MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2015, 67: 155 - 164

Usefulness of the $(GTG)_4$-PCR for typing of monophasic *Salmonella enterica* isolates with antigenic shame 1,4,[5],12:i:-*

Ocena przydatności metody $(GTG)_4$-PCR do różnicowania jednofazowych szczepów *Salmonella enterica* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:-*

Tomasz Wołkowicz[1], Aleksandra Januszkiewicz[1], Anna Chróst[1], Natalia Wolaniuk[1], Anna B. Kubiak[2], Marta Majchrzak[2], Jolanta Szych, Paweł Parniewski[2]

Department of Bacteriology, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene[1]
Department of Molecular Genetics, Institute of Medical Biology Polish Academy of Science[2]

Jednofazowe pałeczki *Salmonella enterica* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:- stanowią narastający problem zdrowia publicznego. Dokładna identyfikacja tych szczepów z zastosowaniem rutynowych testów fenotypowych (badania właściwości biochemicznych i serologicznych szczepów) jest kosztowna i czasochłonna. Analizowana w prezentowanym badaniu metoda $(GTG)_4$-PCR wykazała przydatność do genoserotypowania kilku najczęściej obserwowanych serotypów pałeczek *Salmonella*. Niestety, zastosowanie tej metody do rozróżnienia jednofazowych *S.* Typhimurium, nie pozwoliło na wyróżnienie profilu prążków charakterystycznego dla takich szczepów. Niemożliwe okazało się również rozróżnienie profilów $(GTG)_4$-PCR uzyskanych dla szczepów wzorcowych *S.* Typhimurium, *S.* Farsta, *S.* Tsevie czy *S.* Glocester. Wyraźnie odrębne profile uzyskano jedynie dla pałeczek *S.* Tumodi, *S.* Lagos oraz *S.* Agama.

Słowa kluczowe: *Salmonella; jednofazowe 1,4,[5],12:i:-; serotypowanie; TRS-PCR*

ABSTRACT

Introduction: Monophasic *Salmonella enterica* strains presenting the antigenic shame 1,4,[5],12:i:- are becoming more prevalent. Accurate identification of such strains is hard

* This study was prepared as a scientific project for young scientists funded (number 6/EMMŁ) from funds for statutory activity for 2014.

with routine using biochemical and serological tests. Such strains can be identified with molecular tests. In this study we have tested the usefulness of $(GTG)_4$-PCR for the diagnostic of such monophasic strains. This usefulness of this method was previously confirmed for genoserotyping of *S.* Enterica, Typhimurium, Infantis, Virchow, Hadar, Newport and Anatum.
Materials and Methods: 76 strains with antigenic shame 1,4,[5],12:i:-, isolated in Poland in years 2007-12 were tested. Additionally $(GTG)_4$-PCR patterns were obtained for reference strains of serotypes *S*. Lagos, *S.* Agama, *S.* Farsta, *S.* Tsevie, *S.* Glocester and *S.* Tumodi. $(GTG)_4$-PCR was performed with DreamTaq DNA polymerase. Obtained patterns were analysed with BioNumerics software.
Results: No pattern specific for monophasic pattern was identified. Additionally it was also impossible to differentiate patterns obtained for *S*. Typhimurium, *S.* Farsta, *S.* Tsevie and *S.* Glocester. Only reference strains of serotypes *S*. Tumodi, Farsta and Agama has the distinguishable patterns of $(GTG)_4$-PCR.
Conclusions: Analysed $(GTG)_4$-PCR method do not show the ability to distinguish *S. enterica* serotypes from group O4, H:i, including monophasic strains with the antigenic shame 1,4,[5],12:i:-.

