmonella* ogółem i zakażenia spowodowane przez pałeczki *S. Enteritidis* charakteryzują się statystycznie istotną tendencją spadkową ($p < 0,05$ we wszystkich trzech testach). W przypadku pozostałych serowarów nie można jednoznacznie stwierdzić, że nie cechują się one jakąś tendencją w czasie, jednak w badanym okresie są one na tyle nieistotne bądź ich rozkłady na tyle nieregularne, że nie ma podstaw do przypisywania im określonego trendu. Rozkłady w czasie większości tych współczynników wykazują raczej cechy procesu błędzenia losowego.

4.3. TYPOWANIE BAKTERIOFAGOWE PAŁECZEK *S. ENTERITIDIS* – WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH I OPRACOWAŃ DOKONANYCH NA PODSTAWIE OPUBLIKOWANYCH DANYCH EPIDEMIOLOGICZNYCH DOTYCZĄCYCH TYPÓW BAKTERIOFAGOWYCH WYSTĘPUJĄCYCH W POLSCE

W okresie od 1996 do 2007 roku typowaniu bakteriofagowemu poddano 750 szczepów *Salmonella* Enteritidis. Szczepy izolowano z ognisk zatruc pokarmowych, sporadycznych przypadków zakażeń u ludzi, od zwierząt, z żywności, pasz i z innych źródeł. W przypadku 16 szczepów nieznane było źródło ich pochodzenia. Wyniki typowania bakteriofagowego szczepów *S. Enteritidis* według schematu Lalko i wsp. w kolejnych latach przedstawiono w tabeli 27. Typ fagowy określono dla 97,0% (727/750) badanych szczepów, 16 szczepów reagowało nietypowo z fagami typującymi, 7 spośród nich było niewrażliwych na działanie fagów. Rozpoznano 9 typów bakteriofagowych zgodnie ze schematem (typ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 16, 20) i 4 nowe typy (typ 24, 25, 26, 27), których określenie stało się możliwe na skutek rozszerzenia schematu o kolejnych 7 typów bakteriofagowych w wyniku badań prowadzonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella*. Dominującymi okazały się typy: 1, 6 i 7. Najliczniej reprezentowany był typ fagowy 7 (31,6% wszystkich szczepów). Typ bakteriofagowy 1 izolowano prawie w takich samych ilościach jak typ fagowy 6 (odpowiednio 195 szczepów – 26,0%; 192 szczepy – 25,6%). W przypadku 73 szczepów *S. Enteritidis* (9,7%) rozpoznano 3 typ bakteriofagowy. Pozostałe typy reprezentowane były przez niewielką liczbę szczepów (od 1 do 10).

Po raz pierwszy typowaniu bakteriofagowemu zgodnie ze schematem Lalko i wsp. poddano szczepy *S. Enteritidis* wyizolowane w Polsce w latach 1970 – 1975. W wyniku sukcesywnie prowadzonych badań w następnych latach uzyskiwano kolejne dane, które pozwoliły prześledzić występowanie typów bakteriofagowych pałeczek *S. Enteritidis* rejestrowanych w naszym kraju (oraz wykryć pojawianie się nowych typów fagowych) i zaobserwować zmiany zachodzących w ich dystrybucji. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy stanowią istotny wkład w te działania. Dokonano analizy po-

równawczej występowania typów fagowych *S. Enteritidis* w Polsce w oparciu o zbiorowe opracowania obejmujące lata 1970 – 1975, 1981 – 1990, 1986 – 1995 (źródło danych – tab. 14, Materiały i metody, punkt 3.3.) oraz dane bieżące (1996 – 2007), stanowiące kontynuację poprzednich opracowań, otrzymane w wyniku realizacji tej pracy. Uzyskane wyniki, przedstawione w tabeli 28, pozwolą pełniej oszacować sytuację epidemiologiczną związaną z występowaniem tego patogenu w naszym kraju.

Rok Year	Źródło izolacji Source of isolation	Typ bakteriofagowy / Phage type											Ogółem Total					
		1	3	4	5	6	7	8	16	20	24	25		26	27	AT ¹	NT ²	
Liczba szczepów o danym typie bakteriofagowym / Number of strains of a particular phage type																		
2007	ludzie zwierzęta, żywność, pasze i inne nieznane	1	—	—	—	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7
		—	1	—	—	2	2	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8
		1	2	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5

¹ Szczepy atypowe (nietypowo reagujące z fagami typującymi) / Strains that react with typing phages but do not conform to any of the current recognized patterns

² Szczepy nie typujące się (nie reagujące z fagami typującymi) / Untypable strains (do not react with typing phages)

Typ fagowy Phage type	Liczba szczepów (%) wyizolowanych / Number of strains (%) isolated from					
	1970 – 1975	1981 – 1990	1986 – 1995	1996 – 2007		
	Od ludzi <i>Humans</i>	Od zwierząt, z żywności, pasz i innych źródeł <i>Animals, food, feed, and other sources</i>	Od ludzi <i>Humans</i>	Od zwierząt, z żywności, pasz i innych źródeł <i>Animals, food, feed, and other sources</i>	Od ludzi <i>Humans</i>	Od zwierząt, z żywności, pasz i innych źródeł <i>Animals, food, feed, and other sources</i>
23	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	6 (1,2%)	—	—
25	—	—	—	1 (0,4%)	—	—
26	—	—	—	2 (0,4%)	1	—
27	—	—	—	1	—	—
AT ¹	4 (0,2%)	—	2 (0,6%)	1 (1,2%)	10 (4,2%)	—
NT ²	12 (0,6%)	—	3 (0,9%)	1	6	—
Ogółem	1847	164	2048	93	498	236
Total						

¹ Szczepy atypowe (nietypowo reagujące z fagami typującymi) / Strains that react with typing phages but do not conform to any of the current recognized patterns

² Szczepy nie typujące się (nie reagujące z fagami typującymi) / Untypable strains (do not react with typing phages)

4.4. OKREŚLENIE PODOBIĘSTWA IMMUNOLOGICZNEGO I PRAWDOPODOBNYCH REJONÓW PODOBIĘSTWA MOLEKULARNEGO POMIĘDZY BIAŁKIEM HSP60 BAKTERII *S. ENTERITIDIS* I LUDZKIM BIAŁKIEM HSP60

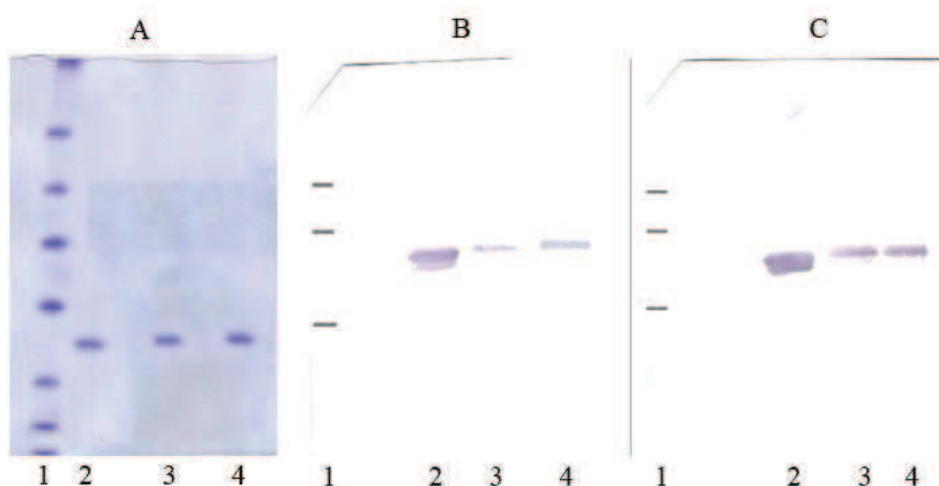
Białka szoku termicznego już od wielu lat stanowią temat badań wielu naukowców. Jedno z nich, białko bakterii *Salmonella* Enteritidis należące do rodziny białek 60kDa (Hsp60), było przedmiotem badań naukowych prowadzonych w ramach niniejszej pracy.

4.4.1. Otrzymanie endogennego białka Hsp60 *S. Enteritidis*

W celu uzyskania wzmożonej produkcji endogennego białka Hsp60, bakterie *S. Enteritidis* (szczep KOS 1663) poddano działaniu podwyższonej temperatury. Szczep ten, pochodzący z Kolekcji Krajowego Ośrodka *Salmonella*, został wyizolowany z ogniska zatrucia pokarmowego i prezentował typ bakteriofagowy 1 (wg schematu Lalko i wsp.), jeden z najczęściej występujących typów fagowych w Polsce, izolowany zarówno od ludzi, jak i z innych źródeł.

Białko otrzymane i oczyszczone według procedur opisanych w rozdziale Materiały i metody, punkt 3.4.1.2. – 3.4.1.6., zostało rozdzielone metodą denaturującej elektroforezy poliakrylamidowej z SDS w 10% żelu, w obecności wzorców masy cząsteczkowej i komercyjnego białka GroEL *E. coli*, w celu sprawdzenia czystości i przeprowadzenia immunologicznej identyfikacji (Materiały i metody, punkt 3.4.2). Wybarwienie żelu barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250, pozwoliło na uwidocznienie w żelu wyraźnych, pojedynczych prążków (ryc. 20A, ścieżka 3 i 4) świadczących o obecności w badanych eluatach białka Hsp60 *S. Enteritidis* oczyszczonego do stanu homogenności. Stosując metodę Western-blotingu przeprowadzono identyfikację otrzymanego białka za pomocą swoistych przeciwciał, wykorzystując białko GroEL *E. coli* do celów porównawczych. Wyeluowane próby rozdzielone w 10% żelu poliakrylamidowym metodą denaturującej elektroforezy, przeniesiono na membranę nitrocelulozową, po czym wykonano immunobloting przy pomocy przeciwciał monoklonalnych anti-GroEL *E. coli* (ryc. 20B, ścieżka 3 i 4) oraz surowicy poliklonalnej anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (ryc. 20C, ścieżka 3 i 4).

Przeprowadzone badania wykazały, że wyeluowane próby zawierały czyste białko o masie cząsteczkowej 58,88 kDa rozpoznawane przez przeciwciała monoklonalne anti-GroEL *E. coli* oraz przeciwciała poliklonalne anti-Hsp60 *S. Enteritidis* zawarte w odpornościowej surowicy króliczej. Masę cząsteczkową otrzymanego białka oszacowano porównując jego ruchliwość elektroforetyczną z ruchliwością wzorców masy cząsteczkowej (205, 116, 97, 84, 66, 55, 45 i 36 kDa) w oparciu o krzywą wzorcową liniowej zależności \log_{10} masy białek wzorcowych i odległości, na którą nastąpiła ich migracja w żelu.



Ryc. 20. Wyniki izolacji i oczyszczania białka Hsp60 *S. Enteritidis* i jego immunologicznej identyfikacji

A. Obraz rozdziału białka Hsp60 *S. Enteritidis* metodą denaturującej elektroforezy poliakrylamidowej z SDS w 10% żelu w obecności markerów masy cząsteczkowej i wzorcowego białka GroEL: ścieżka 1 – białka o znanej masie cząsteczkowej 205, 116, 97, 84, 66, 55, 45, 36 kDa (wzorce masowe, Sigma – Aldrich), ścieżka 2 – białko GroEL *E. coli* (Stressgen), ścieżka 3 i 4 – próby wyeluuowanego białka Hsp60 *S. Enteritidis*. W celu uwidocznienia białek żel poddano działaniu barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250. B, C. Obraz immunodetekcji białka Hsp60 *S. Enteritidis* metodą Western blot – reakcja z przeciwciałami monoklonalnymi anti-GroEL *E. coli* (Stressgen) (B) i z króliczą surowicą odpornościową anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (C): ścieżka 1 – wzorce masowe (80, 66, 41 kDa), ścieżka 2 – białko GroEL *E. coli*, ścieżka 3 i 4 – próby wyeluuowanego białka Hsp60 *S. Enteritidis*

Fig. 20. Results of S. Enteritidis Hsp60 isolation and purification, and its immunological identification

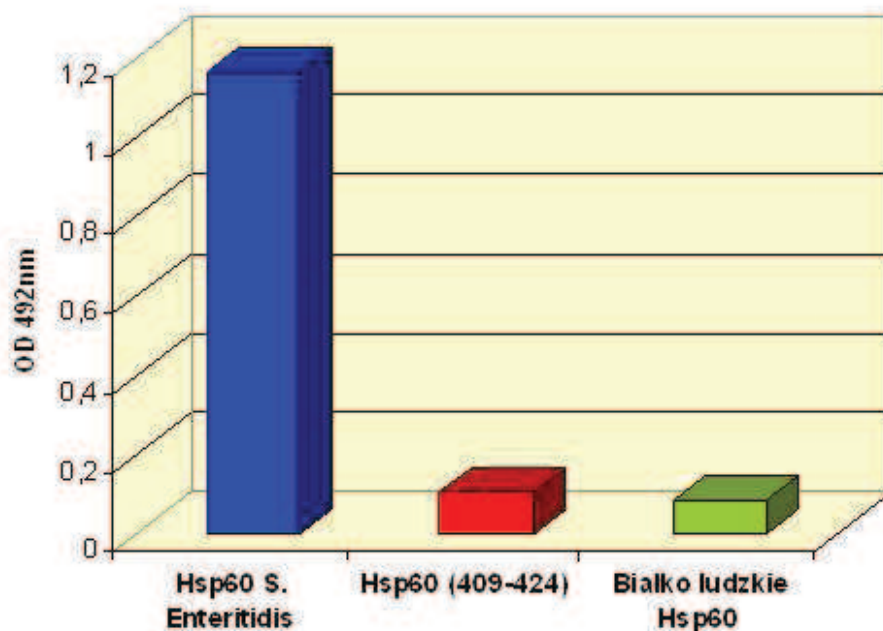
A. Picture of electrophoresis pattern of S. Enteritidis Hsp60 on Coomassie Brilliant Blue R-250 stained 10% SDS polyacrylamide gel along with molecular markers and GroEL standard: lane 1 – proteins of known sizes 205, 116, 97, 84, 66, 55, 45, 36 kDa (MW, Sigma-Aldrich), lane 2 – E. coli GroEL (Stressgen), lanes 3 and 4 – isolated and purified Hsp60 of S. Enteritidis. B, C. Picture of S. Enteritidis Hsp60 immunodetection by Western blot – immunoreactivity with anti-GroEL monoclonal antibodies (Stressgen) (B) and with anti-S. Enteritidis Hsp60 polyclonal antibodies (C): lane 1 – molecular markers (80, 66, 41kDa), lane 2 – E. coli GroEL, lanes 3 and 4 – S. Enteritidis Hsp60

4.4.2. Porównanie reakcji serologicznych białka Hsp60 *S. Enteritidis*, ludzkiego białka Hsp60 i jego syntetycznych fragmentów w testach ELISA

Surowica królicza anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (Materiał i metody, punkt 3.4.4) reagowała w teście ELISA (Materiał i metody, punkt 3.4.6.2) z homologicznym białkiem

Hsp60, z ludzkim białkiem Hsp60 i z jednym jego syntetycznym fragmentem. Spośród siedmiu przebadanych fragmentów ludzkiego białka Hsp60 (Materiał i metody, punkt 3.4.5), reakcję dodatnią otrzymano dla peptydu Hsp60 (409 – 424) o sekwencji aminokwasowej: Thr-Ser-Asp-Val-Glu-Val-Asn-Glu-Lys-Lys-Asp-Arg-Val-Thr-Asp-Ala.

Wyniki badania aktywności króliczej surowicy odpornościowej anti-Hsp60 *S. Enteritidis* wobec wymienionych powyżej antygenów przedstawiono na rycinie 21. Prezentowane wyniki stanowią średnie wartości otrzymane z 6 pomiarów OD uzyskanych dla każdego antygeny w dwóch niezależnych doświadczeniach pomniejszone o średnią wartość OD kontroli ujemnych antygenów i trzykrotne odchylenie standardowe.



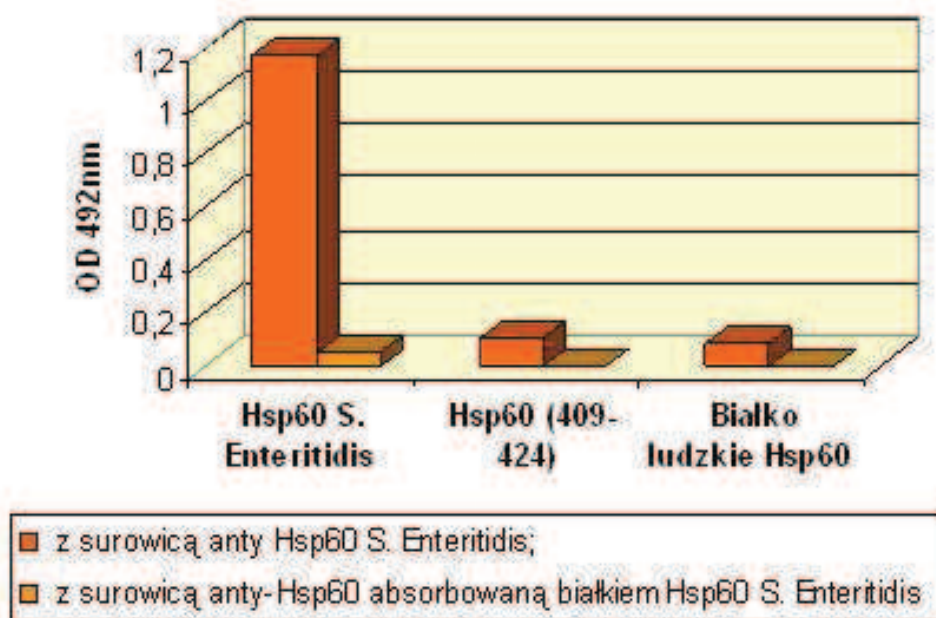
Ryc. 21. Aktywność surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (1:1000) w reakcji z białkiem Hsp60 *S. Enteritidis*, z syntetycznym peptydem Hsp60 (409 – 424) i ludzkim białkiem Hsp60, badana w teście ELISA

Fig. 21. Reactivity of anti-S. Enteritidis Hsp60 serum (1:1000) to Hsp60 of S. Enteritidis, human Hsp60 (409 – 424) synthetic peptide and human Hsp60 detected by ELISA

Zahamowanie reakcji immunoenzymatycznej (Materiał i metody, punkt 3.4.6.3) poprzez absorpcję surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis* odpowiednio białkiem Hsp60 *S. Enteritidis*, peptydem Hsp60 (409 – 424) i ludzkim białkiem Hsp60 pozwoliło na wykazanie swoistości reakcji wiązania ludzkiego białka Hsp60 i jego syntetycznego

fragmentu (409 – 424) przez przeciwciała anti-Hsp60 *S. Enteritidis* zawarte w surowicy króliczej.

Rycina 22 prezentuje wyniki badania aktywności surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis*, odpowiednio przed absorpcją i po wyabsorbowaniu białkiem Hsp60 *S. Enteritidis*, kolejno względem wszystkich trzech antygenów. Wartości OD prezentowane dla antygenów reagujących odpowiednio z surowicą nieabsorbowaną i absorbowaną, stanowią średnią arytmetyczną 6 pomiarów OD uzyskanych dla każdego antygeny w dwóch niezależnych doświadczeniach, pomniejszoną o średnią wartość OD kontroli ujemnych antygenów i trzykrotne odchylenie standardowe. Zaobserwowano znaczącą utratę aktywności absorbowanej surowicy w stosunku do białka Hsp60 pałeczek *S. Enteritidis* i całkowity jej brak w przypadku pozostałych dwóch antygenów.

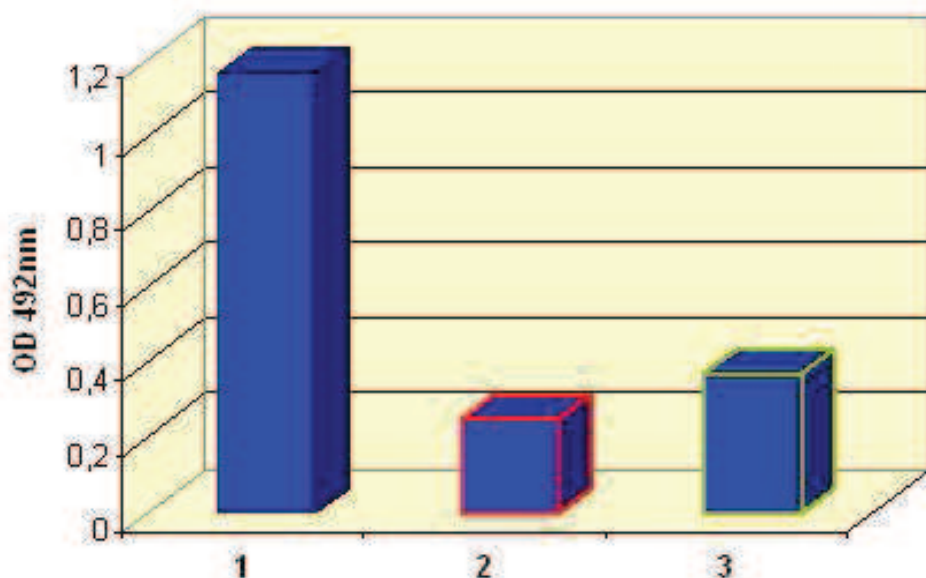


Ryc. 22. Zestawienie wyników badania w teście ELISA aktywności surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (przed absorpcją i po absorpcji białkiem Hsp60 *S. Enteritidis*) względem antygenów odpowiednio: białka Hsp60 *S. Enteritidis*, syntetycznego peptydu Hsp60 (409 – 424) i ludzkiego białka Hsp60

Fig. 22. ELISA results of reactivity of anti-*S. Enteritidis* Hsp60 serum before (orange colour) and after (dark yellow colour) absorption with homologous Hsp60 to the three following antigens: *S. Enteritidis* Hsp60, human Hsp60 (409 – 424) synthetic peptide and human Hsp60

Na rycinie 23 przedstawiono wyniki badania aktywności nieabsorbowanej surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis* oraz surowicy wyabsorbowanej odpowiednio syntetycznym

fragmentem ludzkiego białka Hsp60 (409 – 424) i rekombinowanym ludzkim białkiem Hsp60 wobec tego samego antygeny – białka Hsp60 pałeczek *S. Enteritidis*. Wartości absorbancji uzyskane dla białka Hsp60 *S. Enteritidis* w wyniku reakcji: 1 – z surowicą króliczą anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (1:1000), 2 – z surowicą króliczą anti Hsp60 *S. Enteritidis* inkubowaną z nadmiarem peptydu Hsp60 (409 – 424) (10µg/ml), 3 – z surowicą króliczą anti-Hsp60 *S. Enteritidis* inkubowaną z nadmiarem rekombinowanego ludzkiego białka Hsp60 (5µg/ml) stanowią średnią arytmetyczną odpowiednio 6 pomiarów OD pomniejszoną o średnią wartość OD kontroli ujemnej antygeny i trzykrotne odchylenie standardowe. Zaobserwowano zdecydowany spadek aktywności (mierzonej wartością OD) surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis* względem homologicznego białka, w wyniku wyabsorbowania zawartych w niej przeciwciał poliklonalnych odpowiednio syntetycznym fragmentem ludzkiego Hsp60 (ponad pięciokrotny, ryc. 23, 2) i ludzkim białkiem Hsp60 (ponad trzykrotny, ryc. 23, 3).



Ryc. 23. Zestawienie wyników badania w teście ELISA aktywności nieabsorbowanej surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis* (1) i surowicy po absorpcji odpowiednio syntetycznym peptydem Hsp60 (409 – 424) (2) oraz rekombinowanym ludzkim białkiem Hsp60 (3), względem białka Hsp60 *S. Enteritidis*

Fig. 23. ELISA results of reactivity of no-absorbed anti-S. Enteritidis Hsp60 serum (1) and serum after absorption with human Hsp60 (409 – 424) synthetic peptide (2) and human Hsp60 (3) to Hsp60 of S. Enteritidis

Stosując metodę ELISA wykazano, że przeciwciała poliklonalne anty-Hsp60 *S. Enteritidis* rozpoznają ludzkie białko Hsp60 i jeden z jego syntetycznych fragmentów, co wskazuje na istnienie podobieństwa immunologicznego i molekularnego pomiędzy białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* i jego ludzkim homologiem.

5. DYSKUSJA

Pałeczki z rodzaju *Salmonella* stanowią poważny problem zdrowotny i ekonomiczny w wielu krajach. Salmonelozy – choroby wywołane przez pałeczki *Salmonella* tzw. zwierzęcego pochodzenia, należą do najbardziej rozpowszechnionych chorób na świecie. W roku 2006, współczynnik zarejestrowanych przypadków salmonelozy w państwach Unii Europejskiej wynosił 34,6 na 100 tys. mieszkańców [112]. Pałeczki *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* ponoszą odpowiedzialność za znakomitą większość przypadków salmonelozy w Europie (70 – 80% zakażeń *Salmonella* o rozpoznanym typie serologicznym). Mimo obserwowanej w ostatnim dziesięcioleciu poprawie sytuacji epidemiologicznej związanej z występowaniem pałeczek *Salmonella*, są one w wielu krajach [98, 109, 146, 345, 380], w tym również w Polsce [26, 27, 75, 339], w dalszym ciągu jedną z głównych przyczyn zakażeń i zatruc pokarmowych pochodzenia bakteryjnego. Izolacje pałeczek *Salmonella* od ludzi i zwierząt, z żywności i pasz, a także z otoczenia są w niektórych krajach tak częste, że mogą stanowić swego rodzaju wskaźnik ich stanu sanitarnego.

W wyniku badań przeprowadzonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella* (KOS) w latach 1995 – 2007 rozpoznano ogółem 145 różnych typów serologicznych *Salmonella*. Znakomita większość należała do *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Źródła izolacji tych bakterii były różnorodne. Stanowiły je materiały kliniczne pochodzące od ludzi (prawie połowa wszystkich szczepów przebadanych w KOS w tym okresie), a także zwierzęta, produkty spożywcze, pasze i inne oraz materiały, których pochodzenie było nieznane. Dominującym był serowar *S. Enteritidis*. Reprezentowało go około 10% wszystkich szczepów przysłanych do KOS, celem identyfikacji lub potwierdzenia rozpoznania. Dalej, kolejno najliczniej prezentowane były serowary: *S. Mbandaka*, *S. Hadar*, *S. Thompson*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Agona*, *S. Derby* i *S. Anatum*.

Jak dotąd opisano prawie 2 580 różnych typów serologicznych *Salmonella*, które powodują zakażenia zwierząt [149]. Znakomita większość z nich może również powodować salmonelozę u ludzi. Ze względu na udział zwierząt jako źródła zakażenia pałeczkami *Salmonella* oraz pasz, jako źródła pokarmu dla nich, istotnym jest ciągłe monitorowanie obecności tych bakterii również i w tym środowisku. Na występowanie salmoneloz u drobiu największy wpływ ma jakość mikrobiologiczna pasz oraz warunki higieniczno-sanitarne w fermach i zakładach wylęgowych, a od tych czynników z kolei zależy, tak ważna dla ludzi, jakość żywności pochodzenia zwierzęcego. Wśród materiałów będących przedmiotem badań niniejszej pracy, do których w znacznej mierze należały pasze oraz różne komponenty paszowe, a także materiały mające związek z bytowaniem zwierząt, określono 82 różne serowary *Salmonella*, w tym *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Thompson*, *S. Senftenberg*, *S. Bredeney* i inne. Liczebnie dominował serowar *S. Enteritidis*. Część

serowarów *Salmonella* rozpoznanych jako czynnik etiologiczny salmonelozy zwierząt, zwłaszcza zwierząt importowanych, występuje w Polsce rzadko lub, tak jak w przypadku *S. Alger*, *S. Bardo*, *S. Fischerkietz*, *S. Halle*, *S. Istanbul*, *S. II* (48:d:z₆), *S. IIIb* (35:i:z₆), *S. IIIb* (58:z₅₂:z₃₅), *S. IIIb* (60:z₅₂:z₅₃), *S. IV* (11:z₄,z₂₃:–), wręcz wystąpiła po raz pierwszy i chociaż jest reprezentowana przez pojedyncze egzemplarze szczepów, stanowi jednak potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi zwłaszcza, że nieznana jest nam ich epidemiologia i możliwości chorobotwórcze. Szczególnie pałeczki *Salmonella* występujące u gadów cechuje duża inwazyjność [180, 282]. Bakterie *Salmonella* są częstym składnikiem flory jelitowej tych zwierząt. Nosicielstwo ich utrzymuje się przez długi okres życia zwierząt i dotyczy zarówno osobników dziko żyjących, jak i utrzymywanych w niewoli [128, 150, 183, 238, 300, 347]. Badania prowadzone przez Pęcunek [303], dotyczące nosicielstwa pałeczek *Salmonella* u żółwi spotykanych w Polsce (ogrody zoologiczne, sklepy zoologiczne, prywatni właściciele), wykazały obecność tych bakterii u ponad 30% objętych badaniami osobników, a wyizolowane szczepy prezentowały 12 typów serologicznych, w tym *S. Paratyphi B*. Wśród pałeczek *Salmonella* wyizolowanych od gadów (żółwie, żmije, wąż boa, kameleon), w wyniku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy, określono między innymi aż 6 serowarów, które wcześniej nie występowały w Polsce. Na istnienie takiego źródła izolacji „nowych” serowarów *Salmonella* w Polsce wskazywała już wcześniej Dera-Tomaszewska [84]. Serowary *S. Adamstua*, *S. Pomona*, *S. Stendal*, *S. II* (1,4,[5],12,[27]:b:[e,n,x]) (dawniej *S. II sofia*) wyizolowano w latach 1967 – 1978 od żółwi, *S. Oslo* – z padłej jaszczurki. Pałeczkami *Salmonella* pochodzącymi od gadów zakażają się głównie dzieci, w tym często niemowlęta [51, 52, 54, 60, 171, 180, 257, 282, 343, 394]. W Stanach Zjednoczonych, w wyniku kontaktu z tymi zwierzętami rejestruje się 74 tysiące przypadków rocznie, co stanowi 6% ogółu sporadycznych przypadków zakażeń *Salmonella* w tym kraju, szacowanych na około 1,2 miliona w skali roku [257]. Do zakażenia dochodzi na skutek bezpośredniego kontaktu z zainfekowanymi gadami lub też na drodze pośredniej. W związku z dużą inwazyjnością czynnika patogennego wiele dzieci po zachorowaniu musi być hospitalizowanych z powodu ciężkiego przebiegu choroby (krwawa biegunka, bakteriemia) [51, 52, 53, 54, 60, 282]. Być może takim przykładem, jest opisany w niniejszej pracy przypadek zakażenia 4-miesięcznego dziecka pałeczkami *S. Lindern*. Serowar ten pojawił się w Polsce po raz pierwszy w 2003 roku. W toku dochodzenia epidemiologicznego, nie wykazano wprawdzie źródła zakażenia, ale jak wynikało z wywiadu przeprowadzonego z matką dziecka, w domu były obecne dwa żółwie, przebywające poza terrarium i pies. Nierzadko, w wyniku kontaktu z gadami, występują również formy pozajelitowe salmonelozy, takie jak zapalenie opon mózgowych, stawów, a nawet ucha środkowego. Niekiedy w wyniku infekcji dochodzi do zgonu pacjenta. W związku z rosnącym w Polsce zainteresowaniem hodowlą zwierząt egzotycznych powinno się dążyć do upowszechniania informacji o możliwości zakażenia ludzi poprzez kontakt z trzymanymi w domu gadami. Wprawdzie wyniki badań prowadzonych przez Pęcunek i wsp. [303] zostały

opublikowane w kilku pracach, to jednak, jak twierdzą autorzy, nie wzbudziły one większego zainteresowania w środowisku naukowym związanym z medycyną i weterynarią, jak również wśród pozostałych członków naszego społeczeństwa. Nawet w najnowszych, polskich publikacjach naukowych, dotyczących salmoneloz u zwierząt [372], nie wspomina się o gadach jako potencjalnym źródle bakterii *Salmonella*, a przeciętny obywatel nie zdaje sobie nawet sprawy z występujących w tym zakresie zagrożeń. Zwyczaj trzymania żółwi w domach prywatnych, a także w przedszkolach i szkołach rozpowszechnił się w Polsce. Stały się one częstymi domownikami, przebywającymi w towarzystwie psów, kotów, chomików i innych zwierząt domowych. Mogą zatem pełnić również ważną funkcję w przenoszeniu bakterii *Salmonella* na inne zwierzęta. Każdy potencjalny właściciel gada, kupując węża, jaszczurkę czy żółwia, powinien być poinformowany o tym, że wiele zwierząt jest zakażonych pałeczkami *Salmonella*, które mogą wywołać salmonelozę u ludzi. Szczególnie dużym ryzykiem zdrowotnym związanym z hodowaniem gadów obarczone są rodziny z dziećmi poniżej 8 roku życia, czy z osobami o osłabionym systemie obronnym organizmu.

