

SALMONELLA ENTERITIDIS - TEHNIKE FENOTIPIZACIJE I GENOTIPIZACIJE

Biljana Miljković-Selimović¹, Tatjana Babić², Branislava Kocić¹ i Ljiljana Ristić²

Danas je *Salmonella enterica subspecies enterica serovar Enteritidis* (*S. Enteritidis*) jedan od najzastupljenijih serotipova uzročnika enterokolitisa. S obzirom da se metode identifikacije *S. Enteritidis* stalno usavršavaju, od fenotipskih metoda mogu se primeniti biotipizacija, fagotipizacija (Phage typing - PT) i rezistotipizacija. Od genotipskih metoda tipizacije na *S. Enteritidis* se primenjuju analiza plazmidskog profila (PP), restrikciona analiza plazmida virulencije, ribotipizacija, elektroforeza u pulsirajućem polju jednosmerne struje (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), insercione sekvence, lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction - PCR), analiza strukture slučajno odabrane sekvence DNK (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis - RAPD). *S. Enteritidis* sa jedne strane ispoljava izrazito homogenu strukturu koja se manifestuje dominacijom nekoliko fagotipova, ispoljavanjem jednog plazmidskog profila u većini sojeva, postojanjem samo tri klonalne linije, kao i većim brojem elektroforetskih tipova u samo jednoj liniji dendrograma. Suočavanje sa nedovoljnom diskriminacijom tipizirajućih sistema kod *S. Enteritidis* upućuje nas na uvođenje novih metoda i poboljšavanje već postojećih za tipizaciju sojeva. *Acta Medica Medianae* 2009;48(3):31-34.

Ključne reči: *Salmonella Enteritidis*, tehnike tipizacije bakterija, identifikacija

Medicinski fakultet u Nišu¹,
Institut za javno zdravlje, Niš²

Kontakt: Biljana Miljković-Selimović
Institut za javno zdravlje, Centar za mikrobiologiju
Bulevar dr Zorana Đinđića 50
18000 Niš, Srbija
Tel.: 381 18 4226448
E-mail biljams@eunet.rs

Uvod

Salmonella enterica subspecies enterica serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) je danas jedan od najzastupljenijih serotipova uzročnika enterokolitisa (1). Mada se metode identifikacije pojedinih sojeva *S. Enteritidis* stalno usavršavaju, ovaj serotip je zbog njegove homogenosti i dalje teško tipizirati, a genotipske i fenotipske metode tipizacije omogućavaju tipizaciju uz određena ograničenja.

Od fenotipskih metoda, na *S. Enteritidis* se uglavnom primenjuje biotipizacija, fagotipizacija (Phage typing - PT) i rezistotipizacija. Rezistotipizacija, koja se primenjuje na druge serotipove salmonela, kod *S. Enteritidis* nema veliku vrednost pošto je većina sojeva osetljiva na primenjivane antibiotike (2). Za biotipizaciju *S. Enteritidis* neophodno je 45 biohemijskih testova koji se rutinski koriste u tipizaciji bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*. Međutim, sojevi fagotipa (PT) 8, koji su i najčešći (do 80%) u mnogim delovima sveta, uglavnom daju identične reakcije za većinu testova, izuzev što je odsustvo razgradnje meliobioze obično udruženo sa PT 13a i 14 (3).

Za *S. Enteritidis* postoji nekoliko metoda fagotipizacije. Kolindejska metoda fagotipizacije omogućava podelu ovog serotipa na 27 fagotipova. Međutim, većina sojeva pripada jednom ili dvoma

najčešćim fagotipovima (4). Ovaj sistem u sadašnjem momentu zahteva kolekciju od najmanje 10 faga. Do sada su razvijene barem još dve metode, što znači da ne postoji internacionalni dogovor i može doći do konfuzije o dominantnim fagotipovima u različitim zemljama. Da bi se ova tehnika uvela obično je potrebno nekoliko meseci. Prednost fagotipizacije je što se može tipizirati i do 40 sojeva za 48 sati, a loša strana je slaba moć razlikovanja među sojevima, jer najčešće pripadaju PT 4 i 8 (4). Sa druge strane, zabeležen je prelaz jednog fagotipa u drugi (5).

