

Sistema di sorveglianza e rintraccio rapido delle fonti primarie di infezione nelle tossinfezioni alimentari da *Salmonella* spp. Parte II: Tipizzazione molecolare di alcuni ceppi di *Salmonella enterica* sierotipi Enteritidis e Typhimurium.

V. Rizzi, G. Migliorati, V. Acciari, O. Matteucci, E. Di Giannatale & V. Prencipe

Riassunto

Salmonella enterica sierotipo Enteritidis e sierotipo Typhimurium sono tra i sierotipi del genere *Salmonella* quelli isolati con maggiore frequenza nell'uomo. Le tradizionali attività di sorveglianza, basate sulla sierotipizzazione e sull'epidemiologia, non risultano sufficientemente efficaci per individuare focolai determinati da questi specifici e comuni sierotipi. È necessario, pertanto, una più accurata caratterizzazione dei ceppi con tecniche innovative, per un rintraccio rapido delle fonti primarie d'infezione. Il lavoro ha utilizzato le metodiche molecolari: Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), in associazione con l'antibiogramma secondo il metodo Kirby-Bauer, per effettuare la tipizzazione di 42 ceppi di *Salmonella*, in seno alla sperimentazione di un sistema di sorveglianza attivo per le tossinfezioni alimentari. I risultati, ai fini epidemiologici, hanno evidenziato, per il sierotipo Enteritidis, la scarsa utilità delle metodiche utilizzate e, per il sierotipo Typhimurium, la validità della sola PFGE.

Parole chiave

Antibiogramma, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Random Amplified

Polymorphic DNA (RAPD), *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, Tipizzazione molecolare.

Introduzione

La salmonellosi rappresenta la più importante tra le tossinfezioni alimentari, sia negli animali che nell'uomo (9), con oltre 1,4 milioni di casi umani ogni anno negli Stati Uniti (29). Per l'uomo la principale fonte d'infezione sono gli alimenti di origine animale contaminati da *Salmonella*. Sebbene tutti i sierotipi di *Salmonella* siano considerati potenzialmente patogeni per uomo e animali, solo un loro limitato numero è causa d'infezione (56). Inoltre, alcuni specifici cloni di *Salmonella enterica* sono diventati predominanti in una o più specie e hanno acquisito la capacità di diffondere a livello mondiale (4, 10).

Attualmente i sierotipi Enteritidis e Typhimurium rappresentano quelli più frequentemente isolati dall'uomo, diventando un rilevante problema di Sanità Pubblica anche per i paesi più sviluppati (5, 14, 50).

In passato, le attività di sorveglianza si sono avvalse, per la tipizzazione di *Salmonella*, di indagini specifiche di laboratorio come la sierotipizzazione e la fagotipizzazione. Queste metodiche non si sono dimostrate sufficientemente efficaci per individuare focolai causati da sierotipi

molto comuni come, appunto, Enteritidis e Typhimurium (2, 5, 19, 25). I limiti della sierotipizzazione e, soprattutto, della fagotipizzazione per il suo basso potere discriminante (6), hanno reso indispensabile l'adozione di tecniche in grado di garantire una più accurata caratterizzazione (34).

Da tempo si parla e si adottano sistemi di tipizzazione epidemiologica, che possono essere usati nell'investigazione di focolai per confermare e delineare i pattern di trasmissione di uno o più cloni epidemici e hanno, inoltre, la funzione di evidenziare i "marker epidemiologici", i caratteri distintivi degli isolati clonalmente correlati, discendenti della stessa cellula (43). In questo contesto già da anni si è iniziata ad applicare con successo la tipizzazione molecolare degli isolati che, attraverso la caratterizzazione di proteine o acidi nucleici, è risultata in grado di dare un contributo nell'analisi di focolai di malattie alimentari, soprattutto quando siano coinvolti sierotipi comuni, per cui è diventata una componente essenziale delle investigazioni epidemiologiche delle malattie infettive (46).

Le metodiche molecolari hanno numerosi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali (24) tra cui un maggior potere discriminante, maggiore velocità di esecuzione, la capacità di tipizzare la totalità dei ceppi e una più ampia applicazione a una varietà di specie batteriche.

Diversi autori sostengono la necessità di adottare più di una metodica per la tipizzazione dei ceppi isolati, dimostrando come la combinazione di diversi test aumenti il potere discriminante favorendo l'interpretazione epidemiologica dei focolai (7, 17, 22, 55).

In considerazione della loro diversa efficacia, la scelta delle metodiche da utilizzare è, quindi, determinante per ottenere risultati utili nella tipizzazione (48). Per esempio, l'adozione, come

in questo lavoro, di Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), metodiche basate sull'analisi dell'intero genoma batterico, ha risolto favorevolmente l'inconveniente della variabilità dei risultati ottenuti con i test che si avvalgono dell'amplificazione di limitate regioni del genoma (13, 30).

PFGE e RAPD, inoltre, forniscono buoni livelli di discriminazione per identificare, in tempi brevi, i cloni indagati e dimostrare l'eventuale correlazione tra agente patogeno isolato dall'uomo, alimento sospetto e serbatoio animale (2).

La PFGE per le caratteristiche di ripetibilità, riproducibilità e potere discriminante è da considerare, rispetto alle altre metodiche molecolari, utile soprattutto come metodo di conferma. Completa di linee guida per l'esatta interpretazione dei profili di restrizione dei ceppi studiati (21, 23, 43), la PFGE è determinante soprattutto nei casi in cui i pattern di restrizione appaiono molto differenti (16).

La RAPD, basata sull'amplificazione degli acidi nucleici senza avvalersi della conoscenza preventiva della sequenza dei nucleotidi del DNA target, viene impiegata per la sua rapidità di esecuzione (11, 30).

Nonostante alcuni problemi legati alla sua riproducibilità, si ritiene che, quando venga scelto un set appropriato di primer, la RAPD possa rappresentare un metodo alternativo rapido, riproducibile ed efficace per la tipizzazione genetica del sierotipo Enteritidis (6). Purtroppo però linee guida standard per l'interpretazione dei profili non sono ancora disponibili e i principi che emergono per l'interpretazione di altri sistemi di tipizzazione, come la PFGE, non possono essere adottati facilmente (48).

In questo contesto trova giustificazione il presente lavoro che ha valutato l'efficacia di PFGE e RAPD, in combinazione con Antibiogramma secondo

Kirby-Bauer, per la caratterizzazione epidemiologica di *Salmonella enterica* sierotipi Enteritidis e Typhimurium isolati nella regione Abruzzo (Italia) nel periodo aprile 2000 – ottobre 2002.

Nella sperimentazione l'Antibiogramma è stato incluso per monitorare e valutare il carattere fenotipico della popolazione batterica e la sua eventuale correlazione con i caratteri genotipici dei ceppi isolati.