Skażone w znacznym stopniu są także krajowe i importowane komponenty paszowe i pasze, takie jak: mączka mięsno-kostna, mieszanki paszowe czy śruta sojowa. Jak wykazano w niniejszej pracy, izolowano z nich *S. Mbandaka*, *S. Infantis*, *S. Havana*, *S. Muenster* i inne serowary. Pasze i komponenty paszowe stanowiły również źródło izolacji 9 serowarów, których wcześniej nie rejestrowano w Polsce. Serowary *S. Braeknell*, *S. Cannstatt*, *S. Idican*, *S. Kiambu*, *S. Liverpool*, *S. Llandoff*, *S. Oukam*, *S. Telelkebir* i *S. Telhashomer* pojawiły się w kraju po raz pierwszy w latach 1995 – 2007. Biorąc pod uwagę skalę produkcji i sposób żywienia zwierząt łatwo sobie wyobrazić jak ważne jest znaczenie pasz w rozprzestrzenianiu bakterii *Salmonella*. Dlatego tak istotnym było, uwzględnienie regularnego badania pasz w kierunku obecności pałeczek *Salmonella* w opracowanym przez PIWet-PIB Krajowym Planie Urzędowej Kontroli Środków Żywienia Zwierząt, wdrożonym w życie przez Inspekcję Weterynaryjną w roku 2004 [174].

Jak wynika z danych epidemiologicznych opracowanych przez Przybylską [312], w Polsce, w 1998 roku, około 77% toksykoinfekcji spowodowanych przez tzw. odzwierzęce pałeczki *Salmonella* w ogniskach zbiorowych zatruc i zakażeń pokarmowych, było następstwem konsumpcji produktów spożywczych pochodzących od drobiu. Przyczynę zachorowań stanowiły przede wszystkim potrawy zawierające w swoim składzie jaja. Ich udział wynosił około 74%. Na pierwszoplanową rolę jaj jako nośnika odzwierzęcych pałeczek *Salmonella*, a w szczególności *S. Enteritidis* wskazują również badania prowadzone w innych krajach [70, 175, 356]. A zatem drób, który aż w 60% może być zakażony pałeczkami *Salmonella* oraz jaja są najczęstszym źródłem zakażenia człowieka [112, 174]. Jak wynika z badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy, w ciągu ostatnich lat sprowadzono do Polski duże ilości drobiu do hodowli (kurcząt, indyków, gęsi i kaczek) z USA, Kanady, Holandii, Anglii, Czech i Niemiec. U tych ptaków stwierdzano

zakażenia pałeczkami *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Mbandaka*. Wszystkie te serowary powodują zakażenia i zatrucia pokarmowe u ludzi w naszym kraju. Dobrze poznanym źródłem jest również mięso wieprzowe i wołowe, w tym mięso mielone i produkty je zawierające [109, 112, 174, 345]. Badania przeprowadzone w KOS w latach 1995 – 2007 również to potwierdzają. Szczepy *Salmonella* identyfikowane w KOS izolowano także z jaj kurzych, proszku jajecznego (imp. Holandia), z wyrobów garmażeryjnych zawierających w swym składzie jaja. Izolowano je również z różnego rodzaju mięs mielonych (w tym mieszanych), z mięsa wołowego, drobiowego (indyki, kurczaki, filety z kurzych piersi), a także z karkówki wieprzowej i różnych wędlin. Również wiele innych produktów spożywczych skażonych bakteriami *Salmonella*, na przykład takich jak czekolada, chipsy czy jadalne kielki roślin, stanowić może źródło zakażenia ludzi powodując ogniska zatruć pokarmowych niejednokrotnie o zasięgu międzynarodowym [130, 203, 381]. Na przykład serowar *S. Yoruba*, zarejestrowany w Polsce po raz pierwszy w 2006 roku, wyizolowano z czekolady. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* izolowano także z produktów mlecznych. Niepokoi fakt obecności tych bakterii w mleku i przetworach mlecznych w proszku, w tym w odżywcze dla dzieci „Bebiko”. Środki spożywcze pochodzenia roślinnego i zwierzęcego stanowią pokarm dla ludzi. Mięso w życiu człowieka jest ważnym składnikiem diety. Produkty mleczne są źródłem białka i wielu witamin. Szczególna dbałość o ich jakość mikrobiologiczną powinna być absolutnie priorytetowa. W celu podniesienia walorów smakowych spożywanych przez nas produktów często stosuje się różne przyprawy, z których znakomita większość pochodzi z importu. Jak wykazały badania przeprowadzone w ramach tej pracy, pałeczki *Salmonella* obecne były w takich przyprawach jak susz cebulowy pochodzący z Chin, chili, kminek mielony importowany z Pakistanu, bazylia świeża i suszona, mieszanki przyprawowe do produkcji wędlin importowane z Niemiec, pieprz czarny mielony, pieprz zielony importowany z Chin, papryka czerwona mielona czy gałka muszkatołowa importowana z Indonezji. Bakterie *Salmonella* obecne były także we wiórkach kokosowych, w herbacie, suszonych grzybach Mun, ziarnie sezamowym importowanym z Indonezji i Indii, w figach pochodzących z Iranu, a także w mące pszennej i ryżowej, rurkach sezamowych, zupach błyskawicznych i sosach w proszku importowanych z Belgii. Wśród szczepów *Salmonella* wyizolowanych z żywności, badanych w ramach niniejszej pracy, określono łącznie 60 różnych wariantów serologicznych. Najliczniej reprezentowanym był oczywiście serowar *S. Enteritidis* (11% wszystkich szczepów, pochodzących z produktów spożywczych, które znalazły się w badanym materiale). Następnie kolejno *S. Hadar*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Falkensee*, *S. Kedougou*, *S. Infantis* i inne. Importowane przyprawy były również źródłem izolacji szczepów *Salmonella* prezentujących serowary, których do tej pory nie rejestrowano w Polsce: *S. Hvitittingfos*, *S. Javiana*, *S. Kibusi*, *S. Nyborg* czy *S. II (1,9,12:b:e,n,x)*. Obecność bakterii *Salmonella* w produktach spożywczych powoduje, iż ludzie najczęściej ulegają zakażeniu tymi drobnoustrojami. Stąd zdarza się, że serowary izolowane ze

środków spożywczych znajdują odzwierciedlenie wśród tych, które najczęściej wykrywane są u ludzi, jak to zaobserwowano w tym przypadku dla *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka* i *S. Infantis*. Kolejność ich występowania jest wprawdzie nieco inna, ponieważ zakażenia u ludzi determinowane są także przez serowary powodujące salmonelozę zwierząt. Spośród pałeczek *Salmonella* izolowanych od zwierząt, serowary takie jak *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Choleraesuis*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Saintpaul*, *S. Virchow*, *S. Thompson*, *S. Indiana* czy *S. Derby*, określono również wśród materiałów pochodzących od ludzi.

Ogółem, wśród szczepów wyizolowanych z materiałów pochodzących z innych źródeł (żywność, zwierzęta, pasze, środowisko), dominowały pałeczki *S. Enteritidis* odnosząc znaczną, liczebną przewagę nad *S. Typhimurium*. Pozostałe, najczęściej izolowane serowary to: *S. Mbandaka*, *S. Hadar*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Derby*, *S. Thompson*, *S. Anatum*, *S. Bredeney*, *S. Senftenberg*, *S. Saintpaul*, *S. Virchow*, *S. Heidelberg*, *S. Livingstone* i inne. Taką sytuację epidemiologiczną dotyczącą dystrybucji serowarów *Salmonella* izolowanych z tzw. „non-human sources” potwierdzają również badania prowadzone w latach 2004 – 2007 przez Państwowy Instytut Weterynaryjny Państwowy Instytut Badawczy (PIWetPIB) w Puławach, których wyniki zamieszczono w jednej z ogólnie dostępnych baz danych (WHO Global Salm-Surv. Country Databank) [405]. W tym okresie, od zwierząt, z żywności, z pasz oraz prób środowiskowych wyizolowano łącznie 11 635 szczepów *Salmonella*. Niestety pełnemu badaniu serologicznemu, pozwalającemu na określenie typu serologicznego, poddano jedynie niewielki ich odsetek – 18,3% (2 132 szczepy). Dominującym był serowar *S. Enteritidis*. Na drugim miejscu znalazły się pałeczki *S. Typhimurium*, poprzedzając *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Saintpaul*, *S. Mbandaka*, *S. Choleraesuis*, *S. Virchow*, *S. Agona*, *S. Newport*, *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. Senftenberg*, *S. Bredeney*, *S. Livingstone* i inne. Zatem w Polsce, również wśród tych materiałów zdecydowanie dominują pałeczki *S. Enteritidis*, w przeciwieństwie do trendów obserwowanych globalnie. Na świecie, w tym środowisku, na pierwszym miejscu znajduje się *S. Typhimurium* (23%), wyprzedzając znacznie pałeczki *S. Heidelberg* (9%), *S. Enteritidis* (8%), *S. Infantis* (5%), *S. Anatum* (4%), *S. Derby* (4%), *S. Brandenburg* (3%), *S. Agona* (2%) i inne [405].

Wśród szczepów określonych w KOS w latach 1995 – 2007, które wyhodowano od ludzi (z różnego rodzaju materiałów klinicznych), serowary *S. Thompson*, *S. Mbandaka*, *S. Enteritidis* i *S. Hadar* reprezentowane były prawie w takich samych ilościach. Następnie kolejno typ serologiczny *S. Virchow*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Albany*, *S. Typhi*, *S. Indiana*, *S. Saintpaul*, *S. Anatum*, *S. Newport*, *S. Choleraesuis* i 78 pozostałych serowarów. Obecność *S. Thompson* i *S. Albany* tak wysoko na tej liście (odpowiednio 1 i 8 miejsce) można wytłumaczyć trudnościami diagnostycznymi jakie sprawiać mogą te serowary przy ich identyfikacji. Na przykład izolowane w Polsce szczepy *S. Thompson* najczęściej prezentują antygen rzęskowy w drugiej fazie (H:1,5) i niezwykle trudno jest ujawnić fazę pierwszą. Indukcja pierwszej fazy antygeny rzęskowego

(H:k) w przypadku tego serowaru, niezbędnej do pełnej identyfikacji szczepu, wymaga wielu pracochłonnych zabiegów. Prawdopodobnie z tego względu tak znaczna liczba tych trudnych diagnostycznie szczepów znalazła się w badanym materiale. Z kolei *Salmonella* Choleraesuis występuje często jako jednofazowy wariant (*S. Choleraesuis* war. kunzendorf), co łącznie z jego nietypowymi cechami biochemicznymi sprawia szczególne trudności w ostatecznym rozpoznaniu, dlatego często jest przesyłany do KOS celem identyfikacji lub potwierdzenia rozpoznania w sytuacjach wzbudzających wątpliwości.

Najczęściej występujące serowary *Salmonella*, tzw. epidemiczne, różnią się w poszczególnych krajach, ale też z biegiem lat zmienia się również ich dystrybucja w każdym kraju. Chociaż serowary *Salmonella*, określone w KOS w latach 1995 – 2007 nie odzwierciedlają dokładnie wszystkich typów izolowanych w całej Polsce, mogą jednak być pomocne w oszacowaniu sytuacji epidemiologicznej *Salmonella* w naszym kraju. Szczepy bakteryjne przesyłane do KOS, stanowią tylko niewielki ułamek wszystkich szczepów określanych na terenie Polski. Pozwalają jednak wstępnie zorientować się w sytuacji epidemiologicznej związanej z występowaniem pałeczek *Salmonella*, śledzić pojawianie się nowych serowarów oraz odpowiedzieć na pytanie, które serowary *Salmonella* sprawiają największe trudności diagnostyczne krajowym laboratoriom.

Na podstawie danych będących wynikiem opracowań epidemiologicznych przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy w oparciu o materiały opublikowane przez Zakład Epidemiologii PZH i Departament Przeciwepidemiczny GIS [274, 291, 292, 293], można stwierdzić, że dominującym serowarem izolowanym od ludzi w Polsce w latach 1995 – 2007 były pałeczki *S. Enteritidis*. Wyizolowano je od ponad 320 tysięcy osób, z czego przeszło 73% stanowiły osoby chore. O poprawie sytuacji dotyczącej infekcji spowodowanych tym serowarem świadczyć może, zaobserwowana w tym czasie, tendencja zmniejszania się liczby zakażeń, z ponad 40 tysięcy w roku 1995, do nieco ponad 11 tysięcy w roku 2007. *Salmonella* Typhimurium – drugi serowar pod względem częstości występowania spowodował zakażenie u ponad 15 tysięcy osób. Kolejne miejsce zajął wariant serologiczny *S. Hadar*, stanowiący przyczynę zakażenia 8 521 osób. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, iż w roku 2002 i 2003 pałeczki *S. Hadar* izolowano w ilościach przekraczających liczbę zakażeń spowodowanych przez pałeczki *S. Typhimurium*, które już od wielu lat zajmowały stale drugie miejsce na liście serowarów najliczniej izolowanych w Polsce [274, 291, 292, 293]. Następne w kolejności to: *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport* i *S. Mbandaka*. Serowary te wraz z *S. Typhimurium* i *S. Hadar* zajmowały w poszczególnych latach (1995 – 2007) naprzemiennie miejsca od 2 do 7 wśród serowarów *Salmonella* najczęściej wykrywanych u ludzi w naszym kraju. Taka dystrybucja typów serologicznych reprezentacyjnych dla całego kraju, znalazła również odzwierciedlenie wśród serowarów wyizolowanych z materiałów pochodzących od ludzi, będących przedmiotem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy. Reasumując – obecnie do najczęstszych czynników etiologicznych salmonelozy u ludzi w

Polsce należą: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport* i *S. Mbandaka*.

W krajach Ameryki Północnej oraz Europy, począwszy od połowy lat osiemdziesiątych, najważniejsze znaczenie epidemiologiczne mają tzw. odzwierzęce serowary *Salmonella* wywołujące toksykoinfekcje pokarmowe u ludzi. Według danych opublikowanych przez Centers for Disease Control and Prevention (CDC), w USA, w latach 1993 – 1997 serowarem odpowiedzialnym za ponad połowę (55%) zachorowań na salmonelozę była *S. Enteritidis*. W Polsce w okresie 1990 – 1998, udział *S. Enteritidis* w ogniskach zbiorowych zatruc i zakażeń pokarmowych, wynosił ponad 90%. Dalsze miejsca zajmowały: *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Indiana*, *S. Hadar* i inne [338]. W Afryce, w latach 2002 – 2004, najczęściej izolowanym serowarem od ludzi były pałeczki *S. Typhimurium* (31%). Drugie miejsce zajmował serowar *S. Enteritidis* (19%). W Ameryce Północnej, w latach 2002 – 2007 generalnie dominował wariant serologiczny *S. Typhimurium*, jedynie w roku 2005 i 2006 ustąpił miejsca pałeczkom *S. Enteritidis*. W Azji i Europie najliczniej izoluje się *S. Enteritidis*. Do krajów o wysokiej średniej zachorowań na salmonelozę w skali roku należą: Czechy – średnio około 18 tys. zachorowań rocznie, Polska (2000 – 2007) – nieco ponad 14 tysięcy. Niską średnią zachorowań na salmonelozę mają: Szwecja – około 4 tys. przypadków rocznie, Niemcy – około 3 tys. oraz Finlandia – około 2 tys. przypadków zachorowań rocznie [274, 292, 293, 405].

W Polsce po II wojnie światowej rejestrowano rocznie od kilku do kilkunastu tysięcy zachorowań i kilka tysięcy zgonów z powodu duru brzuszego [216]. Obecnie, dzięki profilaktyce i poprawie warunków sanitarno-higienicznych w naszym kraju zachorowania na dur brzuszny należą do rzadkości. Część z nich to przypadki importowane. W roku 1993 liczbę turystów przekraczających granice własnego kraju oceniono na 500 milionów i szacuje się, iż zwiększa się ona co roku o około 13%. Stwierdzono, że 0,03% podróżujących do Indii, Afryki Północnej i Peru wraca zakażonych dudem brzuszny. W latach 1985 – 1999 zarejestrowano 155 przypadków zachorowań na dur brzuszny w Polsce, w tym 13 zaimportowanych z rejonów endemicznych [188]. W okresie od 1995 do 2007, *S. Typhi* wyizolowano od 360 osób (w tym 70 osób chorych) [274, 291, 292, 293] i tylko dla 23 spośród tych przypadków rozpoznanie pałeczek duru brzuszego potwierdzono w KOS. Typowaniu bakteriofagowemu poddano 84 szczepy *S. Typhi*.

Ponadto w ciągu ostatnich kilku lat w Polsce obserwowany jest stały wzrost liczby przypadków uogólnionych zakażeń pałeczkami *Salmonella* tzw. niedurowymi i pałeczkami paradurowymi, z reguły wymagających leczenia antybiotykami [362]. Na przykład w 2004 roku zarejestrowano 140 zachorowań na salmonelozę pozajelitowe (zapadalność 0,37 na 100 tys.) [76]. W 2005 roku liczba ta wynosiła 191 (zapadalność 0,50 na 100 tys.) [77], a więc o 51 przypadków więcej niż w roku poprzednim. Jest to największa liczba zarejestrowanych zachorowań od czasu wprowadzenia obowiązku ich zgłaszania, to jest od 1994 roku. W kolejnym roku zarejestrowano 152 przypadki (zapadalność 0,40 na 100 tys.) tej postaci salmonelozę [78]. Niepokoi również fakt, iż wśród nich, jak

wynika z badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy, znalazły się zakażenia, spowodowane przez szczepy *Salmonella* prezentujące serowary, których do tej pory nie rejestrowano w Polsce. Wyizolowane z żółci pałeczki *S. Grumpensis* były odpowiedzialne za zakażenie o przebiegu durowym, serowar *S.IIIb* (61:k:1,5,7) izolowano wraz ze *Streptococcus pneumoniae* z przypadku zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.

Szczególną uwagę należy zwrócić na coraz liczniej pojawiające się serowary *Salmonella*, które dotychczas nie występowały w naszym kraju. Olbrzymia mobilność ludzi (rozwój turystyki, migracje ludności) sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu się pałeczek *Salmonella*. W średniowieczu przemieszczanie się patogenów z jednego kontynentu na drugi zajmowało na ogół wiele lat. Dziś mikroorganizmy podróżują z jednego krańca świata na drugi często w ciągu kilku godzin. W związku z wstąpieniem Polski do Unii Europejskiej, otwarciem granic, możliwościami legalnej pracy w innych krajach, rozwojem turystyki i handlu, serowary te mogły zostać zaimportowane z różnych kontynentów. Co roku w naszym kraju pojawiają się „nowe” serowary *Salmonella* [42, 83, 84, 85, 89, 92, 172, 173, 306]. W latach 1995 – 2007 w Krajowym Ośrodku *Salmonella* określono łącznie 52 typy serologiczne, których dotychczas nie izolowano w Polsce. Od jednego do jedenastu w kolejnych latach. Średnio 4 nowo pojawiające się serowary rocznie. Pochodziły one zarówno od ludzi, jak i z innych źródeł. Wszystkie należały do gatunku *Salmonella enterica*. Do roku 1994 zarejestrowano w kraju łącznie 158 serowarów *Salmonella*. Pojawienie się kolejnych 52 pozwoliło na aktualizację tego wykazu. W Polsce w ciągu ostatnich 50 lat (1957 – 2007) określono ogółem 210 serowarów *Salmonella* prezentujących 30 grup serologicznych. W tym trzy serowary, które zostały odkryte w Polsce: 1 – *Salmonella* Gdansk, 2 – rozpoznany w 1972 roku serowar o wzorze antygenowym *Salmonella* (41:z₂₉:–), który w roku 1974 otrzymał nazwę *Salmonella* Lodz, 3 – serowar *Salmonella* IIIb (48:k:z₅₇), określony w 2007 roku, w wyniku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy. Tożsamość ostatniego serowaru potwierdziły, między innymi w celu walidacji, badania przeprowadzone przez WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (Instytut Pasteur, Paryż, Francja) oraz przez dwa inne ośrodki referencyjne: Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg, Niemcy) i Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA). Zgodnie z obowiązującą procedurą, walidacji nowych serowarów *Salmonella* dokonuje WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* we współpracy z wyżej wymienionymi ośrodkami [149]. Zgodność wyników badań identyfikacyjnych przeprowadzonych w tych trzech laboratoriach zatwierdza dany typ serologiczny jako nowy. Wyizolowany w Polsce serowar *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (48:k:z₅₇) uznano za nowy. Został on uwzględniony w nowej, dziesiątej edycji schematu White’a-Kauffmanna-Le Minora.

Pojawienie się „nowych” (zarówno wyizolowanych po raz pierwszy w Polsce, jak i zupełnie nowych) typów serologicznych *Salmonella* stwarza zagrożenie przede wszystkim dla ludzi, gdyż istnieje prawdopodobieństwo zakażenia nieznanymi dotąd drobno-

ustrojami, które wcześniej tych zakażeń u nas nie powodowały. Szczególnie niepokojący jest fakt, iż zakażenia te dotyczyły bardzo małych dzieci, głównie niemowląt. Serowary *S. Agbeni*, *S. Galiema*, *S. Lindern*, *S. Salford*, *S. II* (13,22:z₂₉:1,5), *S. IIIb* (38:r:z) i *S. IIIb* (48:k:z₅₃) stanowiły czynnik etiologiczny zakażeń dzieci w przedziale wiekowym od 4 do 13 miesięcy. Niestety w większości przypadków źródło zakażenia było nie ustalone lub jak w przypadku zakażenia pałeczkami *S. Lindern*, domniemane. Wiele z tych „nowych” serowarów zwyczajnie zaimportowano w wyniku prowadzenia żywnego handlu i transportu międzynarodowego oraz rozwoju masowej turystyki. Niektóre mogły pojawić się na skutek spontanicznych zmian genetycznych zachodzących wśród pałeczek *Salmonella* krążących w środowisku, będących wynikiem mutacji i/lub horyzontalnego transferu genów. Przykładem może być nowo odkryty i określony w Polsce serowar *S. IIIb* (48:k:z₅₇), który do tej pory nie występował nigdzie na świecie.

Niepokoić może również, wykazany w ramach niniejszej pracy, fakt powodowania salmoneloz u ludzi w Polsce przez serowary należące do innych podgatunków niż *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, między innymi z podgatunku *salamae*, *diarizonae* i *houtenae*. W ciągu omawianego przedziału czasu wyizolowano szereg takich serowarów, wśród nich cztery nie występujące wcześniej w Polsce. Szczepy z podgatunku *diarizonae*, jak większość (75%) jego przedstawicieli, wykazywały zdolność fermentowania laktozy. Można podejrzewać, iż udział takich pałeczek *Salmonella* w powodowaniu zakażeń u ludzi w naszym kraju stanowić może znacznie poważniejszy problem. Stosowanie w oficjalnych procedurach diagnostycznych wyłącznie tradycyjnych podłoży do izolacji bakterii *Salmonella* może być przyczyną niedostrzegania ich obecności w badanym materiale. Rozwiązanie problemu stanowić mogą niektóre podłoża chromogenne [106, 126, 243, 302, 320]. Szczególnie godnym polecenia jest oryginalne podłoże CHROMagar *Salmonella* Plus (CHROMagar, Paris, France) pozwalające na izolację i jednoznaczną, wstępną identyfikację wszystkich bakterii *Salmonella*, w tym również pałeczek *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B*, *C* oraz laktozo-dodatnich przedstawicieli rodzaju [82, 321]. W związku z coraz częściej obserwowanym udziałem laktozo-dodatnich szczepów *Salmonella* w powodowaniu ognisk zatruc pokarmowych, niezwykle istotnym byłoby uwzględnienie takiego podłoża w obowiązujących procedurach diagnostycznych, dotyczących zarówno badania żywności, pasz czy prób środowiskowych, jak i materiałów klinicznych. Niewielka lecz bardzo ważna grupa bakterii *Salmonella* wykazujących zdolność fermentowania laktozy może być błędnie identyfikowana lub nawet pominięta w diagnostyce gdzie wykorzystywane są jedynie konwencjonalne podłoża selektywne.

W ostatnich latach obserwuje się w Polsce spadek liczb zachorowań na salmonelozę [274, 291, 292, 293]. W 1995 roku liczba osób, u których wykryto zakażenia, wynosiła prawie 46 tysięcy. Każdego kolejnego roku (z wyjątkiem 1998 i 2002 roku) następował spadek liczb izolacji bakterii *Salmonella* od ludzi, średnio o około 4 tys. rocznie, do roku 2006, w którym według danych PZH i GIS, liczba osób zakażonych pałeczkami *Salmonella* wynosiła około 17 tys., a w 2007 roku już tylko niewiele ponad 14 tysięcy. Prze-

prowadzona w ramach niniejszej pracy analiza statystyczna trendów współczynników zakażeń pałeczkami *Salmonella* (wyrażonych liczbą potwierdzonych przypadków/100 tys. mieszkańców) u ludzi w Polsce w latach 1995 – 2007 wykazała statystycznie istotną tendencję spadkową dla zakażeń *Salmonella* ogółem i dla zakażeń spowodowanych przez pałeczki *S. Enteritidis*. Równocześnie nie stwierdzono istotnej statystycznie tendencji zmian (wzrostowej bądź spadkowej) dla pozostałych 7 serowarów poddanych analizie statystycznej. Rozkłady w czasie większości charakteryzujących je współczynników wykazują raczej cechy procesu błędzenia losowego. Sytuacja epidemiologiczna salmoneloz u ludzi w Polsce odzwierciedla trend ogólnoeuropejski [112, 113]. Istotny statystycznie, ogólny spadek zakażeń *Salmonella* u ludzi zarejestrowano również w latach 2004 – 2007 w krajach Unii Europejskiej, chociaż analiza danych indywidualnych dla poszczególnych państw członkowskich wykazała statystycznie istotną tendencję spadkową, poza Polską, jedynie w Austrii i Hiszpanii. Współczynnik zakażeń pałeczkami *Salmonella* w roku 2006, obliczony dla wszystkich państw członkowskich Unii Europejskiej na podstawie łącznej liczby (160 649) potwierdzonych przypadków salmoneloz, wynosił 34,6 na 100 tys. mieszkańców (Polska – 43,6/100 tys.) i był niższy o 7,6% w stosunku do roku 2005. Współczynnik zarejestrowany w 2007 roku wyniósł 31,1 na 100 tys. (151 995 potwierdzonych przypadków) (Polska – 37,2/100 tys.), wykazując również ponad siedmioprocentowy (7,3%) spadek wartości w stosunku do roku poprzedniego. Oznacza to, utrzymywanie się również na terenie Europy, obserwowanej już od kilku lat, wyraźnej tendencji spadkowej liczby rejestrowanych przypadków salmoneloz. Oczywiście dominującymi serowarami wśród zakażeń u ludzi pozostają nadal *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*. Ponosiły one odpowiedzialność odpowiednio za 62% i 13% wszystkich przypadków zarejestrowanych w 2006 roku. Każdy z pozostałych serowarów powodował 1% lub mniej zakażeń notowanych u ludzi [112]. W roku 2007, *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, stanowiły łącznie przyczynę 81% przypadków zakażeń [113].

Zaobserwowany statystycznie istotny spadek liczb zakażeń pałeczkami *Salmonella* (na 100 tys. mieszkańców) może świadczyć o poprawie sytuacji sanitarnej w naszym kraju. Do poprawy sytuacji epidemiologicznej w Polsce przyczyniają się skuteczne działania wszystkich instytucji odpowiedzialnych za nadzór, zwalczanie i zapobieganie salmonelozom. Nie można jednak pominąć jednego istotnego aspektu, który w pewnej mierze może mieć wpływ na zafałszowanie tych optymistycznych danych rejestrowanych w ostatnich czasach w naszym kraju, na który również już od kilku lat zwraca uwagę Gonera [143, 144, 145]. Jedną z przyczyn spadku rejestrowanych zachorowań może być również pogorszenie się diagnostyki bakteriologicznej zakażeń jelitowych. Przez wielu lat ponad 90% zachorowań na salmoneloz potwierdzano bakteriologicznie. W ostatnich latach znacznie obniżył się odsetek rozpoznań zgłaszanych jako przypadki potwierdzone. Jeszcze w 1995 roku wynosił on 91,5%, w 1998 – 80,4%, w 1999 – nieco ponad 70%, w 2000 – 71%, a w 2001 – już tylko 66,3%. Ponadto znacznie wzrosła licz-

ba chorych, u których nie określono serowarów pałeczek *Salmonella* – od 1,5% (1999 r.) do 2,3% (2001 r.) ogólnej liczby chorych [145]. Dotyczyło to przede wszystkim szczepów z grupy serologicznej O:9, do której należą także pałeczki duru brzuszego. Również w 2000 roku, Gonera [144] zwraca uwagę na dość dużą liczbę zarejestrowanych chorych, u których nie określono typu serologicznego (w tym szczepy z grup O:4, O:9, O:7, O:8), co zdaniem autorki świadczyć może o niewielkim zainteresowaniu lekarzy prawidłowym rozpoznaniem choroby, między innymi duru brzuszego i durów rzekomych. Podobne spostrzeżenia, dotyczące niepełnej identyfikacji pałeczek *Salmonella* rejestrowały również Dera-Tomaszewska i Głośnicka [87]. Znaczna część laboratoriów ogranicza się jedynie do potwierdzenia obecności pałeczek *Salmonella* w badanym materiale, ewentualnie do ustalenia grupy, bez określania typów serologicznych. Fakt ten może utrudniać zwalczanie zakażeń *Salmonella* u ludzi. Jeżeli diagnostyka i identyfikacja etiologii zakażeń nie ulegnie poprawie, to w dobie intensyfikacji podróży międzynarodowych i handlu (między innymi żywnością), tzw. importowane typy serologiczne, w tym również pojawiające się po raz pierwszy, mogą zostać przeoczone. Nie można nie zgodzić się z opinią Gonery [145], że bez poprawy diagnostyki laboratoryjnej zakażeń jelitowych, jakiegokolwiek prognozy dotyczące salmoneloz w naszym kraju będą nierzetelne i złudne. Szczęśliwie w roku 2005 – ponad 94%, a w 2006 – ponad 93% ogółu zarejestrowanych przypadków salmoneloz zostało potwierdzonych wynikami badań laboratoryjnych, spełniając tym samym kryterium przypadku potwierdzonego [77, 78]. Chociaż nadal, u dużej liczby chorych nie określano typu serologicznego. Na przykład, w samym tylko województwie pomorskim, w roku 2004 – u około 35% osób, w 2005 – u około 29%, a w 2006 r. – u ponad 42% osób chorych.