Biohemijski fingerprinting (Phene Plate System), primenjen za ispitivanje 86 sojeva *S. Enteritidis* izolovanih u Nemačkoj između 1980. i 1992. godine, identifikovao je 23 biohemijska fenotipa (Biochemical phenotypes - BPT). Kombinacija biohemijskog fingerprintinga i fagotipizacije omogućila je podelu u 25 fenotipova. Fenotip C2:8 (BPT:PT) nađen je u dužem vremenskom intervalu, a fenotip C4:4 bio je izolovan samo između 1988. i 1992. godine (6). Ovaj nalaz ukazuje da bi kombinovanje nekih fenotipskih metoda moglo da poboljša njihovu moć diskriminacije.

Kombinacija elektroforeze multilokusnih enzima, analize proteina spoljašnje membrane, analize ukupnih ćelijskih proteina (Whole Cells Proteine Profile - WCPP) i primena "Fourier - transform" infracrvene spektroskopija (FTIR), na sojeve *S. Enteritidis* PT 25/17 pokazala je da se unutar jednog fagotipa mogu naći sojevi koji se razlikuju od osnovnog profila. Utvrđeno je da su WCPP i FTIR pogodne metode za dodatnu podelu *S. Enteritidis* (7).

Od genotipskih metoda tipizacije na *S. Enteritidis* se primenjuju, sa manje ili više uspeha, analiza plazmidskog profila (PP), restrikciona analiza

plazmida virulencije, ribotipizacija, elektroforeza u pulsirajućem polju jednosmerne struje (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), insercione sekvence, lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction - PCR), analiza strukture slučajno odabrane sekvence DNK (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis - RAPD).

Samo analiza plazmidskog profila *S. Enteritidis* nema veliku diskriminatornu moć (8). Ispitivanjem plazmidskog profila sojeva *S. Enteritidis* izolovanih na našem geografskom području dokazano je 12 različitih profila. Međutim, većina od njih pripadala je jednom plazmidskom profilu sa plazmidom od 38 MDa. Takođe, nije utvrđena ni razlika između pojave plazmidskih profila kod epidemijskih i neepidemijskih sojeva njihovim praćenjem u istom vremenskom periodu (9).

Vrlo često se primenjuje kombinacija fagotipizacije i ispitivanja plazmidskog profila. U studiji u kojoj je ispitano 318 sojeva *S. Enteritidis*, uglavnom izolovanih iz živine i njene okoline u Kanadi, dokazano je dvanaest fagotipova. Međutim, kod ovih sojeva bilo je moguće odrediti petnaest plazmidskih profila (10). Ispitujući plazmidski profil *S. Enteritidis*, izolovane samo iz živine u periodu 1989-90. godine u Kanadi, autori su dokazali dvanaest profila naspram samo četiri fagotipa (11).

Kada su u pitanju sojevi *S. Enteritidis* PT 8, smatra se da je širenje ovog dominantnog klona, kod koga je uglavnom dokazan PP 38 MDa, smanjilo diskriminatornu sposobnost oba tipizirajuća sistema. Ispitivanjem 203 sporadična i epidemijska izolata *S. Enteritidis*, koja su izolovana u Merilendu između 1985. i 1990. godine, identifikovano je deset plazmidskih profila. Dominantan profil bio je PP 55 kba (38 MDa); on je činio 86% plazmidskih profila kod izolata ovog fagotipa iz 1988-89. godine (12).

U drugom istraživanju analiza plazmidskih profila pokazala se superiornom u odnosu na fagotipizaciju sojeva PT 8, jer je bilo moguće opisati šest različitih plazmidskih profila naspram samo jednog fagotipa. Sa druge strane, tri soja bez plazmida od 55kba (38 MDa) mogla su biti diferencirana primenom dva dodatna faga (3). Ovi rezultati ukazuju da u nekim slučajevima određivanje plazmidskog profila i fagotipizacija mogu biti komplementarne metode.

Prema jednom broju autora, određivanje plazmidskog profila predstavlja dopunu fagotipizaciji. Ispitivanje predstavnika 27 fagotipova *S. Enteritidis* pokazalo je da se može identifikovati samo jedanaest plazmidskih profila. Dva profila su dokazana u petnaest sojeva PT 4 i 8, koji su i dva najčešća fagotipa u Velikoj Britaniji. Varijacije plazmidskih profila, pogodne za epidemiološka ispitivanja, nađene su kod trinaest fagotipova (13). *S. Enteritidis* PT 4 imala je devet različitih plazmidskih profila (14). Stoga se analiza plazmidskog profila prema ovim autorima može prihvatiti kao efikasna dopuna fagotipizacije.