Materiali e metodi

Ceppi batterici

Sono stati sottoposti ad analisi 42 ceppi batterici, identificati nella prima parte del lavoro (41), con metodi batteriologici e sierologici standard, come appartenenti al sierotipo Enteritidis (27 ceppi) e al sierotipo Typhimurium (15 ceppi).

In relazione al sierotipo Enteritidis, 25 ceppi sono risultati di provenienza umana, i restanti 2 di origine alimentare (maionese, würstel, ketchup e crespelle all'uovo). Per il sierotipo Typhimurium, tutti i ceppi sono risultati di provenienza umana.

PFGE

I 42 ceppi studiati sono stati sottoposti alla PFGE utilizzando gli enzimi di restrizione: *Xba* I, *Bln* I, *Spe* I e come marker dei pesi molecolari il ceppo di *Salmonella* sierotipo Braenderup 267 digerito con *Xba* I (32, 39, 52, 54).

Relativamente al ceppo di riferimento, sono stati selezionati sia per il sierotipo Enteritidis che per il sierotipo Typhimurium ceppi di campo isolati dai primi focolai epidemici studiati.

Ogni ceppo batterico in esame è stato fatto sviluppare in terreno agarizzato non selettivo per 14-18 h a 37°C ± 1°C. Successivamente è stata allestita una sospensione con 2 ml di Cell Suspension Buffer (100 mM Tris HCl pH 8,0 - 100 mM EDTA pH 8,0) aggiustata alla densità ottica di 0,850 (lunghezza d'onda 610 nm). I blocchetti sono stati

Tabella I
Condizioni di corsa per la PFGE

Parametri di corsa	<i>Xba</i> I	<i>Bln</i> I	<i>Spe</i> I
Basso peso molecolare	30 kb	30 kb	20 kb
Alto peso molecolare	700 kb	700 kb	400 kb
Tempo di pulso iniziale	2.16 sec	2.16 sec	2.98 sec
Tempo di pulso finale	63.8 sec	63.8 sec	35.38 sec

preparati con sospensione batterica a cui è stata aggiunta la proteinasi K (0,5 mg/ml) e uguale volume di agarosio (Seakem Gold Agarose – BioWhittaker) addizionato di sodio dodecil solfato (SDS) (agarosio 1%: SDS 1%). Ciascun blocchetto è stato quindi lisato in Cell Lysis Buffer (50 mM Tris HCl pH 8,0 - 50 mM EDTA pH 8,0 - 1% Sarcosyl), addizionato con proteinasi K (0,1 mg/ml), a 54°C per 2 ore in costante agitazione, in bagnomaria, con agitatore orbitale (160 rpm). I blocchetti sono stati successivamente lavati 2 volte con acqua distillata sterile, 4 volte con Tris-EDTA (10 mM Tris HCl pH 8,0 - 1 mM EDTA pH 8,0) e, in seguito, conservati in Tris-EDTA a 4°C fino al momento dell'utilizzo. La fase di digestione è stata effettuata sottoponendo una sezione (2 mm di spessore) di ogni blocchetto in una soluzione con 50 unità (pettine da 10 pozzetti: 0,25 unità/μl) o 30 unità (pettine da 15 pozzetti: 0,3 unità/μl) di *Xba* I, *Bln* I e *Spe* I.

L'incubazione, realizzata a 37°C ± 0,1°C, si è protratta per 2 h nel caso dell'enzima *Xba* I e per 4 h per *Bln* I e *Spe* I. Le sezioni digerite sono state inglobate in agarosio (Seakem Gold Agarose – BioWhittaker) all'1% in TBE (6.5 mM Tris HCl – 2.25 mM acido borico – 0.125 mM EDTA) fino a solidificazione del gel. Il prodotto ottenuto è stato sottoposto ad elettroforesi in TBE mantenendo la temperatura a 14°C ± 0,1°C per 18 h in apparecchio Chef Mapper (BioRad) con le condizioni di corsa riportate in Tabella I. Il gel è stato colorato con etidio bromuro (1 μg/ml), visualizzato al transilluminatore e fotografato con macchina

Polaroid. L'immagine è stata acquisita in formato "tif" con il sistema di fotodocumentazione UVP (Alpha Innotech).

Le immagini ottenute sono state successivamente analizzate con software BioNumerics versione 4.0 (Applied Maths, Kortrijk - Belgium), che conteggia automaticamente la matrice di similarità tra i diversi ceppi, secondo il coefficiente di Dice con parametro di ottimizzazione fissato all'1,5% e tolleranza 1,5% (16, 22, 24). Il software ha calcolato il dendrogramma, sulla base di questo tipo di matrice, con il metodo UPGMA (Unweight Pair Group Method using Arithmetic averages). Dalle singole matrici di similarità, calcolate per ogni enzima, il software ha creato un'unica matrice detta "combinata", ottenuta dalla media dei valori delle singole prove in cui ogni matrice è stata considerata ugualmente importante, indipendentemente dall'enzima di restrizione utilizzato.

Per poter in seguito valutare la possibile correlazione epidemiologica e definire la designazione dei ceppi analizzati sono stati utilizzati i criteri adottati da Tenover per interpretare i pattern di restrizione (47). È stato, infine, valutato il potere discriminante con l'indice di diversità di Simpson (18, 24, 37):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

con N = numero totale di ceppi testati, s = numero totale di tipi differenti identificati e nj = numero di ceppi identici di tipo j.

RAPD

Tutti i ceppi sono stati tipizzati anche mediante RAPD (31), secondo il protocollo del Laboratorio Comunitario di Riferimento per le Zoonosi (Berlino). Ogni ceppo batterico è stato fatto sviluppare overnight in brodo Circle Grow (BIO 101), quindi sottoposto a centrifugazione (14.000 rpm per 6 min a 4°C). Il

pellet ottenuto è stato ricostituito in Tris-EDTA (50 mM Tris HCl pH 8,0 - 1 mM EDTA pH 8,0) e quindi portato per 10 minuti alla temperatura di 100°C per determinare la lisi cellulare.

Come primer sono stati utilizzati 1254 (CCG CAG CCA A) e 1283 (GCC ATC CCC A); come marker dei pesi molecolari è stato impiegato il DNA Molecular Weight Marker X (Roche).

La reazione si è sviluppata in una soluzione di 20 µl contenente: GeneAmp PCR buffer (11,7 mM Tris HCl pH 8,3 - 58,4 mM KCl), 3,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (Roche), 0,12 µg/µl sieralbumina bovina (BSA), 2,4 pmol primer (Eurobio), 1,6 U AmpliTaq DNA polymerase (Roche). In seguito sono stati aggiunti 5 µl di campione per ottenere nel volume finale della soluzione una quantità di DNA batterico di 100 - 175 ng.

L'amplificazione è stata condotta in un termociclatore (Perkin-Elmer) secondo il seguente programma: un ciclo a 94°C per 1 min, sei cicli a 94°C per 30 s, 20°C per 40 s, 72°C per 1 min, quaranta cicli a 94°C per 30 s, 30°C per 40 s, 72°C per 2 min, un ciclo a 72°C per 4 min e conservazione a 4°C.