Jednak ciągle pojawiające się nowe warianty serologiczne *Salmonella*, zjawisko mutacji towarzyszące egzystującym w środowisku bakteriom i wpływ czynników środowiskowych sprawiają, że problem salmoneloz, mimo obserwowanej ostatnio tendencji spadkowej zakażeń, jest nadal aktualny i stanowi poważne zagrożenie. Nowe serowary powstają w wyniku zmian kombinacji antygenowych, które mogą być spowodowane różnymi czynnikami. Dlatego powinno podejmować się wszelkie możliwe starania, aby ciągle monitorować występowanie pałeczek *Salmonella* i dystrybucję serowarów, nie tylko epidemicznych, ale również wszystkich pozostałych oraz kontrolować zakażenia przez nie wywoływane i skutecznie im zapobiegać. Wspólne zaangażowanie wszystkich państw na świecie pozwoli na zmniejszenie ryzyka zakażeń tymi bakteriami. Wyniki badań uzyskane w ramach niniejszej pracy stanowią znaczący wkład w te działania.

Od wielu już lat w Polsce, we wszystkich województwach, najczęstszym czynnikiem etiologicznym zarówno w ogniskach, jak i zachorowaniach sporadycznych są pałeczki *S. Enteritidis*. I chociaż udział zachorowań wywołanych tym typem serologicznym w ogólnej liczbie zachorowań na salmonelozy w Polsce wskazuje w ostatnich la-

tach niewielką, ale wyraźną tendencję spadkową, stanowi on ciągle jeszcze bardzo wysoki odsetek. Pod koniec lat dziewięćdziesiątych udział *S. Enteritidis* w ogólnej liczbie salmoneloz wahał się w przybliżeniu, w granicach 85 – 90 %. W roku 2006, zachorowania, za które odpowiedzialny był ten serowar, stanowiły 80% wszystkich zachorowań spowodowanych przez bakterie *Salmonella* [78]. Zatrucia pokarmowe wywołane pałeczką *S. Enteritidis* stanowią już od dawna jeden z ważniejszych problemów służby zdrowia w Polsce. Zaobserwowany po raz pierwszy na początku lat sześćdziesiątych znacznie większy wzrost zakażeń spowodowanych przez *S. Enteritidis*, mających związek z pierwszą w kraju epidemią (1962 – 1976) wywołaną przez ten serowar [134], stał się przyczyną opracowania systemu bardziej szczegółowego różnicowania tych pałeczek za pomocą bakteriofagów. Typowanie bakteriofagowe jest doskonałą metodą pomocniczą w prowadzeniu dochodzeń epidemiologicznych. Pierwszą wersję schematu typowania bakteriofagowego pałeczek *S. Enteritidis* opublikowano w 1968 roku [241]. Na podstawie reakcji z 7 fagami typującymi wyróżniono 11 typów bakteriofagowych. W ciągu następných lat Macierewicz rozszerzyła schemat do 13 typów, a następnie do 25 przy użyciu 11 fagów oraz zmieniła całkowicie nomenklaturę typów bakteriofagowych. Dalsze badania prowadzone przez Lalko wykazały, iż mimo dużej przydatności praktycznej tego systemu, uzyskuje się niekiedy reakcje niepowtarzalne. W toku dalszej pracy, na podstawie uzyskanych wyników, ustalono za aprobatą Macierewicz ostateczną wersję schematu obejmującego 20 typów bakteriofagowych reagujących w odmienny sposób z 8 fagami typującymi [221, 222]. Jego wartość praktyczną potwierdzono analizą epidemiologiczną wykonaną w oparciu o materiał obejmujący 2 011 szczepów *S. Enteritidis* wyizolowanych w Polsce w latach 1970 – 1975. W badanym materiale wyróżniono 19 typów bakteriofagowych. Do najczęściej występujących w kraju, zarówno izolowanych od ludzi, jak i od zwierząt, należały typy 2, 5, 7, 8 i 12. Wśród szczepów pochodzących od ludzi przewagę stanowił typ 8 (31,8%) i typ 5 (21,8%), natomiast wśród izolacji od zwierzęcych – typ 12 (50,0%). Na uwagę zasługuje również fakt, iż typy: 4, 6, 7 i 12 izolowano głównie od osób dorosłych i starszych dzieci, natomiast typ 2 i 5 – od niemowląt ze środowisk zamkniętych, jak szpitale, czy domy małego dziecka. Rejestrowany od 1962 roku szybki wzrost zapadalności dla *S. Enteritidis*, osiągający maksymalne wartości w latach 1965 – 1967 (od 19,1 do 22,1 na 100 tys.) miał głównie związek z epidemią wywołaną przez ten serowar w szpitalach na oddziałach dziecięcych, w żłobkach i w domach dziecka [242]. Chorowały przede wszystkim najmłodsze dzieci. Śmiertelność noworodków sięgała 25%. Zaobserwowano odmienne od normalnie rejestrowanych przyczyny powstania epidemii nie dające się zakwalifikować jako zatrucia pokarmowe [134]. Odrębność źródeł i mechanizmów tej epidemii potwierdzały również wyniki typowania bakteriofagowego. Przyczyna początku pierwszej epidemii *S. Enteritidis* nie została wyjaśniona, natomiast mechanizm jej rozprzestrzeniania się na cały kraj miał związek z długim okresem wydalania zarazka po przechorowaniu, szczególnie przez dzieci. Istniały również podstawy do podejrzeń, że zakażenia te szerzyły się drogą po-

wietrzną. Choć pokaźna liczba przypadków objawowych salmoneloz w tym okresie czasu pochodziła również z ognisk zatruc pokarmowych. Należy podkreślić, iż znakomitą większość szczepów typu: 2, 5, 7, 8 i 12 wyizolowano właśnie z ognisk zatruc pokarmowych [222]. Na szczególną uwagę zasługiwały dwa duże ogniska: jedno spowodowane pałeczkami *S. Enteritidis* typu 12 (1972 rok; kolonie letnie – woj. szczecińskie; lody), drugie – typu 8 (1975 rok; woj. łódzkie; befszytk tatarski). Oba ogniska były jednorodnie. Szczepy izolowane z żywności, od osób chorych i z tzw. kontaktu przedstawiały ten sam typ bakteriofagowy.

Druga epidemia *S. Enteritidis* w Polsce zaczęła się prawdopodobnie we wczesnych latach osiemdziesiątych. Wprowadzenie stanu wojennego w Polsce w 1981 roku zbiegło się z wydaniem zakazu zbierania informacji epidemiologicznych, co spowodowało znaczne utrudnienie w opracowywaniu danych o zakażeniach *Salmonella* w latach 1980 i 1981 oraz stało się przyczyną niekompletnych informacji o salmonelozach w latach 1982 i 1983. Mimo to, już w 1982 roku zaobserwowano 11-krotny wzrost liczby przypadków zakażeń pałeczkami *S. Enteritidis* u ludzi w porównaniu z rokiem 1977 (842 przypadki). W 1984 roku rejestrowano 33-krotny, w 1986 roku 65-krotny, a w 1988 prawie 100-krotny wzrost tej liczby. Zakażenia w kolejnych latach 1989, 1990 i 1991 przekraczały ją 80-krotnie. Od 1993 roku (z wyjątkiem lat 1994 i 1998) obserwujemy ciągłe obniżanie się liczby zakażeń świadczące o stopniowym wygasaniu drugiej epidemii *S. Enteritidis* w naszym kraju, której szczyt przypadł na rok 1988. Epidemia ta do roku 1986 obejmowała głównie zakażenia sporadyczne, dotyczące przede wszystkim małych dzieci, ale nie miała charakteru epidemii szpitalnej. W przeciwieństwie do pierwszej epidemii przebiegała głównie pod postacią ognisk zatruc pokarmowych [134]. Rejestrowano coraz większe liczby ognisk zatruc pokarmowych, które od 1987 roku zaczęły dominować wśród zakażeń *S. Enteritidis*. Główną przyczyną zatruc pokarmowych stały się jaja i produkty je zawierające. Rzadziej przyczynę zatruc stanowiło mięso i jego przetwory, co związane było z wprowadzeniem znacznych ograniczeń i racjonowania żywności o okresie od 1982 do 1989 roku (przydziały kartkowe obejmowały: osoby dorosłe – 2,5 kg, dzieci – 1,8 kg mięsa i wszystkich jego przetworów na miesiąc). Jaja nie podlegały reglamentacji. Typowanie bakteriofagowe ponad 2 100 szczepów *S. Enteritidis* wyizolowanych w latach 1981 – 1990, wykonane przez Głośnicką i wsp. [132] wykazało, że dominującymi typami bakteriofagowymi, izolowanymi od ludzi, od zwierząt i z żywności były typy: 1, 6 i 7. Najwięcej szczepów prezentowało typ bakteriofagowy 7 (ludzie – 64,0%; inne – 52,7%) i typ 1 (ludzie – 26,0%; inne – 37,7%). Liczebna dominacja tych szczepów miała związek ze znaczną liczbą ognisk zatruc pokarmowych spowodowanych przez te typy fagowe. Znakomita większość ognisk była jednorodna – te same typy fagowe określano w przypadku szczepów izolowanych od ludzi chorujących w ogniskach, jak i z żywności odpowiedzialnej za zakażenia (ciastka z kremem, lody, majonez, jaja). Wśród ognisk mieszanych przeważały ogniska spowodowane jednocześnie typem 1 i 7. Kolejne wyniki typowania bakteriofagowego szczepów

S. Enteritidis wyizolowanych w latach 1986 – 1995 [88] wykazały kontynuację występowania opisanych wyżej typów bakteriofagowych. Dominowały typy 1, 6 i 7, zarówno wśród szczepów izolowanych od ludzi z ognisk zatruc pokarmowych, sporadycznych przypadków zakażeń, jak i z innych źródeł. Nie zaobserwowano tylko rejestrowanej wcześniej liczebnej przewagi szczepów typu 7 nad szczepami typu 1.

Wyniki typowania fagowego przeprowadzonego w ramach niniejszej pracy dotyczą szczepów *S. Enteritidis* wyizolowanych w kraju od 1996 do 2007 roku, czyli w okresie wygasania trwającej w Polsce już ponad 25 lat drugiej epidemii spowodowanej tym serowarem. Do najczęściej określanych typów fagowych nadal należą typy: 1, 6 i 7. Dominują wśród izolacji od ludzi, a także z żywności, od zwierząt, z pasz, wymazów sanitarnych i innych źródeł. Zdecydowanie przeważały szczepy typu 7. Szczepy *S. Enteritidis* typu 1 izolowano prawie w takich samych ilościach jak typu 6. Zaobserwowano również nieco większą liczbę szczepów prezentujących typ fagowy 3 w porównaniu do poprzednich przedziałów czasowych. Niepokoić może fakt, tak niewielkiej liczby szczepów otrzymywanych do typowania bakteriofagowego. W okresie od 1996 do 2007 roku zarejestrowano w Polsce łącznie ponad 320 tys. przypadków zakażeń *S. Enteritidis* tylko u ludzi, z których znakomita większość pochodziła z ognisk zatruc pokarmowych. Ilość szczepów wyizolowanych od osób, które krajowe laboratoria zdecydowały poddać typowaniu bakteriofagowemu stanowi zaledwie 0,16% powyższej liczby. Uwzględniając nawet fakt możliwości typowania tylko wybranych, przedstawicielskich szczepów pochodzących z ognisk zatruc pokarmowych, jest to jednak ciągle zbyt mało, przy tak znacznej skali tego problemu i mało, by móc opierać na nich daleko idące prognozy. Niemniej jednak trudno jest nie zauważyć, że przy egzystujących ciągle jeszcze w środowisku tych samych, „stałych” typach bakteriofagowych, zaczynają pojawiać się zupełnie nowe: typ 24, 25, 26 i 27. Izolowano je w niewielkiej liczbie przypadków, przede wszystkim od ludzi. Wprawdzie mogą one być wynikiem jednorazowych izolacji, ale mogą również sugerować pojawienie się nowych, nieznanych jeszcze źródeł zakażeń, co przy skutecznym zwalczaniu obecnie istniejących jest bardzo prawdopodobne. Na przykład obecność w naszym kraju typu 16 w materiałach pochodzenia zwierzęcego zarejestrowała po raz pierwszy Lalko w latach 1970 – 1975 [221]. Pierwszej izolacji tego typu bakteriofagowego od ludzi dokonano w latach 1986 – 1995 z mieszanego ogniska zatrucia pokarmowego [88]. Izolowano go również od ludzi w ciągu kolejnych trzynastu lat, co wykazała autorka niniejszej pracy.

W podsumowaniu przedstawionych wyników prowadzonego w Polsce już od wielu lat typowania bakteriofagowego pałeczek *S. Enteritidis* można stwierdzić, że zakażenia spowodowane tym serowarem, które wystąpiły w naszym kraju w czasie ostatnich pięćdziesięciu lat spowodowały dwie groźne epidemie. Pierwsza z nich była wprawdzie mniejsza liczebnie, ale spowodowała ciężkie schorzenia i śmierć wielu dzieci. Druga natomiast, o łagodniejszym przebiegu i znacznie wydłużona w czasie, objęła wielokrotnie większą liczbę osób i praktycznie trwa do dzisiaj. Obserwowana w ostatnich latach

tendencja spadkowa udziału zachorowań wywołanych tym serowarem w ogólnej liczbie zachorowań na salmonelozę w Polsce napawa optymizmem i rokuje na całkowite wygaśnięcie tej epidemii. Wyniki typowania bakteriofagowego wskazują na pewne powiązanie obydwu epidemii przede wszystkim poprzez obecność pałeczek *S. Enteritidis* typu 7. Izolowane dawniej w stosunkowo niewielkim procencie (18,0%) wyłącznie od ludzi, zdominowały większość źródeł zakażeń (52,7% – 28,9%) związanych z drugą epidemią, uzyskując również przewagę u ludzi (64,1% – 33,5%). Wśród szczepów *S. Enteritidis* badanych od 1981 roku nie stwierdzono występowania typu 2. Typy 5 i 12 prezentowane były wyłącznie przez pojedyncze egzemplarze szczepów. Zarejestrowano tylko niewielką liczbę szczepów typu 8, dominującego w latach 1970 – 1975. Oprócz typu 7 swoją dominację w latach 1981 – 2007 zaznaczyły również typy 1 i 6. Zaobserwowane zmiany w dystrybucji typów bakteriofagowych świadczą o prawie całkowitej zmianie źródeł i mechanizmów szerzenia się zakażeń związanych z drugą epidemią *S. Enteritidis* w Polsce. W ciągu 27 lat trwania tej epidemii dominującymi typami fagowymi *S. Enteritidis* były typy 1, 6 i 7 (według Lalko i wsp.), z najliczniej izolowanymi szczepami typu 7. W Europie dominującym typem bakteriofagowym u ludzi jest nadal PT4 (według schematu Ward i wsp.) [112]. Zaobserwowano również pojawienie się nowych typów bakteriofagowych, które do tej pory nie występowały wśród typów najliczniej izolowanych od ludzi – PT12 i PT1b. Pałeczki *S. Enteritidis* PT4 przeważają również wśród izolacji pochodzących z mięsa drobiowego i od zwierząt gospodarskich.

Białka szoku termicznego, stanowiące stary filogenetycznie system ochrony komórki, są kojarzone z patogenezą niektórych chorób ze względu na zjawisko mimikry antygenowej. Białka Hsp charakteryzuje znaczna homologia struktury między gatunkami. Powstające w reakcji odpornościowej przeciwciała, skierowane przeciwko antygenom powierzchniowym różnych patogenów, reagują z analogicznymi molekułami Hsp.

Część bakteryjnych białek szoku termicznego jest zarazem antygenem powierzchniowym, przeciwko którym są wytwarzane przeciwciała w procesie odpowiedzi immunologicznej. Wśród nich białka klasy GroEL, należące do rodziny białek o masie cząsteczkowej 60 kDa. Z uwagi na duży konserwatyzm struktury tych protein istnieje możliwość wystąpienia immunologicznych reakcji krzyżowych między bakteryjnymi białkami szoku cieplnego a ich ludzkim homologiem. W ten sposób jeden ze starszych mechanizmów ochrony komórki przed niekorzystnymi warunkami środowiska staje się przyczyną inicjacji procesu (auto)immunologicznego. Białka szoku termicznego zajmują w tym procesie centralną pozycję jako cel krzyżowej reakcji odpornościowej z antygenami często występujących patogenów. Stanowią one wdzięczny obiekt prowadzonych od wielu lat badań [38, 108, 123, 127, 154, 299, 376, 402, 412].

Metody stosowane przy izolacji i oczyszczaniu białek, w tym białek szoku termicznego [97, 201, 271, 315], są różnorodne, a ich wybór zależy od właściwości danego białka. Oczyszczanie poszczególnych białek z mieszaniny jest ważnym zagadnieniem w

biochemii białek. Chociaż w przypadku uzyskiwania czystych białek na skalę preparatywną preferowane są techniki chromatograficzne, elektroforeza preparatywna w żelu poliakrylamidowym jest również stosowana z dużym powodzeniem. Wśród różnych sposobów rozdzielania peptydów i białek dominujące znaczenie identyfikacyjne i analityczne posiadają metody elektroforetyczne. Są one bardzo efektywne pod względem rozdzielczości, selektywności, szybkości, jak i relatywnie łagodnych warunków działania. Są użyteczne zarówno dla białek hydrofilowych, jak i hydrofobowych. Elektroforeza w połączeniu z techniką blottingu jest obecnie powszechnie stosowana w identyfikacji białek.

Wykorzystując doskonałą rozdzielczość elektroforezy poliakrylamidowej w obecności siarczanu dodecyłu, przekształcono tę metodę z wyłącznie analitycznej, na metodę preparatywną [159]. Elucję preparatywną białka można przeprowadzić bezpośrednio z żelu, poprzez wycięcie fragmentów zawierających białkowe prążki, rozdrobnienie ich i zalanie odpowiednim buforem wymywającym (metoda dyfuzyjna). Pomimo wielkiego zróżnicowania metod elucji z żelu, żadna z nich nie jest doskonała. Niektóre z nich wymagają olbrzymiego nakładu pracy, inne prowadzą do dużych strat białka lub uzyskania białka bardzo zanieczyszczonego. Ograniczenia elucji białka bezpośrednio z żelu związane są z elastycznością żelu preparatywnego, a także trudnością wycięcia prążka białkowego ze złożonej mieszaniny. Wycięty kawałek żelu może zawierać nie tylko właściwe białko, ale również białka znajdujące się w sąsiednich prążkach. Aby ominąć wyżej wymienione ograniczenia elucji bezpośrednio z żelu stosuje się inną metodę. Białko znajdujące się w żelu może zostać z niego usunięte poprzez przyłożenie pola elektrycznego i przeniesione na inny nośnik – nitrocelulozę lub błonę PVDF, wykonaną z polifluorku wynilidenu o nazwie handlowej Immobilon. Wiązanie białek z nitrocelulozą jest jednak bardzo silne, a stosowane czynniki eluujące częściowo lub całkowicie rozpuszczają membranę. Elucja preparatywna białka z Immobilonu przy zastosowaniu odpowiednich buforów jest znacznie łatwiejsza niż z żelu, a warunki elucji białek znacznie łagodniejsze niż z nitrocelulozy. Elucja z tej membrany jest prawie niezależna od masy cząsteczkowej białka i pozwala odzyskać 70 – 90% białka naniesionego na żel, a uzyskany eluat zawierający białko może być użyty bezpośrednio do szczepienia zwierząt [359].

Dobór odpowiedniej techniki rozdzielania potrzebnych peptydów i białek od zanieczyszczeń, a następnie optymalnych warunków wyodrębnienia, stanowi z reguły trudny problem separacyjny. Poszukiwanie odpowiednich, wydajnych metod izolacji i oczyszczania białek jest w pełni uzasadnione. W oparciu o znane techniki, opracowano w naszym laboratorium własną metodę izolacji i oczyszczania endogennego białka Hsp60 *S. Enteritidis*, którą po raz pierwszy zaprezentowano w 2000 roku na Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Infectious Immunity & Vaccines” [409]. Przedstawiona szczegółowo w niniejszej pracy metoda izolacji i oczyszczania białka Hsp60 bakterii *S. Enteritidis* daje bardzo dobre rezultaty. Pozwoliła na otrzymanie z pełnego preparatu *S. Ente-*

ritidis, uzyskanego za pomocą buforu lizującego Laemmli i sonifikacji, czystego białka o masie cząsteczkowej 58,88 kDa. Komórki bakteryjne poddawano lizie, po czym rozbijano osłony komórkowe (ścianę komórkową oraz błony) i degradowano DNA działaniem ultradźwięków. Stosując wirowanie zbierano odpowiednie frakcje i zawarte w nich białko oczyszczano do stanu homogenności poprzez dwustopniowe wysalanie nasyconym roztworem siarczanu amonu (o końcowym stopniu nasycenia odpowiednio 20 i 35%), chromatografię kolumnową, elektroforezę w żelu poliakrylamidowym, elektrotransfer i elucję preparatywną z membrany Immobilon-P niejonowym detergentem Triton X-100 w stężeniu 1% w buforze Tris-HCl o pH 9,5. Poszczególne etapy izolacji kontrolowano techniką SDS-PAGE i Western blotting. Oczyszczone do homogenności białko Hsp60 *S. Enteritidis* migrowało w żelu poliakrylamidowym z SDS zgodnie z przewidywaną masą cząsteczkową, którą oszacowano porównując jego ruchliwość elektroforetyczną z ruchliwością wzorców masy cząsteczkowej (205, 116, 97, 84, 66, 55, 45 i 36 kDa) w oparciu o krzywą wzorcową liniowej zależności \log_{10} masy białek wzorcowych i odległości, na którą nastąpiła ich migracja w żelu. Białko to zostało wykorzystane jako antygen do otrzymania króliczych przeciwciał poliklonalnych. Przeprowadzone wcześniej przez Dera-Tomaszewską i wsp. [90] badania z zastosowaniem białka Hsp60 tych bakterii wykazały, iż jest ono silnie immunogenne. Wywołuje znaczną odpowiedź immunologiczną gospodarza, porównywalną z odpowiedzią na LPS i flagelinę – antygeny pełniące znamienne rolę w zakażeniach bakteriami *Salmonella*. Uzyskane białko posłużyło również do przeprowadzenia testów immunodetekcyjnych pozwalających na wykazanie podobieństwa immunologicznego pomiędzy białkiem Hsp60 pałeczek *S. Enteritidis* i ludzkim białkiem Hsp60.

Stosując metodę ELISA autorka niniejszej pracy wykazała, że przeciwciała poliklonalne anty-Hsp60 *S. Enteritidis* rozpoznają ludzkie białko Hsp60 i jeden z jego siedmiu syntetycznych fragmentów wykorzystanych do przeprowadzenia badań. Zahamowanie reakcji immunoenzymatycznej poprzez absorpcję surowicy anty-Hsp60 *S. Enteritidis* odpowiednio białkiem Hsp60 *S. Enteritidis*, peptydem Hsp60 (409 – 424) i ludzkim białkiem Hsp60 pozwoliło na wykazanie swoistości reakcji wiązania ludzkiego białka Hsp60 i jego syntetycznego fragmentu (409 – 424) przez przeciwciała anty-Hsp60 *S. Enteritidis* zawarte w surowicy króliczej. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają fakt istnienia homologii pomiędzy białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* i ludzkim białkiem Hsp60. Badania wykazały, że jedna ze wspólnych determinant antygenowych dla tych białek zawarta jest w zakresie sekwencji aminokwasowej wyznaczonej przez syntetyczny peptyd Hsp60 (409 – 424): Thr-Ser-Asp-Val-Glu-Val-Asn-Glu-Lys-Lys-Asp-Arg-Val-Thr-Asp-Ala. W zakresie tej samej sekwencji aminokwasowej, inni autorzy [411] wykazali podobieństwo immunologiczne pomiędzy ludzkim Hsp60 i Hsp65 *Mycobacterium bovis*, co pośrednio sugeruje immunologiczne podobieństwo między białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* i mykobakteryjnym Hsp65. Podejrzewa się, że rodzina białek Hsp60/65 może odgrywać niekorzystną rolę w patofizjologii miażdżycy, w tym

również choroby niedokrwiennej serca [170, 399, 400, 412]. Przeciwciała anty-Hsp60/65 są zdolne do uszkodzenia komórek śródbłonka naczyniowego, na które działał czynnik stresowy (zwiększający ekspresję endogennego białka Hsp60 na powierzchni endotelium), nie mając jednocześnie powinowactwa do śródbłonka znajdującego się w obszarach nienarażonych na destrukcję [170]. Hipotezę uszkodzenia śródbłonka przez przeciwciała anty-Hsp60/65 potwierdził również Mayr [253], który wraz z zespołem badawczym wykazał cytotoksyczność tych przeciwciał wobec komórek śródbłonka. Surowice pacjentów z dusznicą niestabilną i ostrym zawałem serca zostały użyte przez Wysockiego i wsp. [411] do oznaczania poziomu przeciwciał specyficznych dla ludzkiego białka Hsp60 i mykobakteryjnego Hsp65 oraz ich peptydowych fragmentów. Wszystkie próbki surowic pochodzące od osobników grupy kontrolnej zawierały niskie poziomy przeciwciał dla Hsp60, podczas gdy znacząco wyższe poziomy immunoglobulin dla tego białka stwierdzono u pacjentów z dusznicą niestabilną oraz u chorych z zawałem serca. Podobne wyniki uzyskano badając odpowiedź immunologiczną w stosunku do mykobakteryjnego białka Hsp65. Stężenia przeciwciał specyficznych dla białek Hsp60/65 w surowicach osób z dusznicą bolesną i zawałem serca nie odbiegały znacząco od siebie. Wysocki i wsp., [411] udowodnili również, iż te same surowice osób chorych z dusznicą niestabilną i zawałem serca wykazywały reakcje znacząco wyższe dla peptydu (409 – 424) ludzkiego białka Hsp60 w stosunku do wartości uzyskanych dla innych fragmentów tego białka, sugerując tym samym, że sekwencja Thr⁴⁰⁹ – Ala⁴²⁴ stanowić może determinantę antygenową białka Hsp60 indukującą wytwarzanie auto-przeciwciał odpowiedzialnych za powstawanie zmian miażdżycowych. To właśnie w zakresie tej sekwencji, autorka niniejszej pracy wykazała podobieństwo pomiędzy białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* i jego ludzkim odpowiednikiem. Powyższe rozważania mogą stanowić istotne założenie wartej zainteresowania hipotezy, która pozwoliłaby odpowiedzieć na kilka interesujących pytań. Na przykład, czy białko Hsp60 pałeczek *S. Enteritidis* może mieć związek ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia klinicznie objawowej choroby niedokrwiennej serca? Czy pałeczki *S. Enteritidis* mogą brać udział w autoimmunizacyjnej indukcji tej choroby obok innych bakterii, na przykład takich jak *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Chlamydomphila pneumoniae* (dawniej *Chlamydia pneumoniae*) i innych, dla których już wykazano [62, 194, 253, 299, 316] posiadanie takich możliwości?

W wyniku immunizacji myszy rekombinowanym, ludzkim białkiem Hsp60, Boog i wsp. [34] uzyskali dwa przeciwciała monoklonalne LK1 i LK2, rozpoznające epitopy zlokalizowane w rejonie wyznaczonym przez reszty aminokwasowe 383 – 447 cząsteczki tego białka. Przeciwciało LK1 reagowało wyłącznie z ludzkim Hsp60. Drugie natomiast rozpoznawało zarówno ludzkie białko, jak i białka Hsp60 bakterii *Treponema innocens*, *Treponema hyodysenteriae*, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* oraz rekombinowane, mykobakteryjne (*Mycobacterium bovis*) białko Hsp65, co świadczy o istnieniu wspólnych epitopów pomiędzy białkami GroEL tych

bakterii i ich ludzkim odpowiednikiem. Dodatkowe testy wykonane przez Boog i wsp. [34] z zastosowaniem różnych mutantów delecyjnych w zakresie syntezy białka Hsp60, pozwoliły na dokładniejsze zlokalizowanie epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała LK2. Miejsce wiązania tego przeciwciała z ludzkim Hsp60 zostało wyznaczone przez reszty aminokwasów w rejonie 383 – 419. Dokładnie w obrębie tej sekwencji, według Boog i wsp. [34], znajduje się wspólny epitop dla Hsp60 wyżej wspomnianych bakterii i ludzkiego białka. Udowodnione przez autorkę niniejszej pracy, molekularne podobieństwo pomiędzy białkiem Hsp60 pałeczek *S. Enteritidis* i jego ludzkim homologiem, zostało określone w zakresie sekwencji aminokwasowej (reszty 409 – 424) zawierającej się częściowo również w tym rejonie.

Ludzkie białko Hsp60, wykazujące w sekwencji około 50% homologii z Hsp60 *E. coli* (GroEL), posiada strukturę trochę odmienną od białka GroEL. Ludzkie Hsp60, znajdujące się w mitochondrium (eksponowane również na powierzchni wielu komórek), funkcjonuje jako pojedynczy pierścień zbudowany z siedmiu podjednostek [229, 279, 384], posiadający po trzy reszty cysteiny (Cys²³⁷, Cys⁴⁴², Cys⁴⁴⁷) w każdej z nich, których nie zaobserwowano w białku GroEL [272]. Jedną z tych reszt – Cys⁴⁴², zlokalizowana jest blisko miejsca wiązania ATP. Powołując się na zaproponowany przez Nagumo i wsp. [272] model prawdopodobnej struktury pojedynczej podjednostki ludzkiego białka Hsp60 (oparty na porównaniu z GroEL i stworzony za pomocą programu Discover 3 Insight II) możemy przypuszczać, że sekwencja aminokwasowa odpowiadająca syntetycznemu peptydowi Hsp60 (409 – 424) zawiera się w domenie ekwatorialnej pojedynczej podjednostki tego białka. W przypadku białka GroEL, domena ekwatorialna stanowi największą domenę i obejmuje łącznie 243 reszty aminokwasowe (reszty: 6 – 133 i 409 – 523) [37]. Charakteryzuje ją uporządkowana struktura, w której zawiera się miejsce wiązania nukleotydu. Uczestniczy ona również w łączeniu się podjednostek w funkcjonalny kompleks [37, 397]. Być może właśnie ta część białek Hsp60 podlegała najmniejszym zmianom ewolucyjnym, zachowując epitopy wspólne dla białek bakteryjnych i ludzkiego białka.