Keywords: *Salmonella; monophasic 1,4,[5],12:i:-; serotyping; TRS-PCR*

INTRODUCTION

Salmonella are still the most common etiological agents of bacterial gastrointestinal infections in Europe (5). According to data published by the Department of Epidemiology of the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, it shows that although the total number of strains of Salmonella isolated in Poland each year steadily declining, it is still the most common etiological agent of bacterial diarrhoea. In 2013 more than 7.5 thousand strains of *Salmonella* were isolated in Poland (13). *Salmonella* Enteritidis was the most frequently isolated serotype (77% of all cases in 2012) in Poland as in Europe (12). However, annual several hundred strains of serotype *Salmonella* Typhimurium (322 (3.8%) isolates in 2012) is also isolated. A growing problem is the occurrence of *Salmonella* Typhimurium isolates, without the second phase flagella, that present antigenic shame 1,4,[5],12:i:- (2, 6, 9, 15). These bacteria are a major public health problem particularly because of the fact that most of them are presents reduced susceptibility to different antibiotics such as ampicillin, streptomycin, tetracycline or sulphonamides (7).

Due to the lack of the second phase flagellar antigen, these strains are serious diagnostic problem. In the routinely conducted phenotypic diagnostic (biochemical and serological tests) they are indistinguishable from potentially possible monophasic variations (although in practice not observed) of the rest *Salmonella* strains with somatic antigen group O:4 with the first phase flagellar antigen H:i, that is *Salmonella* Lagos, Agama, Farsta, Tsevie, Glocester or Tumodi. The exact determination of belonging to a particular *S. enterica* serotype of monophasic strains with antigenic shame 1,4,[5],12:i:- is only possible with the molecular biology methods. One of them is the technique of DNA-DNA hybridization on microarrays (9). Unfortunately, it requires an expensive equipment such as sophisticated camera for reading, expensive reagents and high-qualified personnel. Specific PCR assays,

that are able to distinguish monophasic *Salmonella* Typhimurium strains, are also already designed (4, 14). Such PCRs are usually designed only for one mechanism that disrupt the second phase flagellar or phases shift.

One of the interesting method suitable for genoserotyping of *Salmonella* is based on TRS-PCR method with a 5'$N_6(GTG)_4$ primer. Previously, we have demonstrated the usefulness of this method for genoserotyping *S. enterica* strains belonging to one of the most frequently isolated serotypes such as *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Virchow, *S.* Infantis, *S.* Hadar, *S.* Newport and *S.* Anatum (10). In this study we examined the usefulness of this method for the differentiation of *Salmonella* strains with the antigenic shame 1,4,[5],12:i:-.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Material consisted of 76 strains *Salmonella enterica* subsp. *enterica* with the antigenic shame 1,4,[5],12:i:- isolated in 2007-2012 and collected in the Department of Bacteriology NIZP-PZH. All strains has been reidentified in the Department of Bacteriology NIZP-PZH as a part of NCN N N404 182940 research project. In addition, the control strains of serotype *Salmonella* Typhimurium ATCC 70072, Lagos KOS 1967, Agama KOS 1968, Farsta KOS 1969, Tsevie KOS 1970, Glocester KOS 1971 and Tumodi KOS 1972 were used to obtain the $(GTG)_4$-PCR profiles characteristic of these serotypes.

$(GTG)_4$-PCR. Genomic DNA was isolated from the overnight culture using a lysis buffer with proteinase K (Sigma-Aldrich), 6 M GTC solution (MP Biomedicals), extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (49.5:49.5:1) and precipitation with isopropanol (Sigma-Aldrich). PCR reaction was performed with a single primer with the sequence 5'$N_6(GTG)_4$, which usefulness in genoserotyping of *S. enterica* strains has been demonstrated previously (10). The reaction mixture had the following composition: 19,65µl deionized water (Sigma), 2,5µl 10x DeamTaq Green Buffer (Thermo Scientific) 0,5µl 10mM dNTP mix (Sigma-Aldrich), 0,5µl 10mM primer 1,5µl DMSO (AppliChem), 0,1µl polymerase DreamTaq with concentration of 5 U/ ml and 0,5µl template DNA. The PCR reaction comprised the following steps: initial denaturation at 95°C for 3 min, then 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min, followed by a final extension step at 72°C for 8 min. The PCR products were separated on 1.6% agarose gel (Agarose Electrophoresis Grade, MP Biomedicals) using the Midori Advanced Green dye (Nippon Genetics).