I prodotti di amplificazione sono stati successivamente analizzati in agarosio (Agarose MP - Roche) al 2% contenente bromuro di etidio (0,5 µl/ml). I profili elettroforetici sono stati comparati visivamente per valutare le bande identiche corrispondenti a frammenti di pari mobilità. La valutazione è stata effettuata sul numero di bande differenti dei ceppi. Le bande con un'eccessiva luminosità sono state considerate come frammenti doppi (44).

I ceppi risultati diversi per due o più bande maggiori sono stati considerati appartenenti a tipi differenti. I ceppi con profili risultati differenti solo per una banda maggiore o per una o due bande minori sono stati considerati sottotipi di un unico ceppo (8, 30). I profili corrispondenti a ogni tipo sono stati identificati con lettere, mentre, i sottotipi con un suffisso numerico.

Tabella II
Sintesi dei rilievi delle indagini epidemiologiche e dei risultati molecolari e di antibiotico-resistenza
dei 27 ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis, isolati da casi umani o da alimenti in
alcuni distretti della regione Abruzzo (2000-2002)

Dati epidemiologici			PFGE Enzimi				RAPD primers		Sensibilità agli antimicrobici Profilo
ID ceppo	Dati di isolamento	Origine del ceppo	Xba I Profilo	Bln I Profilo	Spe I Profilo	PFGE pattern	1254 Profilo	1283 Profilo	
1	AV-2000	Umano	A (Rif) ^(a)	A (Rif) ^(a)	A (Rif) ^(a)	X1	A (Rif) ^(a)	A (Rif) ^(a)	Sensibile
2	AV-2000	Umano	A	A	A	X1	A	A	Sensibile
3	AV-2000	Umano	A	A	A	X1	A	A	Sensibile
4	AV-2000	Umano	A2	A1	A	X6	A	A	Sensibile
5	AV-2000	Umano	A5	A5	A6	X9	A	A	Sensibile
6	AV-2000	Umano	A6	A1	A1	X10	A	A	Sensibile
7	AV-2000	Alimentare	A	A	A	X1	A	A	Sensibile
8	LN-2001	Umano ^(b)	A1	A	A	X2	A	A	Sensibile
9	LN-2001	Umano ^(b)	A3	A	A	X7	^(d)	^(d)	Sensibile
10	LN-2001	Umano ^(b)	A1	A	A	X2	A	^(d)	Sensibile
11	VA-2001	Umano	A3	A	A	X7	A	A	Sensibile
12	VA-2001	Umano ^(b)	A3	A	A	X7	^(d)	A	Sensibile
13	TE-2001	Alimentare	A3	A	A	X7	A	A	Sensibile
14	TE-2001	Umano	A3	A	A	X7	A	A	Sensibile
15	TE-2001	Umano	A7	A4	A2	X11	A	A	Sensibile
16	TE-2002	Umano ^(b)	A1	A	A	X2	A	A	Resistente (Nx-A-Su-T-SXT-Amc) ^(c)
17	TE-2002	Umano	A1	A	A3	X3	^(d)	A	Sensibile
18	TE-2002	Umano	A1	A	A	X2	A	A	Sensibile
19	TE-2002	Umano	A1	A2	A3	X5	A	A	Sensibile
20	TE-2002	Umano ^(b)	A1	A	A5	X4	A	^(d)	Resistente (S-Su) ^(c)
21	GI-2002	Umano	A1	A	A3	X3	^(d)	A	Resistente (K-S) ^(c)
22	GI-2002	Umano	A4	A3	A1	X8	^(d)	^(d)	Resistente (K-S) ^(c)
23	GI-2002	Umano	A1	A	A3	X3	A	A	Resistente (K-S) ^(c)
24	GI-2002	Umano	A4	A3	A1	X8	A	A	Resistente (K-S) ^(c)
25	GI-2002	Umano	A1	A	A3	X3	A	A	Resistente (K-S) ^(c)
26	CH-2002	Umano	A8	A6	A4	X12	A	A	Sensibile
27	CH-2002	Umano	A8	A6	A4	X12	A	A	Sensibile

a) Ceppo di riferimento

b) Ceppi provenienti da casi sporadici

c) A ampicillina

Amc amoxicillina + acido clavulanico

K kanamicina

NX acido nalidixico,

S streptomicina

Su sulfisoxazolo

SXT trimethoprim + sulfametoxazolo

T tetraciclina

d) profilo non interpretabile

Antibiogramma secondo Kirby-Bauer

La valutazione della sensibilità agli antimicrobici è stata effettuata mediante il test di diffusione su Mueller Hinton agar secondo Kirby-Bauer (20), utilizzando il seguente set di antimicrobici:

- acido nalidixico 30 µg
- sulfisoxazolo 25 µg
- ampicillina 10 µg
- tetraciclina 30 µg
- cefazolina 30 µg
- cefalotina 30 µg
- ciprofloxacina 5 µg
- enrofloxacin 5 µg
- cloramfenicolo 30 µg
- colistina 10 µg
- gentamicina 10 µg
- cefotaxime 30 µg
- kanamicina 30 µg
- trimethoprim + sulfamethoxazolo 1,25/23,75 µg
- streptomycin 10 mg
- amoxicillina + acido clavulanico 20/10 µg

I risultati sono stati interpretati secondo i criteri del National Committee for Clinical Laboratory Standards (15, 35, 36). I ceppi, pertanto, in relazione agli antimicrobici utilizzati, sono stati definiti:

- a) sensibili (se inibiti da tutti gli antimicrobici)
- b) resistenti (se non inibiti da almeno 1 a 3 antimicrobici)
- c) multiresistenti (se non inibiti da almeno 4 antimicrobici).

Risultati

L'analisi dei 27 ceppi del sierotipo Enteritidis condotta con PFGE utilizzando l'enzima *Xba* I ha prodotto 9 elettrotipi: il tipo A (di riferimento) e 8 sottotipi ad esso strettamente correlati (A1 - A8) con un massimo di 3 bande differenti (Figura 1, Tabella II). Il potere discriminante (D) è risultato di 0,82. Con lo stesso metodo ma con enzima *Bln* I si sono ottenuti 7 elettrotipi: il tipo A (di riferimento), 5 sottotipi ad esso strettamente correlati (A1 - A5) e un sottotipo (A6) potenzialmente correlato a quello di riferimento, con differenze fino a 5 bande (Figura

1, Tabella II). Il potere discriminante (D) per questo enzima è risultato di 0,56.

Anche la PFGE con l'enzima *Spe* I ha prodotto 7 elettrotipi: il tipo A (di riferimento) e 6 sottotipi strettamente correlati a questo (A1 - A6) con un massimo di differenze pari a 2 bande (Figura 1, Tabella II). Il potere discriminante (D) per l'enzima *Spe* I è stato di 0,70.

