

TYPOWANIE BAKTERIOFAGOWE W DIAGNOSTYCE PAŁECZEK *SALMONELLA* ENTERITIDIS WYSTĘPUJĄCYCH W POLSCE

Bożena Dera-Tomaszewska^{1*}, Ewa Tokarska-Pietrzak¹

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Katedra Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Krajowy Ośrodek *Salmonella*, ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Typowanie bakteriofagowe. 3. Schematy typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella*. 4. Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce. 5. Podsumowanie

Phage typing in the diagnostic of *Salmonella* Enteritidis occurring in Poland

Abstract: Phage typing has a long history with regard to the differentiation of *Salmonella* serovars of human and animal origin. This method provides the fast and cheap characterization of frequent serovars on the sub-serovar level and is especially useful for primary epidemiological analysis before investigation by other, more expensive molecular techniques. Since the discovery of bacteriophages many different *Salmonella* typing schemes have been developed. More than one typing scheme may have been developed for a serovar. Several phage-typing schemes have been published for *Salmonella* Enteritidis. The most widely used is that of Ward et al. In Poland a different typing scheme is used – the Lalko et al. scheme. It employs eight typing phages for differentiation more than 20 phage types. Basing on the results of *Salmonella* Enteritidis phage typing, which has been conducted in Poland for many years, it can be noted that *Salmonella* Enteritidis infections reported in our country during the last fifty years were associated with two serious epidemics. Among the strains isolated during the first epidemic, phage types 2, 5, 7, 8 and 12 were predominant and the great majority of the strains were represented by types 8 and 5. Phage types 1, 6 and 7 were found to be dominated during 27 years of the second *Salmonella* Enteritidis epidemic in Poland. The strains of type 7 were the most numerous ones. The results of phage typing indicate that sources of infections of these two *Salmonella* Enteritidis epidemics are quite different. However, a relationship between them exists: *Salmonella* Enteritidis type 7 organisms occur in both. During the first epidemic they were isolated in a relatively small percentage and only from humans. The great majority of sources of *Salmonella* Enteritidis infections associated with the second epidemic were dominated by them. They were also prevalent in human isolates. Generally, during the last 27 years, no significant changes in the distribution of *Salmonella* Enteritidis phage types in Poland have been observed. Although, it is noteworthy that except the same, permanent phage types continuously existing in the environment, the new types start to appear. They can suggest an appearance of new sources of *Salmonella* Enteritidis infections, unknown yet in our country, which is very possible as a result of effective elimination of currently existing ones.

1. Introduction. 2. Phage typing. 3. *Salmonella* phage typing schemes. 4. *Salmonella* Enteritidis phage types occurring in Poland. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakteriofagi, *Salmonella*, *Salmonella* Enteritidis, typowanie bakteriofagowe, typy bakteriofagowe
Key words: bacteriophages, *Salmonella*, *Salmonella* Enteritidis, phage typing, phage types

1. Wprowadzenie

Niebezpieczeństwo wynikające ze zwiększonej inwazyjności niektórych serowarów *Salmonella* stało się problemem na skalę światową – przykładem może być *Salmonella* Enteritidis. Notuje się także wzrost zatruc pokarmowych spowodowanych innymi serowarami *Salmonella*, które dawniej izolowano sporadycznie. W związku z tym, metody bardziej szczegółowego różnicowania szczepów *Salmonella*, do których zaliczana jest również metoda typowania bakteriofagowego, okazały się niezwykle przydatne dla celów praktycznych [31]. W przypadku epidemii, jak i sporadycznych zachorowań spowodowanych tym patogenem, 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. 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 epi-zoologicznych uzasadnia również fakt możliwości śledzenia typów bakteriofagowych i obserwacji zmian zachodzących w ich dystrybucji na danym obszarze geograficznym, co pozwala na pełniejsze oszacowanie sytuacji epidemiologicznej związanej z występowaniem danego patogenu.