Przypuszcza się, że białko DnaJ (Hsp40) *E. coli* może być zaangażowane w wywoływanie lub rozwój reumatoidalnego zapalenia stawów na zasadzie reakcji autoimmunologicznej [5]. Tak więc infekcja bakteryjna prowadząca do wytworzenia odpowiedzi immunologicznej anty-DnaJ może być jednym z czynników wywołujących tę chorobę. Przeprowadzone przez autorkę niniejszej pracy wstępne badania białka Hsp60 *S. Enteritidis* w teście ELISA z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anty-DnaJ: AC11, BB3, CC5, CC8, DC7, EE11, szczegółowo opisanych w pracy Krzewskiego i wsp. [214] wykazały, że jest ono rozpoznawane przez niektóre z nich (wyniki nie są prezentowane w tej pracy). Dodatkowo reakcje z białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* uzyskano dla przeciwciał CC5, CC8, DC7 oraz EE11, rozpoznających epitopy zlokalizowane w części C-terminalnej białka DnaJ, za aminokwasem 200. Wskazuje to na istnienie wspólnych epitopów dla białka Hsp40 *E. coli* i Hsp60 *S. Enteritidis* świadczących o immunologicz-

nym podobieństwie również tych białek, sugerując jednocześnie potencjalne możliwości wywoływania reumatoidalnego zapalenia stawów przez białko Hsp60 pałeczek *S. Enteritidis*.

Z kolei inni autorzy [167], za wywoływanie lub rozwój reumatoidalnego zapalenia stawów obarczają białko GroEL. Wyniki uzyskane przez Hirata i wsp. [167], wskazują na istotną rolę bakterii jelitowych w indukcji i/lub rozwoju chorób autoimmunologicznych reprezentowanych przez reumatoidalne zapalenie stawów. Wykazali oni, iż podwyższony poziom przeciwciał anti-Hsp60 u pacjentów z różnymi zaburzeniami ze strony tkanki łącznej, w tym z reumatoidalnym zapaleniem stawów, jest raczej wynikiem zakażenia bakteriami jelitowymi (takimi jak *Escherichia coli*) mogącymi wywoływać tę chorobę na drodze autoimmunologicznej, niż zakażenia innymi drobnoustrojami. Reakcję dodatnią tych przeciwciał z mykobakteryjnym Hsp65 (*Mycobacterium tuberculosis*), zdecydowanie słabszą niż z GroEL, tłumaczą mimikrą antygenową obu drobnoustrojów. Autorka niniejszej pracy, stosując białko GroEL i przeciwciała monoklonalne anti-GroEL do celów identyfikacyjnych białka Hsp60 *S. Enteritidis*, pośrednio wykazała również podobieństwo immunologiczne pomiędzy tymi białkami. Przeciwciała monoklonalne anti-GroEL i poliklonalne przeciwciała królicze anti-Hsp60 *S. Enteritidis* reagowały w teście immunoblotingu zarówno z białkiem GroEL, jak i Hsp60 *S. Enteritidis*. Powyższe rozważania po raz kolejny wskazują na istnienie potencjalnych możliwości wywoływania i/lub utrwalania reumatoidalnego zapalenia stawów przez białko Hsp60 *S. Enteritidis* na drodze odpowiedzi immunologicznej.

Zakażenie bakteriami organizmu gospodarza może powodować ostrą infekcję lub nieostre zakażenie chroniczne, ale wiadomo także, że skutki przebytych zakażeń uznanych za wyleczone, mogą ujawniać się dużo później. Istnieje przekonanie, że u podłoża niektórych chorób o nieznaną dotąd etiologię leżą przebyte wcześniej zakażenia bakteryjne [166, 167, 416, 417]. Dzięki tolerancji immunologicznej nie ma destrukcyjnego działania na własne antygeny, ale też obecna na powierzchni bakterii cząsteczka o strukturze podobnej do cząsteczki gospodarza, nie wywołuje natychmiastowej odpowiedzi immunologicznej. Dopiero przerwanie tolerancji na antygen gospodarza w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia jego tkanek. W ten sposób odpowiedź na antygen bakteryjny może powodować reaktywność autoimmunologiczną i nawet łagodną w przebiegu zakażenia może prowadzić do rozwoju reaktywności krzyżowej, a w konsekwencji do choroby autoimmunologicznej [209, 420]. Mimikra cząsteczkowa ma bardzo istotne znaczenie, dlatego też prowadzi się analizy antygenów bakteryjnych pod kątem ich podobieństwa do antygenów gospodarza. Wykazanie mimikry danego antygeny czy cząsteczki jest uwarunkowane odpowiednią metodologią, pozwalającą na określenie rodzaju mimikry czy to strukturalnej, epitopowej inaczej serologicznej, czy też funkcyjnej. Metody zastosowane w badaniach wykonanych przez autorkę i przedstawionych w ramach niniejszej pracy pozwoliły jednoznacznie określić, że białko Hsp60 pałeczek *Salmonella Enteritidis* spełnia warunki mimikry. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w bada-

nia nad białkami szoku termicznego i chorobotwórczością pałeczek *Salmonella*. Wyizolowane białko Hsp60 *S. Enteritidis* o masie cząsteczkowej 58,88 kDa wykazując podobieństwo do ludzkiego białka Hsp60 może być brane pod uwagę jako marker do celów diagnostycznych, podobnie jak przeciwciała anty-Hsp60 *S. Enteritidis*. Nie może jednak być użyte do szczepionki dla ludzi. Istnienie w białku bakteryjnym epitopów podobnych strukturalnie do antygenów gospodarza, może indukować przeciwciała przeciw własnym strukturom białkowym. Oznacza to, że białko Hsp60 *S. Enteritidis* może potencjalnie wzbudzać autoprzeciwciała i jako szczepionka dla ludzi nie jest bezpieczne. Przy konstruowaniu szczepionek, czy leków należy unikać indukcji autoprzeciwciał, niezależnie czy białko ma pełnić rolę antygeny czy nośnika. Autoimmunizacja dotyczyć może nie tylko odpowiedzi humoralnej, lecz poprzez oddziaływanie autoreaktywnych limfocytów T z epitopami antygenów gospodarza, angażować także odporność komórkową, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia tkanek [208]. Należałoby jednak rozważyć możliwość wykorzystania tego białka na przykład do celów diagnostycznych w monitorowaniu zakażeń drobiu [90], do produkcji szczepionek dla drobiu, jak również możliwość zastosowania przeciwciał anty-Hsp60 *S. Enteritidis* (pozyskiwanych na przykład z żółtek jaj kur naturalnie zakażonych *S. Enteritidis*) do pasywnej immunizacji drobiu chroniącej przewód pokarmowy przed kolonizacją, a w konsekwencji i przed zakażeniem pałeczkami *S. Enteritidis*.

Jak widać białka szoku termicznego stanowią wysoce konserwatywną grupę białek. Pomimo trwającego miliony lat procesu ewolucji wykazują dużą homologię zarówno w sekwencji aminokwasowej, budowie i funkcji. Z uwagi na znaczne podobieństwo białek szoku termicznego mikroorganizmów i człowieka można sądzić, że układ odpornościowy stale zmuszany jest do wykrywania niewielkich różnic pomiędzy własnymi białkami stresowymi a białkami mikroorganizmów powodujących zakażenie. Koncepcja, według której białka szoku termicznego zajmują wyjątkową pozycję zmuszając układ odpornościowy do balansowania na granicy tolerancji wobec infekującego organizmu z groźbą autoimmunizacji, jest ogromnie interesująca i wywołuje nie kończące się spory między badaczami [154, 168, 196, 420].

6. WNIOSKI

1. Pojawiające się coraz liczniej serowary *Salmonella*, których dotychczas nie izolowano w naszym kraju, stanowią potencjalne zagrożenie zwłaszcza dla zdrowia ludzi, tym bardziej, że nie znana jest nam w pełni ich epidemiologia i możliwości chorobotwórcze. Szczególnie niepokojący jest fakt, iż zakażenia te dotyczą również bardzo małych dzieci, głównie niemowląt. Każdy serowar stanowi potencjalne zagrożenie epidemiczne i w każdej chwili może stać się przyczyną epidemii. Dlatego powinno podejmować się wszelkie możliwe starania, aby ciągle monitorować występowanie pałeczek *Salmonella* i dystrybucję serowarów, nie tylko najczęściej występujących, ale również wszystkich pozostałych oraz kontrolować ich źródła i zakażenia przez nie wywoływane. Wyniki badań uzyskane w ramach niniejszej pracy stanowią znaczący wkład w te działania.
2. Niepokoić może fakt powodowania salmonelozy u ludzi w Polsce przez serowary należące do innych podgatunków niż *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, między innymi z podgatunku *salamae*, *diarizonae* i *houtenae*. Można podejrzewać, iż udział takich pałeczek *Salmonella* w powodowaniu zakażeń u ludzi w naszym kraju stanowić może znacznie poważniejszy problem. Stosowanie w oficjalnych procedurach diagnostycznych wyłącznie tradycyjnych podłoży do izolacji bakterii *Salmonella* może być przyczyną niedostrzeżenia ich obecności w badanym materiale.
3. W wyniku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy „odkryto” serowar *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (48:k:z₅₇), który do tej pory nie występował nigdzie na świecie. Jest on zupełnie nowym, nie znanym jeszcze wariantem serologicznym, prezentującym formułę antygenową, która dotychczas nie występowała w schemacie White’a-Kauffmanna-Le Minora. Ten trzeci już serowar „odkryty” w naszym kraju (po *S. Gdansk* i *S. Lodz*), zostanie uwzględniony w kolejnej, dziesiątej edycji schematu White’a-Kauffmanna-Le Minora.
4. Opracowany w ramach niniejszej pracy, szczegółowy wykaz zawierający wzory antygenowe wszystkich serowarów *Salmonella* rozpoznanych do tej pory w Polsce, jest dokumentem referencyjnym, przeznaczonym do celów identyfikacyjnych. Może stanowić istotną pomoc w pracy dla wszystkich laboratoriów zajmujących się diagnostyką serologiczną pałeczek *Salmonella* w kraju. Stanowi on również cenne i unikalne w skali kraju źródło danych umożliwiające pogłębienie wiedzy w zakresie epidemiologii pałeczek z rodzaju *Salmonella* występujących w Polsce w ciągu ostatniego półwiecza.

5. Chociaż wyniki badań referencyjnych prowadzonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella*, nie dotyczą wszystkich szczepów *Salmonella* izolowanych w całej Polsce, pozwalają jednak wstępnie oszacować sytuację epidemiologiczną w naszym kraju, śledzić pojawianie się nowych serowarów i typów bakteriofagowych *Salmonella* oraz odpowiedzieć na pytanie, które serowary *Salmonella* sprawiają największe trudności diagnostyczne polskim laboratoriom.
6. Przeprowadzone w pracy analizy epidemiologicznych wskaźników zakażeń bakteriami *Salmonella* u ludzi w Polsce w latach 1995 – 2007 wykazały, że obserwowany ogólny spadek zakażeń *Salmonella* ma związek ze zmniejszającą się liczbą zakażeń spowodowanych przez *S. Enteritidis*, chociaż serowar ten jeszcze ciągle ponosi odpowiedzialność za znaczącą liczbę infekcji u ludzi wywołanych pałeczkami *S. enterica*. *Salmonella* Enteritidis pozostaje epidemicznym „numerem jeden” wśród pałeczek *Salmonella* izolowanych od ludzi w naszym kraju, przy jednocześnie zmieniającej się dystrybucji pozostałych serowarów.
7. Analiza statystyczna trendu współczynników zakażeń *Salmonella* (wyrażonych liczbą potwierdzonych przypadków/100 tys. mieszkańców) u ludzi w Polsce w latach 1995 – 2007, wykazała statystycznie istotną tendencję spadkową dla zakażeń *Salmonella* ogółem i dla zakażeń spowodowanych przez pałeczki *S. Enteritidis*. Równocześnie nie stwierdzono istotnej statystycznie tendencji zmian (wzrostu bądź spadku) dla pozostałych serowarów poddanych analizie, tj. *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport*, *S. Mbandaka* i *S. Agona*. Rozkłady w czasie charakteryzujących je współczynników wykazują raczej cechy procesu błędzenia losowego.
8. Przedstawione w pracy wyniki typowania bakteriofagowego dostarczają unikalnych w skali kraju danych epidemiologicznych, dotyczących dystrybucji typów bakteriofagowych *S. Enteritidis* występujących w Polsce. Przeprowadzone badania z zastosowaniem metody typowania bakteriofagowego wykazały, iż przy egzystujących ciągle w środowisku tych samych, „stałych” typach bakteriofagowych pałeczek *S. Enteritidis*, zaczynają pojawiać się zupełnie nowe typy. Mogą one wprawdzie być wynikiem jednorazowych izolacji, ale mogą również sugerować pojawienie się w kraju nowych, nieznanych jeszcze źródeł zakażeń, co przy skutecznym zwalczaniu obecnie istniejących jest bardzo prawdopodobne.
9. Opracowana metoda izolacji i oczyszczania endogennego białka Hsp60 *S. Enteritidis* pozwala na otrzymanie czystego białka z pełnego preparatu *S. Enteritidis*,

uzyskanego za pomocą buforu lizującego i sonifikacji. Wyizolowane białko Hsp60 *S. Enteritidis*, podobnie jak poliwalentne przeciwciała anti-Hsp60 *S. Enteritidis*, stanowią bardzo dobre narzędzie do badań porównawczych podobieństwa immunologicznego i molekularnego pomiędzy białkami szoku termicznego w testach ELISA.

10. Po raz pierwszy wykazano obecność wspólnej determinanty antygenowej pomiędzy białkiem Hsp60 bakterii *S. Enteritidis* i ludzkim białkiem Hsp60. Białko Hsp60 *S. Enteritidis* może potencjalnie wzbudzać autooprzeciwciała u ludzi. Ewentualne wystąpienie immunologicznych reakcji krzyżowych pomiędzy białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* a jego ludzkim homologiem, indukowanych w przebiegu zakażenia pałeczkami *S. Enteritidis*, może stanowić istotną komponentę w procesach patogenetycznych innych chorób. Uzyskane wyniki stanowią ważny wkład w badania nad białkami szoku termicznego i chorobotwórczością pałeczek *S. Enteritidis*.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Adams, M. H. Methods of study of bacterial viruses. W: Bacteriophages, New York, M. H. Adams, Interscience Publishers, INC., 1959, str. 443-522.
2. Acharya, I. L., Lowe, C. U., Thapa, R., Gurubacharya, V. L., Shrestha, M. B., Cadoz, M., Schultz, D., Armand, J., Bryla, D. A., Trollfors, B., Cramton, T., Schneerson, R., Robbins, J. B. (1987) Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. N. Engl. J. Med. 317:1101-1104.
3. Ahmer, B., Tran, M., Heffron, F. (1999) The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. J. Bacteriol. 181:1364-1368.
4. Aissa, R. B., Al-Galla, N. (2008) Molecular typing of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Corvallis, Anatum and Typhimurium from food and human stool samples in Tunisia, 2001-2004. Epidemiol. Infect. 136:468-475.
5. Albani, S., Carson, D. A. (1996) A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Immunol. Today 17:466-470.
6. Anderson, E. S., Williams, R. E. O. (1956) Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. J. Clin. Path. 9:94-114.
7. Anderson, E. S. Use of phages in epidemiological studies. W: Bacteriophages, New York, M. H. Adams, Interscience Publishers, INC., 1959, str. 395-420.
8. Anderson, E. S. The phage typing of Salmonellae other than S.typhi. W: The world problem of Salmonellosis, The Hague, E. van Oye, Dr W. Junk Publishers, 1964, str. 89-110.
9. Anderson, G. G., Lee, Y. M., Smith, C. L., Hultgren, S. J. Mechanisms of bacterial adhesion and consequences of attachment. W: Molecular paradigms of infectious diseases. A bacterial perspective, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 207-246.
10. Andrews-Polymeris, H. L., Bäuml, A. J., McCormick, B. A., Fang, F. C. (2010) Taming the Elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis and prevention. Infect. Immun. 78:2356-2369.
11. Anjum, M. F. Revealing the mosaic nature of *Salmonella* genomes using microarrays. W: *Salmonella*. Molecular biology and pathogenesis, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskell, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 169-190.
12. Anusz, Z. (1979) Zakażenia szpitalne wywołane przez pałeczki *Salmonella* w Polsce w latach 1972-1977. Przegl. Epidemiol. 1:9-27.
13. Anusz, Z. Epidemiologia zakażeń szpitalnych wywołanych przez pałeczki *Salmonella* w Polsce w 1978 roku. Materiały naukowe XIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego, Szczecin 306.IX.1979, doniesienie nr 32:22.

14. Anusz, Z. (1980) Salmonellozy u ludzi i zwierząt w Polsce w latach 1971 – 1978. *Medycyna Wet.* 36:265-267.
15. Anusz, Z. Salmonellozy. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Zapobieganie i zwalczanie, wyd. 3, Kraków, pod red. W. Magdzika, Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne „Vesalius”, 1993, str. 316-322.
16. Anusz, Z. Podstawy epidemiologii i kliniki chorób zakaźnych. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1998, str. 183-192.
17. Astill, D. S., Manning, P. A., Hauzenroeder, M. W. (1993) Characterization of the small cryptic plasmid, pIMVS1, of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. *Plasmid.* 30:258-267.
18. Azze, R. F. O., Rodriguez, J. C. M., Iniesta, M. G., Mrchena, X. R. F., Alfonso, V. M. R., Padrón, F. T. S. (2003) Immunogenicity of a new *Salmonella* Typhi Vi polysaccharide vaccine – vax-TyVi® – in Cuban school children and teenagers. *Vaccine.* 21:2758-2760.
19. Balicki, A., Makać, W. Metody wnioskowania statystycznego, Gdańsk, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, 2007, str. 220-238.
20. Bannister, B., Gillespie, S., Jones, J. (I) Gastrointestinal infections and food poisoning. W: *Infection. Microbiology and Management*, wyd. 3, Oxford UK, B. Bannister, S. Gillespie, J. Janes, Blackwell Publishing, 2006, str. 167-193.
21. Bannister, B., Gillespie, S., Jones, J. (II) Laboratory techniques in the diagnosis of infection. W: *Infection. Microbiology and Management*, wyd. 3, Oxford UK, B. Bannister, S. Gillespie, J. Janes, Blackwell Publishing, 2006, str. 38-52.
22. Baron, L. S., Carey, W. F., Spilman, W. M. (1959) Characteristics of a high frequency of recombinantion (Hfr) strains of *Salmonella typhosa* compatible with *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia* species. *Proc. N. A. S.* 45:1752-1757.
23. Barrow, P. A. Serological diagnosis of *Salmonella* by ELISA and other tests. W: *Salmonella in Domestic animals*, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 407-427.
24. Barrow, P. A., Wallis, T. S. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. W: *Salmonella in Domestic animals*, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 323-339.
25. Bartkowiak, J. (2003) Badania molekularne w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych. *Przegl. Epidemiol.* 57:381-389.
26. Baumann, A., Sadkowska-Todys, M. (2007) Zatrucia i zakażenia pokarmowe w Polsce w 2005 roku. *Przegl. Epidemiol.* 61:257-266.
27. Baumann, A., Sadkowska-Todys, M. (2008) Zatrucia i zakażenia pokarmowe w Polsce w 2006 roku. *Przegl. Epidemiol.* 62:275-286.

28. Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S., Heffron, F. (1996) The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect. Immun.* 64:61-68.
29. Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Heffron, F. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. W: *Salmonella* in Domestic animals, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 57-72.
30. Bennett, G. (1993) Cockroaches as carriers of bacteria. *Lancet.* 341:732.
31. Besser, J., Beebe, J., Swaminathan, B. Investigation of foodborne and waterborne disease outbreaks. W: *Manual of clinical microbiology*, wyd. 8, USA, P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, ASM Press Washington, C.D., 2003, str. 162-181.
32. Binek, M. (2008) Interakcje pomiędzy pałeczkami *Salmonella* i komórkami gospodarza, implikacje terapeutyczne. *Post. Mikrobiol.* 47:267-273.
33. Bishop, A. L., Dougan, G., Baker, S. The *Salmonella* genome: a global view. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 117-145.
34. Boog, C. J. P., de Graeff-Meeder, E. R., Lucassen, M. A., van der Zee, R., Voorhorst-Ogink, M. M., van Kooten, P. J. S., Geuze, H. J., van Eden, W. (1992) Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J. Exp. Med.* 175:1805-1810.
35. Bopp, C. A., Brenner, F. W., Fields, P. I., Wells, J. G., Strockbine, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. W: *Manual of clinical microbiology*, wyd. 8, Washington, D.C., P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, ASM Press, 2003, str. 654-671.
36. Boyd, E. F., Brussow, H. (2002) Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* 10:521-529.
37. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., Sigler, Z. (1994) The crystal structure of bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371:578-586.
38. Bregier, C., Fabczak, H., Fabczak, S. (2007) Białka opiekuńcze – “Molekularne przyzwoitki” w fałdowaniu białek. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych.* 56:409-419.
39. Brocchieri, L., Karlin, S. (2000) Conservation among Hsp60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci.* 9:476-486.
40. Brumell, J. H., Tang, P., Mills, S. D., Finlay, B. B. (2001) Characterization of *Salmonella*-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between *Sal-*

- monella*-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic* 2:643-653.
41. Buczowski, Z., Lachowicz, K. (1953) Obserwacje dotyczące zmienności typów bakteriofagowych *S. typhi*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 5:297-301.
 42. Buczowski, Z. (1961) Salmonellosis of man diagnosed in the years 1946 – 1956 in Poland. *Biu. IMM.* 1/2:51-71.
 43. Buczowski, Z. *Salmonella*. W: *Enterobacteriaceae – Infectionen. Epidemiologie und Labordiagnostik*, Leipzig, J. Sedlak, H. Rische, Veb Georg Thieme, 1961, str. 57-160.
 44. Buczowski, Z. *Salmonella*. W: *Enterobacteriaceae – Infectionen. Epidemiologie und Labordiagnostik*, Leipzig, J. Sedlak, H. Rische, Veb Georg Thieme, 1968, str. 251-373.
 45. Buczowski, Z., Strzelecki, E., Pietkiewicz, K., Cader-Strzelecka, B. (1970) Zakażenia salmonelowe zwierząt w świetle badań Krajowego Ośrodka *Salmonella* w latach 1965 – 1969. Konferencja Naukowa: „Salmonelozy”, Gdańsk – Gdynia, 19 – 20. IX. 1969. Materiały naukowe Konferencji, str. 25-40.
 46. Bugla-Płoskońska, G., Futoma-Kołoch, B., Doroszkiewicz, W. (2007) Rola białek błony zewnętrznej w oddziaływaniu bakterii Gram-ujemnych z organizmem gospodarza. *Post. Mikrobiol.* 46:139-152.
 47. Burbianka, M., Pliszka, A. *Mikrobiologia żywności. Mikrobiologiczne metody badania produktów żywnościowych*, wyd. 4, Warszawa, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1977.
 48. Caffer, M. I., Eiguier, T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. (1994) *Int. J. Food Microbiol.* 21:15-19.
 49. Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., Brussow, H. (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:417-424.
 50. Cartee, R. T., Rother, J. *Capsules. W: Molecular paradigms of infectious diseases. A bacterial perspective*, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 138-175.
 51. Centers for Disease Control and Prevention. (1999) Reptile-associated salmonellosis – selected states, 1996 – 1998. *JAMA.* 282:1193-2294.
 52. Centers for Disease Control and Prevention. (2005) Salmonellosis associated with turtles – Wisconsin and Wyoming, 2004. *JAMA.* 293:1850-1853.
 53. Centers for Disease Control and Prevention. (2007) Turtle-associated salmonellosis in humans – United States, 2006 – 2007. *MMWR.* 56:649-652.
 54. Centers for Disease Control and Prevention. (2008) Multistate outbreak of human *Salmonella* infection associated with exposure to turtles, United States, 2007 – 2008. *JAMA.* 299:1892-1894.

55. Chapin, K., C., Lauderdale, T-L. Reagents, stains, and media: Bacteriology. W: Manual of clinical microbiology, wyd. 8, Washington, D.C., P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, R. H. Tenover, ASM Press, 2003, str. 354-383.
56. Chirakadze, I., Perets, A., Ahmed, R. Phage typing. W: Bacteriophages. Methods and protocols. Vol. 2, Molecular and applied aspects. New York USA, M. R. J. Clokie, A. M. Kropinski, Humana Press 2009, str. 293-305.
57. Chiu, C.-H., Tang, P., Chu, C., Hu, S., Bao, Q., Yu, J., Chou, Y.-Y., Wang, H.-S., Lee, Y.-S. (2005) The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. Nucl. Acids Res. 33:1690-1698.
58. Choi, J. I., Chung, S. W., Kang, H. S., Rhim, B. Y., Park, Y. M., Kim, U. S., Kim, S. J. (2004) Epitope mapping of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock protein and human heat-shock protein in human atherosclerosis. J. Dent. Res. 12:936-940.
59. Chomiczewski, J. (1961) Badania nad typowaniem bakteriofagowym i biochemicznym *Salmonella typhi*. Zmienność obrazu typów bakteriofagowych w środowisku endemicznym. Med. Dośw. Mikrobiol. 13:217-228.
60. Chong, Y., Kwon, O. H., Lee, S. Y., Chung, K. S., Shimada, T. (1991) *Salmonella enteric* subspecies *diarizonae* bacteremia in infants with enteritis. A case report. Yonsei Medical Journal 32:275-278.
61. Cianciara, D., Miller, M., Przewłocka, T. (2001) Zwyczaje higieniczne Polaków. Przegl. Epidemiol. 55:156-168.
62. Ciervo, A., Visca, P., Petrucca, A., Biasucci, L. M., Maseri, A., Cassone, A. (2002) Antibodies to 60-kilodalton heat shock protein and outer membrane protein 2 of *Chlamydia pneumoniae* in patients with coronary heart disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9:66-74.
63. Clegg, A., Passey, M., Omena, M., Karigifa, K. K., Suve, N. (1994) Reevaluation of the Widal agglutination test in response to the changing pattern of typhoid fever in highlands of Papua New Guinea. Acta Tropica 57:255-263
64. Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J. (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol. Rev. 29:147-487.
65. Cochran, W. G. (1954) Some methods for strengthening the common χ^2 tests. Biometrics. 10(4): 417-451.
66. Cohan, F. M. (2006) Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. Philosophical Trans. R. Soc. B. 361:1985-1996.
67. Constantine, N. T., Lana, D. Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases. W: Manual of clinical microbiology, wyd. 8, Washington D.C., P. R.

- Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, R. M. Tenover, ASM Press, 2003, str. 218-233.
68. Cooke, F. J., Wain, J. Antibiotic resistance in *Salmonella* infections. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 25-56.
69. 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: *Salmonella*. Molecular biology and pathogenesis, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskell, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 1-29.
70. Cowden, J. M., Lynch, D., Joseph, C. A. et al. (1989) Case-control study of infections with *Salmonella*-enteritidis phage type-4 in England. *BMJ*. 299:771-773.
71. Craige, J., Yen, Ch. E. (1938 a) The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparation of type II phage. *Can. Publ. Hlth. J.* 29:448-483.
72. Craige, J., Yen, Ch. E. (1938 b) The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparation of type II phage. 2. The stability and epidemiological significance of V form types of *B. typhosus*. *Can. Publ. Hlth. J.* 29:484-496.
73. Craigie, J., Felix, A. (1947) Typing of typhoid bacilli with Vi – bacteriophage. *Lancet* 1:823-827.
74. Crump, J. A., Luby, S. P., Mintz, E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull. World Health Organ.* 82:346-353.
75. Czerwiński M., Gonera E. (2005) Salmonelozy w 2003 roku. *Przegl. Epidemiol.* 59: 253-262.
76. Czerwiński, M. (2006) Salmonelozy w 2004 roku. *Przegl. Epidemiol.* 60:429-440.
77. Czerwiński, M. (2007) Salmonelozy w 2005 roku. *Przegl. Epidemiol.* 61:239-247.
78. Czerwiński, M., Czarkowski, M. P., Baumann, A. (2008) Salmonelozy w 2006 roku. *Przegl. Epidemiol.* 62:301-310.
79. Daigle, F., Graham, J. E., Curtiss III, R. (2001) Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol. Microbiol.* 41:1211-1222.
80. Daniels, E. M., Schneerson R., Egan, W. M., Szu, S. C., Robbins, J. B. (1989) Characterization of the *Salmonella paratyphi* C Vi polysaccharide. *Infect. Immun.* 57:3159-3164.
81. Darwin, K. H., Miller, V. L. (1999) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:405-428.
82. de Beaumont, C., Breuil, J., Dedocova, D., Tran, Q. Evaluation of a new chromogenic medium, CHROMagarTM Salmonella Plus for detection of *Salmonella*

- spp. including lactose positive *Salmonella*, *S. Typhi* and *S. Paratyphi*. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nicea, France, April 1 – 4, 2006. ECCMID 2006, P998.
83. Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R., Pietkiewicz, K. (1983) Surveillance of foodborne infections and intoxications, Poland 1967 – 1978. *Wkly Epidem. Rec.* 58:41-42.
 84. Dera-Tomaszewska, B. (1984) Serological types of *Salmonella* bacilli isolated from men in Poland between 1967 and 1978. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia.* 35(1/2):56-72.
 85. Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R. (1999) Zestawienie serowarów *Salmonella* występujących w Polsce. Taksonomia rodzaju *Salmonella*. Zmiany w nazewnictwie. *Przeg. Epid.* 53:355-364.
 86. Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R. (1999) Zastosowanie schematu Ward i wsp. do typowania bakteriofagowego szczepów *Salmonella* Enteritidis występujących w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 51:281-288.
 87. Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R. (1999) Serowary *Salmonella* określone w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1995 – 1997. *Przeg. Epid.* 53: 365-369.
 88. Dera-Tomaszewska, B., Głońska R. (1999) Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce w latach 1986 – 1995. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 51:73-79.
 89. Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R. (2001) Zestawienie serowarów *Salmonella* występujących w Polsce (określonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella*). Meldunek 12/A/01 PZH i GIS o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach związkami chemicznymi zgłoszonych w okresie od 1.12.do 15.12.2001 r., str. 3-5.
 90. Dera-Tomaszewska, B., Wysocki, J., Kunikowska, D., Dziadziuszko, H., Głońska, R. (2003) Hsp60 specific antibodies in egg yolks from laying hens naturally infected with *Salomonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26:37- 45.
 91. Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R. (2007) Zastosowanie metody immunoblottingu do diagnostyki duru brzuszego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 59:241-250.
 92. Dera-Tomaszewska, B., Kunikowska, D., Głońska, R. (2007) Serowary *Salmonella* występujące w Polsce, określone w Krajowym Ośrodku *Salmonella*, 1957 – 2005. Konferencja Naukowa „Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią, Gdańsk 2007”. Materiały Naukowe Konferencji, P-16, str. 53.
 93. Dera-Tomaszewska, B. (2011) Metody typowania bakterii *Salmonella*. *Med. Wet.* 67:162-167.
 94. Dera-Tomaszewska B. (2011) Na wyspach *Salmonella*. Czternaście wysp patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella*. *Post. Mikrobiol.* 50:51-58.