La combinazione dei risultati della PFGE con i diversi enzimi ha portato a un incremento dei profili identificati e di conseguenza del potere discriminante, che è risultato pari a 0,85 con *Xba* I + *Bln* I (10 profili) e a 0,91 con i tre enzimi (12 profili).

Può essere utile sottolineare come tutti i pattern elettroforetici ottenuti siano risultati strettamente correlati con gli enzimi *Xba* I e *Spe* I per la presenza di differenze minime a livello di profilo (fino a 3 bande differenti), e strettamente o potenzialmente correlati con l'enzima *Bln* I (fino a 5 bande differenti) nonostante i dati epidemiologici non confermino la correlazione.

La RAPD, analizzando i ceppi del sierotipo Enteritidis, ha prodotto profili identici per 22 ceppi con il primer 1254 (Figure 2, 3, 4, Tabella II) e per 23 ceppi con il primer 1283 (Figure 5 e 6, Tabella II). Per i restanti ceppi, 5 saggiati con il primer 1254 e 4 con il 1283, la metodica non ha permesso di ottenere profili visibili o interpretabili.

L'identità molecolare di tutti i profili interpretabili, appartenenti anche a ceppi non correlati epidemiologicamente, ha dimostrato lo scarso potere discriminante della metodica, sia singolarmente che in associazione con la stessa PFGE.

I risultati dell'Antibiogramma secondo Kirby-Bauer hanno evidenziato 4 diversi profili con 7 ceppi (25,9%) che hanno mostrato resistenza nei confronti di uno o più antimicrobici dei 16 testati (Tabella II).

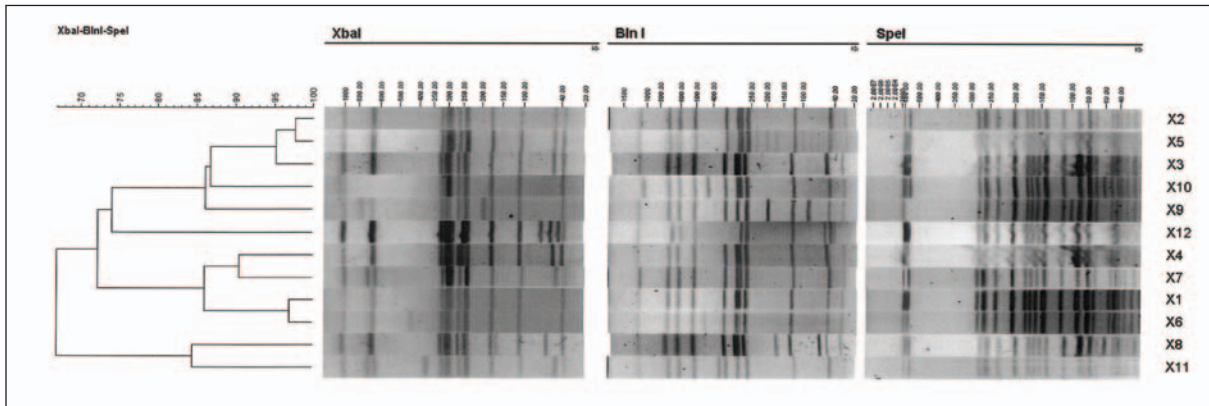


Figura 1
Profili ottenuti alla PFGE con i tre enzimi (*Xba* I, *Bln* I e *Spe* I) per i ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis

L'Antibiogramma ha mostrato un basso potere discriminante ($D = 0,43$), ma associato alla PFGE con i tre enzimi ha permesso di aumentare il numero dei profili e conseguentemente anche l'indice di discriminazione della stessa PFGE (da $D=0,91$ a $D=0,93$).

Per i 15 ceppi del sierotipo Typhimurium la PFGE con *Xba* I ha mostrato un buon livello di discriminazione ($D = 0,90$) producendo 9 diversi profili elettroforetici (Figura 7, Tabella III): tipo A con 2 profili ad esso strettamente correlati (A1 e A2), 4 profili potenzialmente correlati (A3 - A6) e 2 non correlati (B e C) con un massimo di 7 bande differenti.

Con l'enzima *Bln* I si sono ottenuti 11 profili diversi (Figura 7, Tabella III) di cui 2 profili tra loro correlati con sole 3 bande diverse (A e A1). Tutti gli altri profili (B - J) sono risultati non correlati al ceppo di riferimento A, mostrando fino a 13 bande diverse. La metodica ha evidenziato un ottimo potere discriminante ($D = 0,95$).

L'utilizzo dell'enzima *Spe* I ha consentito di ottenere 13 diversi profili elettroforetici (Figura 7, Tabella III) rappresentati da: tipo A (di riferimento), 3 sottotipi strettamente correlati ad A (A1, A2 e A3) e i rimanenti 9 sottotipi ad esso solo potenzialmente correlati con differenze fino a 6 bande rispetto al

riferimento A (A4 - A12). La metodica ha mostrato, anche con questo enzima, un ottimo potere discriminante ($D= 0,98$).

La combinazione dei risultati della PFGE con i diversi enzimi ha portato all'incremento del potere discriminante (D) che è risultato pari a 0,95 con *Xba* I + *Bln* I (11 profili) e a 0,99 con *Xba* I + *Bln* I + *Spe* I (14 profili).

La RAPD eseguita sul sierotipo Typhimurium con il primer 1254 (Figura 8, Tabella III) ha prodotto 2 diversi profili elettroforetici con scarso indice di discriminazione ($D = 0,13$). In particolare sono

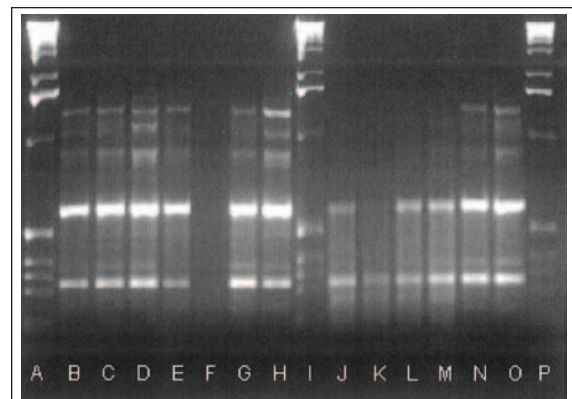


Figura 2
RAPD con il primer 1254 di 13 ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis. Colonne A, I e P: standard; B: 13; C: 14; D: 15; E: 8; F: 9; G: 10; H: 11; J: 12; K: 21; L: 22; M: 23; N: 24; O: 25.

