

## DIAGNOSTYKA SZCZEPÓW *SALMONELLA CHOLERAESUIS* I *SALMONELLA ENTERITIDIS* WYIZOLOWANYCH OD ZWIERZĄT

Jolanta Karakulska<sup>1</sup>, Katarzyna Kopron<sup>2</sup>, Paweł Nawrotek<sup>1</sup>,  
Danuta Czernomysy-Furowicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Akademia Rolnicza w Szczecinie

<sup>2</sup> Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

**Streszczenie.** Oceniano przydatność stosowanych rutynowo w diagnostyce salmonelloz specyficznych markerów fenotypowych oraz wybranych markerów genetycznych do identyfikacji i określenia patogenności szczepów *Salmonella* spp. wyizolowanych od zwierząt. Materiał stanowiło pięć szczepów, wyizolowanych z narządów wewnętrznych świń, gołębi i szynszyli, u których wstępnie rozpoznano salmonellozę. Do izolacji i różnicowania szczepów zastosowano standardowe podłoża diagnostyczne. Identyfikacji serologicznej szczepów dokonano przy użyciu testu lateksowego oraz metodą aglutynacji szkiełkowej. Trzy szczepy wyizolowane od świń zaklasyfikowano jako *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Choleraesuis (6,7:c:1,5, grupa serologiczna C<sub>1</sub>), a dwa szczepy wyizolowane od gołębi i szynszyli jako *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Enteritidis (9:g,m:-, grupa serologiczna D). Do analizy biochemicznej szczepów zastosowano test API oraz podłoża różnicujące. Pomędzy szczepami *Salmonella* Choleraesuis i *Salmonella* Enteritidis wykazano różnice w aktywności biochemicznej wobec 6 substratów. Na podstawie zdolności do wytwarzania siarkowodoru, dwa szczepy *S. Choleraesuis* zaklasyfikowano jako *Salmonella* Choleraesuis var. *america*. Określono wrażliwość szczepów na 20 preparatów przeciwbakteryjnych metodą dyfuzyjno-krażkową. Wszystkie szczepy wykazały oporność na karbenicylinę i cefuroksym oraz zróżnicowane reakcje wobec amoksycyliny oraz gentamycyny. Na pozostałe preparaty szczepy były wrażliwe. W DNA wszystkich szczepów zamplifikowano fragmenty genów: *DNA rep. ori.*, określającego przynależność szczepów do rodzaju *Salmonella* oraz *stn*, *stpA* i *spaO*, kodujących odpowiednio enterotoksynę, cytotoksynę i inwazyję.

**Słowa kluczowe:** budowa antygenowa, patogenność, PCR, preparaty przeciwbakteryjne, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Enteritidis, właściwości biochemiczne

### WSTĘP

Zakażenia i zatrucia pokarmowe wywoływane przez bakterie *Salmonella* spp. to aktualne problemy w medycynie i weterynarii. Zróżnicowanie antygenowe i biochemiczne pałeczek

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr Jolanta Karakulska, Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Akademia Rolnicza w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin, e-mail: kjjm@poczta.onet.pl

*Salmonella* spp. oraz zmienne nasilenie występowania poszczególnych serotypów stwarzają problemy diagnostyczne i utrudniają dochodzenie epidemiologiczne w przebiegu salmonelloz. Obowiązująca taksonomia i nomenklatura rodzaju *Salmonella* wynika z pokrewieństwa genetycznego pomiędzy serotypami [Lindquist 1998, Boroń-Kaczmarek i Furowicz 1999, Brenner i in. 2000, Hoszowski i Wasyl 2000]. Na podstawie analizy genomów oraz profili enzymatycznych wyróżniono podgrupy hybrydazyjne, odpowiadających poszczególnym podgatunkom *S. enterica* i gatunkowi *S. bongori*. Różnicowanie szczepów *Salmonella* spp. w obrębie gatunków i podgatunków opiera się głównie na analizie cech biochemicznych i budowy antygenowej, która umożliwia podział serowarów na 46 grup serologicznych [Boyd i in. 1996, Brenner i in. 2000, Hoszowski i Wasyl 2000]. Obok tradycyjnych procedur badawczych, coraz częściej w diagnostyce szczepów *Salmonella* spp. wykorzystuje się techniki molekularne (głównie PCR), umożliwiające szybką i precyzyjną identyfikację specyficznych markerów genetycznych [Osek 2002, Skwark i in. 2004].

Do głównych czynników zjadliwości pałeczek *Salmonella* należą fimbrie adhezyjne, lipopolisacharyd ściany komórkowej, enterotoksyna i cytotoksyna [Lidacki 1989, Boroń-Kaczmarek i Furowicz 1999].

Wszystkie serowary salmonelli uznaje się za potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi i/lub zwierząt. Zależnie od serowaru i szczepu *Salmonella* spp. stwierdza się wahania stopnia chorobotwórczości oraz swoistość zakażeń różnych gatunków organizmów [Rzedzicki i Kowalska 1995]. Największe znaczenie epidemiologiczne ma podgatunek *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, który obejmuje ponad 1450 odmian serologicznych [Brenner i in. 2000, Rzedzicki i Boś 2001]. Obraz kliniczny choroby, jak również wielkość dawki infekcyjnej, zależą od zjadliwości szczepu oraz od wieku i osobniczej wrażliwości zakażonego organizmu. Dawka zakaźna pałeczkami z rodzaju *Salmonella*, niezbędna do wywołania objawów chorobowych u ludzi i zwierząt, może wynosić w zależności od serotypu  $10^4$ – $10^7$  komórek bakteryjnych [Boroń-Kaczmarek i Furowicz 1999].