* Autor korespondencyjny: Krajowy Ośrodek *Salmonella*, Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Gdański Uniwersytet Medyczny, 80-227 Gdańsk, ul. Do Studzienki 38; tel.: (58) 349 19 12; e-mail: bodeto@gumed.edu.p

2. Typowanie bakteriofagowe

Najlepsze wyniki w rozpoznawaniu zarazka uzyskujemy stosując metody kompleksowe [29]. Choć różnorodne nowe metody typowania molekularnego szczepów *Salmonella* wydają się być przydatne w badaniach epidemiologicznych [16, 30], ciągle jeszcze szczególne usługi epidemiologii oddaje lizotypia [28, 33, 37, 46–48]. 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* przeprowadzane jest głównie z zastosowaniem zestawów fagów, mniej lub bardziej specyficznych dla serowaru prezentowanego przez izolaty poddawane typowaniu.

3. Schematy typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella*

Bakteriofagi wykorzystano po raz pierwszy do subtypowania 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 *Salmonella* Typhi posiadających antygen Vi [9, 10]. Stał się on inspiracją dla Felix'a i Callow do opracowania kolejnego schematu typowania bakteriofagowego, tym razem dla pałeczek *Salmonella* Paratyphi B [19, 20]. Oba schematy odegrały zasadniczą rolę w identyfikacji stałych nosicieli pałeczek *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi B oraz skażonych produktów spożywczych. Badania prowadzone w latach 40-tych i 50-tych ubiegłego stulecia przez Felix'a i Callow [7, 21], uzupełnione badaniami Andersona i wsp. [1–4], zaowocowały następnym schematem typowania bakteriofagowego. Dotyczył on różnicowania szczepów *Salmonella* Typhimurium i początkowo umożliwiał wyróżnienie 80 różnych typów fagowych. Obecnie stosowany, rozszerzony zestaw składający się z 37 fagów pozwala określić ponad 210 różnych typów bakterio-