95. Dera-Tomaszewska B. (2011) Plazmidy i bakteriofagi występujące u bakterii *Salmonella*. Post. Mikrobiol. 50:201-208
96. Dinjus, U., Hänel, I., Rabsch, W., Helmuth, R. (1998) Studies of the presence of the virulence factors, adhesion, invasion, intracellular multiplication and toxin formation in salmonellas of different origin. Zt. bl. Bacteriol. 287:387-398.
97. Dionisi, H. M., Viale, A. M. (1998) Purification and characterization of *Chromatium vinosum* GroEL and GroES proteins overexpressed in *Escherichia coli* cells lacking the endogenous *groESL* operon. Protein Expression and Purification. 14:275-282.
98. Doorduyn, Y., Hofhuis, A., de Jager, C. M., van der Zwaluw, W. K., Notermans, D. W., van Pelt, W. (2008) *Salmonella* Typhimurium outbreaks in the Netherland in 2008. Euro Surveill. 13:715-717.
99. Dorman, C. J., Crónin, T. Ó., Mangan, M. W. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. W: *Salmonella*. Molecular biology and pathogenesis, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskell, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 105-126.
100. Dzierżanowska, D., Krzysztoń, J., Pawińska, A. Kliniczny podział zakażeń szpitalnych. Zakażenia przewodu pokarmowego. W: Zakażenia szpitalne, wyd. 1, Bielsko-Biała, pod red. D. Dzierżanowskiej i J. Jeljaszewicza, α-medica press, 1999, str. 157-196.
101. Dz. U. z 2001 r., Nr 63, poz. 634. Ustawa z dnia 11 maja 2001r. o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia.
102. Dz. U. z 2006 r., Nr 171, poz. 1225. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia.
103. Dz. U. z 2007 r., Nr 61, poz. 414. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 28 marca 2007 w sprawie wprowadzenia „Krajowego programu zwalczania niektórych serotypów *Salmonella* w stadach hodowlanych gatunku kura (*Gallus gallus*)” na lata 2007 – 2009.
104. Dz. U. z 2008 r., Nr 64, poz. 398. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 19 marca 2008 w sprawie wprowadzenia „Krajowego programu zwalczania niektórych serotypów *Salmonella* w stadach niosek gatunku kura (*Gallus gallus*)” na 2008 r.
105. Edwards, P. R., Ewing, W. H. The genus *Salmonella*. W: Identification of *Enterobacteriaceae*, wyd. 2, Minneapolis USA, P. R. Edwards, W. H. Ewing, Burgess Publishing Company, 1957, str. 16-80.
106. Eiger, U., Reissbrodt, R., Hammann, R., Fahr, A. M. (2001) Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* species from stool samples. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20:558-565.

107. Emmerth, M., Goebel, W., Miller, S. I., Hueck, C. J. (1999) Genomic subtraction identifies *Salmonella typhimurium* prophages, F-related plasmid sequences, and novel fimbrial operon, *stf*, which are absent in *Salmonella typhi*. J. Bacteriol. 181:5652-5661.
108. Ensgraber, M., Loos, M. (1992) A 66-Kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. Infect. Immun. 60:3072-3078.
109. Ethelberg, S., Wingstrand, A., Jensen, T., Sørensen, G., Müller, L., Lisby, M., Nielsen, E. M., Mølbak, K. (2008) Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium infection in Denmark in 2008. Euro Surveill. 13:712-714.
110. European Food Safety Authority. (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holding of laying hen flocks of *Gallus gallus*. The EFSA Journal. 97:1.
111. European Food Safety Authority. (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*. The EFSA Journal. 98:1-85.
112. European Food Safety Authority. (2007) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. The EFSA Journal. 130:23-105, 247-257.
113. European Food Safety Authority. (2009) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. The EFSA Journal. 223:21-108.
114. Fantasia, M., Filetici, E. *Salmonella enteritidis* in Italy. (1994) Int. J. Food Microbiol. 21:7-13.
115. Farmer III, J., J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. W: Manual of clinical microbiology, wyd. 8, USA, P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Tenover, M. A. Tenover, ASM Press Washington, C.D., 2003, str. 636-653.
116. Fiett, J., Gniadkowski, M. Diagnostyka chorób infekcyjnych i inwazyjnych. Analiza genetyczna w bakteriologii i epidemiologii zakażeń bakteryjnych. W: Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej., wyd. 2 zmienione, Warszawa, pod red. J. Bala, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2006, str. 528-549.
117. Figueroa-Bossi, N., Bossi, L. (1999) Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. Mol. Microbiol. 33:167-176.
118. Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D., Bossi, L. (2001) Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. Mol. Microbiol. 39:260-271.

119. Fisher, I. S. T. (2004a) Dramatic shift in the epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in Western Europe, 1998-2003 – results from the Enter-net international Salmonella database. *Euro. Surveill.* 9, 43-45.
120. Fisher, I. S. T. (2004b) International trends in *Salmonella* serotypes 1993-2003 – a surveillance report from the Enter-net international surveillance network. *Euro. Surveill.* 9, 45-47.
121. Frisk, A., Ison, C. A., Lagergård, T. (1998) GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: association cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 66:1252-1257.
122. Frome, E. L. (1983) The analysis of rates using Poisson regression models. *Biometrics.* 39(3): 665-674.
123. Fujinami, R. S., Oldstone, M. B. A., Wróblewska, Z., Frankiel, M. E., Koprowski, H. (1983) Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein on of Herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 80:2346-2350.
124. Furowicz, A., Butrym, B., Madejski, J., Steffen, J., Wachowicz, R. (1969) Serotypy pał. *Salmonella* w materiale diagnostycznym Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Katowicach. *Przegl. Epidemiol.* 23:213-220.
125. Furowicz, A. J., Czernomysy-Furowicz, D. (1999) Immunobiologiczne właściwości „opiekuńczych” białek szoku termicznego ze specjalnym uwzględnieniem limfocytów T $\gamma\delta$. *Med. Wet.* 55:25-29.
126. Gaillot, O., Di Camillo, P., Berche, P., Courcol, R., Savage, C. (1999) Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Hectoen Enteric Agar for isolation of Salmonella from stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 37:762-765.
127. Garduño, R. A., Garduño, E., Hoffman P. S. (1998) Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.* 66:4602-4610.
128. Gaertner, J. P., Hahn, D., Rose, F. L., Forstner, M. R. (2008) Detection of salmonellae in different turtle species within a headwater Spring ecosystem. *JWD.* 44:519-526.
129. Gething, M. J., Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-44.
130. Gill, O. N., Bartlett, C. L. R., Sockett, P. N., et al. (1983) Outbreak of *Salmonella* Napoli infection caused by contaminated chocolate bars. *Lancet* 1:574-577.
131. Głońska, R., Pieńkowska, D., Dera-Tomaszewska, B., Ilnicka, I.J. (1987) Characteristics of lactose-fermenting *Salmonella* strains from Poland. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia.* 38:69-75.

132. Głońska, R., Kunikowska, D., Dziadziuszko, H., Tokarska-Kłunejko, E. (1990) Distribution of *Salmonella enteritidis* phage-types in Poland in 1981-1990. Bull Inst Mar Trop Med Gdynia. 41:145-148.
133. Głońska, R. (1993) Taksonomia rodzaju *Salmonella*. Zmiany w nomenklaturze serowarów (serotypów). Załącznik do Meldunku 6/B/93 „O zgłoszonych zachorowaniach za czas od 16.06 do 30.06 1993r ”, Państwowy Zakład Higieny, Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej .
134. Głońska, R., Kunikowska, D. (1994) The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. Int. J. Food Microbiol. 21:21-30.
135. Głońska, R., Dera-Tomaszewska, B., Pieńkowska, D. Phage types of *Salmonella enteritidis* isolates, Poland, 1986 – 1995. (1997) International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis, Ploufragan, France, May 20 – 22, Proceedings: 599-600.
136. Głońska, R., Dera-Tomaszewska, B. (1999) Comparison of two *Salmonella* Enteritidis phage typing schemes. Eur. J. Epidemiol. 15:395-401.
137. Głońska, R., Dziadziuszko, H., Kunikowska, D., Lis, M., Wicha, M., Heleski, M., Tokarska-Pietrzak, E., Strzałkowski, L., Bugajak, P. (2005) IMMUNOVAC – poliwalentna szczepionka przeciwko salmonellozom kur. Med. Wet. 61:1105-1109.
138. Główny Urząd Statystyczny, www.stat.gov.pl.
139. GNU General Public License, <http://gretl.sourceforge.net/>
140. Goldman, B. S., Halling, C. Genomics and the use of genomic tools to study pathogenic bacteria. W: Molecular paradigms of infectious diseases. A bacterial perspective, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 78-114.
141. Gonera, E. Dur brzuszny. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Zapobieganie i zwalczanie, wyd. 3, Kraków, pod red. W. Magdzika, Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne „Vesalius”, 1993, str. 81-90.
142. Gonera, E. Dury rzekome. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Zapobieganie i zwalczanie, wyd. 3, Kraków, pod red. W. Magdzika, Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne „Vesalius”, 1993, str. 102-105.
143. Gonera, E. (2001) Salmonelozy w 1999 roku. Przegl. Epidemiol. 55:75-83.
144. Gonera, E. (2002) Salmonelozy w 2000 roku. Przegl. Epidemiol. 56:275-284.
145. Gonera, E. (2003) Salmonelozy w 2001 roku. Przegl. Epidemiol. 57:67-76.
146. Grandesso, F., Jourdan-da Silva, N., Le Hello, S., Roussel, S., Rassin, S., Rousseau, C., Wyndels, K., Robemanianina, I., Bordeaux, I., Peron, C., Géhin, R. M., Motano, M. B., Vogeleisen, C. (2008) Excess of infections due to a multi-drug sensitive *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in France in June 2008. Euro Surveill. 13:709-711.

147. Gregorova, D., Pravcova, M., Karpiskova, R., Rychlik, I. (2002) Plazmid pC present in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT14b strains encodes a restriction modification system. FEMS Microbiol. Lett. 214:195-198.
148. Grimont, P. A. D., Grimont, F., Bouvet, P. Taxonomy of the genus *Salmonella*. W: *Salmonella* in Domestic animals, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 1-17.
149. Grimont, P. A. D., Weill, F-X. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
150. Grupka, L. M., Ramsay, E. C., Bemis, D. A. (2006) *Salmonella* surveillance in a collection of rattlesnakes (*Crotalis* spp.). J. Zoo Wildl. Med. 37:306-312.
151. Grzybowski, J., Zaborski, P. Teoretyczne i praktyczne podstawy infekcjologii. Warszawa, Wydawnictwo Medyczne Borgis, 2007, str. 130-131.
152. Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., Mendoga, M. C. (2002) Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. Antimicrobs Agents Chemother. 46:2977-2981.
153. Guinée, P. A. M., Leeuwen, W. J. Phage typing of *Salmonella*. W: Methods in Microbiology, vol. 11, New York USA, T. Bergen, J. R. Norris, Academic Press Inc., 1978, str. 157-191.
154. Gullo, C. A., Teoh, G. (2004) Heat shock proteins: to present or not, that is the question. Immunol. Lett. 94:1-10.
155. Gulig, P. A., Danbara, H., Guiney, D. G., Lax, A. J., Norel, F., Rhen, M. (1993) Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. Mol. Microbiol. 7:825-830.
156. Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23:1089-1097.
157. Haghjoo, E., Galan, J. E. (2004) *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:4614-4619.
158. Haneda, T., Okada, N., Nakazawa, N., Kawakami, T., Danbara, H. (2001) Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. Inf. Immun. 69:2612-2620.
159. Harlow, E., Lane, D. Purifying antigens from polyacrylamide gels. W: Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, str. 61-71.
160. Harlow, E., Lane, D. Subcutaneous injections for rabbits. W: Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, str. 105.

161. Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-580.
162. Heffernan, E. J., Harwood, J., Fierer, J., Guiney, D. (1992) The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J. Bacteriol.* 174:84-91.
163. Hensel, M. Pathogenicity islands and virulence of *Salmonella enterica*. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 146-172.
164. Hensel, M. Pathogenicity islands and bacterial virulence. W: *Molecular paradigms of infectious diseases. A bacterial perspective*, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 115-137.
165. Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R. V. (2002) *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129:1-8.
166. Hill, G. J. S., Lilliecrap, M. S. (2003) Arthritis associated with enteric infection. *Best Pract. Res. Clin. Rheum.* 17:219-239.
167. Hirata, D., Hirai, I., Iwamoto, M., Yoshio, T., Takeda, A., Masuyama, J-I., Mimori, A., Kano, S., Minota, A. (1997) Preferential binding with *Escherichia coli* hsp60 of antibodies prevalent in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 2:141-148.
168. Hochleitner, B. W., Hochleitner, E. O., Obrist, P., Eberl, T., Amberger, A., Xu, Q., Margeritner, R., Wick, G. (2000) Fluid shear stress induces Heat Shock Protein 60 expression in endothelial cell *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:617-623.
169. Hollinger, K. Epidemiology and salmonellosis. W: *Salmonella* in Domestic animals, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 341-353.
170. Hoppichler, F., Lechleitner, M., Traweger, C., et al. (1996) Changes of serum antibodies to heat-shock protein 65 in coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 126:333-338.
171. Hoszowski, A., Wasyl, D. (1998) Rola gadów jako źródła zakażeń ludzi pałeczkami *Salmonella*. *Życie Wet.* 12:464-466.
172. Hoszowski, A., Wasyl, D., Truszczyński, M. (2000) *Salmonella* serovars determined in the National Veterinary Research Institute 1994 – 1998. *Bull. Vet. Inst. Pulawy,* 44:33-38.
173. Hoszowski, A., Wasyl, D. (2002) *Salmonella* serovars found in animals and feeding stuffs in 2001 and their antimicrobial resistance. *Bull. Vet. Inst. Pulawy,* 46:165-178.
174. Hoszowski, A., Wasyl, D., Kwiatek, K. (2005) Raport. Występowanie *Salmonella* u zwierząt, w paszach i żywności oraz oporność na substancje antybakteryjne.

- ryjne w roku 2004. T. Wijaszka, Zakład Organizacji i Upowszechniania Badań Naukowych, PIWet-PIB, Puławy, 2005.
175. Humphrey, T. Public health aspects of *Salmonella enterica* in food production. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 89-116.
176. Ibrahim, G. F., Fleet, G. H., Lyons, M. J., Walker, R. A. (1985) Methods for the isolation of highly purified *Salmonella* flagellins. *J. Clin. Microbiol.* 22:1040-1044.
177. ICSP (2005) Judicial Commission of the International Committee on Systematic of Prokaryotes. The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2^T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithet that may be applied to this species. Opinion 80. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:519-520.
178. Iino, T., Ledeborg, J. Genetics of *Salmonella*. W: The world problem of salmonellosis, Hague, E. Van Oye, Dr. W. Junk Publishers, 1964, str. 111-142.
179. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). (1984) Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. Recommendations 1983. *Eur. J. Biochem.* 138:9-37.
180. Jafari, M., Forsberg, J., Gilcher, R. O., Smith, J. W., Crutcher, J. M., Smith, J. W., McDermont, M., Brown, B. R., George, J. N. (2002) Salmonella sepsis caused by platelet transfusion from a donor with a pet snake. *N. Engl. J. Med.* 347:1075-1078.
181. Jagielski, M., Kałużewski, S. Serodiagnosticska duru brzuszego i durów rzekomych. Warszawa, Wydawnictwo Metodyczne Państwowego Zakładu Higieny, 2001.
182. Jagusztyn-Krynicka, E. K. Molekularne podstawy bakteryjnej patogenez. W: *Biologia molekularna bakterii*, pod red. J. Baj i Z. Markiewicz, wyd. 1, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2006, str. 509-605.
183. Jang, Y. H., Lee, S. J., Lim, J. G., Lee, H. S., Kim, T. J. Park, J. H., Chung, B. H., Choe, N. H. (2008) The rate of *Salmonella* spp. infection in zoo animals at Seoul Grand Park, Korea. *J. Vet. Sci.* 9:177-181.
184. Jesudason, M. V., Balaji, V., Densibai, S. (2006) Toxogenicity testing of clinical isolates of non-typhoidal salmonellae in Vero cell culture & *Caenorhabditis elegans* model. *Indian J. Med. Res.* 123:821-824.
185. Jones, Y. E., McLaren, I. M., Wray, C. Laboratory aspects of *Salmonella*. W: *Salmonella* in Domestic animals, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 393-405.

186. Jones-Carson, J., Vazquez-Torres, A. Innate host defenses in salmonellosis. W: *Salmonella*. Molecular biology and pathogenesis, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskel, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 147-168.
187. Juda, M., Dadas, E., Malm, A. (2007) Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotwórczości i lekooporności bakterii. *Post. Mikrobiol.* 46:237-247.
188. Kacprzak, E., Stefaniak, J., Skoryna-Tkacz, B., Wojtacha, A., Bolewska, B., Juszczyk, J. (2002) Trudności diagnostyczne u gorączkujących powracających z tropiku. Dwa przypadki duru brzuszego importowanego z Indii. *Pol. Merkuriusz Lek.* 13:509-515.
189. Kałużewski, S., Tyc, Z., Szych, J., Terech, I., Cechowicz, Ł., Ścianowska, C., Kokocińska, I. (1988) Charakterystyka pałeczek *Salmonella* wyosobnionych z pojemników z drobiem znajdującym się w sprzedaży detalicznej. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 40:1-11.
190. Kamińska, A., Dąbrowska, A., Latała, A. (1975) Występowanie pał. *Salmonella* w materiale diagnostycznym ZHW – Opole w latach 1969 – 1973. *Medycyna Wet.* 31:332-333.
191. Kansau, I., Labigne, A. (1996) Heat shock proteins of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10:51-56.
192. Karawajczyk, B. Synteza i ocena właściwości immunogennych wybranych fragmentów białek szoku termicznego. Rozprawa doktorska. Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Syntezy Organicznej, Zakład Chemii Polipeptydów, Gdańsk 2001, str. 50-68.
193. Karpíšková, R., Dědičová, D., Šrámová, H. (1997) Salmonellosis in the Czech Republic. International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis, Ploufragan, France, May 20 – 22. *Proceedings*: 581-583.
194. Kaufmann, S. H. E. (1990) Heat-shock proteins: a missing link in the host-parasite relationship? *Med. Microbiol. Immunol.* 179:61-66.
195. Kaufmann, S. H. E., Schoel, B. Heat shock protein as antigens in immunity against infection and self. W: *The biology of heat proteins and molecular chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, str. 502.
196. Kaufmann, S. H. E. (1996) Heat shock protein and the immune response. *Immunol. Today.* 11:129-136.
197. Kauffmann, F. (1961) The species definition in the *Enterobacteriaceae*. *IBBNT.* 11:5-6.
198. Kauffmann, F. *Salmonella*. W: *The bacteriology of Enterobacteriaceae*. Collected studies of the author and his co-workers, Kauffmann, F., Munksgard-Copenhagen, 1966, str. 53-304.

199. Khan, S. A., Everest, P., Servos, S., Foxwell N., Zähringer, U., Brade, H., Rietschel, E. Th., Dougan, G., Charles, I. G., Maskell, D. J. (1998) A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol. Microbiol.* 29:571-579.
200. Khan, S. A., Stratford, R., Wu, T., Mckelvie, N., Bellaby, T., Hindle, Z., Sinha, K. A., Eltze, S., Mastroeni, P., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S. N., Brennan, F. R. (2003) *Salmonella typhi* and *S. typhimurium* derivatives harbouring deletions in aromatic biosynthesis and *Salmonella* Pathogenicity Island-2 (SPI-2) genes as vaccine and vectors. *Vaccine.* 21:538-548.
201. Khandekar, S. S., Bettencourt, B. M., Kelley, K. C., Recny, M. A. (1993) A simple and rapid method for the purification of GroEL, an *Escherichia coli* homolog of the heat shock protein 60 family of molecular chaperonins. *Protein Expression and Purification.* 4:580-584.
202. Kidgell, C., Pickard, D., Wain, J. James, K., Diem Nga, L.T., To Song Diep, Levine M. M., O'Gaora, P., Prentice, M. B., Parkhill, J., Day, N., Farrar, J., Dougan, G. (2002) Characterisation and distribution of a cryptic *Salmonella typhi* plasmid pHCM2. *Plasmid.* 47:159-171.
203. Killalea, D., Ward, L. R., Roberts, D. et al. (1996) International epidemiological and microbiological study of outbreak of *Salmonella agona* infection from a ready to eat savoury snack. 1. England and Wales and the United States. *BMJ* 313:1105-1107.
204. Klugman, K. P., Koornhof, H. J., Gilbertson, I. T., Robbins, J. B., Schneerson, R., Schulz, D., Cadoz, M., Armand, J., the Vaccine Advisory Committee. (1987) Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* ii:1165-1169.
205. Konstantinidis, K. T., Tiedje, J. M. (2005) Towards a genome-based taxonomy for Prokaryotes. *J. Bacteriol.* 187:6258-6264.
206. Koo, F. C. W., Peterson, J. W., Houston, C. W., Molina, K. (1984) Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect. Immun.* 43(1): 93-100.
207. Korhonen, T. K. Adhesins of *Salmonella* and their putative roles in infection. W: *Salmonella. Molecular biology and pathogenesis*, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskell, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 53-66.
208. Korzeniowska-Kowal, A., Witkowska, D., Gamian, A. (2001) Mimikra cząsteczkowa bakteryjnych antygenów polisacharydowych i jej rola w etiologii chorób infekcyjnych i autoimmunologicznych. *Post. Hig. Med. Dośw.* 55:211-232.
209. Kotb, M. (1995) Infection and autoimmunity: a story of the host, the pathogen and copathogen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74:10-22.
210. Koupal, L. R., Deibel, R. H. (1975) Assay, characterisation, and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.* 11:14-22.

211. Kowalczyk-Pecka, D., Wernicki, A., Puchalski, A. (2003) Lekowarazliwość oraz typy bakteriofagowe szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych na terenie mikroregionu lubelskiego. Przegl. Epidemiol. 57:201-209.
212. Krawczyk, B. (2007) Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. Post. Mikrobiol. 46:367-378.
213. Kropinski, A. M., Sulakvelidze, A., Konczy, P., Poppe, C. *Salmonella* phages and prophages – Genomics and practical aspects. W: *Salmonella*. Methods and Protocols, Totowa, New Jersey, USA, H. Schatten, A. Eisenstark, Human Press Inc., 2007, str. 133-175.
214. Krzewski, K., Kunikowska, D., Wysocki, J., Kotlarz, A., Thompkins, P., Ashraf, W., Lindsey, N., Picksley, S., Głównicka, R., Lipińska, B. (2003) Characterization of the anti-DnaJ monoclonal antibodies and their use to compare immunological properties of DnaJ and its human homologue HDJ-1. Cell Stress Chaperones 8:8-17.
215. Kwinkowski, M., Zawadzki, K., Zarzycki, M., Kaca, W. (2008) Organizacja klasterów genów biosyntezy części rdzeniowej LPS u wybranych bakterii z rodziny Enterobacteriaceae. Post. Mikrobiol. 47:183-189.
216. Lachowicz, K. *Salmonella* infections in East Europe. W: The world problem of salmonellosis, Hague, E. Van Oye, Dr. W. Junk Publishers, 1964, str. 295-334.
217. Laconcha, I., López-Molina, N., Rementeria, A., Audicana, A., Perales, I., Garaizar, J. (1998) Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. Int. J. Food Microbiol. 40:27-34.
218. Lahiri, A., Lahiri, A., Iyer, N., Das, P., Chakravorty, D. (2010) Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. Microbes Infect. 12:809-818.
219. Lajton, A. N., Galyov, E. E. (2007) *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. Expert review in molecular medicine. 9:1-16.
220. Lalko, J. (1970) Znaczenie typowania bakteriofagowego *Salmonella* w epidemiologii i epizootologii. Konferencja Naukowa „Salmonellozy”, Gdańsk – Gdynia, 19-20.IX.1969. Materiały Naukowe Konferencji, str. 73-81.
221. Lalko, J. Mikrobiologiczna i epidemiologiczna ocena różnych systemów typowania bakteriofagowego szczepów *S.typhi-murium* i *S.enteritidis*. W: Praca habilitacyjna, J. Lalko, Uniwersytet Łódzki, Acta Universitatis Lodzensis, 1976.
222. Lalko, J. *Salmonella enteritidis* bacteriophage typing. (1977) Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia. 28:187-194.
223. Lalko, J., Wegner, Z., Dera-Tomaszewska, B., Michalik, D., Kruminis-Łozowska, W. (1981) Study on the presence of *Salmonella* and other pathogenic bacteria in cockroaches on ocean-going ships. II. Identification of bacterial

- strains isolated from *Blattella germanica* (L.). Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia. 32:277-282.
224. Landeras, E., GonzálezHevia, M. A., Mendoza, M. C. (1998) Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis. Relationship between food, water and pathogenic strains. Int. J. Food Microbiol. 43:81-90.
225. Lapage, S. P., Sneath, P. H.A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., Clark, W. A. International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=icnb>
226. Le Minor, L., Popoff, M.Y. (1987) Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp., nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:465-468.
227. Le Minor, L., Richard, C. *Salmonella*. W: Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries, France, Institut Pasteur, Paris, 1993, str. 27-54.
228. Levine, M. M., Grados, O., Gilman, R. H. et al. (1978) Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:795-800.
229. Levy-Rimler, G., Vitanen, P., Weiss, C., Sharkia, R., Greenberg, A., Niv, A., Lusting, A., Defarea, Y., Azem, A. (2001) The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60. Eur. J. Biochem. 268:3465-3472.
230. Lewandowska, E. (1958) Food poisoning in Poland in 1952 – 1956. Przegl. Epidemiol. 12:249-252.
231. Lewis, V. A., Hynes, G. M., Zheng, D., Saibil, H., Willison, K. (1992) T-complex polypeptide-1 of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol. Nature. 358:249-252.
232. Libby, S. J., Adams, L. G., Ficht, T. A., Allen, C., Whitford, H.A., Buchmeier, N.A., Bossie, S., Guiney, D.G. (1997) The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. Infect. Immun. 65:1786-1792.
233. Lilic, M., Stebbins, C. E. (2004) Re-structuring the host cell: up close with *Salmonella's* molecular machinery. Microbes Infec. 6:1205-1211.
234. Lilleengen K. (1950) Typing of *Salmonella dublin* and *Salmonella enteritidis* by means of bacteriophage. Acta Path. Microbiol. Scand. 27:625-640.
235. Lim, P. L. Diagnostic uses of monoclonal antibodies to *Salmonella*. W: Monoclonal antibodies against bacteria, vol. III, Orlando USA, A. J. L. Macario, E. C. de Macario, Academic Press, Inc., 1986, str. 29-75.
236. Lindberg, A. A., Le Minor, L. Serology of *Salmonella*. W: Methods in microbiology, vol. 15, London UK, T. Bergen, Academic Press, 1984, str. 1-64.

237. Lindler, L. E., Hayes, J. M. (1994) Nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* *groEL* heat shock gene. *Microb. Pathog.* 17:271-275.
238. Lockhart, J. M., Lee, G., Turco, J., Chamberlin, L. (2008) *Salmonella* from gopher tortises (*Gopherus polyhemus*) in south Georgia. *JWD.* 44:988-991.
239. Looney, R. J., Steigbigel, R. T. (1986) Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.* 108:506-516.
240. Loos, M., Wassenaar, T. M. (1994) Pathogenicity factors of enteric Salmonellae. *Immun. Infekt.* 22:14-19.
241. Macierewicz, M., Kałużewski, S., Lalko, J. (1968) Phage differentiation of strains of *Salmonella enteritidis*. *Exp. Med. Microbiol.* 20:138-146.
242. Macierewicz, M. (1970) Zagadnienie zakażeń pałeczką *S. enteritidis* na terenie Polski. Konferencja Naukowa: „Salmonelozy”, Gdańsk – Gdynia, 19 – 20. IX. 1969. Materiały naukowe Konferencji, str. 83-102.
243. Maddocks, S., Olma, T., Chen, S. (2002) Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and *Salmonella*-*Shigella* agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 40:2999-3003.
244. Majtanova, L. (1997) Occurrence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in the Slovak Republic. *Eur. J. Epidemiol.* 13:243-245.
245. Małek, W., Wdowiak, S. (1996) Zasady nomenklatury bakterii. *Post. Mikrobiol.* 35:97-105.
246. Małek, W., Wdowiak, S. (1996) Współczesna systematyka bakterii. *Post. Mikrobiol.* 35:119-137.
247. Małek, W., Wdowiak-Wróbel, S., Kalita, M., Szlachetka, M. (2008) Dylematy z koncepcją i definicją gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* 47:177-182.
248. Markiewicz, Z., Kwiatkowski, Z. A. Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001, str. 185-186.
249. Maskey, A. P., Day, J. N., Phung, Q. T., Thwaites, G. E., Campbell, J.I., Zimmerman, M., Farrar, J. J., Basnayak, B. (2006) *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A and *S. enterica* serovar Typhi cause indistinguishable clinical syndromes in Kathmandu, Nepal. *Clin. Infect. Dis.* 42:1247-1253.
250. Mason, J. (1994) *Salmonella enteritidis* control programs in the United States. *Int. J. Food Microbiol.* 21:155-169.
251. Mastroeni, P. Mechanisms of immunity to *Salmonella* infection. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 207-254.
252. Matsui, H., Bacot, C. M., Garlington, W. A., Doyle, T. J., Roberts, S., Guling, A. (2001) Virulence plasmid-borne *spvB* i *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J. Bacteriol.* 183:4652-4658.

253. Mayr, M., Metzler, B., Kiechl, S., Willeit, J., Schett, G., Xu, Q., Wick, G. (1999) Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*. Immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation*. 99:1560-1566.
254. Mäkelä, P. H. (1963) Hfr males in *Salmonella* abony. *Genetics*. 48:423-429.
255. McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, Ch., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R. K. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 413:852-856.
256. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625.
257. Mermin, J., Hoar, B., Angulo, F. J. (1997) Iguanas and *Salmonella* Marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics* 99:399-402.
258. Methner, U., Barrow, P. A., Martin, G., Meyer, H. (1997) Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonisation in newly hatched SPF chickens Rusing live, attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. *Int. J. Food Microbiol.* 35:223-230.
259. Meuszyński, S. (1962) Salmonelozы u zwierząt w Polsce w latach 1945 – 1960. *Medycyna Wet.* 18:79-83.
260. Mikucki, J. Klasyfikacja bakterii. W: *Biologia szczegółowa. Mikrobiologia dla farmaceutów*, pod red. Włodzimierza Kędzi, Poznań, Wydawnictwo Uczelniane Akademii Medycznej w Poznaniu, 1994, str. 209-212.
261. Minutes of the International Federation for Enteric Phage Typing (IFEPT). 7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Prague, Czech Republic, July 3 -8, 1994 – prepared by Linda Ward and Diane Lightfoot.
262. Mishu, B., Koehler, J., Lee, L. A., Rodrigue, D., Brenner, F.H., Blake, P., Tauxe, R.V. (1994) Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985-1991. *J. Inf. Dis.* 169:547-552.
263. Mizel, S. B., Honko, A. N., Moors, M.A., Smith, P. S., West, A. P. (2003) Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor5/Toll-like receptor4/complexes. *J. Immunol.* 1270:6217-6223.