Jednym z głównych rezerwuarów szczepów *Salmonella* spp. wśród gatunków hodowlanych są świny. Najczęściej izolowanymi od nich serowarami są: *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium* i *S. Dublin* [Radkowski 1991]. Serowarem dominującym u ptaków, w tym u drobiu jest *Salmonella* Enteritidis, rzadziej przyczyną zakażeń są *S. Gallinarum* i *S. Typhimurium* [Rzedzicki i Boś 2001, Trawińska i in. 2006]. U gołębi, w ponad 95% przypadków, salmonellozy wywołuje *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen, ale ze względów epidemiologicznych znaczenie mają przede wszystkim zakażenia wywołane przez *Salmonella* Enteritidis [Szeleszczuk 2001]. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* u różnych gatunków drobiu i ptaków ozdobnych stanowią istotny problem epizootiologiczny, z uwagi na liczne źródła zakażenia oraz transowarialną drogę szerzenia [Radkowski 1995, Koncicki i in. 2000, Rzedzicki i Boś 2001]. Na podstawie własnych obserwacji ustalono, iż salmonelloza stanowi także poważny problem w hodowli szynszyli. Szczepy z rodzaju *Salmonella* szybko rozprzestrzeniają się drogą transmisji horyzontalnej pomiędzy wrażliwymi organizmami, a często występujące i długotrwałe nosicielstwo sprzyja rozprzestrzenianiu się zakażeń. Źródłem zakażenia są nie tylko nosiciele drobnoustrojów, ale także środowisko do którego przedostają się pałeczki *Salmonella* [Rzedzicki i Boś 2001].

Celem pracy była ocena przydatności stosowanych rutynowo w diagnostyce salmonelloz specyficznych markerów fenotypowych oraz wybranych markerów genetycznych do identyfikacji i określenia patogenności szczepów *Salmonella* spp. wyizolowanych od zwierząt.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiło pięć szczepów z rodzaju *Salmonella*, wyizolowanych z narządów wewnętrznych zwierząt hodowlanych: świń, gołębi i szynszyli. Jeden szczep wyizolowano z płuc kilku padłych loch, u których obserwowano objawy biegunki i zapalenia płuc. Z płuc poza pałeczkami *Salmonella* wyizolowano także pałeczki *Pasteurella multocida*. Dwa kolejne szczepy wyizolowano od padłych prosiąt, pochodzących z dwóch różnych stad, w których wystąpiły objawy salmonellozy u zwierząt. W obu stadach, kliniczne objawy ostrej formy salmonellozy wystąpiły u paru tysięcy prosiąt po odsadzeniu; podczas epidemii odnotowano liczne upadki. Kliniczne objawy salmonellozy obserwowano również w stadzie gołębi. Od kilku osobników z narządów mięsnych wyizolowano pałeczki *Salmonella*. Z kolei w stadzie szynszyli, w którym odnotowano pojedyncze upadki, nie obserwowano żadnych objawów klinicznych choroby. Natomiast sekcyjnie stwierdzono u zwierząt wybroczyny na płucach, z których w czystej kulturze wyizolowano bakterie z rodzaju *Salmonella*.

Do izolacji i różnicowania szczepów zastosowano podłoża wybiórczo-różnicujące: MacConkey Agar, Bismuth Sulphite Agar, Brilliant Green Agar, Hektoen Enteric Agar, Endo Agar Base, Deoxycholate Citrate Agar, Salmonella – Shigella Agar, Lysine Iron Agar, Xylose Lactose Dextrose Agar (Oxoid). Hodowle inkubowano przez 24–48 godzin w 37°C.

Identyfikacji serologicznej szczepów dokonano przy użyciu Kit Test Lateks Salmonella (Biomed) z wieloważnym odczynnikiem lateksowym oraz z odczynnikami jednoważnymi dla grup: B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D i E. Szczepy identyfikowano także metodą aglutynacji szkiełkowej z użyciem surowicy poliwalentnej HM oraz surowic grupowych AO, BO, CO, DO, EO, a także surowic wysyconych skierowanych przeciw komponentom antygenowym: O 6,7, O 7, O 8, O 20, O 9 (Biomed). Antygeny rzęskowe oznaczano metodą aglutynacji szkiełkowej z surowicami skierowanymi przeciw antygenom H: b; i; d; g,m; m; 1,2 1,5 oraz c i 1,5 (Krajowy Ośrodek Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdynia). Oznaczenia serologiczne weryfikowano w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Szczecinie.

Do analizy biochemicznej szczepów zastosowano test API 10S (bioMérieux), podłoża różnicujące: MRVP (Oxoid), Kligler Iron Agar (Oxoid), Oxidative-Fermentative z dodatkiem badanych cukrów i alkoholi (Oxoid), Nutrient Gelatin (Difco), Moeller KCN broth base (bioMérieux), Moeller decarboxylase broth base z dodatkiem aminokwasów (bioMérieux) oraz podłoże z fenyloalaniną, podłoże z malonianem sodu i agar półpłynny do badania ruchliwości drobnoustrojów wg Załęskiej i in. [1973]. Test na aktywność katalazy wykonano z 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Wrażliwość szczepów *Salmonella* spp. na preparaty przeciwbakteryjne określano metodą dyfuzyjno-krażkową, wg zaleceń NCCLS [2002a, 2002b]. Przygotowane w 0,85% roztworze NaCl zawiesiny szczepów, o gęstości 0,5 McFarlanda, posiewano na podłoże Muller-Hinton Agar (Oxoid) przy użyciu wymazówek. Zastosowano krążki z 20 preparatami przeciwbakteryjnymi (Oxoid): ampicyliną, amoksycyliną, amoksycyliną z kwasem klawulanowym, karbenicyliną, cefalotyną (cefalosporyna I gen.), cefuroksymem (cefalosporyna II gen.), ceftriaksonem (cefalosporyna III gen.), imipenemem, gentamycyną, kanamycyną, streptomycyną, tetracykliną, doksycykliną, minocykliną, ciprofloksacyną, enrofloksacyną, norfloksacyną, kortimoksazolem, kolistyną i chloramfenikolem. Inkubację prowadzono przez 18–20 godzin w 35°C.