Obtained profiles were analysed and compared with a BioNumerics v6.6 software (Applied Maths). The similarity of the profiles were determined by using the Pearson correlation (optimization of 1%, the curves smoothing value 1%) and UPGMA clustering algorithm.

RESULTS

Dendrogram showing the mutual similarity of $(GTG)_4$-PCR profiles of the tested strains is shown in Figure 1. It is possible to distinguish a large group consisting of 54 strains which showed bands profiles similarity of about 87%. To this group two reference strains were classified: *S.* Typhimurium and *S.* Gloucester, for which the relative similarity of the profiles was as high as 96%. This result indicates that these serotypes could not be distinguished with this method.

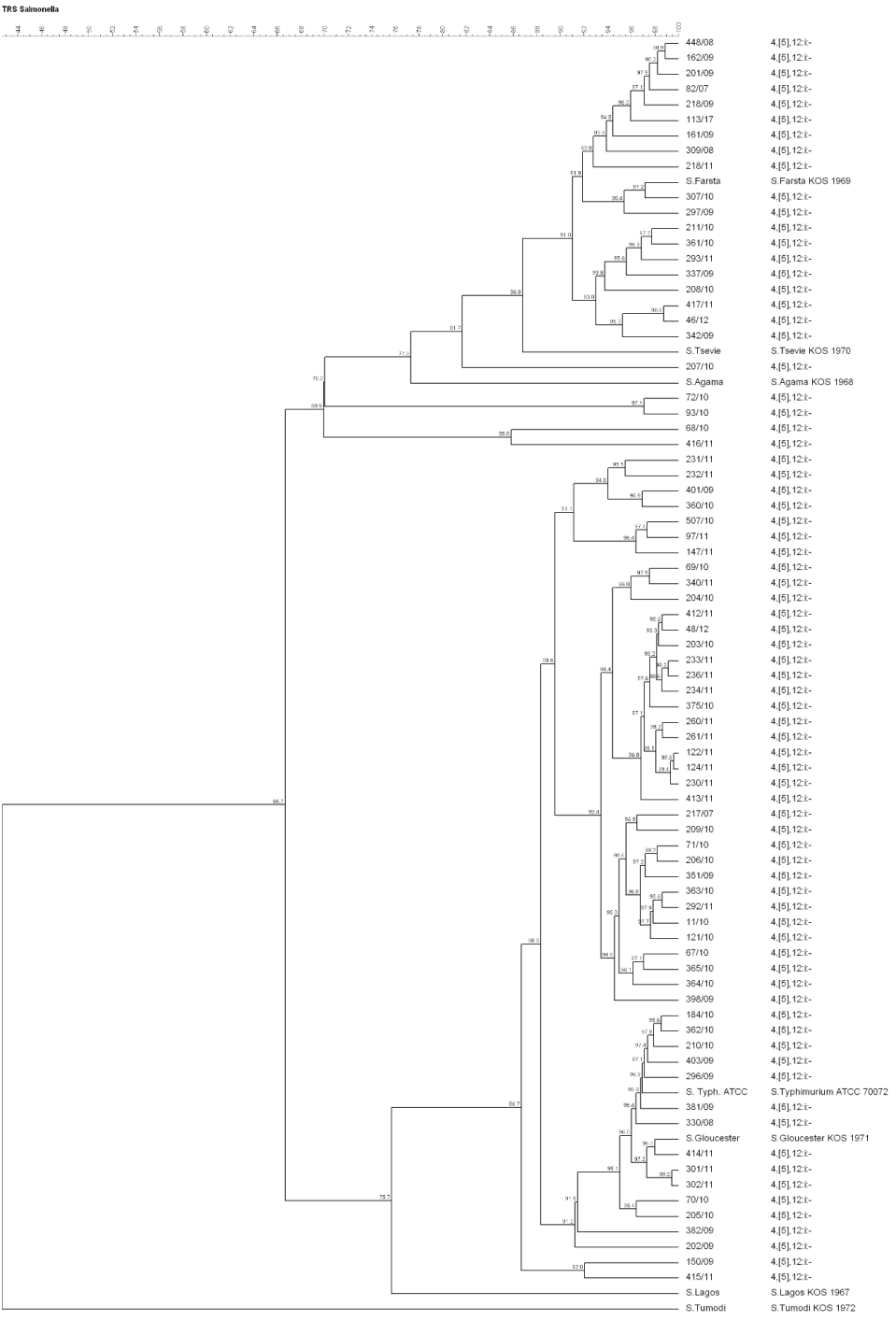


Fig. 1. Dendrogram showing the similarity of $(GTG)_4$-PCR profiles of the tested *S. enterica* strains

Among the tested strains, it is possible to distinguished a group of 20 strains for which the similarity of the profiles was 91%. In this group reference strain of *S*. Farsta serotype was also been included. Similar profile (87% similarity) was also obtained for strains of *S*. Tsevie. However, $(CGC)_4$-PCR profiles obtained for strains of this group, were poorer and not so clear than for the previously described strains from the dominant group. This may be due characteristic of these isolates, or it may indicate some imperfections of analysed method.

Only profiles obtained for the reference strains of *S*. Lagos and *S*. Tumodi clearly distinguished these strains from the other tested strains.

DISCUSSION

Monophasic strains of *S. enterica* with antigenic shame 1,4,[5],12:i:- was first isolated in Spain in 1997 (3). Studies conducted by Echeitę et al. (4) showed that these strains have the IS200 insertion sequences specific for the intergene region between genes *fliB-fliA* of *S*. Typhimurium serotype only. At the same time, these researchers concluded that the cause of disrupting the second phase flagella antigen is caused by the lacking of gene *fljB*. Based on these results and already developed primers, Tennant et al. (14) have constructed a multiplex-PCR that could be used to detect monophasic strains of *S*. Typhimurium. However, such simple PCR test cannot correctly detect all potential types of monophasic strains 1,4, [5], 12: i: -, because of the fact, that such phenotype may be the result of a variety changes, both in the gene *fljB*, as well as genes responsible for phase shift (e.g. in the *hin* gene that encodes the invertase) (11).