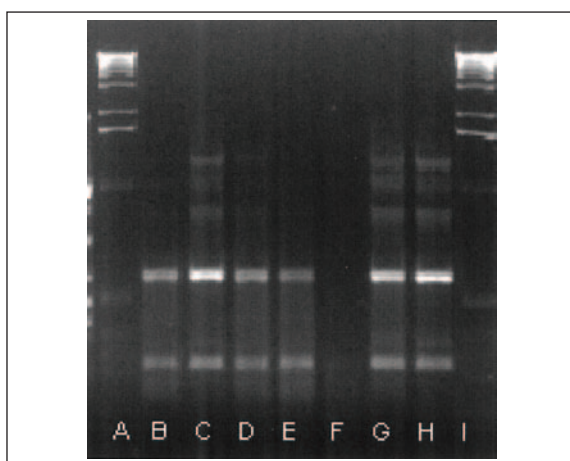


Figura 3
RAPD con il primer 1254 di 7 ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis
Colonne A e I : standard; B: 26; C: 27; D: 16; E: 20; F: 17; G: 18; H: 19.

risultati accomunati nel profilo A tutti i ceppi ad eccezione di uno, che presenta 2 bande differenti (profilo B).

Per questo sierotipo, il primer 1283 si è dimostrato non discriminante producendo un unico profilo per tutti gli isolati esaminati (Figura 8, Tabella III).

I risultati dell'Antibiogramma secondo Kirby-Bauer hanno mostrato 7 differenti profili con 9 ceppi resistenti (60%) (Tabella III).

La metodica, nel caso del sierotipo Typhimurium,

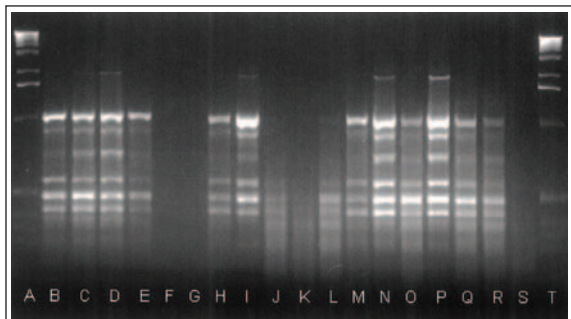


Figura 5
RAPD con il primer 1283 di 18 ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis
Colonne A e T: standard; B: 13; C: 14; D: 15; E: 8; F: 9; G: 10; H: 11; I: 12; J: 21; K: 22; L: 23; M: 24; N: 25; O: 26; P: 27; Q: 16; R: 20; S: 17.

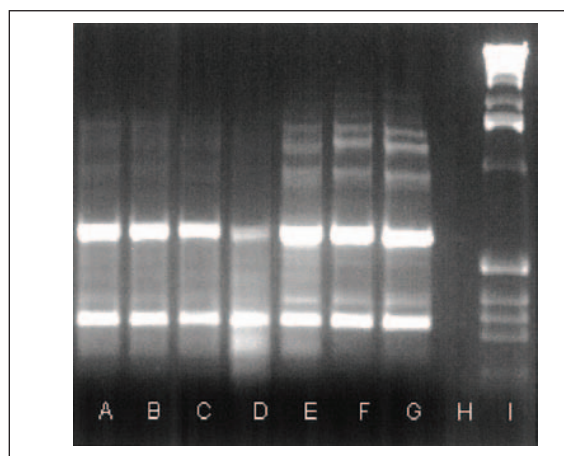


Figura 4
RAPD con il primer 1254 di 7 ceppi *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis
Colonna I: standard; A: 1; B: 2; C: 3; D: 4; E: 5; F: 7; G: 6.

ha dimostrato un modesto potere discriminante ($D=0,80$). In associazione alla PFGE, l'Antibiogramma ha contribuito al raggiungimento del massimo potere discriminante portandolo da 0,99 a 1.

Discussione

I sistemi di sorveglianza convenzionali non riescono a permettere la correlazione di focolai causati da sierotipi comuni di *Salmonella*, come Typhimurium ed Enteritidis, se non in relazione a un loro insolito e temporaneo aumento. Tali sistemi hanno manifestato scarsa sensibilità se applicati a pochi casi di tossinfezione in periodi di tempo superiori ai 6 mesi (5). In una situazione simile, la sperimentazione condotta in questo lavoro, su 42 episodi di salmonellosi in 2 anni, ha dimostrato come l'adozione di un sistema di sorveglianza coadiuvato da metodiche di tipizzazione discriminanti possa ottenere buoni risultati, soprattutto per il sierotipo Typhimurium.

La tipizzazione di *Salmonella* con una o più metodiche molecolari (in questo studio PFGE e RAPD) è ritenuta utile qualora dia un indice di

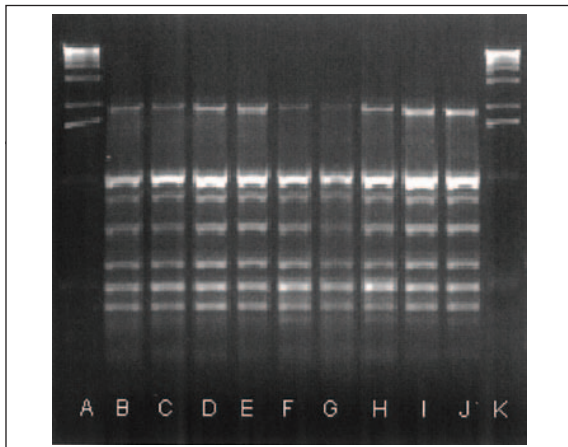


Figura 6
RAPD con il primer 1283 di 9 ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis
Colonne A e K : standard; B: 18; C: 19; D: 1;
E: 2; F: 3; G: 4; H: 5; I:7; J: 6

discriminazione (D) superiore a 0,95 (26, 28, 43). Riguardo ai ceppi del sierotipo Enteritidis, il lavoro ha dimostrato come il potere discriminante della PFGE raggiunga un valore non utile ($D=0,91$) nonostante l'uso dei tre enzimi (*Xba* I, *Bln* I, *Spe* I) in associazione. I ceppi analizzati, pur non in relazione sotto il profilo epidemiologico, per ambito geografico e temporale, sono tuttavia risultati strettamente correlati al ceppo di riferimento dal punto di vista molecolare, evidenziando l'elevata

omogeneità genetica del sierotipo Enteritidis rispetto agli altri.

I risultati della sperimentazione non confermano l'ipotesi secondo cui la PFGE potrebbe rappresentare il metodo genotipico più discriminante per i ceppi del sierotipo Enteritidis (12, 22, 23, 50, 51).

I risultati ottenuti con la RAPD, per quanto riguarda il sierotipo Enteritidis (Figure 2-3-4-5-6) rispecchiano i dati in letteratura sulle ridotte performance della metodica relative al suo basso potere discriminante (12), condizionato dalla scelta dei primer (27). Le limitazioni di questa metodica sono attribuibili anche alla sua ridotta ripetibilità e alla scarsa riproducibilità (38, 43, 53) influenzate da numerosi parametri (pH, forza ionica del buffer, temperatura di reazione, interazione primer-DNA, struttura secondaria del DNA, efficienza del blocco riscaldante del thermocycler, qualità della Taq-polimerasi, inadeguata preparazione del DNA, contaminazione con RNA) (30, 48, 53).