W celu identyfikacji fragmentów chromosomalnych genów: *DNA rep. ori.* (wyznaczającego miejsce inicjacji replikacji DNA) oraz *stn*, *stpA* i *spaO*, kodujących odpowiednio enterotoksynę, cytotoxynę i inwazyję, zastosowano reakcję PCR. Izolację i oczyszczanie DNA wykonywano w oparciu o protokół oraz odczynniki firmy A&A Biotechnology (Gdynia). Sekwencje starterów dla genu *DNA rep. ori.* zaczerpnięto z pracy Hilla [1996]. Natomiast amplifikację fragmentów genów kodujących enterotoksynę *Stn*, cytotoxynę *StpA* i inwazyję *SpaO* przeprowadzono przy użyciu starterów przedstawionych w opracowaniu Skwark i in. [2004]. Reakcję przeprowadzono w końcowej objętości 20 µL mieszaniny reakcyjnej: woda dejonizowana – 12,99 µL, 10-krotnie stężony bufor do Taq polimery (Fermentas) – 2 µL, 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas) – 1,6 µL, 0,2 mM dNTP (Polygen) – 0,16 µL, startery o stężeniu 10 µM: *ori*<sub>1</sub>/*ori*<sub>2</sub>, *stn*<sub>1</sub>/*stn*<sub>2</sub>, *stp*<sub>1</sub>/*stp*<sub>2</sub> i *spa*<sub>1</sub>/*spa*<sub>2</sub> (DNA-Gdańsk) – 1 µL, 1,25 U Taq polimeraza (Fermentas) – 0,25 µL, DNA – 1 µL. Amplifikację wykonywano w termocyklerze Mastercycler personal (Eppendorf). Zastosowano 30 cykli amplifikacji dla starterów *ori*<sub>1</sub>/*ori*<sub>2</sub> oraz 35 cykli dla starterów *stn*<sub>1</sub>/*stn*<sub>2</sub>, *stp*<sub>1</sub>/*stp*<sub>2</sub> i *spa*<sub>1</sub>/*spa*<sub>2</sub>: wstępna denaturacja – 2 minuty / 95°C, denaturacja – 30 sekund / 93°C, przyłączanie starterów – 45 sekund w 51°C (*ori*<sub>1</sub>/*ori*<sub>2</sub>) lub w 56°C (*stn*<sub>1</sub>/*stn*<sub>2</sub>, *stp*<sub>1</sub>/*stp*<sub>2</sub> i *spa*<sub>1</sub>/*spa*<sub>2</sub>), wydłużanie DNA – 1 minuta (*ori*<sub>1</sub>/*ori*<sub>2</sub>) lub 30 sekund (*stn*<sub>1</sub>/*stn*<sub>2</sub>, *stp*<sub>1</sub>/*stp*<sub>2</sub> i *spa*<sub>1</sub>/*spa*<sub>2</sub>) / 72°C, końcowe wydłużanie DNA w ostatnim cyklu – 2 minuty / 72°C. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w buforze TBE na 2% żelu agarozowym, wybarwionym 1% wodnym roztworem bromku etydyny (22–25°C, 70V, 45 minut). Jako wzorzec mas molekularnych zastosowano marker pUC19DNA/MspI (MBI Fermentas). Żele analizowano w transiluminatorze UV (TL – 1, Biometra), a do dokumentacji wyników wykorzystano aparat BioDov v. 2.10 (Biometra) oraz drukarkę termiczną B/W Video Sprinter SONY-UP-890CE.

## WYNIKI I DISKUSJA

Szczepy *Salmonella* spp. rosły na zastosowanych podłożach wybiórczo-różnicujących w sposób typowy dla rodzaju, w ciągu 24–48-godzinnej inkubacji. Jedynie na podłożu Bismuth Sulphite Agar i *Salmonella* – *Shigella* Agar typowy wzrost hodowli obserwowano dopiero po 48–72 godzinach inkubacji. Serologiczną przynależność analizowanych szczepów do rodzaju *Salmonella* określono na podstawie reakcji aglutynacji z wieloważ-