Usefulness of bacteria genotyping based on amplification of sequences flanked by the triplet, repetitive sequences called TRS-PCR was validated for species such as *Escherichia coli* ($(CGG)_4$-PCR) (1), *Mycobacterium gordonae* ($(CAC)_4$-PCR) (17), *Mycobacterium kansasii* (8) and *avium* (16) (for both $(CCG)_4$-PCR). In the case of *S. enterica* method based on the $(GTG)_4$-PCR showed utility for genoserotyping of isolates belonging to serotypes *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Infantis, *S.* Virchow, *S.* Hadar, *S.* Anatum and *S.* Newport (10). These results suggested the possibility of using this method for the differentiation of other serotypes *S. enterica*, including the monophasic strains with the antigenic shame 1,4,[5],12:i:-.

Results obtained by this study shows that the method based on $(GTG)_4$-PCR should not be used for typing *Salmonella* from the group O:4, with a H:i first phase flagellar antigen. Our previous studies on the usefulness of this method were carried out on isolates belonging to the most frequently isolated *Salmonella*. These serotypes belongs to very distant antigenic groups (e.g. somatic antigens groups O:4, O:6,7, O:6,8, O:9, O:3). This may be relevant to the presence of general genetic differences. However, results obtained in this analysis show that, in the case of the group consisting of the strains having a high antigenic similarity, and thus may also general genetic, this method does not allow a clear differentiation between the tested serotypes. As a result, it is impossible to determine the profile specific for monophasic strains of *S. enterica* with the antigenic shame 1,4,[5],12:i:-. or assignment of these strains to a particular serotype. Of course it has to be taken into consideration that the method based on $N_6(GTG)_4$ primer was validated for different serotypes (10). Maybe usage of another $N_6(TRS)_4$ primer would suit better for typing of monophasic *S. enterica* with antigenic shame 1,4,[5],12:i:-.