Per quanto riguarda la riproducibilità di tale metodica il lavoro ha ottenuto risultati in contrasto con quelli di alcuni autori (27, 42).

La RAPD, nella sperimentazione, non ha consentito di ottenere in una sola prova i pattern di tutti i ceppi analizzati, con la conseguenza di dover confrontare tra loro profili amplificati e analizzati

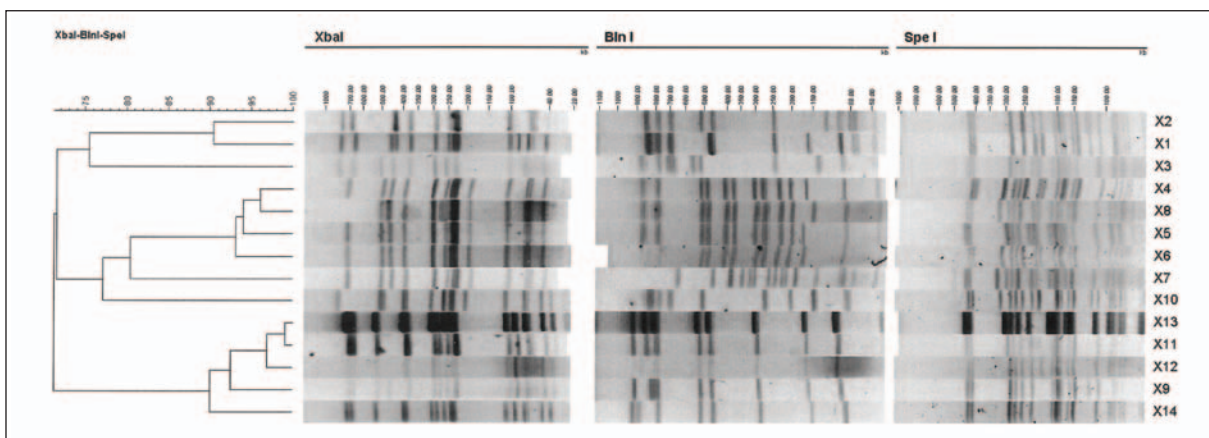


Figura 7
Profili ottenuti dalla PFGE con i tre enzimi (*Xba* I, *Bln* I e *Spe* I) per i ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium

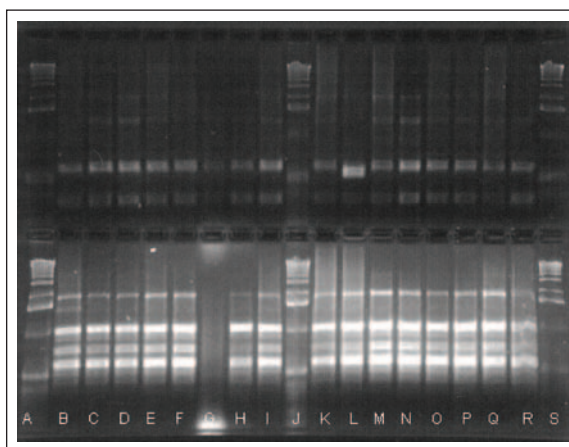


Figura 8
RAPD dei ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium
Colonne A-J e S: standard; B: 14; C: 2; D: 1; E: 3; F: 4; G: 15; H: ceppo non facente parte dei casi investigati; I: 9; K: 5; L: 6; M: 7; N: 8; O: 10; P: 12; Q: 11; R: 13.

in differenti prove, procedura sconsigliata da alcuni autori che hanno dimostrato come i migliori risultati si ottengono testando in una singola reazione di amplificazione e nello stesso gel elettroforetico tutti i ceppi batterici da confrontare (48, 53). La metodica ha prodotto, inoltre, pattern non sempre facilmente leggibili, con conseguenti difficoltà nella fase d'interpretazione.

La RAPD, quindi, non è risultata adatta per tracciare con certezza relazioni epidemiologiche tra i ceppi del sierotipo Enteritidis.

In relazione all'Antibiogramma (Tabella I) l'elevata resistenza dei ceppi del sierotipo Enteritidis nei confronti di streptomicina e kanamicina risulta in disaccordo con i risultati di altri studi (1, 49). Inoltre tale metodica si è dimostrata di scarso valore per scopi epidemiologici sia singolarmente che in combinazione con le altre.

In sintesi le tre metodiche (PFGE, RAPD, Antibiogramma), adottate per la tipizzazione del sierotipo Enteritidis, sono risultate insoddisfacenti a fini epidemiologici, sia utilizzate singolarmente

che in associazione, poiché non in grado di differenziare adeguatamente i ceppi non correlati epidemiologicamente.

Per quanto riguarda il sierotipo Typhimurium, la PFGE si è dimostrata altamente discriminante (Figura 7), in discordanza con i risultati di altri autori (19, 30), e abbastanza concorde con i dati epidemiologici rilevati, soprattutto per quanto riguarda i risultati con l'enzima *Bln I* ($D > 0,95$). L'utilizzo degli enzimi *Xba I* e *Spe I*, pur dimostrando un ottimo potere discriminante (D rispettivamente di 0,90 e 0,98), ha evidenziato la correlazione molecolare al ceppo di riferimento anche per i ceppi non epidemiologicamente collegati; la concordanza quindi tra gli esiti ottenuti con tali enzimi e i riscontri epidemiologici risulta modesta. Purtroppo l'assenza di ceppi sicuramente correlati dal punto di vista epidemiologico ha impedito di confermare i dati relativi all'efficacia della metodica nell'individuazione di relazioni genetiche tra isolati (5, 40).

Con il sierotipo Typhimurium la RAPD, invece, ha dimostrato un trascurabile potere discriminante con i primer utilizzati ($D=0,00$ e $0,13$ rispettivamente) (Figura 8), in accordo con quanto sostenuto da alcuni autori (30) e in contrasto con quanto dimostrato da altri (42).

In relazione alla tipizzazione fenotipica con Antibiogramma (Tabella II), i risultati per il sierotipo Typhimurium hanno confermato l'elevata percentuale di ceppi umani multiresistenti come evidenziato in letteratura (3, 4, 5, 30) e hanno dimostrato la scarsa utilità della metodica per scopi epidemiologici.

In sintesi, delle 3 metodiche adottate per la tipizzazione del sierotipo Typhimurium, la PFGE eseguita con l'enzima *Bln I*, ha permesso la differenziazione dei ceppi analizzati confermando la sporadicità degli episodi tossinfettivi, come si evince dai dati epidemiologici. Il dato ottenuto

Tabella III
Sintesi dei rilievi delle indagini epidemiologiche e dei risultati molecolari e di antibiotico-resistenza dei 15 ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium, isolati da casi umani in alcuni distretti della regione Abruzzo (2000-2002).