Ribotipizacija se u nekim ispitivanjima pokazala kao bolja diskriminatorna metoda od analize plazmidskog profila i fagotipizacije. Ispitivanjem sojeva *S. Enteritidis* izolovanih iz živine, nepovezanih epidemijski, sojeva dobijenih iz dve epidemije i humanih sporadičnih izolata, autori su našli pet različitih plazmidskih profila i četiri različita fagotipa.

Utvrđeno je, međutim, deset ribotipova. Ovakav nalaz ukazuje na primenljivost ribotipizacije u diferencijaciji sojeva istog plazmidskog profila (15).

Ribotipizacija može biti i samo komplementarna analizi plazmidskog profila. Ispitivani su sojevi izolovani iz uzoraka stolica dve grupe bolesnika koji su *S. Enteritidis* izlučivali do četiri meseca posle infekcije. Utvrđeno je da je osetljivost analize ribozomalne DNK zavisila od korišćenih enzima. Od četrnaest različitih enzima, samo su *SmaI* i *SphI* dali različite profile. Razlike su utvrđene između grupa, ali su svi sojevi koji su pripadali istoj grupi pokazivali identične profile. U jednom jedinom soju, izolovanom 66. dana od početka bolesti, zapažen je *SphI* profil koji se razlikovao od originalnog izolata iz istog bolesnika. S obzirom na to da je i između plazmidskih profila sojeva ove dve grupe postojala razlika (PP 55 4,5 kba i PP 55 4,3 kba) (PP 38 3MDa i PP 38 2,8MDa) pokazano je da analiza gena za rRNK može biti komplementarna analizi plazmida ukoliko su oni prisutni (16).

Ribotipizacijom je pokušana i subtipizacija sojeva *S. Enteritidis* PT 8, s obzirom na to da analiza plazmidskog profila često ne omogućava njihovu efikasnu podelu. Ispitivani sojevi su uglavnom vodili poreklo iz severoistočnog, srednjeatlantskog i srednjojapanskog regiona SAD. Većina sojeva (15 od 20) imala je identičan i plazmidski profil i ribotip, ukazujući na sličnost ovih sojeva. Primenom restrikcione endonukleaze *AccI* dobijeno je šest različitih profila, a jedan uzorak je mogao biti subtipiziran primenom enzima *SmaI*. Epidemiološki povezani sojevi imali su identične ribotipove. Ovi nalazi ukazuju da ribotipizacija pomoću *AccI* i *SmaI* obezbeđuje dodatnu diskriminaciju među nekim sojevima PT8 (17). Restrikcijom analizom plazmida virulencije *S. Enteritidis* iz različitih izvora, potvrđen je stalni karakter nukleotidnih sekvenci plazmida sa molekularnom težinom od 38 MDa. Stoga je zaključeno da restrikcijom analiza ovog plazmida nije pogodna metoda za definisanje epidemijskog soja (18).

Primenom PFGE na analizu sojeva *S. Enteritidis* PT 4, izolovanih u Engleskoj i Velsu, uz korišćenje restrikcionog enzima *XbaI*, utvrđeno je devet profila uz dominaciju jednog (14). Takođe, kada je ova tehnika, uz isti enzim, primenjena na analizu sojeva *S. Enteritidis* PT 4 ljudi i živine izolovane u Koreji, utvrđeno je deset profila (19). Međutim, primena ove metode na sojeve fagotipova 9a, 13a, 25 izolovanih u Slovačkoj Republici, utvrdila je prisustvo samo dva profila koji nisu korespondirali sa potvrđenim fagotipovima (20). Sa druge strane, kombinovana primena PFGE sa tri restrikcione enzima (*XbaI*, *SpeI* i *NotI*), analize plazmidskog profila i fagotipizacije na sojeve *S. Enteritidis* izolovane na Tajvanu potvrdila je postojanje 46 subtipova sa diskriminatornim indeksom koji je iznosio 0,795 (21).