POLSKA WERSJA JĘZYKOWA

Ocena przydatności metody $(GTG)_4$-PCR do różnicowania jednofazowych szczepów *Salmonella enterica* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:-*

Tomasz Wołkowicz[1], Aleksandra Januszkiewicz[1], Anna Chróst[1], Natalia Wolaniuk[1], Anna B. Kubiak[2], Marta Majchrzak[2], Jolanta Szych, Paweł Parniewski[2]

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny[1]
Zakład Genetyki Molekularnej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk[2]

WSTĘP

Pałeczki z rodzaju *Salmonella* należą do najczęstszych czynników etiologicznych bakteryjnych zakażeń przewodu pokarmowego w Europie (5). Według danych publikowanych przez Zakład Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia publicznego – Państwowego Zakładu Higieny wynika, że jakkolwiek ogólna liczba szczepów pałeczek *Salmonella* izolowanych w Polsce każdego roku systematycznie spada, wciąż jest to najczęstszy etiologiczny czynnik bakteryjnych biegunek. W 2013 roku wyizolowano w Polsce ponad 7,5 tysiąca izolatów pałeczek *Salmonella* (13). W Polsce, podobnie jak w całej Europie, najczęściej izoluje się pałeczki *Salmonella* Enteritidis (77% przypadków w roku 2012) (12). Jednakże corocznie izolowanych jest również kilkaset szczepów serotypu *Salmonella* Typhimurium (322 (3,8%) izolaty w 2012 roku). Narastającym problemem jest pojawianie się szczepów *Salmonella* Typhimurium nieposiadających rzęsek drugiej fazy, o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:- (2, 6, 9, 15). Bakterie te stanowią istotny problem zdrowia publicznego szczególnie ze względu na fakt, iż zazwyczaj charakteryzują się obniżoną wrażliwością na antybiotyki takie jak ampicylina, streptomycyna, tetracyklina czy sulfonamidy (7).

Ze względu na brak antygenu rzęskowego drugiej fazy, szczepy te stanowią poważny problem diagnostyczny. W rutynowo prowadzonym badaniu właściwości fenotypowych są one bowiem nierozróżnialne od potencjalnie możliwych jednofazowych wariantów (choć w praktyce nie obserwowanych) pozostałych pałeczek *Salmonella* z grupy O:4 posiadających w pierwszej fazie antygen rzęskowy H:i, czyli pałeczek *Salmonella* Lagos, *S*. Agama, *S*. Farsta, *S*. Tsevie, *S*. Glocester czy *S*. Tumodi. Dokładne określenie przynależności do konkretnego serotypu pałeczek o fenotypie 1,4,[5],12:i:- możliwe jest jedynie z zastosowaniem metod biologii molekularnej. Jedną z takich metod jest technika hybrydyzacji DNA-DNA na mikromacierzach (9) wymaga ona jednak posiadania drogiego sprzętu takiego jak kamera do odczytów, drogich odczynników oraz wykwalifikowanego personelu. Istnieją również opracowane testy PCR pozwalające odróżnić jednofazowe szczepy *Salmonella* Typhimurium (14).

* Badania zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego finansowanego ze środków na działalność statutową za rok 2014: 6/EMMŁ.