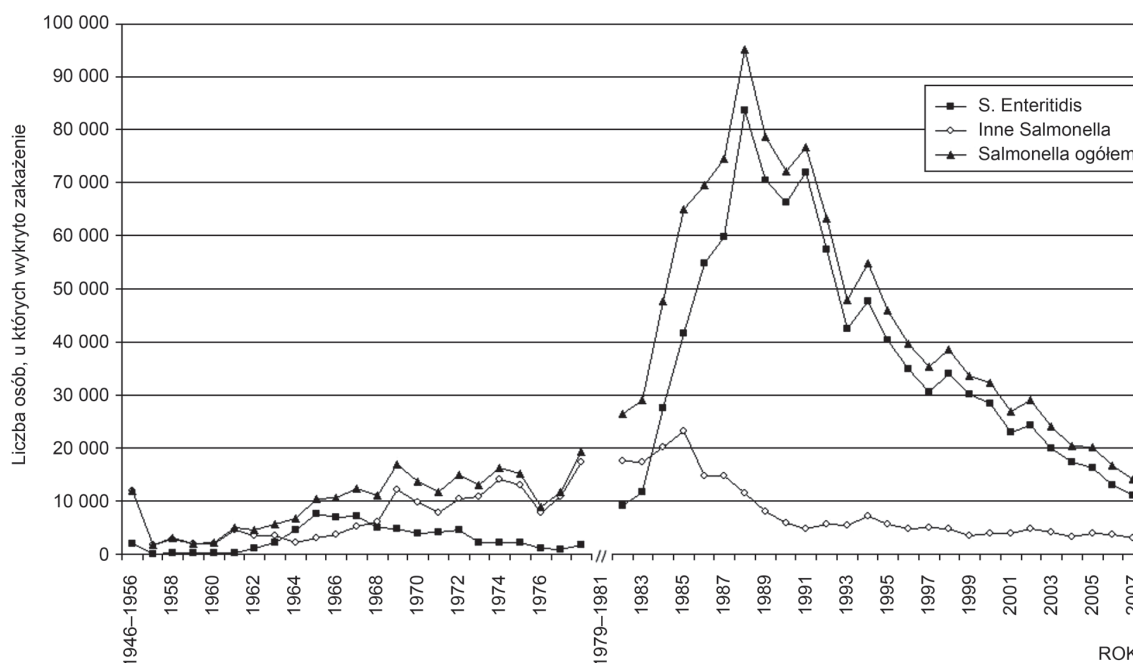
fagowych (definitive phage type, DT) w obrębie serowaru *Salmonella* Typhimurium. Niemal równocześnie z Felix'em i Callow pracę nad typowaniem *Salmonella* Typhimurium podjął również Lilleengen [34]. Jego schemat wyróżniał 24 typy bakteriofagowe, w oparciu o reakcje z 12 fagami izolowanymi ze ściętków, nawozu oraz hodowli *Salmonella* Typhimurium. Schemat Lilleengen'a został później rozszerzony przez Kallings i wsp. [27] o 4 nowe typy fagowe. Opracowano również kilka schematów typowania fagowego pałeczek *Salmonella* Enteritidis, spośród których najbardziej popularnym stał się schemat zaproponowany przez Ward i wsp. [48]. Pozwalał on na określenie 27 typów fagowych przy pomocy zestawu 10 fagów. Znaczący odsetek szczepów reagujących z fagami Ward i wsp. w sposób uniemożliwiający określenie typu fagowego oraz dość duży odsetek szczepów nie reagujących z fagami, wskazał na ograniczoną przydatność tego schematu do badań epidemiologicznych zakażeń wywołanych tym serowarem w naszym kraju [15]. Szczegółowa ocena użyteczności schematu Ward i wsp. oraz stosowanego w Polsce schematu Lalko i wsp. do prowadzenia analizy epidemiologicznej *Salmonella* Enteritidis w Polsce została przedstawiona przez Głośnicką i Dera-Tomaszewską [24]. Stosowany obecnie, rozszerzony schemat Ward i wsp., obejmuje już 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 [25]. Umożliwiają one subtypowanie w obrębie takich serowarów *Salmonella* jak: Abortusovis, Adelaide, Agona, Anatum, Bareilly, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Choleraesuis, Dublin, Gallinarum, Good, Hadar, Infantis, Minnesota, Montevideo, Newport, Oranienburg, Panama, Potsdam, Thompson, Virchow, Waycross i Weltevreden [25, 26]. Celowość stosowania metody typowania bakteriofagowego została powszechnie uznana, czego wyrazem było powołanie ośrodków międzynarodowych i krajowych, których zadaniem jest czuwanie nad prawidłowością rozpoznania i porównywalnością wyników oraz dalsza praca badawcza nad doskonaleniem tej metody. Standardowa technika typowania bakteriofagowego zaproponowana przez Craigie i Felix'a w 1947 roku [11] 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 Williamsa [1]. Metoda typowania bakteriofagowego opisywana jest również przez wielu autorów w różnych przeglądowych opracowaniach dotyczących fagotypowania bakterii *Salmonella* [8, 25, 29, 45]. Obecnie do schematów o zasięgu międzynarodowym, powszechnie stosowanych w ośrodkach referencyjnych na świecie, należą schematy typowania fagowego pałeczek *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi B (również *Salmonella* Paratyphi B biowar Java), *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis [26]. Wiele schematów typowania fagowego (w tym dla *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* 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* [29]. 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.

4. Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce

Od wielu już lat w Polsce najczęstszym czynnikiem etiologicznym, zarówno w ogniskach zatruc pokarmowych, jak i zachorowaniach sporadycznych są pałeczki *Salmonella* Enteritidis. I chociaż udział zachorowań wywołanych tym typem serologicznym w ogólnej liczbie zachorowań na salmonelozę w Polsce wskazuje w ostatnich latach niewielką, ale wyraźną tendencję spadkową [12, 17], stanowi on ciągle jeszcze bardzo wysoki odsetek. Pod koniec lat dziewięćdziesiątych udział *Salmonella* 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* [12]. Zatrucia pokarmowe wywołane pałeczką *Salmonella* 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 *Salmonella* Enteritidis, mających związek z pierwszą w kraju epidemią (1962–1976) wywołaną przez ten serowar [23], stał się przyczyną opracowania systemu bardziej szczegółowego różnicowania tych pałeczek