Dati epidemiologici			PFGE Enzimi				RAPD primers		Sensibilità agli antimicrobici Profilo
ID ceppo	Dati di isolamento	Origine del ceppo	<i>Xba</i> I Profilo	<i>Bln</i> I Profilo	<i>Spe</i> I Profilo	PFGE pattern	1254 Profilo	1283 Profilo	
1	LN-2001	Umano	A (Rif) ^(a)	A (Rif) ^(a)	A (Rif) ^(a)	X1	A (Rif) ^(a)	A (Rif) ^(a)	Resistente (A-C-S-Su-T-Amc) ^(b)
2	LN-2001	Umano	A6	B	A2	X9	A	A	Sensibile
3	LN-2001	Umano	C	D	A8	X13	A	A	Sensibile
4	LN-2001	Umano	C	D	A4	X12	A	A	Sensibile
5	LN-2001	Umano	C	F	A6	X14	A	A	Resistente (Su-T-SXT) ^(b)
6	LN-2002	Umano	B	C	A5	X10	B	A	Sensibile
7	LN-2002	Umano	A3	I	A12	X6	A	A	Resistente (A-S-Su-T) ^(b)
8	LN-2002	Umano	A3	H	A7	X4	A	A	Resistente (A-S-Su-T) ^(b)
9	VA-2001	Umano	A	A	A	X1	A	A	Resistente (A-S-Su-T-Col) ^(b)
10	TE-2002	Umano	A4	G	A10	X7	A	A	Resistente (A-S-Su) ^(b)
11	TE-2002	Umano	A5	J	A11	X8	A	A	Resistente (A-S-Su-T) ^(b)
12	TE-2002	Umano	A3	H	A9	X5	A	A	Resistente (A-S-Su-T) ^(b)
13	TE-2002	Umano	A2	E	A9	X3	A	A	Sensibile
14	CH-2001	Umano	A1	A1	A1	X2	A	A	Resistente (A-Su-T-SXT) ^(b)
15	CH-2001	Umano	C	D	A1	X11	A	^(c)	Sensibile

a) ceppo di riferimento

b) A ampicillina

Amc amoxicillina + acido clavulanico

C cloramfenicolo

Col colistina

S streptomina

Su sulfisoxazolo

SXT trimethoprim + sulfametoxazolo

T tetraciclina

c) profilo non interpretabile

trova conferma nella nota eterogeneità genetica del sierotipo Typhimurium (33) in conseguenza della quale l'individuazione di ceppi strettamente correlati in aree geografiche distinte potrebbe

indicare sia la diffusione del sierotipo Typhimurium su scala mondiale, che l'esistenza di gruppi clonali emergenti strettamente correlati (45).

Le altre metodiche adottate sono risultate poco

utili in campo epidemiologico poiché la RAPD ha evidenziato una quasi totale omogeneità dei ceppi e l'Antibiogramma una scarsa differenziazione dei profili di antibioticoresistenza.

In conclusione, la ricerca ha evidenziato la scarsa utilità di PFGE, RAPD, Antibiogramma nella tipizzazione, a fini epidemiologici, della *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis; relativamente al sierotipo Typhimurium, la PFGE, tra i metodi adottati, è risultata l'unica utile per la tipizzazione epidemiologica degli isolati.

Bibliografia

1. Adesiyun A., Carson A., McAdoo K. & Bailey C. 2000. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from the Caribbean by pulsed-field gel electrophoresis. *Pan Am J Publ Health*, **8** (5), 342-347.
2. Ahmed R., Soule G., Demczuk W.H., Clark C., Khakhria R., Ratnam S., Marshall S., Ng L-K., Woodward D.L., Johnson W.M. & Rodgers F.G. 2000. Epidemiologic typing of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. *J Clin Microbiol*, **38** (6), 2403-2406.
3. Baggesen D.L. & Aarestrup F.M. 1998. Characterization of recently emerged multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 and other multiresistant phage types from Danish pig herds. *Vet Rec*, **143**, 95-97.
4. Baggesen D.L., Sandvang D. & Aarestrup F.M. 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol*, **38** (4), 1581-1586.
5. Bender J.B., Hedberg C.W., Bouxrud D.J., Besser J.M., Wicklund J.H., Smith K.E. & Osterholm M.T. 2001. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *N Engl J Med*, **344** (3), 189-195.
6. Betancor L., Schelotto F., Martinez A., Pereira M., Algorta G., Rodriguez M.A., Vignoli R. & Chabalgoity J.A. 2004. Random Amplified Polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *J Clin Microbiol*, **42** (3), 1155-1162.
7. Biendo M., Thomas D., Dechepey O., Laurans G. & Eb F. 2003. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int J Med Microbiol*, **293**, 219-223.
8. Bingen E., Bonacorsi S., Rohrllich P., Duval M., Lhopital S., Brahimi N., Vilmer E. & Goering R.V. 1996. Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O: 12 outbreak isolates from a pediatric hospital. *J Clin Microbiol*, **34** (12), 3226-3229.
9. Brenner F. W., Villar R.G., Angulo F. J., Tauxe R. & Swaminathan B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, **38**, 2465-2467.
10. Centers for Disease Control (CDC) 2001. PHLS Surveillance Data. *Salmonella*. Annual Summaries: *Salmonella*, 2001. CDC, Atlanta (cdc.gov/ncidod/dbmd/phlsdata/salmonella.htm)
11. Chansiripornchai N., Ramasoota P., Bangtrakulnonth A., Sasipreeyajan J. & Svenson S.B. 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing Avian *Salmonella enterica* subsp. Enterica. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **29**, 221-225.
12. Clark C.G., Kruk T.M.A.C., Bryden L., Hirvi Y., Ahmed R. & Rodgers F.G. 2003. Subtyping of *Salmonella enterica* serotype enteritidis strains by manual and automated PstI-SphI ribotyping. *J Clin Microbiol*, **41** (1), 27-33.
13. Clewley J.P. 1998. A user's guide to producing and interpreting tree diagrams in taxonomy and phylogenetics. Part 3. Using restriction