nym odczynnikiem testu lateksowego oraz poliwalentną surowicą HM. Przy użyciu odczynników jednoważnych testu lateksowego i surowic grupowych trzy szczepy zaklasyfikowano do grupy serologicznej C<sub>1</sub>, a dwa szczepy do grupy serologicznej D (tab. 1). Uzyskane wyniki przynależności szczepów do grup serologicznych, potwierdzono przy pomocy surowic wysyconych, skierowanych przeciw wybranym komponentom antygenowym. Identyfikacji antygenu rzęskowego H u szczepów zaklasyfikowanych do grupy serologicznej C<sub>1</sub>, dokonywano przy użyciu surowic monowalentnych c i 1,5. Z obiema surowicami uzyskano reakcje aglutynacji. Szczegółowej identyfikacji szczepów zaklasyfikowanych do grupy serologicznej D dokonywano przy użyciu surowic H: b; i; d; g,m; m; 1,2; 1,5. Nie stwierdzono u tych szczepów obecności fazy drugiej antygenu rzęskowego H, a reakcja aglutynacji zachodziła tylko z surowicami H: g,m i m. W oparciu o schemat Kauffmana-White'a i wyniki reakcji aglutynacji z surowicami monowalentnymi, zaklasyfikowano szczepy grupy serologicznej C<sub>1</sub> jako *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Choleraesuis, o wzorze antygenowym 6,7:c:1,5, a szczepy należące do grupy serologicznej D jako *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Enteritidis, o wzorze antygenowym 9:g,m:- (tab. 2).

Tabela 1. Identyfikacja serologiczna szczepów *Salmonella* spp. testem lateksowym  
Table 1. Serological identification of *Salmonella* spp. strains using latex test

	<i>Salmonella Choleraesuis</i>		<i>Salmonella Enteritidis</i>	
	źródło izolacji szczepu – source of isolation			
	świnie pigs		gołębnie pigeons	szynszyle chinchillas
	lochy sows	prosięta piglets		
Reakcja z odczynnikiem wieloważnym B-E Reaction with polyvalent serum B-E	+	+	+	+
Reakcja z odczynnikiem jednoważnym Reaction with monovalent serum				
B	-	-	-	-
C	+	+	-	-
C <sub>2</sub>	-	-	-	-
D	-	-	+	+
E	-	-	-	-

„+” – reakcja aglutynacji – positive reaction.

„-” – brak reakcji aglutynacji – negative reaction.

Tabela 2. Identyfikacja serologiczna szczepów *Salmonella* spp. testem aglutynacji szkiełkowej  
 Table 2. Serological identification of *Salmonella* spp. strains using slide agglutination test

	<i>Salmonella</i> Choleraesuis			<i>Salmonella</i> Enteritidis	
	źródło izolacji szczepu – source of isolation				
	świnie pigs			gołębnie pigeons	szynszyle chinchillas
	lochy sows	prosięta piglets			
Autoaglutynacja (3% NaCl) Autoagglutination (3% NaCl)	–	–	–	–	–
Surowica HM HM serum	+	+	+	+	+
Surowice grupowe Anti-group sera					
AO	–	–	–	–	–
BO	–	–	–	–	–
CO	+	+	+	–	–
DO	–	–	–	+	+
EO	–	–	–	–	–
Surowice anty-O Anti-O sera					
6,7	+	+	+	nb	nb
7	+	+	+	nb	nb
8	–	–	–	nb	nb
20	–	–	–	nb	nb
9	nb	nb	nb	+	+
46	nb	nb	nb	–	–
Surowice anty-H Anti-H sera					
Faza 1 Phase 1					
c	+	+	+	nb	nb
b	nb	nb	nb	–	–
i	nb	nb	nb	–	–
d	nb	nb	nb	–	–
g,m	nb	nb	nb	+	+
m	nb	nb	nb	+	+
Faza 2 Phase 2					
1,5	+	+	+	–	–
1,2	nb	nb	nb	–	–

„+” – reakcja aglutynacji – positive reaction.

„–” – brak reakcji aglutynacji – negative reaction.

nb – nie badano – not examine.

Wszystkie badane szczepy *Salmonella* spp. charakteryzowały się typowymi dla rodzaju właściwościami biochemicznymi. Pomiedzy szczepami *Salmonella* Choleraesuis i *Salmonella* Enteritidis wykazano różnice w aktywności biochemicznej wobec arabinozy, trehalozy, glicerolu, dulcytolu, sorbitolu i zdolności do wykorzystania cytrynianów jako źródło węgla. Wśród szczepów reprezentujących serowar *S. Choleraesuis* cechą różnicującą była zdolność do wytwarzania siarkowodoru. Brakiem tej zdolności cechowały się dwa szczepy wyizolowane od prosiąt, zaklasyfikowane na tej podstawie do serowaru *Salmonella* Choleraesuis var. america (tab. 3).

Tabela 3. Właściwości biochemiczne szczepów *Salmonella* spp.  
 Table 3. Biochemical properties of *Salmonella* spp. strains

	<i>Salmonella</i> Choleraesuis	<i>Salmonella</i> Choleraesuis var. americana		<i>Salmonella</i> Enteritidis	
	źródło izolacji szczepu – source of isolation				
	lochy sows	świnie pigs		gołębnie pigeons	szynszyle chinchillas
Oksydaza Oxidase	–	–	–	–	–
Katalaza Catalase	+	+	+	+	+
ONPG	–	–	–	–	–
MR	+	+	+	+	+
VP	–	–	–	–	–
KCN	–	–	–	–	–
Ureaza Urease	–	–	–	–	–
H <sub>2</sub> S	+	–	–	+	+
Produkcja indolu Indole production	–	–	–	–	–
Ruch Motility	+	+	+	+	+
Cytrynian sodu Sodium citrate	–	–	–	+	+
Żelatyna Gelatin	–	–	–	–	–
Malonian sodu Sodium malonate	–	–	–	–	–
Azotany Nitrates	+	+	+	+	+
Arginina Arginine	–	–	–	–	–
Fenylalanina Phenylalanine	–	–	–	–	–
Lizyna Lysine	+	+	+	+	+
Ornityna Ornithine	+	+	+	+	+
Tryptofan Tryptophane	–	–	–	–	–
Arabinoza Arabinose	–	–	–	+	+
Celobioza Celobiose	–	–	–	–	–
Glukoza Glucose	+	+	+	+	+
Gaz z glukozy Gas production	+	+	+	+	+
Ksyloza Xylose	+	+	+	+	+
Laktoza Lactose	–	–	–	–	–

cd. tab. 3 – Table 3 cont.