za pomocą bakteriofagów. Typowanie bakteriofagowe jest doskonałą metodą pomocniczą w prowadzeniu dochodzeń epidemiologicznych. Pierwsza wersja stosowanego w Polsce schematu typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella* Enteritidis została opublikowana w 1968 roku przez Macierewicz i wsp. [35]. Na podstawie reakcji z 7 fagami typującymi wyróżniono 11 typów bakteriofagowych. W ciągu następujących 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 [32, 33]. Jego wartość praktyczną potwierdzono poprzez analizę epidemiologiczną wykonaną w oparciu o materiał obejmujący 2011 szczepów *Salmonella* 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 *Salmonella* 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 [36]. Chorowały przede wszystkim najmłodsze dzieci. Śmiertelność noworodków sięgała 25%. Zaobserwowano odmienne od normalnie rejestrowanych przyczyny powstania epidemii nie dające się zakwalifikować jako zatrucia pokarmowe [23]. Odrębność źródeł i mechanizmów tej epidemii potwierdzały również wyniki typowania bakteriofagowego. Przyczyna początku pierwszej epidemii *Salmonella* Enteritidis nie została wyjaśniona, natomiast mechanizm jej rozprzestrzenienia 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 powietrzną. Pokażna liczba przypadków objawowych salmoneloz w tym okresie czasu pochodziła również z ognisk zatruc pokarmowych, z których wyizolowano znakomitą większość szczepów typu: 2, 5, 7, 8 i 12 [33]. Na szczególną uwagę zasługiwały dwa duże ogniska: jedno spowodowane



Rys. 1. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* Enteritidis i innymi serowarmi *Salmonella* u ludzi w Polsce na tle ogólnej liczby zakażeń *Salmonella*, 1957–2007 [5, 6, 13, 38–44]

pałeczkami *Salmonella* Enteritidis typu 12 (1972 rok; kolonie letnie – woj. szczecińskie; lody), drugie – typu 8 (1975 rok; woj. łódzkie; befsztyk tatarski). Oba ogniska były jednorodnie. Szczepy izolowane z żywności, od osób chorych i z tzw. kontaktu przedstawiały ten sam typ bakteriofagowy.

Druga epidemia *Salmonella* 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 1979–1981 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 *Salmonella* 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. Dane przedstawione na Rys. 1, pozwolą prześledzić, jak kształtowała się liczba zakażeń u ludzi w Polsce spowodowanych pałeczkami *Salmonella* Enteritidis (i innymi serowarami) na tle ogólnej liczby zakażeń *Salmonella* w ciągu ostatnich 50 (1957–2007) lat. Od 1993 roku (z wyjątkiem lat 1994 i 1998) obserwujemy ciągłe zmniejszanie się liczby zakażeń świadczące o stopniowym wygasaniu drugiej epidemii *Salmonella* 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 [23]. Rejestrowano coraz większe liczby ognisk zatruc pokarmowych, które od 1987 roku zaczęły dominować wśród zakażeń *Salmonella* 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 2100 szczepów *Salmonella* Enteritidis wyizolowanych w latach 1981–1990, wykonane przez Główną i wsp. [22] 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 *Salmonella* Enteritidis wyizolowanych w latach 1986–1995 [14] 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 Krajowym Ośrodku *Salmonella* w oparciu o szczepy *Salmonella* Enteritidis wyizolowane w kraju w latach 1996–2007 (publikacja w druku), czyli w okresie wygasania trwającej w Polsce już ponad 25 lat drugiej epidemii spowodowanej tym serowarem, wykazały, że 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 *Salmonella* Enteritidis typu 1 izolowano prawie

Tabela I

Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis (wg schematu L a l k o i wsp.) występujące w Polsce w następujących latach: 1970–1975, 1981–1990, 1986–1995, 1996–2007 [14, 22, 32, 33]