Diferenciranje sojeva *S. Enteritidis* pokušano je i određivanjem IS200 profila i utvrđeno je da izolati *S. Enteritidis* imaju visok stepen genomske homogenosti. *S. Enteritidis* sadrži konstantna i varijabilna mesta insercije insercione sekvence (IS) 200. Utvrđeno je da se kod *S. Enteritidis* izolovane u Švajcarskoj uz pomoć određivanja IS200 profila mogu identifikovati svega tri klonalne

linije (22). Analiza rearanžmana DNK oko varijabilnih mesta i njihovo upoređivanje sa fagotipom pokazalo je da humani izolati PT 4, koji su izazivali epidemije enterokolitisa, pripadaju istoj klonalnoj liniji. S obzirom na to što su primenom IS200 dokazane tri osnovne klonalne linije, one su delimično omogućile diferencijaciju PT 4 i 8. PT 4 približno odgovara klonalnoj liniji (SeCL) I, PT 8 odgovara SeCL II, a PT NT, 15, 11 odgovaraju SeCL III koja se ređe javlja posle 1983. godine. Imajući u vidu ove rezultate, smatra se da je profil dobijen uz pomoć SE IS200 primenljiv za ispitivanje epidemiologije samo manje čestih serotipova (22). Primena insercionih sekvenci za tipizaciju sojeva *S. Enteritidis* ne mora biti uspešna. Primenom IS200 i ribotipizacije na četrnaest sojeva ovog serotipa francuski autori nisu mogli da izvrše tipizaciju koja je bila moguća određivanjem plazmidskog profila i ispitivanjem osetljivosti na antibiotike (23).

Na analizu sojeva *S. Enteritidis* primenjuje se i kvantitativna lančana reakcija polimeraze. Deo fragmenta plazmidске DNK označen kao *PstI/Pvull*, koji se nalazi na plazmidu virulencije *S. Enteritidis* i koji je specifičan za ovaj serotip, upotrebljen je za dizajniranje prajmera za ovu reakciju (24).

Metoda analize slučajno umnožene sekvence DNK (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis - RAPD) je, takođe, primenjena za diferencijaciju izolata *S. Enteritidis*. Ispitano je 29 izolata, koji su primenom fagotipizacije, ribotipizacije i PFGE podeljeni na dvadeset različitih subtipova. Međutim, RAPD fingerprinting je sam omogućio podelu na četrnaest RAPD tipova. Izolati *S. Enteritidis* koji se na drugi način nisu mogli tipizirati ovom su metodom podeljeni na tri podtipa. Nasuprot ovome, izolati koji su poticali iz istog izvora nisu diferencirani ni jednom subtipizirajućom metodom (25).

Ni primena više različitih metoda ne mora da bude uspešna u tipizaciji *S. Enteritidis*. Kombinacija sero-fagotipizacije, analize plazmida, fingerprinting genoma i ribotipizacije korišćena je u tipizaciji *S. Enteritidis* koja je izazivala epidemije u jednoj oblasti Španije. Analizirani izolati pripadali su fagotipu A, imali su plazmid veličine 38 MDa, pokazivali su sličan fingerprinting genoma i isti ribotip (26).

Sojevi *S. Enteritidis* (62), predstavljeni sa 33 fagotipa i jedan soj osetljiv na fage, koji je klasifikovan kao RDNC (React Did Not Comply), ispitani su sa četiri različite metode koje se baziraju na tipizaciji hromozoma da bi se utvrdili odnosi genoma između sojeva različitih fagotipova. Izolati su ispitivani primenom IS200, ribotipizacijom, PFGE i genskim probama. Kombinovanom prime-

nom četiri genotipske metode formirane su dve grupe sojeva sa po osam i sedam fagotipova. Ove dve grupe se mogu smatrati glavnim linijama evolucije *S. Enteritidis* (27).

Analizom multilokusnih enzima *S. Enteritidis* dokazano je četrnaest elektroforetskih tipova (ET). Ovi elektroforetski tipovi su neravnomerno raspoređeni u dendrogramu salmonela. Utvrđeno je da 10 od 14 elektroforetskih tipova (1,5,6,9,10,12-15,17) pripadaju liniji A, a da se drugi elektroforetski tipovi nalaze u trima dodatnim linijama. ET 7 ulazi u sastav linije C, ET 3 i 4 obrazuju liniju H, a ET 2 ulazi u sastav linije L; svi su daleko povezani sa linijom A. Ova analiza je pokazala da sojevi *S. Enteritidis* jesu genotipski heterogeni i da mogu biti predstavljeni sa više veoma divergentnih filogenetskih linija (28).