Maltoza Maltose	+	+	+	+	+
Mannoza Mannose	+	+	+	+	+
Melezitoza Melesitose	-	-	-	-	-
Rafinoza Raphinose	-	-	-	-	-
Ramnoza Rhamnose	+	+	+	+	+
Sacharoza Sucrose	-	-	-	-	-
Trehaloza Trehalose	-	-	-	+	+
Salicyna Salicin	-	-	-	-	-
Dulcytol Dulcitol	-	-	-	+	+
Glicerol Glycerol	-	-	-	+	+
Mannitol Mannitol	+	+	+	+	+
Sorbitol Sorbitol	-	-	-	+	+

„+” – reakcja aglutynacji – positive reaction.

„-” – brak reakcji aglutynacji – negative reaction.

Wszystkie szczepy *Salmonella* spp. wykazały oporność na 2 preparaty (10%): karbenicylinę i cefuroksym (cefalosporyna II generacji) oraz zróżnicowane reakcje wobec 2 preparatów (10%): amoksycyliny oraz gentamycyny. Na pozostałe preparaty (80%) wszystkie szczepy były wrażliwe (tab. 4). Nie odnotowano różnic we wrażliwości na zastosowanych 20 preparatach wśród szczepów *Salmonella Choleraesuis*. Natomiast szczepy *Salmonella* Enteritidis wykazywały zróżnicowane reakcje na działanie gentamycyny (tab. 4).

Przy zastosowaniu testu PCR, we wszystkich badanych szczepach zidentyfikowano fragment genomu zdefiniowany jako *DNA rep. ori.*, potwierdzający przynależność szczepów do rodzaju *Salmonella* (rys. 1). Ponadto, we wszystkich szczepach zamplifikowano fragmenty genów *stn*, *stpA*, *spaO*, kodujących odpowiednio: enterotoksynę, cytotoksynę i inwazyję (rys. 1).

Uzyskane wyniki dowodzą przydatności zastosowanych markerów fenotypowych (właściwości morfologiczne i hodowlane, budowa antygenowa, cechy biochemiczne i wrażliwość na preparaty przeciwbakteryjne) oraz genetycznych (geny: *DNA rep. ori.*, *stn*, *stpA*, *spaO*) do identyfikacji, analizy porównawczej i określania zjadliwości szczepów *Salmonella* spp. wyizolowanych od zwierząt. Markery te mogą być wykorzystywane zarówno w rutynowej diagnostyce salmonelloz, jak i dochodzeniach epidemiologicznych.



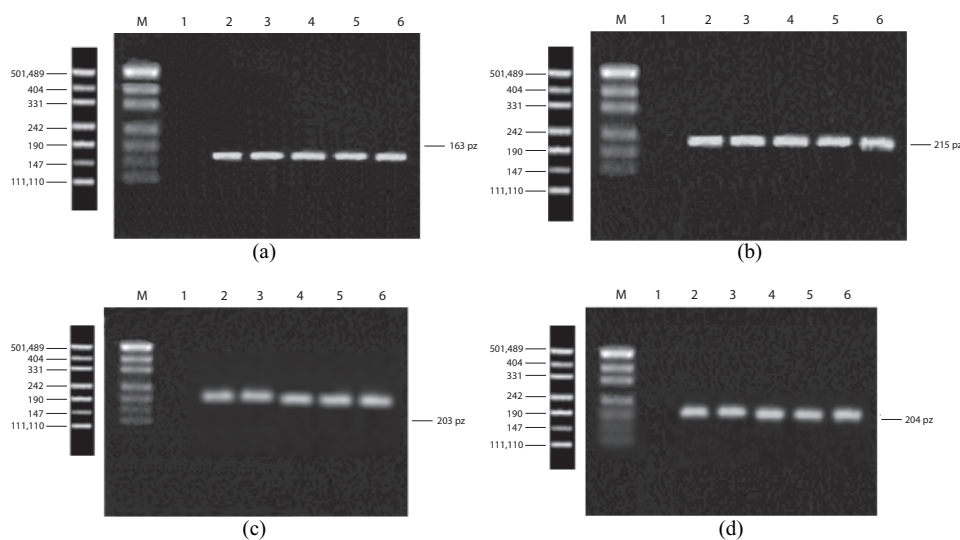
Tabela 4. Wrażliwość szczepów *Salmonella* spp. na preparaty przeciwbakteryjne  
 Table 4. Susceptibility of *Salmonella* spp. strains to antimicrobial agents