Typ fagowy	Liczba szczepów (%) wyizolowanych							
	1970–1975		1981–1990		1986–1995		1996–2007	
	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł
1	1	–	536 (26,2%)	35 (37,6%)	137 (38,2%)	32 (36,4%)	124 (25,0%)	69 (29,3%)
2	147 (8,0%)	–	–	–	–	–	–	–
3	1	–	47 (2,3%)	3 (3,2%)	6 (1,6%)	–	38 (7,6%)	31 (13,1%)
4	56 (3,0%)	1	11 (0,5%)	–	–	–	2 (0,4%)	–
5	402 (21,8%)	26 (15,9%)	1	–	–	–	–	1
6	25 (1,3%)	1	98 (4,8%)	4 (4,3%)	59 (16,4%)	24 (27,3%)	140 (28,1%)	44 (18,7%)
7	332 (18,0%)	–	1313 (64,1%)	49 (52,7%)	147 (41,1%)	30 (34,1%)	167 (33,5%)	68 (28,9%)
8	582 (31,8%)	39 (23,8%)	14 (0,7%)	–	–	–	5 (1,0%)	5 (2,1%)
9	10 (0,5%)	–	1	–	–	1	–	–
10	5 (0,2%)	9 (5,5%)	–	–	–	–	–	–
11	1	–	–	–	–	–	–	–
12	139 (7,5%)	82 (50,0%)	2 (0,1%)	–	–	–	–	–
13	60 (3,2%)	–	–	–	–	–	–	–
14	17 (0,9%)	–	–	–	–	–	–	–
15	1	–	–	–	–	–	–	–
16	–	1	–	–	3 (0,9%)	–	5 (1,0%)	–
17	1	–	–	–	–	–	–	–
18	1	5 (3,0%)	6 (0,3%)	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–
20	50 (2,7%)	–	3 (0,1%)	–	–	–	–	1
21	–	–	–	–	–	–	–	–
22	–	–	3 (0,1%)	2 (2,2%)	–	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	–	–	–	6 (1,2%)	–
25	–	–	–	–	–	–	1	–
26	–	–	–	–	–	–	2 (0,4%)	1
27	–	–	–	–	–	–	1	–
AT ¹	4 (0,2%)	–	–	–	2 (0,6%)	1	6 (1,2%)	10 (4,2%)
NT ²	12 (0,6%)	–	13	–	3 (0,9%)	–	1	6 (2,5%)
Ogółem	1847	164	2048	93	358	88	498	236

¹ Szczepy atypowe (nietypowo reagujące z fagami typującymi)

² Szczepy nie typujące się (nie reagujące z fagami typującymi)

w takich samych ilościach jak typu 6. Zaobserwowano również nieco większą liczbę szczepów prezentujących typ fagowy 3 w porównaniu do poprzednich przedziałów czasowych. Obecność typu 16 w naszym kraju zarejestrowała po raz pierwszy *L a l k o* w latach 1970–1975 wyłącznie w materiałach pochodzenia zwierzęcego [32]. Pierwszej izolacji tego typu bakteriofagowego od ludzi dokonano w latach 1986–1995 z mieszanego ogniska zatrucia pokarmowego [14]. Izolowano go również od ludzi w ciągu kolejnych trzynastu lat (1996–2007). Trudno jednak nie zauważyć, że przy egzystujących ciągle jeszcze w środowisku tych samych, „stałych” typach bakteriofagowych (tj. 1, 3, 6, 7), 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. Pojawianie się nowych typów fagowych wśród pałeczek *Salmonella* Enteritidis obserwuje się również w państwach Europy Zachodniej [18, 37].

W oparciu o opublikowane, zbiorcze opracowania obejmujące lata 1970–1975 [32], 1981–1990 [22], 1986–1995 [14] oraz wyniki opisanych powyżej badań, stanowiących kontynuację poprzednich opracowań, dokonano analizy porównawczej występowania typów bakteriofagowych *Salmonella* Enteritidis w naszym kraju (Tabela I). Uzyskane wyniki pozwolą na pełniejsze oszacowanie sytuacji epidemiologicznej związanej z występowaniem tego patogenu w Polsce.

5. Podsumowanie

W podsumowaniu przedstawionych wyników prowadzonego w Polsce już od wielu lat typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella* 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 *Salmonella* Enteritidis typu 7. Izolowane dawniej w stosunkowo niewielkim procencie wyłącznie od ludzi, zdominowały większość

źródeł zakażeń związanych z drugą epidemią, uzyskując również przewagę u ludzi. Wśród szczepów *Salmonella* 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 *Salmonella* Enteritidis w Polsce. W ciągu 27 lat trwania tej epidemii dominującymi typami fagowymi *Salmonella* Enteritidis były typy 1, 6 i 7 (według *L a l k o* i wsp.), z najliczniej izolowanymi szczepami typu 7. Zaczynają również pojawiać się w Polsce nowe typy bakteriofagowe. Izolowano je wprawdzie w niewielkiej liczbie przypadków, przede wszystkim od ludzi. Mogą one sugerować pojawienie się w kraju nowych źródeł zakażeń, co przy skutecznym zwalczaniu obecnie istniejących jest wielce prawdopodobne. W Europie Zachodniej, podobnie jak w Polsce, zaobserwowano również pojawienie się nowych typów bakteriofagowych, które do tej pory nie występowały wśród typów najliczniej izolowanych od ludzi.