Elektroforeza multilokusnih enzima definiše *S. Enteritidis* kao polifilogenetski serotip blisko povezan sa salmonelama koje poseduju flagelarni g antigen: *S. Gallinarum* i *S. Pullorum*. Ukazano je da *S. Enteritidis* zauzima najstarije i vodeće mesto među ovim serotipovima salmonela (29). Utvrđena je i sličnost genoma *S. Enteritidis* sa genomom *S. Dublin* (28) i smatra se da klonovi ova dva serotipa imaju skoro poreklo iz zajedničkog pretka (30). Evolucija nastanka *S. Dublin* iz istog pretka kao što je *S. Enteritidis* bi obuhvatala modifikaciju faze jedan flagelarnog antigena, gubitak epitopa *m* i sticanje epitopa *p*, izmene u strukturi plazmida virulencije i povezanost sa infekcijama stoke (Selander et al., 1992). Sa druge strane genom *S. Enteritidis* je sličan i genomu nekih sojeva *S. Typhimurium* što je utvrđeno mapiranjem hromozoma ove dve bakterije (31).

S. Enteritidis sa jedne strane ispoljava izrazito homogenu strukturu, s obzirom na dominaciju nekoliko fagotipova, zastupljenost jednog plazmidskog profila u većini sojeva, postojanje samo tri klonalne linije, kao i veći broj elektroforetskih tipova u samo jednoj liniji dendrograma. Sa druge strane, *S. Enteritidis* ispoljava genetsku sličnost sa salmonelama koje poseduju slične flagelarne antigene, a neki elektroforetski tipovi se nalaze veoma daleko od linije A. Možda u ovakvoj, sa jedne strane izraženoj genetskoj homogenosti najvećeg broja sojeva, a sa druge strane u izraženoj genetskoj heterogenosti preostalih sojeva, leže razlozi za tešku subtipizaciju *S. Enteritidis* danas poznatim metodama fenotipizacije i genotipizacije. Suočavanje sa nedovoljnom diskriminacijom tipizirajućih sistema kod *S. Enteritidis*, upućuje nas na uvođenje novih metoda i poboljšavanje već postojećih u tipizaciji sojeva.

Literatura

- Guard-Petter J. The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. *Environ Microbiol* 2001;3(7):421-30.
- Lee LA, Puhf ND, Maloney EK, Bean NH, Tauxe RV. Increase in antimicrobial-resistant Salmonella infections in the United States, 1989-1990. *J Infect Dis* 1994;170(1):128-34.
- Stubbs AD, Hickman-Brenner FW, Cameron DN, Farmer JJ 3rd. Differentiation of Salmonella enteritidis phage type 8 strains: evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. *J Clin Microbiol* 1994;32(1):199-201.
- Ward LR, de Sa JD, Rowe B. A phage-typing scheme for Salmonella enteritidis. *Epidemiol Infect* 1987; 99(2):291-4.
- Rankin S, Platt DJ. Phage conversion in Salmonella enterica serotype Enteritidis: implications for epidemiology. *Epidemiol Infect* 1995; 114(2): 227-36.
- Katouli M, Seuffer RH, Wollin R, Kuhn I, Mollby R. Variations in biochemical phenotypes and phage types of Salmonella enteritidis in Germany 1980-92. *Epidemiol Infect* 1993; 111(2): 199-207.
- Seltmann G, Voigt W, Beer W. Application of physico-chemical typing methods for the epidemiological