	<i>Salmonella</i> Choleraesuis	<i>Salmonella</i> Choleraesuis var. americana		<i>Salmonella</i> Enteritidis	
	źródło izolacji szczepu – source of isolation				
	lochy sows	świnie pigs		gołębie pigeons	szynszyle chinchillas
		prosięta piglets			
Ampicylina Ampicillin	W	W	W	W	W
Amoksycylina Amoxicillin	ŚW	ŚW	ŚW	W	W
Amoksycylina / kwas klaw. Amoxicillin / clav. acid	W	W	W	W	W
Karbenicylina Carbenicillin	O	O	O	O	O
Cefalotyna Cephalothin	W	W	W	W	W
Cefuroksym Cefuroxime	O	O	O	O	O
Ceftriakson Ceftriaxone	W	W	W	W	W
Imipenem Imipenem	W	W	W	W	W
Gentamycyna Gentamicin	W	W	W	O	ŚW
Kanamycyna Kanamycin	W	W	W	W	W
Streptomycyna Streptomycin	W	W	W	W	W
Tetracyklina Tetracycline	W	W	W	W	W
Doksycyklina Doxycycline	W	W	W	W	W
Minocyklina Minocycline	W	W	W	W	W
Cyprofloksacyna Ciprofloxacin	W	W	W	W	W
Enrofloksacyna Enrofloxacin	W	W	W	W	W
Norfloksacyna Norfloxacin	W	W	W	W	W
Sulfametoksazol / trimetoprim Sulphamethoxazole / trimetoprim	W	W	W	W	W
Kolistyna Colistin	W	W	W	W	W
Chloramfenikol Chloramphenicol	W	W	W	W	W

W – wrażliwość – susceptibility.

ŚW – średnia wrażliwość – intermediate.

O – oporność – resistance.



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym zamplifikowanych genów *DNA rep. ori.* (a), *stn* (b), *stpA* (c) i *spaO* (d)

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplified *DNA rep. ori.* (a), *stn* (b), *stpA* (c) and *spaO* (d) genes

Ścieżki: M – marker masy molekularnej (pUC19/MspI), 1 – kontrola negatywna (H<sub>2</sub>O), 2 – *Salmonella Choleraesuis* (izolacja od loch), 3, 4 – *Salmonella Choleraesuis* var. *america* (izolacja od prosiąt), 5 – *Salmonella Enteritidis* (izolacja od gołębi), 6 – *Salmonella Enteritidis* (izolacja od szynszyli).

Lanes: M – DNA molecular mass marker (pUC19/MspI), 1 – negative control (H<sub>2</sub>O), 2 – *Salmonella Choleraesuis* (isolated from sows), 3, 4 – *Salmonella Choleraesuis* var. *america* (isolated from piglets), 5 – *Salmonella Enteritidis* (isolated from pigeons), 6 – *Salmonella Enteritidis* (isolated from chinchillas).

Badane szczepy *Salmonella* spp. wykazywały typowe dla rodzaju właściwości morfologiczne i hodowlane [Hoszowski 1989, Boroń-Kaczmarek i Furowicz 1999]. Najbardziej przydatnymi do izolacji i identyfikacji szczepów były podłoża: Endo Agar Base, Hektoen Enteric Agar i Brilliant Green Agar. Dłuższy czas inkubacji (do 72 godzin) oraz brak intensywnego wzrostu szczepów na podłożach Bismuth Sulfite Agar oraz *Salmonella-Shigella* Agar powodował wydłużenie czasu identyfikacji morfologicznej.

Określenie budowy antygenowej bakterii z rodzaju *Salmonella* umożliwiają metody aglutynacji szkiełkowej z surowicami diagnostycznymi oraz testy lateksowe [Szych i in. 1994]. Typowanie serologiczne pozwala na określenie przynależności gatunkowej oraz na zróżnicowanie podgatunków na serowary. Badania serologiczne uzupełnione o badania biochemiczne umożliwiają z kolei podział serowarów na odmiany biochemiczne, co odgrywa ważną rolę w dochodzeniu epidemiologicznym. Na podstawie badań serologicznych ustalono przynależność 3 szczepów do serowaru *Salmonella Choleraesuis* i 2 szczepów do

serowaru *Salmonella* Enteritidis. Wzory antygenowe szczepów były zgodne z danymi piśmiennictwa [Szych i in. 1994] i zawartymi w schemacie Kauffmanna-White'a. Typowanie serologiczne pałeczek *Salmonella* wykazało różnice między serotypami w swoistości antygenów somatycznych i rzęskowych.

Określenie cech biochemicznych pozwala na ustalenie wzorców aktywności komórkowych enzymów metabolicznych oraz może służyć do identyfikacji niektórych serotypów rodzaju *Salmonella*. Zmienność w ekspresji genów, determinujących określone cechy biochemiczne, będąca wynikiem oddziaływania różnych czynników zewnętrznych, może powodować różnice we właściwościach enzymatycznych między serotypami i w obrębie serotypów [Tarasiuk i Truszczyński 1995]. W niniejszej pracy wykazano taką samą aktywność biochemiczną szczepów *Salmonella* Enteritidis oraz niewielkie zróżnicowanie cech wśród szczepów *Salmonella* Choleraesuis. Na podstawie budowy antygenowej oraz zdolności do wytwarzania siarkowodoru, wśród badanych szczepów *S. Choleraesuis* zidentyfikowano dwa serowary *S. Choleraesuis* var. *america*. Uzyskane wyniki potwierdzają konieczność uzupełniania testów serologicznych badaniami aktywności biochemicznej szczepów *Salmonella* spp.