Piśmiennictwo

1. Anderson E.S., Williams R.E.O.: Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *J. Clin. Path.* **9**, 94–114 (1956)
2. Anderson E.S., Wilson E.M.J.: The importance of *Salmonella typhimurium* phage typing in human and veterinary medicine. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* **224**, 368–373 (1961)
3. Anderson E.S.: Phage typing of *Salmonella* other than *Salmonella typhi* (w) The world problem of salmonellosis, red. W. van Oye, Junk Publisher, The Hague, 1964, s. 89–110
4. Anderson E.S., Ward L.R., De Saxe M.J., De Sa J.D.H.: Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Camb.)*, **78**, 297–300 (1977)
5. Buczowski Z.: Salmonellosis of man diagnosed in the years 1946–1956 in Poland. *Bull. Inst. Mar. Med. Gdańsk*, **1/2**, 51–71 (1961)
6. Buczowski Z.: *Salmonella* (w) Enterobacteriaceae – Infektionen. Epidemiologie und Labordiagnostik, red. J. Sedlak, H. Rische, Veb Georg Thieme, Leipzig, 1961, s. 57–182
7. Callow B.: A new phage-typing scheme for *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Camb.)*, **57**, 346–559 (1959)
8. Chirakadze I., Perets A., Ahmed R.: Phage typing (w) Bacteriophages. Methods and protocols. Vol. 2, Molecular and applied aspects, red. M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, Humana Press, New York USA, 2009, s. 293–305
9. Craigie J., Yen Ch.E.: The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparation of type II phage. *Can. Publ. Hlth. J.* **29**, 448–483 (1938 a).
10. Craigie J., Yen Ch.E.: 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 (1938 b)