- fragment length polymorphism patterns of bacterial genomes to draw trees. *Commun Dis Publ Health*, **1**, 208-210.
14. Fernandes S. A., Ghilardi A. C. R., Tavechio A.T., Machado A. M. O. & Pignatari A.C.C. 2003. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella enteritidis* strains isolated in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop San Paulo*, **45** (2), 59-63.
 15. Gorman R., Adley C.C. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates from human, food and animal sources in the Republic of Ireland. *J Clin Microbiol*, **42** (5), 2314-2316.
 16. Grothues D. & Tümmler B. 1991. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Molec Microbiol*, **5** (11), 2763-2776.
 17. Helmuth R. & Schroeter A. 1994. Molecular typing methods for *S. enteritidis*. *Int J Food Microbiol*, **21**, 69-77.
 18. Hunter P.R. & Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, **26**, 2465-2466.
 19. Jeffreys N.J., James G.S., Chiew R. & Gilbert G.L. 2001. Practical evaluation of molecular subtyping and phage typing in outbreaks of infection due *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Pathol*, **33**, 66-72.
 20. Kirby J., Bauer A. W., Sherris C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45**, 493-496.
 21. Koort J.M.K., Lukinmaa S., Rantala M., Unkila E. & Siitonen A. 2002. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol*, **40** (9), 3497-3498.
 22. Laconcha I., Lòpez-Molina N., Rementeria N., Audicana A., Perales I. & Garaizar J. 1998. Phage typing combined with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Random Amplified Polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *Int J Food Microbiol*, **40**, 27-34.
 23. Laconcha I., Baggesen D. L., Rementeria A. & Garaizar J. 2000. Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. *Vet Microbiol*, **75**, 155-165.
 24. Landeras E., Gonzàles-Hevia M.A. & Mendoza M.C. 1998. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. *Int J Food Microbiol*, **43**, 81-90.
 25. Liebana E., Garcia-Migura L., Breslin M.F., Davies R.H. & Woodward M.J. 2001. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *J Clin Microbiol*, **39** (1), 154-161.
 26. Liebana E., Guns D., Garcia-Migura L., Woodward M.J., Clifton-Hadley F.A. & Davies R.H. 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol*, **39** (10), 3609-3616.
 27. Lin A.W., Usera M.A., Barrett T.J. & Goldsby R.A. 1996. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol*, **34** (4), 870-876.
 28. Ling J.M., Koo I.C., Kam K.M. & Cheng A.F. 1998. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong Kong from

- 1986 to 1996. *J Clin Microbiol*, **36** (6), 1693-1699.
29. Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S. & Shapiro C. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **5**, 607-625.
30. Mhand R.A., Brahim N., Moustou N., El Mdaghi N., Amorouch H., Grimont F., Bingen E. & Benbachir M. 1999. Characterization of extended-spectrum B-Lactamase-producing *Salmonella typhimurium* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol*, **37** (11), 3769-3773.
31. Miyamoto T., Tian H.Z., Okabe T., Trevanich S., Asoh K., Tomoda S., Honjoh K.-I. & Hatano S. 1998. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis for detection of *Salmonella* spp. in foods. *J Food Prot*, **61** (7), 785-791.
32. Murase T., Nakamura A., Matsushima A. & Yamai S. 1996. An epidemiological study of *Salmonella enteritidis* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): Several PFGE patterns observed in isolates from a food Poisoning outbreak. *Microbiol Immunol*, **40**, 873-875.
33. Nastasi A. & Mammina C. 1995. Epidemiological evaluation by PCR ribotyping of sporadic and outbreak-associated strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Res Microbiol*, **146**, 99-106.
34. Nastasi A. & Mammina C. 1996. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype enteritidis infections in southern Italy during the years 1980-1994. *Res Microbiol*, **147**, 393-403.
35. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard-seventh edition. M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 26 pp.
36. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement. Vol. 22, n.1. M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 136 pp.
37. Old D.C., Chisholm S.A. & Crichton P.B. 1999. Molecular fingerprinting of *Salmonella* serotype Glostrup. *Lett Appl Microbiol*, **29**, 156-159.
38. Olive D.M. & Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, **37** (6), 1661-1669.
39. Peters T.M., Maguire C., Threlfall E.J., Fisher I.S.T., Gill N. & Gatto A.J. 2003. The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Eurosurveillance*, **8** (2), 46-50.
40. Refsum T., Heir E., Kapperud G., Vardund T. & Holstad G. 2002. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals and the environment in Norway. *Appl Environ Microbiol*, **68** (11), 5600-5606.
41. V. Rizzi, G. Migliorati, V. Acciari, V. Prencipe, E. Di Giannatale, P. Calistri & O. Matteucci 2005. Sistema di sorveglianza e rintraccio rapido delle fonti primarie di infezione nelle tossinfezioni alimentari da *Salmonella* spp. *Vet Ita*, **41** (4), 239-248.
42. Soto S.M., Guerra B., Gonzalez-Hevia M.A. & Mendoza M.C. 1999. Potential of three-way Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl Environ Microbiol*, **65** (11), 4830-4836.
43. Struelens M.J. 1998. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **93** (5), 581-585.

44. Struelens M.J., Schwam V., Deplano A. & Baran D. 1993. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, **31** (9), 2320-2326.
45. Sulakvelidze A., Kekelidze M., Turabelidze D., Tsanova S., Tevsadze L., Devdariani L., Gautom R., Myers R., Morris J.G. & Imnadze P. 2000. Salmonellosis in the Republic of Georgia: Using molecular typing to identify the outbreak-causing strain. *Emerg Infect Dis*, **6** (1), 70-73.
46. Swaminathan B., Barrett T.J., Hunter S.B. & Tauxe R.V., CDC PulseNet Task Force, 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*, **7** (3), 382-389.
47. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. & Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, **33** (9), 2233-2239.
48. Tenover F.C., Arbeit R.D. & Goering R.V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **18** (6), 426-439.
49. Threlfall E.J., Fisher I.S.T., Berghold C., Gerner-Smidt P., Tschape H., Cormican M., Luzzi I., Schnieder F., Wannet W., Machado J. & Edwards G. 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Eurosurveillance*, **8** (2), 41-45.
50. Thong K-L., Ngeow Y-F., Altwegg M., Navaratnan P. & Pang T. 1995. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by Pulsed-Filed Gel Electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol*, **33**: 1070-1074.
51. Tsen H.Y. 2002. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Typhi and Enteritidis isolated in Taiwan. *J Food Drug Anal*, **10** (4), 242-251.
52. Tsen H.Y., Lin J.S., Hu H.H. & Wang T.K. 1999. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as an epidemiological tool for analysis of sporadic associated strains of *Salmonella typhi* isolated in Taiwan. *J Appl Microbiol*, **86**, 761-768.
53. Tyler K.D., Wang G., Tyler S.D. & Johnson W.M. 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*, **35** (2), 339-346.
54. Weigel R.M., Qiao B., Teferedegne B., Suh D.K., Barber D.A., Isaacson R.E. & White B.A. 2004. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reactions genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. *Vet Microbiol*, **100**, 205-217.
55. Wright J.M., Brett M. & Bennett J. 1998. Laboratory investigation and comparison of *Salmonella* Brandenburg case in New Zealand. *Epidemiol Infect*, **121**, 49-55.
56. Yan S.S., Pendrak M.L., Abela-Ridder B., Punderson J.W., Fedorko D.P. & Foley S.L.. 2003. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. *Clin Appl Immunol Rev*, **4**, 189-204.