Według danych piśmiennictwa, szczepy *Salmonella* spp. izolowane od ludzi i zwierząt wykazują w ostatnich latach rosnącą oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki, zależną od przynależności serowarowej i źródła izolacji. Ponadto odnotowuje się coraz częściej oporność tych bakterii na kilka preparatów przeciwbakteryjnych [Jones i in. 2002, Esaki i in. 2004, Su i in. 2004]. Wyniki badań niektórych autorów wskazują na wzrost liczby szczepów *Salmonella* Choleraesuis opornych na ampicylinę streptomycynę, tetracyklinę, fluorochinolony, sulfametoksazol i chloramfenikol [Radkowski 1991, Hoszowski i Wasyl 2000, Małafiej 2000, Chiu i in. 2004, Esaki i in. 2004] oraz szczepów *Salmonella* Enteritidis opornych na erytromycynę, kolistynę, enrofloksacynę i aminoglikozydy, zwłaszcza na streptomycynę [Jones i in. 2002, Esaki i in. 2004]. Badane szczepy *Salmonella* Choleraesuis i *Salmonella* Enteritidis wykazały dużą wrażliwość *in vitro* na preparaty przeciwbakteryjne. Odnotowano wrażliwość wszystkich szczepów na 80% zastosowanych preparatów, w tym na większość antybiotyków  $\beta$ -laktamowych: ampicylinę, amoksyliny z kwasem klawulanowym, cefalotynę, ceftriakson i imipenem oraz na tetracykliny, fluorochinolony, sulfametoksazol, kolistynę i chloramfenikol. Wszystkie szczepy wykazały natomiast oporność na karbenicylinę i cefuroksym, a szczep *Salmonella* Enteritidis wyizolowany od gołębia dodatkowo na gentamycynę.

Czasochłonną konwencjonalną diagnostykę mikrobiologiczną coraz częściej uzupełniają lub zastępują techniki oparte na analizie materiału genetycznego [Salwa i in. 2001, Osek 2002]. Genetycznym markerem rodzaju *Salmonella* jest fragment genomu zdefiniowany jako *DNA rep. ori.* [Hill 1996]. W obrębie genu *DNA rep. ori.* występują wysokokonserwatywne sekwencje nukleotydowe charakterystyczne dla wszystkich bakterii z rodzaju *Salmonella*. U badanych szczepów zidentyfikowano gen *DNA rep. ori.*, co potwierdziło ich przynależność do rodzaju *Salmonella*.

Chorobotwórczy potencjał badanych szczepów określano na podstawie obecności genów *stn*, *stpA*, *spaO*, determinujących odpowiednio syntezę enterotoksyny podobnej do toksyny ST *E. coli*, cytotoksyny podobnej do toksyny ShT *Shigella dysenteriae*, a także

inwazyjnego białka zewnątrz błonowego – inwazyjny, umożliwiającej penetrację do enterocytów. Geny kodujące te czynniki zjadliwości zostały po raz pierwszy zlokalizowane w genomowym DNA kolejno u *S. Typhimurium*, *S. Typhi* i *S. Typhisuis* [Suarez i Rüssmann 1998, Tsolis i in. 1999], ale ich obecność stwierdza się także u innych serotypów *Salmonella*, jak np. *S. Enteritidis* i *S. Dublin* [Groisman i Ochman 1993, Prager i in. 1995, Li i Mustapha 1999]. W genomach analizowanych szczepów *Salmonella Choleraesuis* i *Salmonella Enteritidis* stwierdzono obecność wszystkich analizowanych genów wirulencji. O wystąpieniu infekcji na tle *Salmonella* spp. decyduje nie tylko ich zdolność adhezencji i inwazji do tkanek organizmu ludzkiego i zwierzęcego, ale także produkcja toksyn, powodujących zaburzenia funkcjonalne i procesy degeneracji w komórkach żywiciela. Wykorzystanie w diagnostyce salmonelloz charakterystycznych markerów określających przynależność rodzajową oraz wirulencję izolowanych szczepów może być pomocne w ich wykrywaniu oraz prognozowaniu przebiegu zakażenia i epidemii. Wykrycie genetycznych markerów zjadliwości u badanych szczepów dowiodło ich wysokiej patogenności, odzwierciedleniem której były obserwowane objawy kliniczne, zmiany anatomiczne i liczne upadki zwierząt.

## PIŚMIENNICTWO

- Boroń-Kaczmarek A., Furowicz A.F., 1999. Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową, PZWL, Warszawa.
- Boyd E.F., Wang F.S., Whittam T.S., Selander R.K., 1996. Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 804–808.
- Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B., 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2465–2467.
- Chiu C.-H., Su L.-H., Chu Ch., 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 311–322.
- Esaki H., Morioka A., Ishihara K., Kojima A., Shiroki S., Tamura Y., Takahashi T., 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 266–270.
- Groisman E.A., Ochman H., 1993. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella Typhimurium*. *EMBO J.* 12, 3779–3787.
- Hill W.E., 1996. The polymerase chain reaction applications for the detection for foodborne pathogens. *Clin. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 123–173.
- Hoszowski A., 1989. Wykrywanie pałeczek *Salmonella*. *Med. Weter.* 45, 195–200.
- Hoszowski A., Wasyl D., 2000. Taksonomia i nomenklatura rodzaju *Salmonella*. *Med. Weter.* 56, 75–78.
- Jones Y.E., Chappell S., McLaren I.M., Davies R.H., Wray C., 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals and their environment in England and Wales from 1988 to 1999. *Vet. Rec.* 150, 649–654.
- Koncicki A., Krasnodębska-Depta A., Szewda W., Rumińska-Groda E., Guiro S., 2000. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* u indyków w Polsce. *Med. Weter.* 56, 524–527.