264. Molenda, J. (1991) Czynniki chorobotwórczości pałeczek *Salmonella*. Post. Mikrobiol. XXX(1):3-19.
265. Moncik, M. (1975) Występowanie pałeczek *Salmonella* u drobiu na terenie woj. kieleckiego w latach 1969 – 1974. Medycyna Wet. 31:326-328.
266. Montenegro, M. A., Morelli, G., Helmuth, R. (1991) Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. Microb. Pathog. 11:7-16.
267. Morgan, E. *Salmonella* pathogenicity islands. W: *Salmonella*. Molecular biology and pathogenesis, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskell, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 67-88.
268. Morici, L. A., Frisk, A., Schurr, M. J. Two-component regulatory systems. *Salmonella* PhoPQ regulon. W: Molecular paradigms of infectious diseases. A bacterial perspective, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 502-543.
269. Murthy, K. G., Deb, A., Goonesekera, S., Szabo, C., Salzman, A. L. (2004) Identification of conserved domains in *Salmonella* muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. J. Biol. Chem. 7:5667-5675.
270. Murugkar, H. V., Rahman, H., Dutta, P. K. (2003) Distribution of virulence genes in *Salmonella* serovars isolated from man & animals. Indian J. Med. Res. 117:66-70.
271. Mutharia, L. M., Klinck, J., Yamaguchi, H., Davey, M. (1998) Purification, characterization and immunochemical properties of a novel 60-kDa protein of *Vibrio anguillarum* strains. FEMS Microbiol. Lett. 168:111-117.
272. Nagumo, Y., Kakeya, H., Shoji, M., Hayashi, Y., Dohmae, N., Osada, H. (2005) Epolactaene binds human Hsp60 Cys⁴⁴² resulting in the inhibition of chaperone activity. Biochem. J. 387:835-840.
273. Namimatsu, T., Asai, T., Osumi, T., Imai, Y., Sato, S. (2006) Prevalence of the virulence plasmid in *Salmonella* Typhimurium isolates from pigs. J. Vet. Med. Sci. 68:187-188.
274. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Przeciwdemiczny. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2007 roku, Biuletyn roczny, Wydawnictwo PZH, Warszawa, 2008.
275. Nedler, J. A., Wedderburn, W. M. (1972) Generalized linear models. J. R. Statist. Soc. 135(3): 370-384.
276. Nester, E. W., Derson, D. G., Roberts Jr., C. E., Pearsall, N. N., Nester, M. T. Microbiology a human perspective. New York, USA, McGraw-Hill, 2004, str. 616-617.

277. Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T., Killington, R. Struktury bakteryjne i ich funkcje. Ruch bakterii i chemotaksja. W: Mikrobiologia. Krótkie wykłady, przekład zbiorowy pod red. Z. Markiewicza z oryginału Instant Notes in Microbiology, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002, str. 93-98.
278. Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. Kolonizacja różnych części ciała ludzkiego przez bakterie patogenne. W: Mikrobiologia. Krótkie wykłady, przekład zbiorowy pod red. Z. Markiewicza z oryginału Instant Notes in Microbiology, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002, str. 178-184.
279. Nielsen, K. L., Cowan, N. J. (1998) A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding *in vivo*. Mol. Cell 2:93-99.
280. Nolte, F. S., Caliendo, A. M. Molecular detection and identification of microorganisms. W: Manual of clinical microbiology, 8 ed., Washington, D.C., P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, R. M. Tenover, ASM Press, 2003, str. 234-266.
281. Nygård, K., De Jong, B., Guerin, P. J., Andersson, I., Olson, A., Giesecke, J. (2004) Emergence of new *Salmonella* Enteritidis phage types in Europe? Surveillance of infections in returning travellers. BMC Medicine. 2:32:1-8.
282. O'Byrne, A. M., Mahon, M. (2008) Reptile-associated salmonellosis in residents in the south east of Ireland 2005 – 2007. Euro. Surveill. 13:1-2.
283. Ochiai, R. L., Wang, X., Seidlein, L., Yang, J., Bhutta, Z. A., Bhattacharya, S. K., Agtini, M., Deen, J. L. Wain, J., Kim, D. R., et al. (2005) *Salmonella paratyphi* A rates, Asia. Emerg. Infect. Dis. 11:1764-1766.
284. O'Hara, C. M., Weinstein, M. P., Miller, J. M. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. W: Manual of clinical microbiology, 8 ed., Washington, D.C., P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, R. M. Tenover, ASM Press, 2003, str. 185-217.
285. Ohl, M. E., Miller, S. I. (2001) *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. Annu. Rev. Med. 52:259-274.
286. Olsen, J. E. Molecular typing of *Salmonella*. W: *Salmonella* in Domestic animals, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 429-446.
287. Osuchowska, E., Jóźwik, E. (1988) Występowanie *S. saintpaul* u drobiu rzeźnego. Medycyna Wet. 44:674-676.
288. Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, Raport: Występowanie serotypów *Salmonella* wśród osób chorych i zdrowych badanych w Polsce (kolejno w latach 1982-1985) – na podstawie sprawozdań WSSE na formularzach Mz/E.II-17 (opracowanie: Stypułkowska-Misiurewicz, H., Nowicki, M.).
289. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej – Departament Inspekcji Sani-

- tarnej. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1986-1988.
290. Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, Raport: Serotypy pałeczek *Salmonella* najczęściej wykrywane u osób chorych i zdrowych w Polsce w 1989 roku – dane wg sprawozdań 48 WSSE (opracowanie: Stypułkowska-Misiurewicz, H., Nowicki, M.).
291. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej – Departament Zdrowia Publicznego. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1990-1998.
292. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Przeciwdemiczny i Oświaty Zdrowotnej. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1999-2002.
293. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Przeciwdemiczny. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 2003-2007.
294. Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., James, K. D., Thompson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S. D., Holden, M. T. G., Sebahia, M., Baker, S., Bashman, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R. M., Dowd, L., Whgite, N., Farrar, J., Fettwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T. T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T. S., Leather, S., Moule, S., O’Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B. G. (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 413:848-852.
295. Parry, C. M., Hoa, N. T., Dico, T. S. et al. (1999) Value of a single-tube Widal test in diagnosis of typhoid fever in Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 37:2882-2886.
296. Parry, C. M. (2004) Typhoid fever. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 6:27-33.
297. Parry, C. M. Epidemiological and clinical aspects of human typhoid fever. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 1-24.
298. Pawliczak, R., Kowalski, M. L. (2001) Badanie ekspresji genów metodą microarray – perspektywy wykorzystania w medycynie. *Alerg Astma Immun.* 6:77-85.
299. Pawlikowska, M., Deptuła, W. (2009) Białka szoku termicznego (Hsps – heat shock proteins), a chlamydiozy i chlamydofilozy. *Post. Mikrobiol.* 48:213-219.
300. Pedersen, K., Lassen-Nielsen, A. M., Nordentoft, S., Hammer, A. S. (2009) Serovars of *Salmonella* from captive reptiles. *Zoonoses Public Health.* 56:238-242.

301. Peptide Companion, version 1.24, CoshiSoft/PeptiSearch 1994.
302. Perez, J. M., Cavalli, P., Roure, C., Renae, R., Gille, Y., Freydiere, A. M. (2003) Comparison of four chromogenic media and Hektoen Agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *J. Clin. Microbiol.* 41:1130-1134.
303. Pęcunek, J. (1999) *Salmonella* występujące u zółwi w Polsce. *Życie Wet.* 74:442-446.
304. Phipps, B. M., Typke, D., Hegerl, R., Volker, S., Hoffmann, A., Stetter, K. O., Baumeister, W. (1993) Structure of a molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium. *Nature* 361:475-477.
305. Pieniżek, N. J. Diagnostyka chorób infekcyjnych i inwazyjnych. Podstawy diagnostyki molekularnej. W: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*, wyd. 2 zmienione, Warszawa, pod red. J. Bala, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2006, str. 506-519.
306. Pietkiewicz, K., Buczowski, Z. (1969) Salmonellosis in man in Poland, 1957 – 66. *Public Health Reports.* 84:712-720.
307. Popoff, M. Y., Le Minor, L. (1985) Expression of antigenic factor O:54 is associated with the presence of a plasmid in *Salmonella*. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie.* 136B:169-179.
308. Popoff, M. Y., Le Minor, L. Taxonomy of the genus *Salmonella*. Changes in serovars nomenclature. W: *Antigenic Formulas of the Salmonella serovars*, 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997, str. 5.
309. Popoff, M. Y. (2001) *Antigenic Formulas of the Salmonella serovars*, 8th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.
310. Poppe, C. *Salmonella enteritidis* in Canada. (1994) *Int. J. Food Microbiol.* 21:1-5.
311. ProMED-mail. A chronology of some cross-border salmonellosis outbreaks. Pro-MED-mail 2006; 12 Feb: archive number 20060212.0469. <http://www.promedmail.org>. Accessed 10 April 2006.
312. Przybylska, A. (2001) Ogniska zbiorowych zatruc i zakażeń pokarmowych w Polsce w latach 1985 – 1999. *Przegl. Epidemiol.* 55:261-173.
313. Ptak, W., Ptak, M. Autoimmunizacja. W: *Podstawy immunologii*, wyd. 1, Kraków, W. Ptak, M. Ptak, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 1999, str. 245-254.
314. Ptak, W., Ptak, M. Odporność i zakażenia. W: *Podstawy immunologii*, wyd. 1, Kraków, W. Ptak, M. Ptak, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 1999, str. 255-288.

315. Quait-Randall, E., Joachimiak, A. (1999) Purification of chaperonins. *J. Chromatogr. B.* 722:153-177.
316. Rabczyński, M., Adamec, R., Olszewska-Rocznik, J. (2006) Przeciwciała anty-Hsp60/65 – rola w patogenezie miażdżycy, czynnik ryzyka rozwoju blaszki miażdżycowej. *Adv. Clin. Exp. Med.* 5:933-939.
317. Rabsch, W. *Salmonella* Typhimurium phage typing for pathogens. W: *Salmonella*. Methods and Protocols, Totowa, New Jersey, USA, H. Schatten, A. Eisenstark, Human Press Inc., 2007, str. 177-211.
318. Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Dusold, R., Rubino, S., Bäumlner, A. J. (2005) The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 73:3367-3374.
319. Raffatellu, M., Tükel, Ç., Chessa, D., Wilson, R. P., Bäumlner, A. J. The intestinal phase of *Salmonella* infections. W: *Salmonella*. Molecular biology and pathogenesis, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskel, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 31-51.
320. Rall, V. L. M., Rall, R., Aragon, L. C., da Silva, M. G. (2005) Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Brazilian J. Microbiol.* 36:147-150.
321. Rambach, A., Tran, Q., Le Dantec, A. C. Evaluation of the new chromogenic medium: CHROMagar *Salmonella* Plus for the detection of all *Salmonella* species including *Salmonella* Typhi and *Salmonella* lactose plus. XXIst ISTH Congress, Oxford, UK, 2007. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007, Volume 5, Supplement 2, abstract number: p998.
322. Ranson, N. A., White, H. E., Saibil, H. R. (1998) Chaperonins. *Biochem. J.* 333:233-242.
323. Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plykaitis, B. D., Farmer III, J. J. (1989) Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* 27:313-320.
324. Rhen, M., Taira, S., Koski, P., Hurme, R., Riikonen, P., Mäkelä, P. H. Virulence factors of *Salmonella*. International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis, Ploufragan, France, September 15-17, 1992. Reports and Communications: 141-163.
325. Rodrigue, D. C., Tauxe, R. V., Rowe, B. (1990) International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? *Epidemiol. Infect.* 105:21-27.
326. Rotger, R., Casadesús, J. (1999) The virulence plasmids of *Salmonella*. *Internatl. Microbiol.* 2:177-184.

327. Rodríguez-Peña, J. M., Buisán, M., Ibáñez, M., Rotger, R. (1997) Genetic map of the virulence plasmid of *Salmonella enteritidis* and nucleotide sequence of its replicons. *Gene* 188:53-61.
328. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Odporność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza. W: *Immunologia*, wyd. 2 polskie, Warszawa, Brema, pod red. J. Żeromskiego, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Wydawnictwo Medyczne Słotwiński Verlag, 2000, str. 229-242.
329. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Autoimmunizacja i choroby autoimmunizacyjne. W: *Immunologia*, wyd. 2 polskie, Warszawa, Brema, pod red. J. Żeromskiego, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Wydawnictwo Medyczne Słotwiński Verlag, 2000, str. 367-380.
330. Römling, U., Pesen, D., Yaron, S. Biofilms of *Salmonella enterica*. W: *Salmonella*. Molecular biology and pathogenesis, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskel, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 127-145.
331. Rudy, A. (1986) Występowanie salmoneli w narządach wewnętrznych drobiu, jajach, komponentach paszowych i ściółce. *Medycyna Wet.* 42:73-75.
332. Rules of the *Bacteriological Code* (1990 Revision).
333. Rushdy, A. A., Wall, R., Seng, C., Wall, P. G., Stuart, J. M., Ridley, A. M., Threlfall, E. J., Ward, L. R. (1997) Application of molecular methods to a nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 4. *J. Hosp. Infect.* 36:123-131.
334. Rychlik, I., Lovell, M. A., Barrow, P. A. (1998) The presence of genes homologous to the K88 genes *faeH* and *faeI* on the virulence plasmid of *Salmonella gallinarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159:255-260.
335. Rycroft, A. N. Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Salmonella*. W: *Salmonella in Domestic animals*, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 19-33.
336. Rzedzicki, J., Kowalska, M. (1994) Rola *Salmonella enteritidis* w patologii ptaków. *Medycyna Wet.* 50:439-442.
337. Rzedzicki, J., Pawelec, M. (1998) Ptaki jako potencjalne źródło zakażenia ludzi salmonelami. *Medycyna Wet.* 54:19-21.
338. Rzedzicki, J., Boś, M. (2001) Sytuacja epizootyczna patogenów zakażeń pokarmowych (salmonellozy). *Przegl. Epidemiol.* 55:5-11.
339. Sadkowska-Todys, M., Baumann, A., Stefanoff, P. (2006) Zatrucia i zakażenia pokarmowe w Polsce w 2004 roku. *Przegl. Epidemiol.* 60:449-463.
340. Sandefur, P. D., Peterson, J. W. (1976) Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 14:671-679.
341. Sandefur, P. D., Peterson, J. W. (1977) Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of Chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. *Infect. Immun.* 15(3): 988-992.

342. Sanderson, K. E., Ross, H., Ziegler, L., Mäkelä, P. H. (1972) F⁺, Hfr, and F' strains of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella abony*. Bacteriol. Rev. 36:608-637.
343. Sanyal, D., Douglas, T., Roberts, R. (1997) *Salmonella* infection acquired from reptilian pets. Arch. Dis. Child. 77:345-346.
344. Scherburne, C. K., Lawley, T. D., Glimour, M. W., Blattner, F. R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D. J., Taylor, D. E. (2000) The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. Nucleic Acids Res. 28:2177-2186.
345. Schmid, H., Hächler, H., Stephan, R., Baumgartner, A., Boubaker, K. (2008) Outbreak of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Switzerland, May – June 2008, implications for production and control of meat preparations. Euro Surveill. 13:705-708.
346. Schneitz, C., Mead, G. Competitive exclusion. W: *Salmonella* in Domestic animals, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 301-322.
347. Schröter, M., Roggentin, P., Hofmann, J., Speicher, A., Laufs, R., Mack, D. (2004) Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (serogroup IIIb): a prospective study. Appl. Environ. Microbiol. 70:613-615.
348. Sharma, A., Qadri, A. (2004) Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. PNAS. 101:17492-17497.
349. Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P., Lovley, D. R. (2004) Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 70:2959-2965.
350. Shinnick, T. M., Sweetser, D., Thole, J., van Embden, J., Young, R. A. (1987) The etiology agents of leprosy and tuberculosis share an immunoreactive protein antigen with the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 55:1932-1935.
351. Sickenga, F. N. Transmission of salmonellae and pathogenesis of salmonellosis in man. W: The world problem of salmonellosis, Hague, E. Van Oye, Dr. W. Junk Publishers, 1964, str. 205-232.
352. Slauch, J. M. Genetic Analysis of Bacterial Pathogenesis. W: Molecular paradigms of infectious disease. A bacterial perspective, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 1-33.
353. Soll, D. R., Lockhart, S. R., Pujol, C. Laboratory procedure for the epidemiological analysis of microorganisms. W: Manual of clinical microbiology, wyd.

- 8, USA, P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, ASM Press Washington, C.D., 2003, str. 139-161.
354. Steffen, R., Rickenbach, M., Wilhelm, U., Helmonger, A., Schar, M. (1987) Health problems after travel to developing countries. *J. Infect. Dis.* 156:84-91.
355. Stebbins, C. E., Galan, J. E. (2000) Modulation of host signaling by bacterial mimic; Structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Mol. Cell.* 6:1449-1460.
356. St Luis, M. E., Morse, D. L., Potter, M. E. et al. (1988) The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections: new implications for the the control of salmonellosis. *JAMA.* 259:2103-2107.
357. Streyer, L. (I) Fałdowanie się białek. W: *Biochemia*, Warszawa, przekład zbiorowy pod redakcją Jacka Augustyniaka i Jana Michejdy z 4 wydania amerykańskiego, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997, str. 444-470.
358. Streyer, L. (II) Kierowanie białek. W: *Biochemia*, Warszawa, przekład zbiorowy pod redakcją Jacka Augustyniaka i Jana Michejdy z 4 wydania amerykańskiego, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997, str. 968-1006.
359. Szewczyk, S., Summwr, D. F. Efficient elution of purified proteins from polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon) after transfer from SDS-PAGE and their use as immunogenes. W: *Immunolchemical protocols, Methods in molecular biology*, vol. 10, Totowa, NJ, M. Manson, The Humana, 1992, str. 7-12.
360. Szpakiewicz, W., Zalewska-Schonthaler, N., Bąk, J. (1981) Badania nad salmonelozą kaczek niosek na terenie województwa suwalskiego w latach 1977 – 1980. *Medycyna Wet.* 37:528-530.
361. Szu, S. C., Li, X. R., Stone, A. L., Robbins, J. B. (1991) Relation between structure and immunologic properties of Vi capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 59:4555-4561.
362. Szych, J., Gierczyński, R., Wardak, S., Cieślik, A. (2005) Występowanie i charakterystyka szczepów opornych na antybiotyki oksy-imino-betalaktamowe wśród szczepów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolowanych w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 57:115-130.
363. Tang, S-W., Abubakar, S., Devi, S., Puthucheary, S., Pang, T. (1997) Induction and characterization of heat shock proteins of *Salmonella typhi* and their reactivity with sera from patients with typhoid fever. *Infect. Immun.* 65: 2983-2986.
364. Tezcan-Merdol, D., Ygberg, S. E., Rhen, M. The *Salmonella enterica* virulence plasmid and the *spv* gene cluster. W: *Salmonella. Molecular biology and pathogenesis*, Norfolk UK, M. Rhen, D. Maskel, P. Mastroeni, J. Threlfall, Horizon Bioscience, 2007, str. 89-103.
365. Thompson, R. B., Miller, J. M. Specimen collection, transport and proceeding: Bacteriology. W: *Manual of clinical microbiology*, wyd. 8, USA, P. R. Murray,

- E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Yolken, ASM Press Washington, C.D., 2003, str. 286-330.
366. Thomson, N., Baker, S., Pickard, D., Fokes, M., Anjum, M., Hamlin, N., Wain, J., House, D., Bhutta, Z., Chan, K., Falkow, S., Parkhill, J., Woodward, M., Ivens, A., Dougan, G. (2004) The role of prophage-like elements in diversity of *Salmonella enterica* serovars. *J. Mol. Biol.* 339:279-300.
367. Thorns, C. J., Woodward, M. J. *Fimbriae of Salmonella*. W: *Salmonella in Domestic animals*, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 35-55.
368. Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., Euzéby, J. P. (2005) Taxonomic note. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:521-524.
369. Todd, M. J., Viitanen, P. V., Lorimer, G. H. (1994) Dynamics of the chaperonin ATPase: implications for facilitated protein folding. *Science* 265:659-666.
370. Tokarska-Pietrzak, E., Kunikowska, D., Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R. (2007) Typowanie bakteriofagowe w diagnostyce *Salmonella* Enteritidis. Konferencja Naukowa „Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią, Gdańsk 2007”. Materiały Naukowe Konferencji, P-17, str. 54.
371. Toporowska-Kowalska, E., Kostrzevska, M., Biernacka, E., Plocek, A., Wąsowska-Królikowska, K. (2007) Zakażenia pałeczkami *Salmonella* u dzieci – doświadczenia własne. *Przegl. Gastroenterol.* 2:17-21.
372. Trawińska, B., Gągoł, M., Więch, B. (2008) *Salmonelozы* u zwierząt i ludzi. *Życie Wet.* 83:31-36.
373. Truszczyński, M., Hoszowski, A. (1991) Zapobieganie kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez pałeczki *Salmonella*. *Post. Mikrobiol.* XXX, 1:21-31.
374. Tsang, R. S. W., Wong, A. (1989) Release of Vi antigens from *Salmonella typhi*: implications for virulence and diagnosis. *FEMS Microbiol. Immunol.* 47:437-442.
375. Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D., White, M. R. H. Regulacja transkrypcji u prokariotów. W: *Biologia molekularna. Krótkie wykłady, przekład zbiorowy pod red. J. Augustyniaka i J. Michejdy z oryginału Instant Notes in Molecular Biology*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000, str. 209-220.
376. Urban-Chmiel, R. (2006) Wpływ podwyższonej temperatury na ekspresję białek szoku termicznego (Hsp70) u terenowych szczepów *Mainnheimia haemolytica* serotyp 1. *Medycyna Wet.* 62:801-803.
377. Uzzau, S., Bossi, L., Figuerosa-Bossi, N. (2002) Differential accumulation of *Salmonella* [Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular

- bacteria : correlation with their relative contribution to pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 46:147-156.
378. Van Asten, A. J., van Dijk, J. E. (2005) Distribution of „classic“ virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44:251-259.
379. Vandamme, P. Taxonomy and classification of bacteria. W: *Manual of clinical microbiology*, wyd. 8, USA, P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover, ASM Press Washington, C.D., 2003, str. 271-285.
380. Van Duijkeren, E., Wannet, W. J. B., Houwers, D. J., van Pelt, W. (2002) Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chicken in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.* 11:3980-3985.
381. Van Duynhoven, Y. T., Widowson, M. A., de Jager, C. M. et al. (2002) *Salmonella enteric* serotype Enteritidis phage type 4b outbreak associated with bean sprouts. *Emerg. Infect. Dis.* 8:440-443.
382. Validation list N° 102. (2005) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:547-549.
383. Venner, T. J., Singh, B., Gupta, R. S. (1990) Nucleotide sequences and novel structural features of human and Chinese hamster hsp60 (chaperonin) gene families. *DNA Cell Biol.* 9:545-552.
384. Viitanen, P. V., Lorimer, G. H., Seetharam, R., Gupta, R. S., Oppenheim, J., Thomas, L. O., Cowan, N. J. (1992) Mammalian mitochondrial chaperonin 60 functions as a single toroidal ring. *J. Biol. Chem.* 267:695-698.
385. Virella, G., Schmidt, M. G. Pałeczki Gram-ujemne II: *Enterobacteriaceae* i inne enteropatogenne pałeczki Gram-ujemne. W: *Mikrobiologia i choroby zakażne*, Wrocław, G. Virella, wyd. 1 polskie pod red. P. B. Heczko, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, 2000, str. 161-179.
386. Virlogeux-Payant, I., Popoff, M. Y. (1996) The Vi antigen of *Salmonella typhi*. *Bull. Inst. Pasteur* 94:237-250.
387. Virlogeux-Payant, I., Mompert, F., Velge, P., Bottreau, E., Pardon, P. (2003) Low persistence of a large-plasmid-cured variant *Salmonella enteritidis* in ceca of chicks. *Avian Dis.* 47:163-168.
388. Vollard, A. M., Ali, S., van Asten, H. A., Widjaja, S., Visser, L. G., Surjadi, C., van Dissel, J. T. (2004) Risk factors for typhoid and paratyphoid fever in Jakarta, Indonesia. *JAMA.* 291:2607-2615.
389. Wain, J., Diem Nga, L. T., Kidgell, C., James, K., Fortune, S., To Song Diep, Ali, T., Ó Gaora, P., Parry, C., Parkhill, J., Farrar, J., White, N. J. i Dougan, G. (2003) Molecular analysis of incHII antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2732-2739.

390. Wallis, T. S. Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 57-88.
391. Waltman, W. D. Methods for the cultural isolation of *Salmonella*. W: *Salmonella* in Domestic animals, New York USA, C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, 2000, str. 355-372.
392. Wang, L., Andrianopoulos, K., Liu, D., Popoff, M. Y., Reeves, P. R. (2002) Extensive variation on the O-antigen gene cluster within one *Salmonella enterica* serogroup reveals an unexpected complex history. *J. Bacteriol.* 184:1669-1677.
393. Ward, L. R., de Sa, J. D., Rowe, B. (1987) A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* 106:291-294.
394. Waterman, S. H., Juarez, G., Carr, S. J., Kilman, L. (1990) *Salmonella arizona* infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine. *AJPH* 80:286-289.
395. Wattiau, P., Weijers, T., Andreoliu, P., Schilker, C., Vander Veken, H., Maas, H. M. E., Verbruggen, A. J., Heck, M. E. O. C., Wannet, W. J., Imberechts, H., Vos, P. (2008) Evaluation of the Premi®Test *Salmonella*, a commercial low-density DNA microarray system intended for routine identification and typing of *Salmonella enterica*. *Int. J. Food Microbiol.* 123:293-298.
396. Wattiau, P., Van Hessche, M., Schlicker, C., Vander Veken, H., Imberechts, H. (2008) Comparison of classical serotyping and PremiTest assay for routine identification of common *Salmonella enterica* serovars. *J. Clin. Microbiol.* 12:4037-4040.
397. Weber, F., Keppel, F., Georgopoulos, C., Hayer-Hartl, M. K., Hartl, F. U. (1998) The oligomeric structure of GroEL/GroES is required for biologically significant chaperonin function in protein folding. *Nature Struct. Biol.* 5: 977-985.
398. Wegner, Z., Kruminis-Łozowska, W., Lalko J., Bonin, I., Michalik, D., Dera, B., Jankowska-Gan, E., Arendarczyk, W. (1979) Study on the presence of *Salmonella* and other pathogenic bacteria in cockroaches on ocean-going ships. I. Basis investigations on isolation of bacterial strains from *Blattella germanica* (L.). *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia.* 30:59-67.
399. Wick, G., Xu, Q. (1999) Atherosclerosis – An autoimmune disease. *Exp. Gerontol.* 34:559-566.
400. Wick, G. (2000) Atherosclerosis – an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. *Herz.* 2:87-90.
401. Wigley, P., Barrow, P., Villarreal-Ramos, B. Immunity to *Salmonella* in domestic (food animal) species. W: *Salmonella* infections. Clinical, immunological and molecular aspects, wyd. 1, UK, P. Mastroeni, D. Maskell, Cambridge University Press, 2006, str. 299-321.

402. Wong, R. S. Y., Chow, A. W. (2002) Identification of enteric pathogens by heat shock protein 60 kDa (Hsp60) gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 206:107-113.
403. World Health Organization, (1972) *Salmonella* Surveillance other than *S. typhi* and *S. paratyphi* 1970. *Wkly Epidem. Rec.* 43:405-414.
404. World Health Organization *Salmonella* Surveillance, Reports received from Centres participating in the WHO Programme, 1982, 1984, 1985 (prepared by Rowe, B.)
405. World Health Organization Global Salm-Surv (GSS) Country Databank. http://thor.dfvf.dk/portal/page?_pageid=53,1&_dad=portal&_schema=PORTAL
406. Wolf, J. K., Goldberg, J. B. Bacterial cell walls. W: Molecular paradigms of infectious diseases. A bacterial perspective, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 176-206.
407. Wolska, K. I. Ekspresja genów. W: Biologia molekularna bakterii, wyd. 1, Warszawa, pod red. J. Baj i Z. Markiewicz, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2006, str. 304-364.
408. Woodward, M. J., McLaren, I., Wray, C. (1989) Distribution of virulence plasmids within salmonellae. *J. General Microbiol.* 135:503-511.
409. Wysocki, J., Dera-Tomaszewska, B., Głońska, R. (2000) Purification of Hsp60 protein of *Salmonella* Enteritidis. Międzynarodowa Konferencja Naukowa "EFIS 2000. Satellite Symposium. Infectious Immunity & Vaccines". Kazimierz Dolny n. Wisłą, September 21-22. Materiały Naukowe Konferencji, Selected oral presentations, str. 22.
410. Wysocki, J., Dera-Tomaszewska, B., Tokarska-Pietrzak, E., Strzałkowski, L., Głońska, R. Agglutination assays and ELISA for detecting egg yolk antibodies in flocks naturally infected with *Salmonella* Enteritidis. (2002) *Vet. Rec.* 151:304-305.
411. Wysocki, J., Karawajczyk, B., Górski, J., Korzeniowski, A., Maćkiewicz, Z., Kupryszewski, G., Głońska, R. (2002) Human heat shock protein 60 (409-424) fragment is recognized by serum antibodies of patients with acute coronary syndromes. *Cardiovasc. Pathol.* 11:238-243.
412. Xu, Q. (2001) Heat shock proteins and atherosclerosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 31:283-284.
413. Załęska, H., Teisseyre, T., Janczura, E. Podłoża i pożywki dla drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae*. W: Pożywki Bakteriologiczne. Skład i przygotowanie. Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, Wydawnictwa Metodyczne Państwowego Zakładu Higieny, Dział: Bakteriologia, Zeszyt Nr 5, 1969, Nr 3 (22), str. 82-110.

-
414. Zeng, H., Carlson, A. Q., Guo, Y., Yu, Y., Collier-Hyams, L.S., Madara, J. M., Gewirtz, A. T., Neish, A. S. (2003) Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J. Immunol.* 171:3668-3674.
415. Zhang, X. L., Morris, C., Hackett, J. (1997) Molecular cloning, nucleotide sequence, and function of a site-specific recombinase encoded in the major "pathogenicity islands" of *Salmonella typhi*. *Gene.* 202:139-146.
416. Zhang, H., Kaur, I., Niesel, D. W., Seetharamaiah, G. S., Peterson, J. W., Prabhakar, B. S., Klimpel, G. R. II (1997) Lipoprotein from *Yersinia enterocolitica* contains epitopes that cross-react with the human thyrotropin receptor. *J. Immunol.* 158:1976-1983.
417. Zholudev, A., Zurakowski, D., Young, W., Leichtner, A., Bousvaros, A. (2004) Serologic testing with ANCA, ASCA, and antui-OMPC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: siagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* 99:2235-2241.
418. Zhou, D. Bacterial invasion into non-phagocytic cells. W: Molecular paradigms of infectious diseases. A bacterial perspective, New York USA, C. A. Nickerson, M. J. Schurr, Springer, 2006, str. 247-273.
419. Zlacka, D., Velek, J., Vavrincova, P., Hromadnikova, I. (2007) Antibodies against *M. Bovis* 65 kDa heat shock protein and its P180-188 epitope in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Int. J. of Biomed. Sci.* 3:185-193.
420. Zügel, U., Kaufmann, S.H.E. (1999) Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:19-39.