- analysis of *Salmonella enteritidis* strains of phage type 25/17. *Epidemiol Infect* 1994; 113(3):411-24.
8. Miljković-Selimović B, Babić T, Kocić B, Stojanović P, Ristić LJ, Dinić M. Plasmid profile analysis of *Salmonella enterica* serotype enteritidis. *Acta Medica Medianae* 2008; 47(2): 54-57.
 9. Miljković-Selimović B, Lepsanović Z, Babić T, Kocić B, Randelović G. [Plasmid profile analysis in identification of epidemic strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis] [Article in Serbian]. *Vojnosanit Pregl* 2008;65(4):303-7.
 10. Poppe C, Demczuk W, McFadden K, Johnson RP. Virulence of *Salmonella enteritidis* phage types 4, 8 and 13 and other *Salmonella* spp. for day-old chicks, hens and mice. *Can J Vet Res* 1993;57(4):281-7.
 11. Dorn CR, Silapanuntakul R, Angrick EJ, Shipman LD. Plasmid analysis and epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in three commercial layer flocks. *Avian Dis* 1992; 36(4): 844-51.
 12. Morris JG Jr, Dwyer DM, Hoge CW, Stubbs AD, Tilghman D, Groves C, et al. Changing clonal patterns of *Salmonella enteritidis* in Maryland: evaluation of strains isolated between 1985 and 1990. *J Clin Microbiol* 1992;30(5):1301-3.
 13. Threlfall EJ, Rowe B, Ward LR. Subdivision of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid profile typing. *Epidemiol Infect* 1989;102(3):459-65.
 14. Powell NG, Threlfall EJ, Chart H, Rowe B. Subdivision of *Salmonella enteritidis*, PT 4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 119(1-2): 193-8.
 15. Gruner E, Martinetti-Lucchini G, Hoop RK, Altwegg M. Molecular epidemiology of *Salmonella enteritidis*. *Eur J Epidemiol* 1994;10(1):85-9.
 16. Martinetti G, Altwegg M. rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella enteritidis*. *Res Microbiol* 1990; 141(9): 1151-62.
 17. Usera MA, Popovic T, Bopp CA, Strockbine NA. Molecular subtyping of *Salmonella enteritidis* phage type 8 strains from the United States. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1): 194-8.
 18. Riabchenko LE, Rashidov AM, Riapis LA. The screening and restriction analysis of the plasmid DNA of *Salmonella enteritidis* strains. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 1994; 5: 17-9.
 19. Woo YK. Finding the sources of Korean *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT 4 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol*. 2005;43(5):424-9.
 20. Majtánová L, Szaboová M, Majtán V. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains by pulsed-field gel electrophoresis isolated in the Slovak Republic. *Pol J Microbiol*. 2004;53(4):287-90.
 21. Pang JC, Chiu TH, Chiou CS, Schroeter A, Guerra B, Helmuth R, Tsen HY. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. *J Appl Microbiol*. 2005;99(6):1472-83.
 22. Stanley J, Burnens AP, Threlfall EJ, Chowdry N, Goldsworthy M. Genetic relationships among strains of *Salmonella enteritidis* in a national epidemic in Switzerland. *Epidemiol Infect* 1992;108(2): 213-20.
 23. Millemann Y, Lesage MC, Chaslus-Dancla E, Lafont JP. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(1): 173-9.
 24. Wood MW, Mahon J, Lax AJ. Development of a probe and PCR primers specific to the virulence plasmid of *Salmonella enteritidis*. *Mol Cell Probes* 1994; 8(6): 473-9.
 25. Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, Goldsby RA. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *Clin Microbiol* 1996;34(4):870-6.
 26. Gonzalez-Hevia MA, Llanaez JJ, Mendoza MC. Usefulness of molecular genetic markers in the typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis causing a food-borne outbreak. *Int J Food Microbiol* 1994;22(2-3):97-103.
 27. Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 1994; 40(1):15-22.
 28. Beltran P, Musser JM, Helmuth R, Farmer JJ 3rd, Frerichs WM, Wachsmuth IK, et al. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(20):7753-7.
 29. Stanley J, Baquar N. Phylogenetics of *Salmonella enteritidis*. *Int J Food Microbiol* 1994; 21(1-2):79-87.
 30. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci*. 2008;86(14 Suppl):E173-87.
 31. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. The XbaI-BlnI-CeuI genomic cleavage map of *Salmonella enteritidis* shows an inversion relative to *Salmonella typhimurium* LT2. *Mol Microbiol* 1993;10:655-64.

SALMONELLA ENTERITIDIS – PHENOTYPIC AND GENOTYPIC TECHNIQUES

Biljana Miljković-Selimović, Tatjana Babić, Branislava Kocić and Ljiljana Ristić

Nowadays, *Salmonella enterica subspecies enterica serovar Enteritidis* (*S. enteritidis*) represents one of the most common serotypes that causes enterocolitis. Since *S. enteritidis* identification methods are being advanced, for this purpose, the following phenotyping methods could be applied: biotyping, phagotyping (phage typing – PT), and resistotyping. Among the methods for genotyping of *S. enteritidis*, the following could be applied: plasmid profile analysis (PP), restriction analysis of the virulence plasmid, ribotyping, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), insertion sequences, polymerase chain reaction (PCR), random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD). On the one hand, *S. enteritidis* clearly expresses the homogenous structure which is reflected by the domination of few phage types, presence of one plasmid profile in most of the strains, merely three clonal lines, as well as a large number of electrophoretic types in a single dendrogram line. Insufficient discrimination of typing systems of *S. enteritidis* points to the necessity of introducing new typing methods as well as improving the old ones. *Acta Medica Medianae* 2009;48(2):31-34.

Key words: *Salmonella enteritidis*, bacterial typing techniques, identification