- Li Y., Mustapha A., 1999. Comparison of DNA extraction procedures for rapid detection of *Salmonella* in ground beef and ground chicken by the polymerase chain reaction. Department of Food Science, University of Missouri – Columbia, session 76B–18.
- Lidacki A., 1989. Enterotoksyna pałeczek *Salmonella*. Med. Weter. 45, 286–289.
- Lindquist J., 1998. *Salmonella* – General aspects and nomenclature. <http://www.splammo.net/foodaplmicro/home324.html>.
- Małafiej E., 2000. Antybiotyko profilaktyka w aspekcie zjawiska oporności drobnoustrojów. Prz. Epidemiol. 54, 85.
- NCCLS, 2002 a. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard – second edition. NCCLS document M31-A2. NCCLS 940 West Valley Rad, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19087-1898, 19 (11).
- NCCLS, 2002 b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth International Supplement. NCCLS document M100-S12. NCCLS 940 West Valley Rad, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19087-1898, 22 (1).
- Osek J., 2002. Praktyczne aspekty zastosowania reakcji PCR w diagnostyce mikrobiologicznej. Med. Weter., 58, 251–255.
- Prager R., Fruth A., Tschape H., 1995. *Salmonella* enterotoxin (*stn*) gene is prevalent strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other *Enterobacteriaceae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 12, 47–50.
- Radkowski M., 1991. Nosicielstwo drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella* u świń rzeźnych. Med. Weter. 47, 324–325.
- Radkowski M., 1995. Przeżywalność pałeczek *Salmonella* w jajach. Med. Weter. 51, 507–509.
- Rzedzicki J., Boś M., 2001. Sytuacja epizootyczna patogenów zakażeń pokarmowych (Salmonekozy). Prz. Epidemiol. 55, 5–11.
- Rzedzicki J., Kowalska M., 1995. Metody typowania pałeczek *Salmonella*. Med. Weter. 51, 501–504.
- Salwa A., Przewoski W., Strzałkowski L., Burkiewicz A., 2001. Identyfikacja drobnoustrojów rodzaju *Salmonella* w oparciu o technikę PCR. Med. Weter. 57, 349–353.
- Skwark M., Nawrotek P., Czyżewska I., 2004. The detection and determination of potential virulence of *Salmonella* spp. using PCR method. Pol. J. Vet. Sci. 7, 33–37.
- Su L.-H., Chiu C.-H., Chu Ch., Ou J.T., 2004. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. Clin. Infect. Dis. 39, 546–551.
- Suarez M., Rüssmann H., 1998. Molecular mechanism of *Salmonella* invasion: the type III secretion system of pathogenicity island 1. Int. Microbiol. 1, 197–204.
- Szeleszczuk P., 2001. Diagnostyka, terapia i profilaktyka salmonelozy gołębi. Mag. Weter. 10, 63–66.
- Szych J., Jasielski M., Cieślak A., 1994. Porównawcza ocena zestawów lateksowych Wellcolex Colour *Salmonella* i Lateks *Salmonella* służących do wykrywania i identyfikacji somatycznych antygenów rodzaju *Salmonella*. Med. Dośw. Mikrobiol. 46 (4), 259–276.
- Tarasiuk K., Truszczyński M., 1995. Znaczenie fenotypowych i genotypowych metod klasyfikacji bakterii w epidemiologii i zwalczaniu chorób zakaźnych. Med. Weter. 51, 323–326.
- Trawińska B., Smeja K., Sławomirski J., Saba L., 2006. Mikrobiologiczne zanieczyszczenie surowców drobiarskich w województwie lubelskim w latach 2002–2005. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sect. DD Med. Vet. 24, 365–370.

- Tsolis R.M., Adams G.L., Fight T.A., 1999. Contribution of *Salmonella* Typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* 67, 4879–4885.
- Załęska H., Teisseyre T., Janczara E., 1973. Pożywki bakteriologiczne. PZH, Warszawa.

## DIAGNOSTICS OF *SALMONELLA* CHOLERAESUIS AND *SALMONELLA* ENTERITIDIS STRAINS ISOLATED FROM ANIMALS

**Abstract.** The aim of this study was to define the usefulness of phenotypic determinants used in routine diagnostics and selected genotypic markers for identification and pathogenicity designation of *Salmonella* spp. strains isolated from animals. Five strains isolated from internal organs of pigs, pigeons and chinchillas, in which salmonellosis was initially recognized, were analyzed. Conventional diagnostic media were used for isolation and differentiation of *Salmonella* spp. strains. Serological identification of these strains was done using latex test and slide agglutination method. Three swine isolates were classified as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (6.7:c:1.5. serological group C<sub>1</sub>) and two strains isolated from pigeons and chinchillas as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (9:g.m:-, serological group D). Biochemical features of the strains were analyzed by means of API test and differential media. Differences in biochemical activity to six substrata between *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Enteritidis strains were indicated. Basing on ability to hydrogen sulphide production, two *S. Choleraesuis* strains were classified as *Salmonella* Choleraesuis var. *america*. The susceptibility to 20 antimicrobial agents was carried out by disk diffusion method. Strains revealed resistance to carbenicillin and cefuroxime, variable susceptibility to amoxicillin and gentamicin and phenotypic susceptibility to all other investigated antimicrobials. The *DNA rep. ori.* gene, the specific marker of genus *Salmonella*, as well as *stn*, *stpA* and *spaO* genes that determine production of enterotoxin, cytotoxin and invasine respectively, were identified in all strains using PCR.

**Key words:** antigenic structure, antimicrobial agents, biochemical features, pathogenicity, PCR, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Enteritidis

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 6.12.2007