8. STRESZCZENIE

Bakterie z rodzaju *Salmonella* zajmują w mikrobiologii szczególną pozycję, zarówno z teoretycznego, jak i praktycznego punktu widzenia. Osobliwością tej najliczniejszej wśród bakterii grupy systematycznej jest bogactwo struktur antygenowych, umożliwiające rozróżnienie w jej obrębie 2 579 serowarów, do których stale przybywają nowo odkrywane typy serologiczne. Różnice struktury antygenowej są głównym, choć nie jedynym, kryterium różnicowania szczepów w obrębie rodzaju *Salmonella*. Różnorodna wrażliwość na bakteriofagi, różnice w zakresie aktywności biochemicznej w stosunku do niektórych substratów dostarczają dalszych możliwości podziału serotypów i wykrywania w ich obrębie różnic jeszcze bardziej subtelnych, przyczyniając się do dokładniejszej identyfikacji ognisk zakażeń. Mimo coraz lepszego poznawania różnych właściwości biologicznych pałeczek z rodzaju *Salmonella*, szczegółowo opisanych we wstępie do niniejszej pracy, ich patogenna rola jaką odgrywają w środowisku ludzi i zwierząt nie tylko nie malała lecz przez wiele lat wykazywała stały wzrost. Chociaż dur brzuszny i dury rzekome należą obecnie do chorób zdecydowanie rzadziej występujących, rozpowszechnienie salmoneloz wywołanych przez różne inne serowary stanowi ciągle problem pierwszorzędnej wagi. Koordynowana od wielu lat przez Światową Organizację Zdrowia akcja zwalczania salmoneloz wymaga przede wszystkim możliwie dokładnego rozeznania w aktualnym obrazie rozprzestrzenienia się poszczególnych przedstawicieli rodzaju *Salmonella* w poszczególnych krajach na wszystkich kontynentach, co pociąga za sobą potrzebę przeprowadzania ścisłych okresowych analiz epidemiologicznych. Liczby rejestrowanych przypadków zakażeń *Salmonella* przedstawia się zwykle w postaci pewnych stałych wskaźników, często ogólnie dostępnych w różnych bazach danych. Założeniem niniejszej pracy była chęć przedstawienia pałeczek *Salmonella* występujących w Polsce w sposób mniej konwencjonalny, pozwalający na uzyskanie unikalnych danych epidemiologicznych, poprzez prezentację wszystkich izolowanych typów serologicznych, w tym nowo pojawiających się w kraju, o których zwykle wiadomo niewiele. W różnego rodzaju opracowaniach epidemiologicznych ujmowane są one zazwyczaj łącznie w pozycji „inne” lub „pozostałe”. Szczególną uwagę poświęcono również bakteriom *Salmonella* Enteritidis. Ze względu na pandemiczny charakter ekspansji stanowią one swoistego rodzaju fenomen na skalę światową. W Polsce, już od dawna, serowar ten jest wśród pałeczek *Salmonella* epidemicznym „numerem jeden”. W ciągu ostatnich 25 lat (1983 – 2007) zajmował niezmiennie pierwsze miejsce wśród serowarów najczęściej izolowanych od ludzi w Polsce, przy jednocześnie zmieniającej się dystrybucji pozostałych serowarów. W niniejszej pracy dokonano szczegółowej charakterystyki epidemiologicznej pałeczek *S. Enteritidis* poprzez prezentację liczb zakażeń spowodowanych tym serowarem rejestrowanych w Polsce w kolejnych latach począwszy od 1957 roku, poprzez typy bakteriofagowe oraz jeden z jego czynników wirulecji, jakim okazało się być białko szoku termicznego Hsp60. Przy formułowaniu

celów pracy wzięto również pod uwagę fakt obowiązku monitorowania salmonelozy na każdym szczeblu nadzoru, prowadzonego również przez Krajowy Ośrodek *Salmonella*. Nadzór epidemiologiczny oparty na wynikach rutynowych badań prowadzonych w różnych laboratoriach dostarcza informacji pozwalających na ocenę aktualnej sytuacji epidemiologicznej, niezbędnych do podejmowania odpowiednich akcji przeciwepidemicznych oraz dla planowania zapobieganiu chorobom i ich zwalczanie. Obowiązek monitorowania obejmuje zbieranie, przechowywanie, analizowanie, opracowywanie i rozpowszechnianie danych dotyczących występowania salmonelozy i jej czynników chorobotwórczych, w szeroko pojętym zakresie takich działań, których wynikiem, między innymi, jest również niniejsza praca.

Przedstawione w pracy, wyniki badań referencyjnych przeprowadzonych w Krajowym Ośrodku *Salmonella*, choć nie dotyczą wszystkich szczepów *Salmonella* izolowanych w całej Polsce, pozwalają jednak wstępnie oszacować sytuację epidemiologiczną w naszym kraju, śledzić pojawianie się nowych serowarów *Salmonella* oraz odpowiedzieć na pytanie, które serowary *Salmonella* sprawiają największe trudności diagnostyczne polskim laboratoriom. Badaniu poddano 2 038 szczepów otrzymanych przez Krajowy Ośrodek *Salmonella* w latach 1995 – 2007, wyizolowanych w Polsce z materiałów różnego pochodzenia. Rozpoznano ogółem 145 typów serologicznych w tym 52, które pojawiły się w kraju po raz pierwszy. Jeden spośród z nich okazał się zupełnie nowym, nie znanym jeszcze wariantem serologicznym, prezentującym formułę antygenową, która do tej pory nie występowała nigdzie na świecie. Tożsamość nowo „odkrytego” serowaru potwierdziły, między innymi w celu walidacji, badania przeprowadzone przez WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (Instytut Pasteur, Paryż, Francja) oraz przez dwa inne ośrodki referencyjne: Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg, Niemcy) i Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA). Zgodnie z obowiązującą procedurą, walidacji nowych serowarów *Salmonella* dokonuje WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* we współpracy z wyżej wymienionymi ośrodkami. Zgodność wyników badań identyfikacyjnych przeprowadzonych w tych trzech laboratoriach zatwierdza dany typ serologiczny jako nowy. Serowar *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (48:k:z₅₇) wyizolowany i określony w Polsce w 2007 roku, uznano za nowy. Ten trzeci już serowar „odkryty” w naszym kraju (po *S. Gdansk* i *S. Lodz*), zostanie uwzględniony w kolejnej, dziesiątej edycji schematu White’a-Kauffmanna-Le Minora.

Wszystkie serowary *Salmonella* wyizolowane po raz pierwszy w Polsce w latach 1995 – 2007, szczegółowo zaprezentowane w niniejszej pracy, należały do gatunku *Salmonella enterica*. Trzydzieści siedem spośród nich wykazało przynależność do podgatunku *enterica* (I), sześć – do podgatunku *salamae* (II), siedem (w tym nowo „odkryty” serowar) – do podgatunku *diarizonae* (IIIb) oraz pojedyncze serowary odpowiednio do podgatunków *houtenae* (IV) i *indica* (VI). Trzynaście spośród nich wyizolowano

wyłącznie od ludzi, 34 z innych źródeł, a w przypadku pięciu serowarów izolacji dokonano zarówno od pacjentów, jak i z innych materiałów. Niepokoi, wykazany w ramach niniejszej pracy, fakt powodowania salmoneloz u ludzi w naszym kraju przez serowary należące do innych podgatunków niż *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, między innymi z podgatunku *salamae*, *diarizonae* i *houtenae*. W ciągu omawianego przedziału czasu wyizolowano sześć takich serowarów, wśród nich cztery nie występujące wcześniej w Polsce. Szczepy z podgatunku *diarizonae*, jak większość jego przedstawicieli, wykazywały zdolność fermentowania laktozy. Można podejrzewać, iż udział takich pałeczek *Salmonella* w powodowaniu zakażeń u ludzi w naszym kraju stanowić może znacznie poważniejszy problem. Stosowanie w oficjalnych procedurach diagnostycznych wyłącznie tradycyjnych podłoży do izolacji bakterii *Salmonella* może być przyczyną nie dostrzegania ich obecności w badanym materiale.

Pojawienie się nowych (zarówno izolowanych po raz pierwszy, jak i zupełnie nowych) typów serologicznych *Salmonella* stwarza zagrożenie przede wszystkim dla ludzi, gdyż istnieje prawdopodobieństwo zakażenia „nieznanymi” dotąd drobnoustrojami, które wcześniej tych zakażeń u nas nie powodowały. Szczególnie niepokojący jest fakt, iż zakażenia te dotyczyły bardzo małych dzieci, głównie niemowląt. Serowary *S. Agbeni*, *S. Galiema*, *S. Lindern*, *S. Salford*, *S. II* (13,22:z₂₉:1,5), *S. IIIb* (38:r:z) i *S. IIIb* (48:k:z₅₃) stanowiły czynnik etiologiczny zakażeń dzieci w przedziale wiekowym od 4 do 13 miesięcy. Niestety w większości przypadków źródło zakażenia było nie ustalone lub jak w przypadku zakażenia pałeczkami *S. Lindern*, domniemane.

Część spośród serowarów *Salmonella* rozpoznanych, w wyniku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, jako czynnik etiologiczny salmonelozy zwierząt, zwłaszcza zwierząt importowanych, pojawia się w Polsce rzadko lub, tak jak w przypadku *S. Alger*, *S. Bardo*, *S. Fischerkietz*, *S. Halle*, *S. Istanbul*, *S. II* (48:d:z₆), *S. IIIb* (35:i:z₆), *S. IIIb* (58:z₅₂:z₃₅), *S. IIIb* (60:z₅₂:z₅₃), *S. IV* (11:z₄,z₂₃:–), wręcz po raz pierwszy i chociaż jest reprezentowana przez pojedyncze egzemplarze szczepów, stanowi jednak potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi zwłaszcza, że nieznaną jest nam ich epidemiologia i możliwości chorobotwórcze. Skażone w znacznym stopniu są także krajowe i importowane pasze oraz komponenty paszowe, takie jak: mieszanki paszowe, mączka mięsna i mięsno-kostna, mączka rybna, mączka zwierzęca czy śruta rzepakowa, sojowa lub słonecznikowa. Jak wykazała autorka tej pracy, izolowano z nich *S. Mbandaka*, *S. Infantis*, *S. Havana*, *S. Muenster* i inne serowary. Pasje i komponenty paszowe stanowiły również źródło izolacji 9 serowarów, których wcześniej nie rejestrowano w Polsce. Serowary *S. Bracknell*, *S. Cannstatt*, *S. Idican*, *S. Kiambu*, *S. Liverpool*, *S. Llandoff*, *S. Oukam*, *S. Telelkebir* i *S. Telhashomer* pojawiły się w kraju po raz pierwszy w latach 1995 – 2007. Biorąc pod uwagę skalę produkcji i sposób żywienia zwierząt łatwo sobie wyobrazić jak ważne jest znaczenie pasz w rozprzestrzenianiu bakterii *Salmonella*.

Nowe serowary powstają w wyniku zmian kombinacji antygenowych, które mogą być spowodowane różnymi czynnikami. Dlatego powinno podejmować się wszelkie

możliwe starania, aby ciągle monitorować występowanie pałeczek *Salmonella* i dystrybucję serowarów, nie tylko epidemicznych, ale również wszystkich pozostałych oraz kontrolować zakażenia przez nie wywoływane, by móc skutecznie im zapobiegać. Pełniejsza wiedza dotycząca występowania różnych serowarów *Salmonella*, w określonym czasie, na danym obszarze, jest istotna z punktu widzenia poszczególnych państw. Ma również ogromne znaczenie międzynarodowe. Wspólne zaangażowanie wszystkich państw na świecie pozwoli na zmniejszenie ryzyka zakażeń tymi bakteriami. Wyniki badań uzyskane w ramach niniejszej pracy stanowią znaczący wkład w te działania.

Jak wynika z przedstawionych przez autorkę analiz, dokonanych na podstawie danych epidemiologicznych opublikowanych przez PZH i GIS, w latach 1995 – 2007 zakażeniu pałeczkami *Salmonella* uległo w Polsce około 380 tysięcy osób, z czego przeszło 73% stanowiły osoby chore. Za ponad 320 tysięcy, to jest około 86% wszystkich bakteriologicznie potwierdzonych przypadków zakażeń *Salmonella* odpowiedzialność ponosiły pałeczki *S. Enteritidis*. Obserwowany w ostatnich latach spadek liczby zakażeń *Salmonella*, mający związek ze zmniejszającą się liczbą zakażeń spowodowanych przez *S. Enteritidis*, świadczy o poprawie stanu sanitarnego naszego kraju. Autorka pracy wykazała statystycznie istotną tendencję spadkową zakażeń *Salmonella* ogółem i zakażeń wywołanych przez pałeczki *S. Enteritidis*. Żadnego z pozostałych serowarów poddanych analizie statystycznej (tj. *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport*, *S. Mbandaka*, *S. Agona*) nie cechowała istotna statystycznie tendencja zmian (wzrostowa bądź spadkowa). Rozkłady w czasie charakteryzujących je współczynników zakażeń wykazują raczej cechy procesu błędzenia losowego. Do poprawy sytuacji epidemiologicznej *Salmonella* w Polsce przyczyniają się skuteczne działania wszystkich instytucji odpowiedzialnych za nadzór, zwalczanie i zapobieganie salmonelozom. Do najczęściej rejestrowanych czynników etiologicznych salmonelozy u ludzi w Polsce w okresie od 1995 do 2007 roku należały następujące serowary: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport* i *S. Mbandaka*. Taka dystrybucja typów serologicznych reprezentatywnych dla całego kraju, znalazła również potwierdzenie wśród szczepów wyizolowanych z materiałów pochodzących od ludzi, będących przedmiotem badań Krajowego Ośrodka *Salmonella*, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy.

Do roku 1994 zarejestrowano w kraju łącznie 158 serowarów *Salmonella*. Rozpoznanie kolejnych 52, w wyniku badań przeprowadzonych w ramach tej pracy, pozwoliło na aktualizację tego wykazu. W Polsce w ciągu ostatnich 50 lat (1957 – 2007) określono ogółem 210 serowarów *Salmonella*. Prawie 70% spośród nich należało do grup serologicznych O:4, O:7, O:8, O:9, O:3,10 i O:13. Każda z pozostałych 24 grup reprezentowana była odpowiednio przez niewielką liczbę (1 – 8) serowarów. Pojawiające się coraz liczniej serowary *Salmonella*, których dotychczas nie izolowano w naszym kraju, mogą stanowić w przyszłości poważny problem społeczny i ekonomiczny. Każdy serowar stanowi potencjalne zagrożenie epidemiczne i w każdej chwili może stać się przyczyną

epidemii. Przygotowany w postaci aneksu do niniejszej pracy, szczegółowy wykaz uwzględniający wzory antygenowe wszystkich serowarów *Salmonella* rozpoznanych do tej pory w Polsce, jest dokumentem referencyjnym, przeznaczonym do celów identyfikacyjnych. Opracowany na podstawie najnowszej, dziewiątej edycji schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora, może stanowić istotną (wręcz rekomendowaną) pomoc w pracy dla wszystkich laboratoriów zajmujących się diagnostyką serologiczną pałeczek *Salmonella* w kraju. Uwzględniono w nim także, w przypisach umieszczonych pod odpowiednimi grupami serologicznymi, informacje o tych serowarach, które dawniej występowały w Polsce, a których nazwy w wyniku modyfikacji schematu zostały z niego usunięte, z jednoczesnym podaniem ich aktualnych odpowiedników. Wykaz ten stanowi również cenne i unikalne w skali kraju źródło danych umożliwiających pogłębienie wiedzy w zakresie epidemiologii pałeczek z rodzaju *Salmonella* występujących w Polsce w ciągu ostatniego półwiecza.

W podsumowaniu przedstawionych wyników prowadzonego w Polsce już od wielu lat typowania bakteriofagowego pałeczek *S. Enteritidis* można stwierdzić, że zakażenia spowodowane tym serowarem, które wystąpiły w naszym kraju w czasie ostatnich pięćdziesięciu lat spowodowały dwie groźne epidemie. Pierwsza z nich była wprawdzie mniejsza liczebnie, ale spowodowała ciężkie schorzenia i śmierć wielu dzieci. Druga natomiast, o łagodniejszym przebiegu i znacznie wydłużona w czasie, objęła wielokrotnie większą liczbę osób i praktycznie trwa do dzisiaj. Obserwowana w ostatnich latach tendencja spadkowa udziału zachorowań wywołanych tym serowarem w ogólnej liczbie zachorowań na salmonelozę w Polsce napawa optymizmem i rokuje na całkowite wygasnięcie tej epidemii. Wyniki typowania fagowego przeprowadzonego w ramach niniejszej pracy dotyczą 750 szczepów *S. Enteritidis* wyizolowanych w Polsce w okresie wygasania (1996 – 2007) trwającej już ponad ćwierć wieku drugiej epidemii spowodowanej tym serowarem. Do najczęściej określanych typów fagowych należą nadal typy: 1, 6 i 7 (według schematu Lalko i wsp.). Dominują one wśród izolacji od ludzi, a także z żywności, od zwierząt, z pasz, wymazów sanitarnych i innych źródeł. Zdecydowanie przeważały szczepy typu 7. Szczepy *S. Enteritidis* typu 1 izolowano prawie w takich samych ilościach jak typu 6. Zaobserwowano również nieco większą liczbę szczepów prezentujących typ fagowy 3 w porównaniu do poprzednich przedziałów czasowych. Trudno jednak nie zauważyć, że przy egzystujących ciągle jeszcze w środowisku tych samych, „stałych” typach bakteriofagowych, zaczynają pojawiać się zupełnie nowe: typ 24, 25, 26 i 27. Izolowano je przede wszystkim od ludzi. Mogą one być wprawdzie wynikiem jednorazowych izolacji, ale mogą również sugerować pojawienie się w kraju nowych, nieznanych jeszcze źródeł zakażeń, co przy skutecznym zwalczaniu obecnie istniejących jest bardzo prawdopodobne. W ciągu 27 lat trwania drugiej epidemii *S. Enteritidis* w Polsce dominującymi typami fagowymi były: typ 1, 6 i 7, z najliczniej izolowanymi szczepami typu 7. Wyniki typowania bakteriofagowego wskazują na pewne powiązanie

pierwszej i drugiej epidemii, przede wszystkim poprzez obecność pałeczek *S. Enteritidis* typu 7. Izolowane podczas pierwszej epidemii w stosunkowo niewielkim procencie wyłącznie od ludzi, zdominowały większość źródeł zakażeń związanych z drugą epidemią, uzyskując również przewagę u ludzi.

Białka szoku termicznego już od wielu lat stanowią temat badań wielu naukowców. Część bakteryjnych białek szoku termicznego jest zarazem antygenem powierzchniowym, przeciwko którym są wytwarzane przeciwciała w procesie odpowiedzi immunologicznej. Wśród nich znajdują się białka klasy GroEL, należące do rodziny białek o masie cząsteczkowej 60 kDa. Jedno spośród tych białek, Hsp60 bakterii *Salmonella* Enteritidis, było przedmiotem badań naukowych prowadzonych w ramach niniejszej pracy. Z uwagi na duży konserwatyzm struktury tych protein istnieje możliwość wystąpienia immunologicznych reakcji krzyżowych między bakteryjnymi białkami szoku cieplnego a ich ludzkim homologiem. W ten sposób jeden ze starszych mechanizmów ochrony komórki przed niekorzystnymi warunkami środowiska staje się przyczyną inicjacji procesu (auto)immunologicznego. Do tej pory niewiele wiadomo na temat białka Hsp60 produkowanego przez pałeczki *Salmonella* Enteritidis i jego ewentualnej roli w procesie infekcyjnym. Pałeczki *Salmonella* Enteritidis stanowią obecnie dominującą przyczynę salmoneloz ludzi i zwierząt, zarówno w Polsce, jak i na świecie. Poważny problem zdrowotny i ekonomiczny związany z tym patogenem był podstawą do przeprowadzenia badań nad rolą białka Hsp60 w zakażeniach spowodowanych pałeczkami *Salmonella* Enteritidis. W oparciu o znane techniki, opracowano własną metodę izolacji i oczyszczania endogenego białka Hsp60 *S. Enteritidis*, uważanego za jeden z czynników wirulencji tych bakterii. Przedstawiona szczegółowo w niniejszej pracy metoda daje bardzo dobre rezultaty. Pozwala na otrzymanie z pełnego preparatu *S. Enteritidis*, uzyskanego za pomocą buforu lizującego Laemmli i sonifikacji, czystego białka o masie cząsteczkowej 58,88 kDa. Uzyskane białko posłużyło między innymi do przeprowadzenia testów immunodetekcyjnych pozwalających na wykazanie podobieństwa immunologicznego pomiędzy białkiem Hsp60 pałeczek *S. Enteritidis* i ludzkim białkiem Hsp60. Stosując metodę ELISA wykazano, że przeciwciała poliklonalne anti-Hsp60 *S. Enteritidis* rozpoznają ludzkie białko Hsp60 i jeden z jego siedmiu syntetycznych fragmentów wykorzystanych do przeprowadzenia badań. Zahamowanie reakcji immunoenzymatycznej poprzez absorpcję surowicy anti-Hsp60 *S. Enteritidis* odpowiednio białkiem Hsp60 *S. Enteritidis*, peptydem Hsp60 (409 – 424) i ludzkim białkiem Hsp60 pozwoliło na wykazanie swoistości reakcji wiązania ludzkiego białka Hsp60 i jego syntetycznego fragmentu (409 – 424) przez przeciwciała anti-Hsp60 *S. Enteritidis* zawarte w surowicy króliczej.

Zaprezentowane w pracy wyniki badań potwierdzają fakt istnienia homologii pomiędzy białkiem Hsp60 *S. Enteritidis* i ludzkim białkiem Hsp60. Wykazano, że jedna ze wspólnych determinant antygenowych dla obu białek zawarta jest w zakresie sekwencji

aminokwasowej wyznaczonej przez syntetyczny peptyd ludzkiego Hsp60 (409 – 424): Thr-Ser-Asp-Val-Glu-Val-Asn-Glu-Lys-Lys-Asp-Arg-Val-Thr-Asp-Ala.

Istnienie w białku bakteryjnym epitopów podobnych strukturalnie do antygenów gospodarza, może indukować przeciwciała przeciw własnym strukturom białkowym. Odpowiedź na antygen bakteryjny może powodować reaktywność autoimmunologiczną i nawet łagodne w przebiegu zakażenie może prowadzić do rozwoju reaktywności krzyżowej, a w konsekwencji do choroby autoimmunologicznej. Metody zastosowane w badaniach wykonanych i przedstawionych w ramach niniejszej pracy pozwoliły jednoznacznie określić, że białko Hsp60 pałeczek *Salmonella* Enteritidis spełnia warunki mimikry. Oznacza to, że białko Hsp60 *S. Enteritidis* może potencjalnie wzbudzać auto-przeciwciała. Uzyskane wyniki stanowią ważny wkład w badania nad białkami szoku termicznego i chorobotwórczością pałeczek *S. Enteritidis*.

9. SUMMARY

Members of the genus *Salmonella* are of great importance in microbiology both from the theoretical as well as practical point of view. The antigenic diversity is a curiosity of this most numerous taxon within bacteria. The antigenic structures of *Salmonella* allowed to differentiate 2579 serovars within genus and new variants will continue to be described. Differences of the antigenic structure is the main, although not only, criterion of strain differentiation within the genus *Salmonella*. The different susceptibility of isolates to selected bacteriophages, differences in the range of their biochemical activity against certain substrates, gave additional possibility for serovars subdividing and finding more subtle differences, which makes the outbreaks identification more accurate. Even though we got to know better the biological characteristics of *Salmonella*, the pathogenic role of these bacteria in the human and animal environment has not only decreased but continuously increased for many years. Although typhoid and paratyphoid fevers are recently noted rather occasionally (except the endemic areas), spreading of *Salmonella* infections caused by other serovars is still a problem of the most importance. The campaign of the elimination of salmonellosis coordinated for years by WHO, first of all requires the precise knowledge about current spreading of the genus *Salmonella* members in the individual countries of all continents. For this reason the accurate, periodically made epidemiological analyses are needed. The numbers of recorded cases of *Salmonella* infections are usually presented in a form of reliable regular rates commonly available in different databases. The main principle of this research work, giving possibility to obtain unique epidemiological data, was the idea to present *Salmonella* occurring in Poland in a less conventional way, through the presentation of all isolated *Salmonella* serovars, including the new ones appearing in our country, especially as about the last not much is usually known. They are rarely presented individually. They are usually taken together and included into different epidemiological reports in a position named "others" or "remaining". The particular attention was also devoted to *Salmonella* Enteritidis serovar. Because of a pandemic nature of these bacteria expansion they are a kind of the world range phenomenon. For many years, *Salmonella* Enteritidis has been the epidemic "number one" among other *Salmonella* serovars occurring in Poland. During the last 25 years (1983 – 2007) this serovar was permanently on the first place within *Salmonella* serovars most often isolated from humans, and at the same time the changes in distribution of other serovars were observed. In this research work, a detailed epidemiological characterization of *Salmonella* Enteritidis bacteria was performed by presenting the numbers of infections caused by this serovar registered in Poland for years since 1957, by phage types and by one of their virulence factors which turned out to be heat shock protein of 60 kDa (Hsp60). The obligation for monitoring of salmonellosis on each level of the control, performed also by the National *Salmonella* Centre, was taken into consideration to formulate the aims of this work. The surveillance based on the

results of routine investigations performed by different laboratories provides information that allows to estimate the current epidemiological situation of *Salmonella*. They are also useful for taking the proper antiepidemic activities and planning the strategy of protection against diseases and to control them. Monitoring includes ongoing systematic collection, storage, analysis, interpretation and the timely dissemination of data associated with occurring of salmonellosis and its virulence factors in a wide range of meaning of such activities, which also result in this research work.

Although the results of reference investigations performed by the National *Salmonella* Centre and presented in this paper are only the part of all *Salmonella* strains isolated in Poland, they allow for preliminary estimation of the epidemiological situation in our country. They also allow to observe the appearance of new *Salmonella* serovars and answer the question which serovars cause the most diagnostic difficulties for Polish laboratories. A total number of 2038 *Salmonella* strains were examined. They were submitted to the National *Salmonella* Centre for reference identification between 1995 – 2007. All of them were isolated in Poland, from human and non-human sources. One hundred and forty five serovars were recognized among the examined strains including fifty two which appeared in our country for the first time. One of them turned out to be a quite new serological variant, not known before. Its antigenic formula was not recognized anywhere in the world yet. Identity of this newly discovered serovar was confirmed, among other things for the validation reason, by the researches performed by the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris, France) and two other reference laboratories: Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg, Germany) and Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA). According to the current procedure the validation of new *Salmonella* serovars should be done at the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* in collaboration with laboratories in Hamburg and Atlanta mentioned above. Serovars are homologated when these three laboratories agree on their validation. Serovar *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (48:k:z₅₇) isolated and defined in Poland in 2007 was confirmed by the above laboratories to be the new one. This third, after *S. Gdansk* and *S. Lodz*, serovar newly discovered in Poland will be included into the next, 10th edition of the White-Kauffmann-Le Minor scheme.

All *Salmonella* serovars isolated for the first time in Poland between 1995 – 2007, presented in detail in this paper, belonged to the species *Salmonella enterica*. Thirty seven of them were assigned to subspecies *enterica* (I), six – to subspecies *salamae* (II), seven (including the new discovered serovar) – to subspecies *diarizonae* (IIIb), one to subspecies *houtenae* (IV) and one to subspecies *indica* (VI). Thirteen of these first isolations were made only from human and 34 only from non-human sources. Five serovars, namely *S. Mississippi*, *S. Hvittingfoss*, *S. Isaszeg*, *S. Lindern* and *S. IV* (11:z₄,z₂₄:-) were isolated from both sources. Unfortunately, human salmonellosis in Poland are also

caused by serovars of subspecies other than *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Members of such subspecies as *salamae*, *diarizonae* and *houtenae* have been responsible for *Salmonella* infection in humans, what was shown in this paper. Six of such serovars, including four of those which did not appear previously in Poland, were isolated during the reported period. Strains of subspecies *diarizonae*, like the majority of its representatives, showed ability to ferment lactose. The participation of such serovars in causing infections of humans in our country may constitute more serious problem than it is suspected. The use of traditional media for *Salmonella* isolation as the only ones in official diagnostic procedures may result in omitting their presence in the examined material.

Appearance of new (in the meaning: occurring for the first time as well as newly discovered) *Salmonella* serological variants constitutes a major hazard, because people are at risk to be infected with microorganisms which are unknown for us, and which have not caused infections in our country yet. The fact that very young children, mainly infants, were involved in these infections, is especially worrisome. Such serovars as *S. Agbeni*, *S. Galiema*, *S. Lindern*, *S. Salford*, *S. II* (13,22:z₂₉:1,5), *S. IIIb* (38:r:z) and *S. IIIb* (48:k:z₅₃) were etiologic agents of infections of children in the 4- to 13-month age range. Unfortunately in great majority of these cases, the source of infection was unknown or assumed only, like it was in *S. Lindern*-caused severe systemic infection (exposure to turtles).

Some of *Salmonella* serovars presented in this paper which were recognized as etiologic agents of animal salmonellosis, especially of imported animals, are rare in Poland. Such serovars as *S. Alger*, *S. Bardo*, *S. Fischerkietz*, *S. Halle*, *S. Istanbul*, *S. II* (48:d:z₆), *S. IIIb* (35:i:z₆), *S. IIIb* (58:z₅₂:z₃₅), *S. IIIb* (60:z₅₂:z₅₃), *S. IV* (11:z₄,z₂₃:-) just occurred for the first time. Although represented by single isolates, they constitute a hazard to human health, the more so that their ecology and pathogenesis of infection have not been completely explained.

Animal feed is a recognized source of pathogenic microorganisms for animals. It is still relatively common to find evidence of contamination of domestic and imported feed and feed ingredients. Recent evidence presented in this paper indicates that a high proportion of both domestic and imported bone meal, meat meal, fish meal, and similar protein supplements used in animal and poultry feeds are contaminated with *Salmonella*. *Salmonella* Mbandaka, *S. Infantis*, *S. Havana*, *S. Muenster* and other serovars were defined in this study within strains isolated from them. The feedstuff and ingredients were also the source of nine *Salmonella* serovars that previously had not been reported in Poland. Serovars *S. Bracknell*, *S. Cannstatt*, *S. Idican*, *S. Kiambu*, *S. Liverpool*, *S. Lladoff*, *S. Oukam*, *S. Teitelkebir* and *S. Telhashomer* appeared for the first time in our country between 1995 and 2007. Taking into consideration the range of animal production and the feeding habits, it is easy to imagine how important in *Salmonella* dissemination the contaminated feeds are.

New *Salmonella* serovars come into existence as a result of changes in antigenic combinations which can be provoked by different factors. Because of that, all possible steps should be taken to monitor the occurrence of *Salmonella* organisms and the frequency of distribution of all serovars, not only the epidemic ones. Measuring trends in serovars over time ought to be done to provide information about the efficacy of prevention and control measures. More complete knowledge of the relative prevalence of different *Salmonella* serovars, by time and place, is of high importance, both from national and international standpoint. Global joint actions and involvement of all countries in this strategy will allow to reduce the risk of *Salmonella* infections. The results of author's research work, presented in this paper, are significant for these activities.

How it appears from the analyses performed by author on the basis of the epidemiological data published by the National Institute of Hygiene and Chief Sanitary Inspectorate, about 380,000 persons were infected with *Salmonella* in Poland for the 13-year period (1995 – 2007). Above 73% of them were symptomatic. *Salmonella* Enteritidis was responsible for more than 320,000 cases, that is about 86% of all culture-confirmed *Salmonella* infections. The decreases in the annual total case counts of *Salmonella* infections observed in the last years reflect the improvement in the sanitary condition of our country. Statistically significant and decreasing trend (1995 – 2007) in *Salmonella* notification rates was revealed by author. The decrease in notification rates associated with *S. Enteritidis* infections was also observed. The decreasing *S. Enteritidis* trend was statistically significant as well. None of the remaining, statistically analyzed serovars (i.e. *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport*, *S. Mbandaka* i *S. Agona*) was found to be significantly increasing or decreasing in frequency over time. The distribution of their notification rates shows rather features of random walk. An improvement in *Salmonella* epidemiological situation observed in Poland is a result of effective actions taken by all institutions responsible for surveillance, control and prevention of salmonellosis. At present, the most frequent etiologic agents of human salmonellosis in Poland are: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Newport* and *S. Mbandaka*. Such distribution of *Salmonella* serovars representative for the whole country was also confirmed by the results presented in this paper. The same serovars were recognized among the strains isolated from human specimens, submitted to the National *Salmonella* Centre for reference identification.