Jedną z ciekawszych metod, wykazującą przydatność do genoserotypowania pałeczek *Salmonella,* jest metoda TRS-PCR z zastosowaniem startera 5'$N_6(GTG)_4$. Wcześniej wykazano użyteczność tej metody do genoserotypowania pałeczek *Salmonella* należących do jednych z najczęściej izolowanych serotypów takich jak *S*. Enteritidis, *S*. Typhimurium, *S*. Virchow, *S*. Infantis, *S*. Hadar, *S*. Newport i *S*. Anatum (10). W poniższej pracy sprawdzono przydatność tej metody do różnicowania pałeczek *Salmonella* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:-.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Materiał do badań stanowiło 76 szczepów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* o wzorze antygenowym 4,[5],12:i:- wyizolowanych w latach 2007-2012 i zgromadzonych w kolekcji Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH. Szczepy te były reidentyfikowane w Zakładzie Bakteriologii NIZPPZH w ramach projektu badawczego NCN N N404 182940. Dodatkowo użyto szczepów kontrolnych serotypów *Salmonella* Typhimurium ATCC 70072, *S*. Lagos KOS 1967, *S*. Agama KOS 1968, *S*. Farsta KOS 1969, *S*. Tsevie KOS 1970, *S*. Glocester KOS 1971 oraz *S*. Tumodi KOS 1972, w celu uzyskania profili TRSPCR charakterystycznych dla wymienionych serotypów.

$(GTG)_4$-PCR. Genomowe DNA było izolowane z nocnej hodowli z zastosowaniem buforu lizującego z proteinazą K (Sigma-Aldrich), 6M roztworu GTC (MP Biomedicals), ekstrakcją mieszaniną fenol-chloroform-alk. izoamylowy (49,5:49,5:1) oraz precypitacją izopropanolem (Sigma-Aldrich). Reakcje PCR przeprowadzono z zastosowaniem pojedynczego startera o sekwencji 5'$N_6(GTG)_4$, którego przydatność w typowaniu serotypów *Salmonella* wykazano wcześniej (10). Mieszanina reakcyjna posiadała następujący skład: 19,65µl wody dejonizowanej (Sigma), 2,5µl 10x DeamTaq Green Buffer (Thermo Scientific), 0,5µl 10mM mieszaniny dNTP (Sigma-Aldrich), 0,5µl 10mM startera, 1,5µl DMSO (AppliChem), 0,1µl polimerazy DreamTaq o stężeniu 5U/µl oraz 0,5µl matrycowego DNA. Program reakcji PCR zawierał następujące etapy: Wstępna denaturacja w 95°C przez 3 min, następnie 35 cykli: 95°C przez 1 min, 55°C przez 1 min oraz 72°C przez 2 min, a następnie końcowy etap elongacji w 72°C przez 8 min. Produkty PCR rozdzielano w 1,6% żelu agarozowym (Agarose Electrophoresis Grade, MP Biomedicals) z zastosowaniem barwnika Midori Green Advanced (Nippon Genetics).

Analizę uzyskanych profili prowadzono z użyciem oprogramowania BioNumerics v6.6 (Applied Maths). Wzajemne podobieństwo profili określano używając korelacji Pearsona (optymalizacja 1%, stopień wygładzenia krzywych 1%) i algorytmu klasteryzacji UPGMA.

WYNIKI

Dendrogram obrazujący wzajemne podobieństwa profili $(GTG)_4$-PCR badanych szczepów przedstawiono na rycinie 1. Przeprowadzone analizy pozwoliły na wyodrębnienie dużej grupy, obejmującej 54 szczepy, dla których uzyskane profile prążków wykazywały podobieństwo około 87%. Do grupy tej zakwalifikowane zostały także dwa szczepy wzorcowe: *S.* Typhimurium oraz *S*. Gloucester, dla których wzajemne podobieństwo profili wynosiło aż

96%. Wynik ten wskazuje, że serotypy te nie mogłyby być rozróżniane przy zastosowaniu analizowanej metody.

Wśród pozostałych badanych szczepów możliwe jest wyróżnienie grupy 20 szczepów dla których podobieństwo profili wynosiło 91%. Do grupy tej zaliczony został również szczep wzorcowy *S.* Farsta. Zbliżony profil (87% podobieństwa) uzyskano również dla szczepu *S.* Tsevie. Profile prążków uzyskane dla szczepów z tej grupy były jednak uboższe i mniej wyraźne, niż dla wcześniej opisanych szczepów z dominującej grupy. Może to być wynikiem charakterystycznym dla tych izolatów lub też może świadczyć o pewnej niedoskonałości analizowanej metody.