11. Craigie J., Felix A.: Typing of typhoid bacilli with Vi-bacteriophage. *Lancet*, i, 823–827 (1947)
12. Czerwiński M., Czarkowski M.P., Baumann A.: Salmonelozy w 2006 roku. *Przegl. Epidemiol.* **62**, 301–310 (2008)
13. Dera-Tomaszewska B.: Serological types of *Salmonella* bacilli isolated from men in Poland between 1967 and 1978. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia*, **35**, 56–72 (1984)
14. Dera-Tomaszewska B., Głońska R.: Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce w latach 1986–1995. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **51**, 73–79 (1999)
15. Dera-Tomaszewska B., Głońska R.: Zastosowanie schematu Ward i wsp. do typowania bakteriofagowego szczepów *Salmonella* Enteritidis występujących w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **5**, 281–288 (1999)
16. Dera-Tomaszewska B.: Metody typowania bakterii *Salmonella*. *Med. Wet.* **67**, 162–167 (2011)
17. Dera-Tomaszewska B., Kozłowski A.: Statystyczna analiza trendu zakażeń *Salmonella* u ludzi w Polsce w latach 1995–2007. *Przegl. Epidemiol.* **65**, 353–361 (2011)
18. European Food Safety Authority. 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 (2009)
19. Felix A., Callow B.R.: Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi-bacteriophages. *Brit. Med. J.* **2**, 127–130 (1943)
20. Felix A., Callow B.R.: Paratyphoid-B Vi-phage typing. *Lancet*, ii, 10–14 (1951)
21. Felix A.: Phage typing of *Salmonella typhimurium*: its place in epidemiological and epizootiological investigations. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 208–222 (1956)
22. Głońska R., Kunikowska D., Dziadziuszko H., Tokarska-Kłunejko E.: Distribution of *Salmonella enteritidis* phage-types in Poland in 1981–1990. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia*, **41**, 145–148 (1990)
23. Głońska R., Kunikowska D.: The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* **21**, 21–30 (1994)
24. Głońska R., Dera-Tomaszewska B.: Comparison of two *Salmonella* Enteritidis phage typing schemes. *Eur. J. Epidemiol.* **15**, 395–401 (1999)
25. Guinée P.A.M., van Leeuwen W.J.: Phage typing of *Salmonella* (w) *Methods in Microbiology*, vol. 11, red. T. Bergen, J.R. Norris, Academic Press, New York USA, 1978, s.157–191
26. Jones Y.E., McLaren I.M., Wray C.: Laboratory aspects of *Salmonella* (w) *Salmonella* in Domestic animals, red. C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, New York USA, 2000, s. 393–405
27. Kallings L.O., Laurell A.B.: Relation between phage types and fermentation types of *Salmonella typhimurium*. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **40**, 328–342 (1957)
28. Kowalczyk-Pecka D., Wernicki A., Puchalski A.: Lekowrażliwość oraz typy bakteriofagowe szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych na terenie mikroregionu lubelskiego. *Przegl. Epidemiol.* **57**, 201–209 (2003)
29. Kropinski A. M., Sulakvelidze A., Konczy P., Poppe C.: *Salmonella* phages and prophages – Genomics and practical aspects (w) *Salmonella*. *Methods and Protocols*, red. H. Schatten, A. Eisenstark, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2007, s. 133–175.
30. Laconcha I., López-Molina N., Rementeria A., Audicana A., Perales I., Garaizar J.: 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 (1998)
31. Lalko J.: Znaczenie typowania bakteriofagowego *Salmonella* w epidemiologii i epizootologii. Konferencja Naukowa „Salmonellozy”, Gdańsk–Gdynia, 19–20.IX.1969. Materiały Naukowe Konferencji, s. 73–81 (1970)
32. Lalko J.: Mikrobiologiczna i epidemiologiczna ocena różnych systemów typowania bakteriofagowego szczepów *S. typhimurium* i *S. enteritidis*. Praca habilitacyjna, red. J. Lalko, Acta Universitatis Lodzensis, Uniwersytet Łódzki, 1976.
33. Lalko J.: *Salmonella enteritidis* bacteriophage typing. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia*, **28**, 187–194 (1977)
34. Lilleengen K.: Typing of *Salmonella typhimurium* by means of bacteriophage. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.* **77** (1948)
35. Macierewicz M., Kałużewski S., Lalko J.: Phage differentiation of strains of *Salmonella enteritidis*. *Exp. Med. Microbiol.* **20**, 138–146 (1968)
36. Macierewicz M.: Zagadnienie zakażeń pałeczką *S. enteritidis* na terenie Polski. Konferencja Naukowa: „Salmonellozy”, Gdańsk – Gdynia, 19–20. IX. 1969. Materiały naukowe Konferencji, s. 83–102 (1970)
37. Nygård K., De Jong B., Guerin P.J., Andersson I., Olson A., Giesecke J.: Emergence of new *Salmonella* Enteritidis phage types in Europe? Surveillance of infections in returning travellers. *BMC Medicine*, **2**, 1–8 (2004)
38. 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.)
39. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej – Departament Inspekcji Sanitarnej. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1986–1988
40. 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.)
41. 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
42. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Przeciwepidemiczny i Oświaty Zdrowotnej. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1999–2002
43. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Przeciwepidemiczny. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 2003–2007
44. Pietkiewicz K., Buczowski Z.: Salmonellosis in man in Poland, 1957–66. *Publ. Hlth. Rep.* **84**, 712–720 (1969)
45. Rabsch W.: *Salmonella* Typhimurium phage typing for pathogens (w) *Salmonella*. *Methods and Protocols*, red. H. Schatten, A. Eisenstark, Totowa, New Jersey, USA, Human Press Inc., 2007, s. 177–211
46. Tokarska-Pietrzak E., Kunikowska D., Dera-Tomaszewska B., Głońska R.: Typowanie bakteriofagowe w diagnostyce *Salmonella* Enteritidis. Konferencja Naukowa „Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią, Gdańsk 2007”. Materiały Naukowe Konferencji, P-17, s. 54 (2007)
47. Van Duijkeren E., Wanner W.J.B., Houwers D.J., van Pelt W.: 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 (2002)
48. Ward L.R., de Sa J.D., Rowe B.: A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* **106**, 291–294 (1987)