One hundred and fifty eight *Salmonella* serovars were reported in Poland up to the end of 1994. Fifty-two another serovars were isolated during the next 13-year period as a result of this research work, which allowed to update the list. During the last fifty years (1957 – 2007) two hundred and ten *Salmonella* serovars were recognized in Poland. Group O:4 occupied the major part and together with groups O:7, O:8, O:9, O:3,10 and O:13 covered about 70% of these 210 serovars. Each of the 24 remaining groups was represented by several serovars (1 – 8), respectively. More and more numerous appearing *Salmonella* serovars which have not been isolated in our country yet, may become a

serious social and economic problem in the future. Each *Salmonella* serovar means a potential epidemic threat and may cause an epidemic at any time. A detailed list summarizing antigenic formulae of all *Salmonella* serovars recognized in Poland so far was prepared in a form of annex to this paper. The list, worked out on the basis of the newest, 9th edition of the White-Kauffmann-Le Minor scheme is a reference document designated for identification purposes. It can be used (and is recommended to be used) by all laboratories conducting serological diagnostics of *Salmonella* organisms in our country. The list includes also information about these serovars which formerly occurred in Poland and which names were withdrawn from the modified White-Kauffmann-Le Minor scheme. Serovars corresponding to them are indicated. It is also a valuable source of data that allow to broaden our knowledge about epidemiology of *Salmonella* organisms occurring in Poland during the last 50 years.

Basing on the presented results of *S. Enteritidis* phage typing, which has been conducted in Poland for many years, it can be noted that *S. Enteritidis* infections reported in our country during the last fifty years were associated with two serious epidemics. The first epidemic of *S. Enteritidis* was found to be small in the total case counts but more severe. Very serious courses of disease and death of many children were noted. The second one was less severe in course but considerably prolonged in time (virtually, it still exists) and involved much more people. The decreasing trend in participation of this serovar in total case counts of salmonellosis reported in Poland in the last years is buoyant and prognosticates the complete dying out of this epidemic. The results of phage typing carried out as a part of this research work are associated with 750 *S. Enteritidis* strains isolated in Poland between the years 1996 – 2007, in the dying out period of lasting over 25 years second epidemic caused by this serovar. Types 1, 6 and 7 (according to the Lalko et al. scheme) belong to the most often identified phage types. They are dominant among human as well as non-human (food, feeds, animals, environment and others) isolates. The great majority of them were of type 7. Type 1 *S. Enteritidis* strains were isolated in the same number as type 6 strains. Compared with the previous periods of time a little higher number of strains which presented phage type 3 was noted. It is not difficult to notice that except the same permanent phage types continuously existing in the environment, the completely new types become to appear such as 24, 25, 26 and 27. First of all they were isolated from humans. Indeed, they can be an effect of one-time isolations, but they can also suggest an appearance of new, unknown yet sources of *S. Enteritidis* infections in our country, which is very possible as a result of effective elimination of currently existing ones. Phage types 1, 6 and 7 were predominant during 27 years of lasting of the second *S. Enteritidis* epidemic in Poland. The strains of type 7 were the most numerous ones. The results of phage typing indicate that there exists a relationship between the two *S. Enteritidis* epidemics: that *S. Enteritidis* type 7 organisms occur in both. During the first epidemic they were isolated in relatively small per-

centage and only from humans. The great majority of sources of *S. Enteritidis* infections associated with the second epidemic were dominated by them. They were also prevalent in human isolates.

Heat shock proteins (Hsps) constitute a subject of research of many scientists from many years. Some of the bacterial Hsps function as the surface antigens and antibodies against them were produced as a result of immune response. Heat shock proteins of the GroEL class, from the 60 kDa family, belong to this group. One of them, Hsp60 of *S. Enteritidis* became a part of research work performed within this study. Because of highly conserved structures of these proteins, the immune cross-reactivity between bacterial Hsps and their human homologues is possible. In this way, one of the older mechanisms of cell protection against adverse environmental conditions becomes a reason of initiation of (auto)immune process. To this time little is known about Hsp60 produced by *S. Enteritidis* organisms and its possible role in the infectious process. Currently, *S. Enteritidis* is the predominant etiologic agent of human and animal salmonellosis in Poland and in the world. A serious health and economic problem associated with this pathogen was the basis for performing the study to investigate the role of Hsp60 protein in the infections caused by *S. Enteritidis*. Basing on the known techniques, the own method of isolation and purification of endogenous Hsp60 of *S. Enteritidis*, which is suggested to be one of virulence factors of these bacteria, was worked out. This method, presented in detail in this paper, gives very good results. It allows to obtain pure protein of 58.88 kDa from *S. Enteritidis* crude preparation prepared from pelleted cells lysed in the Laemmli buffer and disrupted by sonication. Enzyme-linked immunosorbent assays were used successfully to show that rabbit polyclonal antibodies developed against Hsp60 of *S. Enteritidis* recognize human Hsp60 and one of its seven synthetic peptides used in the study. Specificity of binding was confirmed by inhibition of immunoenzymatic reaction by means of absorption of serum antibodies with the excess amount of a given antigen. The test revealed that human recombinant Hsp60 and synthetic fragment (409 – 424) of human Hsp60 markedly inhibited the binding activity of rabbit anti-*S. Enteritidis* Hsp60 antibodies to the solid phase bound Hsp60 of *S. Enteritidis*.

The results of experimental study presented in this paper confirmed that there is a homology between Hsp60 of *S. Enteritidis* and human Hsp60. It was revealed that one of the common antigenic determinant for both the proteins is determined by the amino acid sequence of human Hsp60 peptide (409 – 424): Thr-Ser-Asp-Val-Glu-Val-Asn-Glu-Lys-Lys-Asp-Arg-Val-Thr-Asp-Ala. Epitopes of bacterial proteins structurally similar to self-antigens present in the host may induce antibodies against self protein structures. An immune response originally triggered by bacterial antigen might induce an autoimmune reactivity and even mild infections are able to cause crossreactive response and, as a consequence, the autoimmune disease. The methods used in the performed study and presented in this paper allow to determine explicitly that Hsp60 of *S. Enteritidis* meets

the requirements of molecular mimicry. It means, that *S. Enteritidis* Hsp60 potentially might induce autoantibodies. Obtained results make a considerable contribution to the research on heat shock proteins and *S. Enteritidis* pathogenicity.

10. ANEKS

Serowary *Salmonella* występujące w Polsce, określone w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w latach 1957–2007¹, przedstawione w oparciu o zmodyfikowany schemat White'a-Kauffmanna-Le Minor² [149], z uwzględnieniem wszystkich zmian w klasyfikacji i nazewnictwie bakterii *Salmonella*

Salmonella serovars isolated in Poland, identified by the National Salmonella Centre between 1957 and 2007¹, presented according to the modified White-Kauffmann-Le Minor² scheme [149] with all changes in classification and nomenclature of genus Salmonella

Wzory antygenowe / Antigenic formulae				
Serowar <i>Serovar</i>	Antygen somatyczny (O) <i>Somatic (O) antigen</i>	Antygen rzęskowy (H) <i>Flagellar (H) antigen</i>		
		Faza 1 <i>Phase 1</i>	Faza 2 <i>Phase 2</i>	Inne <i>Other</i>
Grupa O:2 (A)				
Paratyphi A	1,2,12	a	[1,5]	
Grupa O:4 (B) ^a				
Kisangani	1,4,[5],12	a	1,2	
Bispebjerg	1,4,[5],12	a	e,n,x	
Paratyphi B ^b	1,4,[5],12	b	1,2	[z ₅],[z ₃₃]
Abony	1,4,[5],12,[27]	b	e,n,x	
II	1,4,[5],12,[27]	b	[e,n,x]	
Schleissheim ^c	4,12,27	b	-	
Stanley	1,4,[5],12,[27]	d	1,2	
Schwarzengrund	1,4,12,27	d	1,7	
Duisburg	1,4,12,[27]	d	e,n,z ₁₅	[e,h]
Saintpaul	1,4,[5],12	e,h	1,2	
Reading ^d	1,4,[5],12	e,h	1,5	[R1...]
Chester	1,4,[5],12	e,h	e,n,x	
Sandiego	1,4,[5],12	e,h	e,n,z ₁₅	
Derby	1,4,[5],12	f,g	[1,2]	
Agona	1,4,[5],12	f,g,s	[1,2]	[z ₂₇],[z ₄₅]
Essen	4,12	g,m	-	
Hato	1,4,[5],12	g,m,s	[1,2]	
California	4,12	g,m,t	[z ₆₇]	
Kingston	1,4,[5],12,[27]	g,s,t	[1,2]	[z ₄₃]
Banana	1,4,[5],12	m,t	[1,5]	
Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2	
Agama	4,12	i	1,6	
Ljubliana	4,12, 27	k	e,n,x	
Bredeney	1,4,12, 27	l,v	1,7	[z ₄₀]
Brandenburg	4,[5],12	l,v	e,n,z ₁₅	
Kunduchi	1,4,[5],12,[27]	l,[z ₁₃],[z ₂₈]	1,2	

Heidelberg	<u>1</u> ,4,[5],12	r	1,2
Coeln	<u>1</u> ,4,[5],12	y	1,2
Kiambu	<u>1</u> ,4,12	z	1,5
Indiana	<u>1</u> ,4,12	z	1,7
Stanleyville	<u>1</u> ,4,[5],12,[27]	Z ₄ ,Z ₂₃	[1,2]
Haifa	<u>1</u> ,4,[5],12	Z ₁₀	1,2
Abortusequi	4,12	-	e,n,x

^a Serowary z dawnej grupy B, które występowały w Polsce, a których nazwy zostały usunięte ze schematu: *S. abortusbovis* (obecnie połączony z *S. Abony*), *S. II sofia* (obecnie *S. II 1*,4,[5],12,[27];b:[e,n,x]) . ^b Wariant rozkładający d-winian sodowo-potasowy nazywany jest wariantem Java. ^c Żelatynaza +, dulecytol -. ^d R1...: R-fazy antygeny rzęskowego aglutynujące z surowicami anty-1,2, anty-1,5, anty-1,6, anty-1,7 i nie aglutynujące z surowicami anty-2, anty-5, anty-6, anty-7

Grupa O:7 (C₁)^a

Szczepy z tej grupy mogą być lizogenizowane przez faga 14 (O:6,7 → O:6,7,14). Szczepy takie, umieszczane dawniej w odrębnej grupie C₄^b, obecnie włączono do grupy O:7 (warianty 14⁺ serowarów już w niej istniejących), a ich nazwy zostały wyeliminowane ze schematu

Oslo	6,7, <u>14</u>	a	e,n,x	
Coleypark	6,7, <u>14</u>	a	l,w	
Brazzaville	6,7	b	1,2	
Ohio	6,7, <u>14</u>	b	l,w	[Z ₅₉]
Paratyphi C ^c	6,7,[Vi]	c	1,5	
Choleraesuis ^c	6,7	c	1,5	
Isangi	6,7, <u>14</u>	d	1,5	
Livingstone	6,7, <u>14</u>	d	l,w	
Norwich	6,7	e,h	1,6	
Braenderup	6,7, <u>14</u>	e,h	e,n,z ₁₅	
Rissen	6,7, <u>14</u>	f,g	-	
Montevideo ^d	6,7, <u>14</u>	g,m,[p],s	[1,2,7]	
Oranienburg	6,7, <u>14</u>	m,t	[Z ₅₇]	
Galiema	6,7, <u>14</u>	k	1,2	
Thompson ^e	6,7, <u>14</u>	k	1,5	[R1...]
Singapore	6,7	k	e,n,x	
Concord	6,7	l,v	1,2	
Potsdam	6,7, <u>14</u>	l,v	e,n,z ₁₅	
Gdansk	6,7, <u>14</u>	l,v	Z ₆	
Virchow	6,7, <u>14</u>	r	1,2	
Infantis ^e	6,7, <u>14</u>	r	1,5	[R1...],[Z ₃₇], [Z ₄₅],[Z ₄₉]
Bareilly	6,7, <u>14</u>	y	1,5	
Hartford	6,7	y	e,n,x	Z ₆₇
Oakland	6,7	z	1,6,[7]	
Mbandaka	6,7, <u>14</u>	Z ₁₀	e,n,z ₁₅	[Z ₃₇],[Z ₄₅]
Jerusalem	6,7, <u>14</u>	Z ₁₀	l,w	
Tennessee	6,7, <u>14</u>	Z ₂₉	[1,2,7]	
Lille	6,7, <u>14</u>	Z ₃₈	-	[Z ₈₂]

^a Serowary z dawnej grupy C₁, które występowały w Polsce, a których nazwy zostały usunięte ze schematu: *S. mission* (obecnie połączony z *S. Isangi*). ^b Serowary z dawnej grupy C₄, które występowały w Polsce, a których nazwy zostały usunięte ze schematu: *S. nienstedten*, *S. bornum* (obecnie warianty 14⁺ odpowiednio serowarów *S. Ohio* i *S. Lille*). ^c Serowary różnicowane biochemicznie. ^d Może występować czynnik O:54 uwarunkowany obecnością plazmidu i maskować faktory O:6,7,14. ^e R1...: R-fazy antygeny rzęskowego aglutynujące z surowicami anty-1,2, anty-1,5, anty-1,6, anty-1,7 i nie aglutynujące z surowicami anty-2, anty-5, anty-6, anty-7

Grupa O:8 (C₂ – C₃)

Dawne grupy C₂ (O:6,8) i C₃ (O:8), różniące się tylko obecnością lub brakiem czynnika O:6, zostały połączone w jedną grupę O:8

Tado	8,20	c	z ₆	
Virginia	8	d	1,2	
Muenchen	6,8	d	1,2	[z ₆₇]
Manhattan	6,8	d	1,5	[z ₅₈]
Bardo	8	e,h	1,2	
Newport	6,8,20	e,h	1,2	[z ₆₇],[z ₇₈]
Kottbus	6,8	e,h	1,5	
Tshiongwe	6,8	e,h	e,n,z ₁₅	
Emek	8,20	g,m,s	-	
Yokoe	8,20	m,t	-	
Takoradi	6,8	i	1,5	
Bonariensis	6,8	i	e,n,x	
Kentucky	8,20	i	z ₆	
Haardt	8	k	1,5	
Blockley	6,8	k	1,5	[z ₅₈]
Litchfield	6,8	l,v	1,2	
Manchester	6,8	l,v	1,7	
Breukelen	6,8	l,z ₁₃ ,[z ₂₈]	e,n,z ₁₅	
Hindmarsh	8,20	r	1,5	
Bovismorbificans ^a	6,8,20	r,[i]	1,5	[R1...]
Goldcoast	6,8	r	l,w	
Altona	8,20	r,[i]	z ₆	
Inchpark	6,8	y	1,7	
Chailey	6,8	z ₄ ,z ₂₃	[e,n,z ₁₅]	
Corvallis	8,20	z ₄ ,z ₂₃	[z ₆]	
Albany	8,20	z ₄ ,z ₂₄	-	[z ₄₅]
Istanbul	8	z ₁₀	e,n,x	
Hadar	6,8	z ₁₀	e,n,x	
Glostrup	6,8	z ₁₀	e,n,z ₁₅	
Molade	8,20	z ₁₀	z ₆	

^a R1...: R-fazy antygeny rzęskowego aglutynujące z surowicami anty-1,2, anty-1,5, anty-1,6, anty-1,7 i nie aglutynujące z surowicami anty-2, anty-5, anty-6, anty-7

Grupa O:9 (D₁)^a

Miami ^b	1,9,12	a	1,5
Saarbruecken	1,9,12	a	1,7
Durban	9,12	a	e,n,z ₁₅

II	<u>1</u> ,9,12	b	e,n,x	
Typhi ^c	9,12[Vi]	d	-	[Z ₆₆]
Eastbourne	<u>1</u> ,9,12	e,h	1,5	
Berta	<u>1</u> ,9,12	[f],g,[t]	-	
Enteritidis ^d	<u>1</u> ,9,12	g,m	-	
Blegdam	9,12	g,m,q	-	
Dublin	<u>1</u> ,9,12[Vi]	g,p	-	
Rostock	<u>1</u> ,9,12	g,p,u	-	
Moscow	<u>1</u> ,9,12	g,q	-	
Panama ^e	<u>1</u> ,9,12	l,v	1,5	[R1...]
Kapemba	9,12	l,v	1,7	[Z ₄₀]
Javiana ^e	<u>1</u> ,9,12	l,z ₂₈	1,5	[R1...]
Gallinarum	<u>1</u> ,9,12	-	-	

^a Serowary z dawnej grupy D₁, które występowały w Polsce, a których nazwy usunięto ze schematu: *S. pullorum* (obecnie wariant biochemiczny serowaru *S. Gallinarum*). ^b Jest prototrofem (*S. Sendai* o tym samym wzorze antygenowym jest auksotrofem). ^c Niektóre szczepy (rzadko występujące) mogą posiadać jako fazę 1 antygeny rzęskowego H:j zamiast H:d (delecja 261 nukleotydu w genie *fliC*); niezależnie od tego, mogą również występować (rzadko) szczepy posiadające dodatkową fazę H:z₆₆ uwarunkowaną obecnością genu pochodzenia plazmidowego. ^d Dodatkowo obok faktorów H:g,m, niektóre szczepy mogą posiadać faktory H:p lub H:f lub H:t; wyjątkowo, niektóre szczepy mogą prezentować drugą fazę antygeny rzęskowego H:1,7. ^e R1...: R-fazy antygeny rzęskowego aglutynujące z surowicami anty-1,2, anty-1,5, anty-1,6, anty-1,7 i nie aglutynujące z surowicami anty-2, anty-5, anty-6, anty-7

Grupa O:9,46 (D₂)

Plymouth	9,46	d	z ₆	
India	9,46	l,v	1,5	
Ouakam	9,46	z ₂₉	-	[Z ₄₅]
Fresno	9,46	z ₃₈	-	

Grupa O:3,10 (E₁)^a

Szczepy z tej grupy mogą być lizogenizowane przez faga ε₁₅ (O:3,10 → O:3,15) a następnie przez faga ε₃₄ (O:3,15 → O:3,15,34); w takiej sytuacji faktory O:15 lub O:15,34 zastępują faktor O:10, który przestaje być wykrywalny. Szczepy posiadające antygen somatyczny O:3,15 (dawna grupa E₂) i szczepy z antygenem somatycznym O:3,15,34 (dawna grupa E₃) zostały, wraz ze szczepami O:3,10 zaklasyfikowane do jednej grupy serologicznej nazywanej obecnie grupą O:3,10

Oxford	3,{10}{ <u>15</u> }{ <u>15,34</u> }	a	1,7	
Butantan	3,{10}{ <u>15</u> }{ <u>15,34</u> }	b	1,5	
Onireke	3,10	d	1,7	
Vejele	3,{10}{ <u>15</u> }	e,h	1,2	[Z ₂₇]

Muenster	3, {10} {15} {15,34}	e,h	1,5	[z ₄₈]
Anatum	3, {10} {15} {15,34}	e,h	1,6	[z ₆₄]
Nyborg	3, {10} {15}	e,h	1,7	
Newlands	3, {10} {15,34}	e,h	e,n,x	
Meleagridis	3, {10} {15} {15,34}	e,h	l,w	
Amsterdam	3, {10} {15} {15,34}	g,m,s	-	
Westhampton	3, {10} {15} {15,34}	g,s,t	-	[z ₃₇]
Falkensee	3, {10} {15}	i	e,n,z ₁₅	
Zanzibar	3, {10} {15}	k	1,5	
Nchanga	3, {10} {15}	l,v	1,2	
London	3, {10} {15}	l,v	1,6	
Give	3, {10} {15} {15,34}	l,v	1,7	[d],[z ₇₇]
Uganda	3, {10} {15}	l,z ₁₃	1,5	
Elizabethville	3, {10} {15}	r	1,7	
Weltevreden	3, {10} {15}	r	z ₆	
Orion	3, {10} {15} {15,34}	y	1,5	
Stockholm	3, {10} {15}	y	z ₆	
Lexington	3, {10} {15} {15,34}	z ₁₀	1,5	[z ₄₉]

^a Serowary z dawnej grupy E₂ i E₃, które występowały w Polsce, a których nazwy zostały usunięte ze schematu: *S. rosenthal*, *S. newhaw*, *S. newington*, *S. cambridge*, *S. drypool*, *S. halmstad*, *S. portsmouth*, *S. newbrunswick*, *S. kinhasa*, *S. binza* (obecnie warianty 15⁺ serowarów odpowiednio *S. Butantan*, *S. Muenster*, *S. Anatum*, *S. Meleagridis*, *S. Amsterdam*, *S. Westhampton*, *S. London*, *S. Give*, *S. Uganda*, *S. Orion*) i *S. thomasville* (obecnie wariant 15⁺34⁺ serowaru *S. Orion*)

Grupa O:1,3,19 (E₄)

Liverpool	1,3,19	d	e,n,z ₁₅	
Senftenberg	1,3,19	g,[s],t	-	[z ₂₇],[z ₃₄],[z ₃₇], [z ₄₃],[z ₄₅],[z ₄₆], [z ₈₂]
Cannstatt	1,3,19	m,t	-	
Taksony	1,3,19	i	z ₆	
Westerstede	1,3,19	l,z ₁₃	1,2	
Krefeld	1,3,19	y	l,w	
Llandoff	1,3,19	z ₂₉	[z ₆]	[z ₃₇]
Dessau	1,3,15,19	g,s,t	-	

Grupa O:11 (F)

Adamstua	11	e,h	1,6	
Stendal	11	l,v	1,2	
Rubislaw	11	r	e,n,x	
IV	11	z ₄ ,z ₂₃	-	
Telhashomer	11	z ₁₀	e,n,x	

Grupa O:13 (G)

Grupy, nazywane dawniej G₁ (O:13,22) i G₂ (O:13,23), zostały połączone w jedną grupę O:13

Ibadan	13,22	b	1,5	
Mississippi	<u>1</u> ,13,23	b	1,5	
Bracknell	13,23	b	1,6	
Grumpensis	<u>1</u> ,13,23	d	1,7	
Teitelkebir	13,23	d	e,n,z ₁₅	
Havana	<u>1</u> ,13,23	f,g,[s]	-	[z ₇₉]
Agbeni	<u>1</u> ,13,23	g,m,[s],[t]	-	
Idikan	<u>1</u> ,13,23	i	1,5	
Kedougou	<u>1</u> ,13,23	i	1,w	
Poona	<u>1</u> ,13,22	z	1,6	[z ₄₄],[z ₅₉]
Worthington	<u>1</u> ,13,23	z	1,w	[z ₄₃]
II	13,22	z ₂₉	1,5	
Cubana	<u>1</u> ,13,23	z ₂₉	-	[z ₃₇],[z ₄₃]

Grupa O:6,14 (H)

Heves	6,14,[24]	d	1,5	
Finkenwerder	[1],6,14,[25]	d	1,5	
Lindern	6,14,[24]	d	e,n,x	
Fischerkietz	1,6,14,25	y	e,n,x	
Uzaramo	1,6,14,25	z ₄ ,z ₂₄	-	

Grupa O:16 (I)

Brazil	16	a	1,5	
Hull	16	b	1,2	
Hvittingfoss	16	b	e,n,x	
Yoruba	16	c	1,w	
Gaminara	16	d	1,7	
Salford	16	l,v	e,n,x	

Grupa O:17 (J)

Berlin	17	d	1,5	
--------	----	---	-----	--

Grupa O:18 (K)

Cerro	<u>6</u> , <u>14</u> ,18	z ₄ ,z ₂₃	[1,5]	[z ₄₅],[z ₈₂]
-------	--------------------------	---------------------------------	-------	---------------------------------------

Grupa O:21 (L)				
Minnesota	21	b	e,n,x	[Z ₃₃],[Z ₄₉]
Grupa O:28 (M)				
Halle	28	c	1,7	
Kibusi	28	r	e,n,x	
Pomona	28	y	1,7	[Z ₈₀],[Z ₉₀]
Grupa O:30 (N)				
Urbana	30	b	e,n,x	
Morehead	30	i	1,5	
Grupa O:35 (O)				
Adelaide	35	f,g	- [Z ₂₇]	
Anecho	35	g,s,t	-	
IIIb	35	i	Z ₃₅	
Alachua	35	Z ₄ ,Z ₂₃	-	[Z ₃₇],[Z ₄₅]
Grupa O:38 (P)				
Thiaroye	38	e,h	1,2	
Invernes	38	k	1,6	
Alger	38	l,v	1,2	
IIIb	38	r	z	[Z ₅₇]
Grupa O:40 (R)				
Johannesburg	<u>1</u> ,40	b	e,n,x	
Tilene	<u>1</u> ,40	e,h	1,2	
Grupa O:41 (S)				
II	41	z	1,5	
Waycross	41	Z ₄ ,Z ₂₃	[e,n,Z ₁₅]	
Lodz	41	Z ₂₉	-	
Grupa O:42 (T)				
II	42	b	e,n,x,Z ₁₅	

II	42	g,t	-
Grupa O:43 (U)			
IV	43	Z ₄ ,Z ₂₃	-
Grupa O:45 (W)			
VI	45	a	e,n,x
Suelldorf	45	f,g	-
Grupa O:47 (X)			
II	47	a	1,5
Bergen	47	i	e,n,Z ₁₅
Alexanderplatz	47	Z ₃₈	-

Grupa O:48 (Y)

Dawna grupa O:64 została włączona do grupy O:48. Wykazano identyczność faktora O:64 z podjednostką O:48₄ antygeny somatycznego będącego wyznacznikiem tej grupy

II	48	d	Z ₆
IIIb	48	k	Z ₅₃
IIIb	48	k	Z₅₇
IIIb	48	r	e,n,x,Z ₁₅
IV	48	Z ₄ ,Z ₂₃	-
Isaszeg	48	Z ₁₀	e,n,x

Grupa O:50 (Z)

IIIb	50	k	Z ₅₃
------	----	---	-----------------

Grupa O: 58

IIIb	58	Z ₅₂	Z ₃₅
------	----	-----------------	-----------------

Grupa O:60

IIIb	60	Z ₅₂	Z ₅₃
------	----	-----------------	-----------------

Grupa O:61

IIIb	61	k	1,5,(7)
------	----	---	---------

¹ Nowy serowar wyróżniono czerwoną czcionką; zostanie on uwzględniony w kolejnej, dziesiątej edycji schematu White'a-Kauffmanna-Le Minora

² Objasnienia symboli zastosowanych w schemacie:

_____ = Symbole czynników antygenów somatycznych, których obecność uwarunkowana jest lizogenezacją odpowiednim fagiem (lizogenna konwersja) są podkreślone, np.: 6,14,18. Czynniki te zwykle pojawiają się jako dodatkowe, obok czynników normalnie występujących w szczepach nie posiadających faga (nelizogennych), np.: 6,7 → 6,7,14. Wyjątek stanowią szczepy z grupy O:3,10 (patrz poniżej). Uwzględnione w schemacie czynniki antygenów somatycznych, będące wynikiem lizogennej konwersji (podkreślone), dotyczą tylko tych serowarów, dla których wykazano już ich obecność. Jest bardzo prawdopodobne, że zjawisko lizogennej konwersji może dotyczyć wszystkich serowarów w danej grupie

{ } = W nawiasach klamrowych umieszczono O-czynniki wzajemnie się wykluczające. Dla danego serowaru, czynniki znajdujące się w nawiasach klamrowych nie mogą współistnieć wzajemnie z innymi czynnikami umieszczonymi w nawiasach klamrowych. Obecność niektórych z nich może być uwarunkowana obecnością faga (czynniki wyróżnione poprzez podkreślenie). W grupie O:3,10, czynniki O:15 lub O:15,34, jeżeli są obecne, zastępują czynnik O:10. Aby podkreślić tę ich wyjątkowość zastosowano następujące symbole – O:3,{10}{15}{15,34}

[] = W nawiasach kwadratowych umieszczono niektóre czynniki antygenów rzęskowych, a także czynniki antygenów somatycznych (bez podkreślenia), które mogą występować lub nie, z innych powodów niż lizogenna konwersja, np.: czynnik [5] w grupie O:4 (dawna grupa B). Umieszczenie czynników antygenów rzęskowych w nawiasach kwadratowych oznacza, że wyjątkowo pojawiać się mogą w niektórych szczepach typu dzikiego prezentujących dany serowar. Np.: większość szczepów *Salmonella* Paratyphi A posiada jedną (pierwszą) fazę antygenu rzęskowego H:a. Mogą być również izolowane, wprawdzie niezwykle rzadko, szczepy dwufazowe, z antygenem H:1,5 w fazie drugiej. Stąd antygen [1,5] umieszczono w nawiasie kwadratowym, co oznacza możliwość występowania w naturze dwóch wariantów *Salmonella* Paratyphi A – z antygenem i bez antygenu H:1,5 w drugiej fazie

() = W nawiasach zwykłych prezentowane są czynniki antygenów somatycznych lub rzęskowych słabo aglutynujące z surowicami diagnostycznymi. Np.: czynnik H:k szczepów *S. enterica* subsp. *arizonae*, odpowiadający czynnikowi H:22 bakterii „Arizona”, tworzących dawniej odrębny rodzaj, wykazuje słabą reakcję ze standardową surowicą anty-H:k (wytwarzaną dla szczepów *S. enterica* subsp. *enterica*), ale intensywnie aglutynuje z surowicą poliwalentną anty-H:k

¹ *The new serovar is written in red; it will be described in the next issue of the White-Kauffmann-Le Minor scheme*

² *The following symbols are used in the scheme:*

_____ = *O factors determined by phage conversion are underlined, e.g. 6,14,18. They can be found only if the culture is lysogenized by the corresponding phage. These factors are added to those present in non-converted strain (e.g. 6,7 → 6,7,14) except in group O:3,10 (see below). The underlined factors are mentioned only for these serovars in which they were found. It is possible that such situation may be encountered for all serovars in the same O group*

{ } = *O factors which are placed in curly brackets are exclusive. In a given serovar, factors in curly brackets cannot coexist with other factors in curly brackets. Some of them can be determined by converting phage (underlined). In group O:3,10, factors O:15 or O:15,34, when present, replace factor O:10. This fact is indicating by using the following symbols – O:3,{10}{15}{15,34}*

[] = Certain H factors or O (not underlined) factors that may be present or not without relation to phage conversion are placed in square brackets, e.g. factor [5] of group O:4 (B). When H factors are in square brackets, this means that they are exceptionally found in wild type strains. For example, most strains of *Salmonella Paratyphi A* possess only one phase of H antigen – phase 1 (a). In rare cases, diphasic strains with phase 2 H:1,5 may be isolated. Because of that, H:[1,5] is indicated in square brackets (may be present or absent) in the antigenic formula of this serovar

() = O or H factors enclosed in parentheses are weakly agglutinable. Flagellar antigen factor H:k in *S. enterica* subsp. *arizonae*, is weakly agglutinable by the standard k serum prepared against *S. enterica* subsp. *enterica*, but is normally agglutinable by polyvalent k serum