Profile uzyskane dla szczepów wzorcowych *S.* Lagos oraz *S.* Tumodi jako jedyne wyraźnie odróżniały się od profili pozostałych badanych szczepów.

DYSKUSJA

Jednofazowe szczepy *S. enterica* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:- zostały po raz pierwszy wyizolowane w Hiszpanii w 1997 roku (3). Badania przeprowadzone przez *Echeitę* i wsp. (4) wykazały, że szczepy te posiadają sekwencję insercyjną IS200 charakterystyczną dla regionu międzygenowego pomiędzy genami *fliB-fliA* pałeczek *S.* Typhimurium. Równocześnie badacze ci stwierdzili, że przyczyną niewytwarzania rzęsek drugiej fazy jest brak kodującego je genu *fljB*. Na podstawie uzyskanych wyników i opracowanych starterów, Tennant i wsp. (14) opracowali multiplexPCR mogący służyć do wykrywania jednofazowych szczepów *S.* Typhimurium. Jednakże, co sami autorzy testu przyznają, tego typu prosty test PCR może nie wykrywać poprawnie wszystkich potencjalnych wariantów szczepów jednofazowych 1,4,[5],12:i:-, gdyż taki fenotyp może być wynikiem bardzo różnorodnych zmian, zarówno w samym genie *fljB*, jak i w genach odpowiedzialnych za zmienność fazową (zarówno ją regulującyc jak i genu *hin* kodującego białko-inwertazę) (11)

Przydatność metody genotypowania bakterii oparta na amplifikacji sekwencji flankowanych przez trójkowe sekwencje repetytywne, nazwana TRS-PCR, została potwierdzona dla takich gatunków jak: *Escherichia coli* ($(CGG)_4$-PCR) (1), *Mycobacterium gordonae* ($(CAC)_4$-PCR) (17), *Mycobacterium kansasii* (8) i *avium* (16) (dla obydwu $(CCG)_4$-PCR). W przypadku pałeczek Salmonella enterica metoda oparta na $(GTG)_4$-PCR okazała się przydatna do genoserotypowania izolatów należących do serotypów *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Infantis, *S.* Virchow, *S.* Hadar, *S.* Anatum i *S.* Newport (10). Wyniki te sugerowały możliwość wykorzystania tej metody do różnicowania także innych serotypów pałeczek *S. enterica*, w tym być może do oznaczania szczepów jednofazowych o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:-.

Uzyskane w poniższym badaniu wyniki wskazują jednak, że metoda $(GTG)_4$-PCR nie powinna być stosowana do typowania pałeczek *Salmonella* z grupy O:4, posiadających w pierwszej fazie antygen rzęskowy H:i. Dotychczasowe badania przydatności tej metody były prowadzone na izolatach należących do najczęściej izolowanych serotypów *Salmonella*. Serotypy te należą do bardzo odległych grup antygenowych (np. grupy antygenów somatycznych O:4, O:6,7, O:6,8, O:9, O:3). Może to przekładać się na występowanie dużych różnic ogólnogenomowych. Jednakże uzyskane w prezentowanej analizie wyniki wskazują, że w przypadku grupy złożonej ze szczepów wykazujących wysokie podobieństwo anty-

genowe, a więc być może także ogólnogenomowe, metoda ta nie pozwala na jednoznaczne rozróżnienie badanych serotypów. W efekcie niemożliwe jest więc ani określenie profilu prążków charakterystycznego dla jednofazowch szczepów *S. enterica* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:-, ani przypisanie tych szczepów do konkretnego serotypu. Należy jednakże pamiętać, że metoda oparta o starter $N_6(GTG)_4$ została wybrana jako najlepiej typująca pałeczki wcześniej analizowanych serotypów (10). Być może więc zastosowanie innego startera $N_6(TRS)_4$ do typowania szczepów jednofazowych o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:- pomogłoby uzyskać lepsze wyniki typowania takich pałeczek *S. enterica*.

REFERENCES

1. *Adamus-Bialek W, Wojtasik A, Majchrzak M, Sosnowski M, Parniewsi P*. $(CGG)_4$-Based PCR as a novel tool for discrimination of uropathogenic *Escherichia coli* strains: comparison with enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. J Clin Microbiol 2009; 47: 3937-44.
2. *Centers for Disease Conttrol and Prevention*. Salmonella surveillance: annual summary 2005 Atlanta Department of Health and Human Services. 2007.
3. *Echeita MA, Aladuena A, Cruchaga S, Usera MA*. Emergence and spread of atypical *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. J Clin Microbiol 1999; 37: 3425.
4. *Echeita MA, Herrera S, Usera MA*. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. J Clin Microbiol 2001; 39: 2981-3.
5. *European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control*. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA J 2014; 12: 3547 – 59.
6. *Hoszowski A, Samcik I, Lalak A, Skarżyńska M* i inni. Charakterystyka jednofazowych izolatów Salmonella enterica serowar Typhimurium (1,4,[5],12:i :-). Med Wet 2014; 70: 117–21.
7. *Hugas M, Beloeil P*. Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union - progress over the last ten years. Eurosurveillance 2014; 19: 1–4.
8. *Kubiak AB, Wojtasik A, Augustynowicz-Kopeć E, Zabost A, Zwolska Z, Parniewski P*. TRS-PCR--based genotyping of *Mycobacterium kansasii*. Progr Med 2011; XXIV: 846-52.
9. *Madajczak G, Wołkowicz T, Dera-Tomaszewska B, Wasiak M, Chróst A, Szych J*. Występowanie i charakterystyka jednofazowych pałeczek *Salmonella enterica* subsp. *enterica* o wzorze antygenowym 1,4,[5],12:i:- izolowanych w Polsce w latach 2007-2012. Med Dośw Mikrobiol 2014; 66: 65-78.
10. *Majchrzak M, Krzyżanowska A, Kubiak AB, Wojtasik A, Wołkowicz T, Szych J, Parniewski P*. TRS-based PCR as a potential tool for inter-serovar discrimination of *Salmonella* Enteritidis, *S*. Typhimurium, *S*. Infantis, *S*. Virchow, *S*. Hadar, *S*. Newport and *S*. Anatum. Mol Biol Rep. 2014; 41: 7121-32.
11. *Merickel SK, Haykinson MJ, Johnson RC*. Communication between Hin recombinase and Fis regulatory subunits during coordinate activation of Hin-catalyzed site-specific DNA inversion. Genes Dev 1998; 12: 2803-16
12. *Sadkowska-Todys M, Czarkowski MP*. Salmonellosis in Poland in 2012. Przegl Epidemiol 2014; 68: 353-5.
13. *Sadkowska-Todys M, Zieliński A, Czarkowski MP*. Infectious diseases in Poland in 2013. Przegl Epidemiol 2015; 69: 329-34.
14. *Tennant SM, Diallo S, Levy H, Livio S* i inni. Identification by PCR of non-typhoidal Salmonella enterica serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4:e621.

15. *Wasyl D, Hoszowski A*. Occurrence and characterization of monophasic Salmonella enterica serovar typhimurium (1,4,[5],12:i:-) of non-human origin in Poland. Foodborne Pathog Dis 2012; 9: 1037–43.
16. *Wojtasik A, Kubiak AB, Krzyżanowska A, Majchrzak M, Augustynowicz-Kopeć E, Parniewski P*. Comparison of the $(CGG)_4$-based PCR and MIRU-VNTR for molecular typing of *Mycobacterium avium* strains. Mol Biol Rep 2012; 39: 7681-6.
17. *Wojtasik A, Majchrzak M, Adamus-Bialek W, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Dziadek J, Parniewski P*. Trinucleotide repeat sequence-based PCR as a potential approach for genotyping *Mycobacterium gordonae* strains. J Microbiol Methods 2011; 85: 28-32.

Received: 18 XI 2015 r.

Autor Adress: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Department of Bacteriology,
National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene.