

Aneta Duda\*, Jakub Guzy\*\*, Joanna Pytel\*\*,  
Renata Rubinkiewicz\*\*\*

## DOBÓR PODŁÓŻ I SPRAWDZENIE METODY WYKRYWANIA I IZOLACJI BAKTERII *SALMONELLA* W WODACH POWIERZCHNIOWYCH METODĄ FILTRACJI MEMBRANOWEJ

**Streszczenie.** W pracy przedstawiono metodykę badawczą wykrywania i izolacji bakterii *Salmonella* w wodach powierzchniowych metodą filtracji membranowej. Dokonano doboru płynnych pożywek namnażających i selektywnych pożywek agarowych do wykrywania typowych i nietypowych serotypów. Pożywki zostały dobrane tak, aby wyeliminować w znacznym stopniu zaburzenia ze strony towarzyszącej mikroflory podczas procesu wykrywania chorobotwórczych bakterii *Salmonella*. Opracowana metodyka ma na celu wykrycie zarówno odzwierzęcych serotypów pałeczek *Salmonella*, jak i *S. Typhi*, *S. Paratyphi*. Metodę sprawdzono w konkretnych warunkach laboratoryjnych przeprowadzając proces walidacji obejmujący: wyznaczenie granicy wykrywalności, sprawdzenie poprawności metody za pomocą metod standardowych w porównaniu z testem API 20E (porównanie metody standardowej z metodą alternatywną), podanie prawdopodobieństwa podania wyniku fałszywego.

Wykazano, że czynniki selektywne zawarte w pożywkach RVS i MKKTn najlepiej hamowały wzrost obfitej flory towarzyszącej w wodach powierzchniowych, a pożywka XLD jest idealnym podłożem do wykrywania typowych bakterii *Salmonella spp.* Jedyną ze sprawdzanych pożywek, która umożliwiała wykrycie laktozodatnich *Salmonella* okazał się agar z siarczynem bizmutu wg Wilson-Blair'a. Metodę sprawdzono i stwierdzono, że jest selektywna, specyficzna, powtarzalna i odtwarzalna w warunkach laboratoryjnych. Granica wykrywalności została określona na poziomie od 1 do 3 jednostek tworzących kolonie.

### 1. WSTĘP

Obowiązek badania w kierunku wykrywania *Salmonella* w wodach powierzchniowych został nałożony Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 27.11.2002 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia oraz Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 16.10.2002 r. w sprawie wymagań, jakim powinna odpowiadać woda w kąpieliskach [1, 2].

---

\* Aneta DUDA – Katedra Podstaw Techniki, Wydział Podstaw Techniki, Politechnika Lubelska.

\*\* Jakub GUZY, Joanna PYTEL – Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Kielce.

\*\*\* Renata RUBINKIEWICZ – Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Kielce.

Rodzaj *Salmonella* należy do rodziny *Enterobacteriaceae* i obejmuje dwa gatunki, tj.: *Salmonella bongori* oraz *Salmonella enterica* (klasyfikacja wg Le Minor'a i Popoff'a 1992 – WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*) [3]. Ich naturalnym rezerwuarem jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Są one Gram-ujemnymi, nieprzetrwalnikującymi pałeczkami o wymiarach 2–3  $\mu\text{m}/0,6 \mu\text{m}$ , są zazwyczaj ruchliwe (wyjątek: *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*). Formy ruchliwe są zazwyczaj perytrichalnie urzęsione. Istnieją jednak informacje o izolacji szczepów, które w wyniku oddziaływania czynników środowiska zatraciły zdolność ruchu. Są one względnie beztlenowcami [4]. Przeżywalność bakterii *Salmonella* jest zależna od temperatury, pH i aktywności wodnej ( $a_w$ ). Silne działanie hamujące na ich rozwój mają środowisko kwaśne, temperatura poniżej 25 °C, duża ilość tlenu oraz ogrzewanie w temperaturze 72 °C przez 15 sekund [5].

Pałeczki *Salmonella* są również wrażliwe na promieniowanie gamma i beta oraz na działanie chloru, kwasu mlekowego i innych środków dezynfekcyjnych. Takie procesy jak: solenie i wędzenie mają ograniczony wpływ na przeżywanie pałeczek *Salmonella*, np. w suszonych i wędzonych produktach mięsnych przeżywają tygodnie, a nawet miesiące. *Salmonella* są odporne na wysychanie (nawet przez dwa lata), szczególnie w suszonym kale, kurzu, paszach i żywności.

Woda nie jest dla bakterii *Salmonella* naturalnym środowiskiem. Trafiają one bezpośrednio do wody z chorego organizmu ludzi lub zwierząt (ptactwo domowe i dzikie, gryznie) lub pośrednio poprzez ścieki, a także poprzez spływy ze skażonej gleby. Woda jest jedynie wektorem bakterii i to tylko w okresie, w jakim organizmy te mogą utrzymywać się przy życiu [6]. Podaje się, że *Salmonella* może przeżywać w wodach stojących 115 dni, w glebie łąkowej 120 dni, w glebie uprawnej 180 dni, a w nawozie ptasim i krowim do 28–30 miesięcy [7]. Niekiedy bakteriami *Salmonella* mogą być zarażone produkty roślinne zraszane lub podlewane zakażoną wodą (sałata) oraz w wyniku zakażenia gleby nawożonej odchodami ludzi lub zwierząt [8]. Bakterie w środowisku wodnym, znajdujące się w stanie VBNC, stanowią również niewątpliwe zagrożenie dla zdrowia publicznego, gdyż wykazując pewną aktywność metaboliczną, zachowują wirulencję, a nie są wykrywane w badaniach mikrobiologicznych wód metodą hodowlaną [9].

Pałeczki *Salmonella* powodują wiele schorzeń [10, 11, 12]: ostre choroby zakaźne (dur brzuszny – wywoływany przez *Salmonella Typhi* oraz dury rzekome wywoływane przez *Salmonella Paratyphi A, B i C*), zatrucia pokarmowe typu zakaźnego (tzw. salmonelozy), posocznicę lub bakteriemię, zespół gorączki jelitowej (*enteric fever*), zakażenia układu moczowego, oddechowego, skórne, ropnie narządów, stan nosicielstwa pochorobowego – jako następstwo wcześniejszego zakażenia. W przypadku salmoneloz rezerwuarem i źródłem zakażenia jest zwierzę, a nośnikiem czynnika patogenego jest produkt pochodzenia zwierzęcego (mięso, mleko, jaja) oraz skażona odchodami zwierzęcymi woda używana do sporządzania potraw, mycia owoców, płukania naczyń, podlewania upraw, a także przyprawy dodawane do gotowych potraw poddanych wcześniej obróbce cieplnej. Chorobotwórcze dla człowieka

pałeczki *Salmonella* należą do gatunku *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i stanowią one ponad 99,5% izolowanych szczepów. Sporadycznie izoluje się pałeczki *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* i *diarizonae*. Można uznać, że zatrucia pokarmowe są najczęściej spotykanym schorzeniem odzwierzęcych w krajach przemysłowo rozwiniętych. W krajach Ameryki Północnej oraz Europy, począwszy od połowy lat 80, najważniejsze znaczenie epidemiologiczne miały odzwierzęce serowary *Salmonella*. Według danych opublikowanych przez amerykańskie Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (CDC), w USA w latach 1993–97 serowarem odpowiedzialnym za 55% zachorowań na salmonelozę była *S. Enteritidis* [13]. W Polsce w okresie 1990–97 udział *S. Enteritidis* w zachorowaniach wynosił ponad 90%, *S. Typhimurium* – ok. 6% [14, 15, 16]. W Polsce w 2001 roku *S. Enteritidis* wywołała 93,4% zachorowań bakteryjnych (w tym jeden zgon), spośród pozostałych typów najwięcej zachorowań spowodowała *S. Virchow* – 2,2% , a za pozostałe odpowiadały: *S. Typhimurium*, *S. Indiana*, *S. Hadar* i inne [17].

Obecnie nie ma dostępnej spójnej normy a wykrywanie *Salmonella* jest wymogiem do oceny wód powierzchniowych. Dlatego celem niniejszej pracy było opracowanie metodyki badawczej wykrywania i izolacji bakterii *Salmonella* w wodzie powierzchniowej metodą filtracji membranowej, dobór płynnych pożywek namnażających i selektywnych pożywek agarowych do wykrywania typowych i nietypowych serotypów *Salmonella*, które eliminowałyby w znacznym stopniu wzrost towarzyszącej mikroflory przeszkadzającej w wykrywaniu chorobotwórczych bakterii *Salmonella*, oraz sprawdzenie metody w konkretnych warunkach laboratoryjnych. Metodyka ta ma na celu wykrycie zarówno odzwierzęcych serotypów pałeczek *Salmonella*, jak i *S. Typhi*, *S. Paratyphi*. W badaniach istotny jest też wpływ matrycy wody powierzchniowej, która może charakteryzować się dużą zawartością innych mikroorganizmów, co ma wpływ na powtarzalność, odtwarzalność, specyficzność i czułość metod badawczych.

Pałeczki *Salmonella* nie są organizmem wskaźnikowym zanieczyszczenia wód powierzchniowych, które są dość bogate pod względem różnorodności i ilości organizmów żywych [18]. Jednak obowiązek ich oznaczania wynika z konieczności klasyfikacji i dopuszczania kąpielisk publicznych i stad ma istotne znaczenie dla zdrowia publicznego.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metodyki badawczej, która eliminowałaby w znacznym stopniu wzrost towarzyszącej mikroflory przeszkadzającej w wykrywaniu chorobotwórczych bakterii *Salmonella* oraz zwalidowanie metody w konkretnych warunkach laboratoryjnych.

## 2. METODYKA BADANIA

Badaniom poddano próbki wody powierzchniowej z rzeki Bobrzy (woj. świętokrzyskie) stanowiącą matrycę. Zasada badania i dobór podłoży został oparty na:

„Metodyce wykrywania i izolacji *Salmonella* z wód powierzchniowych i ścieków” – metodyka Państwowego Zakładu Higieny (2001) [19] oraz normach PN-A-82055-8:1994, PN-EN ISO 6579:2003 i PN-A-04023:2001 [20, 21, 22, 23]. W chwili obecnej metodyka Państwowego Zakładu Higieny [19] obejmuje jedynie diagnostykę *Salmonella* do etapu „krótkiego szeregu biochemicznego”, co nie gwarantuje identyfikacji pałeczek *Salmonella* do gatunku i typu serologicznego. Taką możliwość dają z kolei wyżej powołane normy.

## 2.1. Badanie matrycy, izolacja *Salmonella*

Matryca została przebadana w kierunku: ogólna liczba bakterii na agarze odżywcym (inkubacja w temp. 22 °C – 72 h, 37 °C – 24 h), bakterie grupy coli, bakterie grupy coli termotolerancyjne, enterokoki kałowe.

Pobraną próbkę homogenizowano poprzez wytrząsanie, filtrowano a następnie poddano preinkubacji na nie selektywnym podłożu płynnym – zbuforowanej wodzie peptonowej (BWP) w temp. 36 °C ± 2 °C przez 18 ± 2 h. Następnie namnażono na:

- zmodyfikowanej pożywce Rappaport-Vassiliadis (RVS) – inkubacja w temp. 41,5°C ± 0,5°C przez 21 ± 3 h,
- pożywce Müller’a-Kauffmanna z tetratonianem i nowobiocyną (MKTTn) – inkubacja w temp. 36°C ± 2°C, przez 21 ± 3 h,
- podłożu z kwaśnym seleninem sodu (SF) – inkubacja temp. 36°C±2°C, przez 21±3 h,
- podłożu z kwaśnym seleninem sodu i cystyną (SC) – inkubacja w temp. 36°C ± 2°C, przez 21 ± 3 h.

Następnie dokonano namnażania selektywno-różnicującego równolegle na podłożach: XLD (pożywka z lizyną, ksylozą i dezoksycholanem) oraz pożywce z siarczynem bizmutowym (zmodyfikowana pożywka Wilson-Blaira), pożywce SS (*Salmonella* – *Shigella*) i pożywce BGA wg Edel i Kampelmacher (z zielenią brylantową i czerwienią fenolową). Próbki inkubowano w temp. 36 °C ± 2 °C, przez 21 ± 3 h (pożywka XLD, BGA) i 44 ± 4 h (SS, zmodyfikowane podłoże Wilson-Blaira).

W kolejnym etapie kolonie poddano badaniom potwierdzającym. W tym celu z każdej płytki przeszczepiono wszystkie lub minimum 5 kolonii wykazujących wzrost charakterystyczny dla *Salmonella*. Przesiano je na płytkę z agarem odżywcym i inkubowano w temp. 36 °C ± 2 °C przez 21 ± 3 h. Następnie dokonano potwierdzeń poprzez badania biochemiczne i serologiczne. W celu potwierdzeń biochemicznych przeszczepiono charakterystyczne kolonie do probówek zawierających:

- pożywkę TSI,
- pożywkę agarową z mocznikiem,
- wodę peptonową z tryptofanem,
- pożywkę z malonianem sodu,
- pożywkę do wykrywania dekarboksylacji L-Lizyny,
- pożywkę z cyjankiem potasu (KCN),

- pożywkę Simmonsą,
  - pożywkę Clarka do testu Voges-Proskauera (VP)
- oraz równolegle wykonano test API 20E.

Potwierzeń serologicznych dokonano (po wykluczeniu autoaglutynacji szczepu) metodą aglutynacji szkiełkowej z wieloważną surowicą HM (zawierającą przeciwciała przeciw wszystkim składnikom antygenów rzęskowych i przeciw niektórym antygenom somatycznym). Szczepy aglutynujące w tej surowicy zbadano z surowicami grupowymi AO, BO, CO, DO, i EO. W przypadku ujemnego wyniku aglutynacji z surowicami dla grup AO, BO, CO, DO i EO wykonano badanie odczynu z surowicą dla antygeny Vi (aglutynacja drobnoziarnista – typu „O”). W przypadku dodatniego wyniku aglutynacji z surowicą Vi, w celu ustalenia przynależności do grupy powtarzano badanie z surowicami grupowymi BO i DO, używając jako antygeny gęstej zawiesiny bakterii w fizjologicznym roztworze soli, ogrzanej przez 30 min. w temp. 100 °C.

W toku badań zastosowano szczepy wzorcowe: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 o udokumentowanych właściwościach fizjologicznych, wymaganiach wzrostowych i aktywności biochemicznej oraz szczep roboczy *Salmonella* Paratyphi B z akredytowanego laboratorium diagnostyki medycznej.

## 2.2. Powtarzalność metody

Powtarzalność metody określono sporządzając z jednej próbki pięć podróbek, które były badane, oceniane i interpretowane przez dwóch niezależnych analityków w tych samych warunkach. Uzyskanie takiego samego wyniku: obecności lub nieobecności drobnoustrojów we wszystkich podróbkach, przez każdego z analityków, świadczy o powtarzalności metody.

## 2.3. Odtwarzalność metody

Odtwarzalność metody określono na podstawie badań, ocen i interpretacji wyników przez dwóch niezależnych analityków w tych samych warunkach tego samego rodzaju próbek. Wykorzystano próbki: ślepa (woda jałowa) oraz próbki kontaminowane *S. Enteritidis* (wysoki poziom kontaminacji – pow. 100 j.t.k.), *E. coli* (wysoki poziom kontaminacji – pow. 100 j.t.k.), *S. Enteritidis* (niski poziom kontaminacji – 10 j.t.k.) + *E. coli* (wysoki poziom kontaminacji – pow. 100 j.t.k.) oraz *S. Enteritidis* (niski poziom kontaminacji – 10 j.t.k.).

## 2.4. Specyficzność i czułość metody

Specyficzność metody określono wg zależności:

$$SP = \left[ 1 - \left( \frac{FP}{N^-} \right) \right] \times 100\% ,$$

gdzie: SP – specyficzność,  
 $N^-$  – liczba próbek niekontaminowanych,  
 FP – liczba próbek fałszywie pozytywnych.

Czułość metody określono wg wzoru:

$$SE = \frac{TP}{N^+} \times 100\% ,$$

gdzie: SE – czułość,  
 $N^+$  – liczba próbek kontaminowanych,  
 TP – liczba próbek prawdziwie pozytywnych.

## 2.5. Granica wykrywalności metody

Oznaczenia granicy wykrywalności dokonano posiewając szczepy wzorcowe *Salmonella* spp. na podłożu Ringera na różnym poziomie kontaminacji (znamiennie istotnym  $10^{-7}$ – $10^{-10}$ ) na 5 płytkach niewybiórczego podłoża agarowego.

Celem potwierdzenia w warunkach laboratoryjnych dokonano również oznaczenia granicy wykrywalności dla najlepiej ocenionej kombinacji pożywek selektywnie różnicujących. Badanie wykonano dla każdego rozcieńczenia badanego szczepu wzorcowego z płynnej pożywki selektywnej na 5 płytkach każdego podłoża różnicującego.

## 2.6. Porównanie metody alternatywnej z referencyjną

Przebadano 35 próbek wody powierzchniowej przebadano metodą alternatywną i referencyjną. Były to próbki dodatnie i ujemne. Na podstawie odczytów szeregów biochemicznych i testów API 20E określono względną dokładność, względną selektywność oraz względną czułość.

$$AC - \text{Względna dokładność } AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\% ,$$

$$SP - \text{Względna selektywność } SP = \frac{NA}{N_-} \times 100\% ,$$

$$SE - \text{Względna czułość } SP = \frac{PA}{N_+} \times 100\% ,$$

gdzie:  $N$  – ogólna liczba próbek,  
 $N_+$  – ogólna liczba ujemnych wyników uzyskanych metodą odniesienia,  
 $N_-$  – ogólna liczba dodatnich wyników uzyskanych metodą odniesienia,  
 $PA$  – zgodność dodatnia,  
 $NA$  – zgodność ujemna.

### 3. WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA

Wstępna analiza wody surowej z rzeki Bobrzy nie wykazała obecności *Salmonella* spp. Natomiast w kolejnych rozcieńczeniach (100 ml, 10 ml, 1 ml i 0,1 ml) w matrycy stwierdzono:

- ogólną liczbę bakterii na agarze odżywczym w 22 °C po 72 h – pow. 300 j.t.k./1 ml,
- ogólną liczbę bakterii na agarze odżywczym w 22 °C po 72 h – 54 j.t.k./0,1 ml,
- ogólną liczbę bakterii w 37 °C po 24h – pow. 300 j.t.k./1 ml,
- ogólną liczbę bakterii w 37 °C po 24h – 157 j.t.k./0,1 ml,
- bakterie grupy coli w 37 °C po 24h – pow. 100 j.t.k./100 ml,
- bakterie grupy coli w 37 °C po 24h – 68 j.t.k./10 ml,
- bakterie grupy coli termotolerancyjne w 44 °C po 24h – pow. 100 j.t.k./100 ml,
- bakterie grupy coli termotolerancyjne w 44 °C po 24h – 47 j.t.k./10 ml,
- Enterokoki kałowe w 37 °C po 48h – pow. 100 j.t.k./100 ml,
- Enterokoki kałowe w 37 °C po 48h – 42 j.t.k./10 ml.

Na podłożach różnicujących stwierdzono wzrost flory towarzyszącej, w różnej obfitości – tab. 1. Zidentyfikowano następujące szczepy *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, które potencjalnie mogą wpływać na możliwość wykrycia *Salmonella* spp.

W próbce środowiskowej nie wykryto obecności *Salmonella* ssp. dlatego zkontaminowano ją szczepami wzorcowymi na różnym poziomie kontaminacji. Do kontaminacji użyto szczepów *Salmonella* jak i szczepów tożsamyh z florą stwierdzoną w matrycy, tj. *E. coli* i *P. aeruginosa*. W celu wybrania odpowiedniej kombinacji pożywek selektywno-różnicujących, po etapie preinkubacji w BWP próbki namnażono selektywnie na czterech pożywkach: RVS, MKKTn, SF i S.C., z których dokonano przesiewu na pożywki agarowe różnicujące: XLD oraz BGA, SS i WB [24].

Wyniki oceny hodowli szczepów wzorcowych oraz szczepów z matrycy przedstawiono w tabeli 2.

Analiza wzrostu na pożywkach agarowych wykazała, że najwyższą selektywnością wykazały się RVS, MKKTn, SC, SF. Pożywki RVS i MKKTn najlepiej hamowały wzrost bakterii flory towarzyszącej.

Na pożywce WB szczepy *S. Paratyphi* B i w mniejszym stopniu *S. Typhimurium* wykazały wzrost z charakterystycznym, metalicznym połyskiem, natomiast *S. Enteritidis* – wzrost w postaci zielono-czarnych kolonii. Na pożywce SS wszystkie

**Tabela 1.** Charakterystyka wzrostu wodnej flory towarzyszącej na selektywnych pożywkach agarowych

Nazwa pożywki	Szczepy niespecyficzne	Wygląd kolonii
Z siarczynem bizmutu wg Wilson-Blaira (WB)	<i>E. coli</i>	- kolonie drobne, zielono-szare - brak metaliczności
	<i>P. aeruginosa</i>	- obfity wzrost - kolonie bardzo drobne, szorstkie, zielono-szare - brak metaliczności - intensywny, charakterystyczny zapach
	<i>P. vulgaris</i>	- obfity wzrost - kolonie zielono-czarne
BGA	<i>E. coli</i>	- obfity wzrost - kolonie żółte - zażółcenie pożywki
	<i>P. aeruginosa</i>	- obfity wzrost - kolonie szorstkie, koloru pożywki (jasnoróżowe) - intensywny, charakterystyczny zapach
	<i>P. vulgaris</i>	- obfity wzrost - kolonie koloru pożywki (jasnoróżowe)
SS	<i>E. coli</i>	- obfity wzrost - kolonie różowe
	<i>P. aeruginosa</i>	- obfity wzrost - kolonie jasnobrażowe, drobne - intensywny, charakterystyczny zapach
	<i>P. vulgaris</i>	- obfity wzrost - kolonie duże, przezroczyste lub mleczne, z wypukłym czarnym środkiem
	<i>P. mirabilis</i>	- obfity wzrost. - kolonie duże, niespecyficzne, żółto- brązowe z wypukłym brązowym środkiem.
XLD	<i>E. coli</i>	- słaby wzrost - kolonie żółte - zażółcenie podłoża
	<i>P. aeruginosa</i>	- kolonie drobne, szorstkie, koloru pożywki (jasnoróżowe) - intensywny, charakterystyczny zapach
	<i>P. vulgaris</i>	- obfity wzrost - kolonie duże, przezroczyste koloru podłoża lub mleczne, z wypukłym czarnym środkiem

**Tabela 2.** Ocena wzrostu bakterii *Salmonella* i flory towarzyszącej na selektywnych pożywkach agarowych po inkubacji na pożywce RVS

Rodzaj próbki	RVS			
	WB	SS	BGA	XLD
Próbka ślepa – jałowy płyn Ringera	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu
Próbka ślepa – woda powierzchniowa z rzeki Bobrzy	>100 j.t.k. ** ok.100 j.t.k. ***	>100 j.t.k. ****	wzrost zlewny	>100 j.t.k. * ok.100 j.t.k. ***
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup>	>100 j.t.k. * 2.j.t.k. * ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. **** 15 j.t.k.	wzrost zlewny	>100 j.t.k. * 20 j.t.k. ****
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	>100 j.t.k. * >100 j.t.k.	ok.100 j.t.k. * ok.100 j.t.k. *** >100 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.100 j.t.k. * ok.100 j.t.k. ** ok.100 j.t.k. *** ok.100 j.t.k. ****
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. * ok.20 j.t.k. *	wzrost zlewny	ok.100 j.t.k. * 10 j.t.k. *** 20 j.t.k. ****
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-4</sup>	>100 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	wzrost zlewny	>100 j.t.k. * ok.30 j.t.k. *
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup>	10 j.t.k. ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. * ok.20 j.t.k. *	wzrost zlewny	ok.100 j.t.k. * 10 j.t.k. *** 10 j.t.k. ****
<i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup>	3 j.t.k. ok.100 j.t.k.	wzrost zlewny *** wzrost zlewny	wzrost zlewny	ok.100 j.t.k. * 10 j.t.k. *** 20 j.t.k. ****
<i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	>100 j.t.k.	ok.100 j.t.k. *** ok.100 j.t.k. ****	wzrost zlewny	>100 j.t.k. * 10 j.t.k. ****

\* *E. coli*, \*\* *P. aeruginosa*, \*\*\* *P. vulgaris*, \*\*\*\* *P. mirabilis*.

**Tabela 3.** Ocena wzrostu bakterii *Salmonella* i flory towarzyszącej na selektywnych pożywkach agarowych po inkubacji na pożywce MKKTn

Rodzaj próbki	MKKTn			
	WB	SS	BGA	XLD
Próbka ślepa – jałowy płyn Ringera	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu
Próbka ślepa – woda powierzchniowa z rzeki Bobrzy	>100 j.t.k.	>100 j.t.k. 20 j.t.k.	>100 j.t.k.	>100 j.t.k.
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup>	ok.100 j.t.k. ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. 20 j.t.k. >100 j.t.k.	>100 j.t.k.	>100 j.t.k.
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	20 j.t.k. >100 j.t.k. >100 j.t.k.	>100 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	>100 j.t.k. 20 j.t.k. 20 j.t.k.
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	>100 j.t.k. >100 j.t.k.	20 j.t.k. ok.30 j.t.k. ok.30j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	10 j.t.k. >100 j.t.k.
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-4</sup>	>100 j.t.k. >100 j.t.k.	>100 j.t.k. 10j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	>100 j.t.k. 20 j.t.k.
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup>	ok.100 j.t.k. ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. 10j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	20 j.t.k. >100 j.t.k.
<i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup>	10 j.t.k. ok.100 j.t.k. ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. 10j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.100 j.t.k. >100 j.t.k.
<i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	10 j.t.k. ok.100 j.t.k. ok.100 j.t.k.	10j.t.k. 30 j.t.k. >100 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.100 j.t.k. >100 j.t.k.

\* *E. coli*, \*\* *P. aeruginosa*, \*\*\* *P. vulgaris*, \*\*\*\* *P. mirabilis*.

**Tabela 4.** Ocena wzrostu bakterii *Salmonella* i flory towarzyszącej na selektywnych pożywkach agarowych po inkubacji na pożywce SC

Rodzaj próbki	Kwaśny Selenin z Cystyną (SC)			
	WB	SS	BGA	XLD
Próbka ślepa – jałowy płyn Ringera	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu
Próbka ślepa – woda powierzchniowa z rzeki Bobrzy	ok.100 j.t.k. ** ok.100 j.t.k. ***	>100 j.t.k. ****	>100 j.t.k.	>100 j.t.k.
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup>	>100 j.t.k. **	>100 j.t.k. **	>100 j.t.k. **	ok.100 j.t.k. . ok.100 j.t.k. ** 2 j.t.k.
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	>100 j.t.k. ** ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. >100 j.t.k. ***	ok.50 j.t.k. ok.50 j.t.k. **	ok.100 j.t.k. ok.100 j.t.k. **
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	ok.100 j.t.k.	>100 j.t.k. *** >100 j.t.k. ****	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.100 j.t.k. . ok.100 j.t.k. .
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-4</sup>	>100 j.t.k.	ok.70 j.t.k. 30 j.t.k.****	wzrost zlewny wzrost zlewny	>100 j.t.k.
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup>	ok.40 j.t.k.	>100 j.t.k. ****	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.60 j.t.k. . ok.100 j.t.k. .
<i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup>	>100 j.t.k. 10 j.t.k.	ok.50 j.t.k. **** ok.50 j.t.k. ****	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.100 j.t.k.
<i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	>100 j.t.k.	ok.30 j.t.k. **** ok.100 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.100 j.t.k.

\* *E. coli*, \*\* *P. aeruginosa*, \*\*\* *P. vulgaris*, \*\*\*\* *P. mirabilis*.

**Tabela 5.** Ocena wzrostu bakterii *Salmonella* i flory towarzyszącej na selektywnych pożywkach agarowych po inkubacji na pożywce SF

Rodzaj próbki	Kwaśny Selenin (SF)			
	WB	SS	BGA	XLD
Próbka ślepa – jałowy płyn Ringera	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu
Próbka ślepa – woda powierzchniowa z rzeki Bobrzy	9 j.t.k.***	20 j.t.k.***	wzrost zlewny	9 j.t.k.
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup>	20 j.t.k.***	ok.50 j.t.k.*** ok.50 j.t.k.***	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.50 j.t.k. 3 j.t.k.***
<i>E.coli</i> 10 <sup>-4</sup> <i>P.aeruginosa</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	ok.100 j.t.k.	ok.30 j.t.k.*** 20 j.t.k.*** 4 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	20 j.t.k. ok.30 j.t.k.
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	ok.70 j.t.k.	ok.30 j.t.k.*** 10 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	20 j.t.k. ok.100 j.t.k.
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-4</sup> <i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-4</sup>	ok.50 j.t.k.	ok.70 j.t.k.*** ok.30 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.40 j.t.k. ok.30 j.t.k.
<i>S.Enteritidis</i> 10 <sup>-7</sup>	15 j.t.k.	20 j.t.k. 10 j.t.k.	wzrost zlewny wzrost zlewny	5 j.t.k. 20 j.t.k.
<i>S.Typhimurium</i> 10 <sup>-7</sup>	ok.50 j.t.k.	ok.30 j.t.k.***	wzrost zlewny wzrost zlewny	ok.30 j.t.k. ok.100 j.t.k.
<i>S.Paratyphi B</i> 10 <sup>-7</sup>	10 j.t.k.	10 j.t.k.***	wzrost zlewny wzrost zlewny	10 j.t.k.

\* *E. coli*, \*\* *P. aeruginosa*, \*\*\* *P. vulgaris*, \*\*\*\* *P. mirabilis*.

serotypy rosły charakterystycznie w postaci kolonii przezroczystych lub lekko żółtych, w większości z czarnym środkiem. Podobny wzrost wykazywały *Proteus mirabilis* i *Proteus vulgaris* pochodzące z matrycy.

Analiza wzrostu na pożywce BGA wykazała obfity wzrost obcej mikroflory (*E. coli*, *P. aeruginosa*), która hamowała wzrost bakterii *Salmonella*. W przypadku czystych hodowli *Salmonella* odnotowano wzrost zlewny charakterystycznych i nie charakterystycznych kolonii (z matrycy), który uniemożliwiał izolację pojedynczych kolonii, niezależnie od zastosowanego selektywnie namnażającego płynnego podłoża.

Wszystkie serowary *Salmonella* na pożywce XLD wykazały się charakterystycznym wzrostem.

Do oceny szeregu biochemicznego i metody alternatywnej wyizolowano kolonie różnych drobnoustrojów z matrycy (woda powierzchniowa kontaminowana *Salmonella* spp.) W tabeli 6 i na rys. 1–4 przedstawiono przykładowe wyniki porównawcze obu metod.

**Tabela 6.** Wyniki odczytów biochemicznych metodą odniesienia

Pożywka agarowa	Zespół cech biochemicznych											
	TSI				mocznik	indol	malonian sodu	reakcja V-P	lizyna	KCN	podłoże Simmons	wyniki
	glukoza	laktoza	H <sub>2</sub> S	gaz								
WB	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+ <sup>1</sup> API 1
WB	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	- <sup>2</sup> API 3
XLD	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+ <sup>2</sup> API 10
XLD	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	- <sup>****</sup> API 12

\* *E. coli*, \*\*\*\* *P. mirabilis*.

1 *Salmonella* Paratyphi B (0,85% NaCl, HM<sup>+++</sup>, BO<sup>+++</sup>, O4<sup>+++</sup>, b<sup>+++</sup>, 2 H<sup>+++</sup>, 5 H<sup>-</sup>).

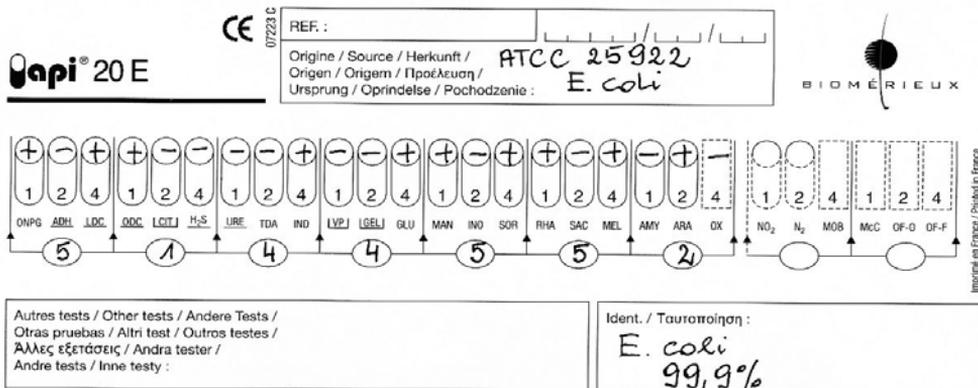
2 *Salmonella* Typhimurium (0,85% NaCl, HM<sup>+++</sup>, BO<sup>+++</sup>, O4<sup>+++</sup>, i<sup>+++</sup>, 2 H<sup>+++</sup>, 5 H<sup>-</sup>).

The image shows an API 20E biochemical test strip. The strip consists of 20 wells, each containing a different substrate. The results are indicated by the presence (+) or absence (-) of a reaction, which is often accompanied by a handwritten number. The results are as follows:

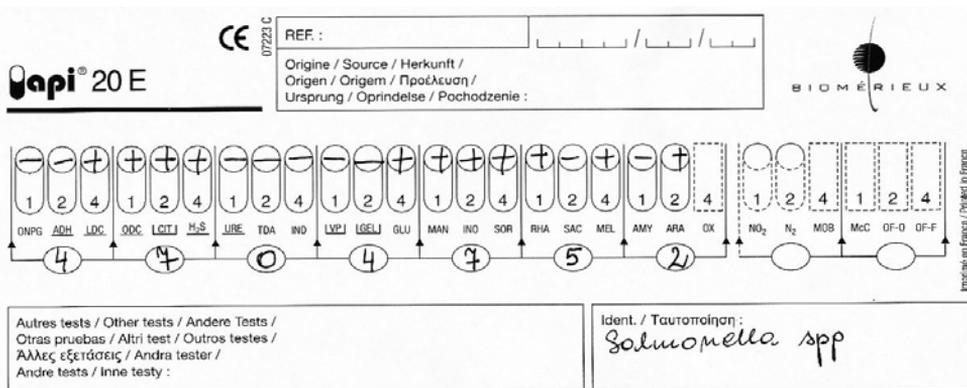
Well	Substrate	Result	Handwritten Number
1	ONPG	+	2
2	ADH	+	2
4	LDC	+	2
1	ODC	+	4
2	LDT	+	4
4	H <sub>2</sub> S	-	0
1	URE	-	0
2	TDA	-	0
4	IND	-	0
1	LVP	+	4
2	LEU	+	4
4	GLU	+	4
1	MAN	+	4
2	INO	+	4
4	SOR	+	4
1	RHA	-	5
2	SAC	-	5
4	MEL	-	5
1	AMY	+	2
2	ARA	+	2
4	DX	+	2
1	NO <sub>2</sub>	-	0
2	N <sub>2</sub>	-	0
4	MOB	-	0
1	McC	-	0
2	OF-D	-	0
4	OF-F	-	0

Below the strip, there is a box for identification. The handwritten text reads: "Ident. / Ταυτοποίηση: *Salmonella* spp 99,8%".

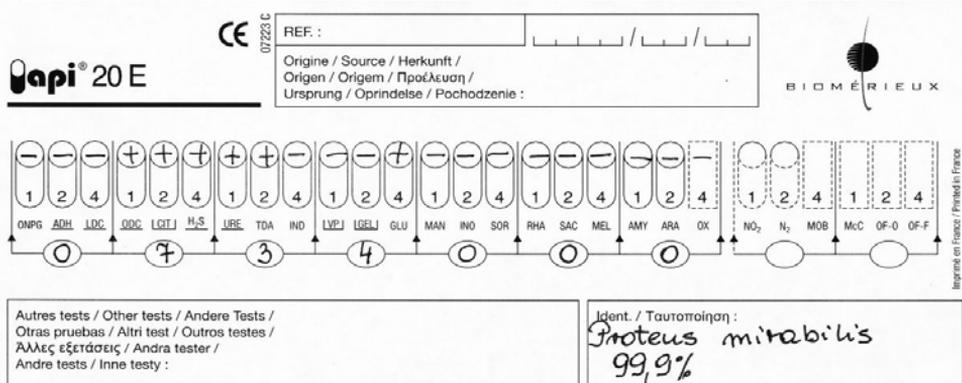
**Rys. 1.** Identyfikacja biochemiczna za pomocą testu API 20E pojedynczej kolonii *Salmonella* spp. wyizolowanej z podłoża WB



Rys. 2. Identyfikacja biochemiczna za pomocą testu API 20E pojedynczej kolonii *E. coli* wyizolowanej z podłoża WB



Rys. 3. Identyfikacja biochemiczna za pomocą testu API 20E pojedynczej kolonii *Salmonella ssp.* wyizolowanej z podłoża XLD



Rys. 4. Identyfikacja biochemiczna za pomocą testu API 20E pojedynczej kolonii *P. mirabilis* wyizolowanej z podłoża XLD

Z wody powierzchniowej jako matrycy przebadano metodą alternatywną i referencyjną 35 próbek (niezbędne jest min. 20 próbek). Były to próbki dodatnie i ujemne. Na podstawie odczytów szeregów biochemicznych i testów API 20E określono względną czułość, względną specyficzność, względną dokładność. Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

**Tabela 7.** Obliczanie względnej dokładności, względnej czułości oraz względnej selektywności wg EN-ISO 16140:2003 [23]

PA	NA	N	Względna dokładność AC (%)	N <sub>+</sub>	Względna czułość SE (%)	N	Względna selektywność SP (%)
10	25	35	100 %	10	100 %	25	100 %

Na podstawie zestawienia porównań odczytu wyników można stwierdzić, że metoda alternatywna pozwala na:

- wykrycie pałeczek *Salmonella* spp, wtedy, gdy są obecne w badanej próbce i były wykryte metodą odniesienia (względna czułość),
- brak zdolności wyhodowania pałeczek *Salmonella* spp., gdy nie są obecne w badanej próbce i nie zostały wykryte metodą odniesienia (względna selektywność).

Oceniając szereg biochemiczny w porównaniu do testu komercyjnego API 20E otrzymano 100% zgodności wyników dla wszystkich izolatów (dodatnich i ujemnych) pochodzących z pożywek różnicujących.

W zakresie powtarzalności metody z jednej próbki wody sporządzono pięć podpróbek (tab. 8), które zbadał każdy z analityków w tych samych warunkach. Uzyskano taki sam wynik we wszystkich podróbkach, co świadczy o powtarzalności metody.

Przeprowadzone badania odtwarzalności metody dla wszystkich 5-ciu próbek (jednej ślepej i czterech kontaminowanych na różnych poziomach kontaminacji szczepami wzorcowymi: specyficznym *S. Enteritidis* i niespecyficznym *E. coli*) przez różnych analityków, pozwoliły na stwierdzenie zgodności wyników uzyskanych w warunkach odtwarzalności. W tabeli 9 przedstawiono procedurę postępowania i wyniki dla próbki kontaminowanej *S. Enteritidis* na wysokim poziomie zanieczyszczenia powyżej 100 j.t.k.

Przeprowadzone badania w celu zbadania odtwarzalności pozwoliły jednocześnie na określenie czułości i specyficzności metody. Czułość metody (selektywność) jest równa 100% (tab. 10). Specyficzność metody jest równa 100%.

Wyznaczono granicę wykrywalności dla metody wykrywania bakterii *Salmonella* metodą filtracji membranowej – wynosi ona od 1 do 3 j.t.k. (tab. 11). Jest to taki poziom zanieczyszczenia próbki, w którym niekoniecznie w każdym powtórzeniu

**Tabela 8.** Zestawienie wyników powtarzalności badanej próbki w pięciu powtórzeniach (podpróbkach) przez każdego z analityków

Analityk 1	Analityk 2
<p style="text-align: center;">Podpróbki I-V</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Zbuforowana woda peptonowa</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>0,1ml</p> <p>↓</p> <p>RVS</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>XLD</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>WB</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1ml</p> <p>↓</p> <p>MKKTn</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>XLD</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>WB</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> </div> </div> </div> <p style="text-align: center;">Agar odżywczy Szereg biochemiczny: <b>poz.</b> / neg. test API 20E: <b>poz.</b> / neg. <b><u>Salmonella spp. 89,4%</u></b></p> <p style="text-align: center;">Surowica HM 0,85% NaCL <b>poz.</b> / neg. poz. / <b>neg.</b> Surowice w/g schematu Kauffmana-White'a* HM +++, D0 +++, O9 +++, g +++, m +++)</p> <p>* wymagane dochodzenie epidemiolog.</p>	<p style="text-align: center;">Podpróbki I-V</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Zbuforowana woda peptonowa</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>0,1ml</p> <p>↓</p> <p>RVS</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>XLD</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>WB</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> </div> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1ml</p> <p>↓</p> <p>MKKTn</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>XLD</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>↓</p> <p>WB</p> <p>5 kol.</p> <p>↓</p> </div> </div> </div> </div> <p style="text-align: center;">Agar odżywczy Szereg biochemiczny: <b>poz.</b> / neg. test API 20E: <b>poz.</b> / neg. <b><u>Salmonella spp. 89,4%</u></b></p> <p style="text-align: center;">Surowica HM 0,85% NaCL <b>poz.</b> / neg. poz. / <b>neg.</b> Surowice w/g schematu Kauffmana-White'a* HM +++, D0 +++, O9 +++, g +++, m +++)</p> <p>* wymagane dochodzenie epidemiolog.</p>

**Tabela 9.** Zestawienie wyników posiewu próbki nr 2 przez dwóch analityków

PRÓBKĄ NR 2 - próbka kontaminowana <i>S. Enteritidis</i> na wysokim poziomie zanieczyszczenia powyżej 100 j.t.k	
Analityk 1	Analityk 2
<p>Próbka</p> <p>↓</p> <p>Zbuforowana woda peptonowa</p> <p>0,1ml ↓ 1ml ↓</p> <p>RVS MKKTn</p> <p>XLD WB XLD WB</p> <p>5 kol. ↓ 5 kol. ↓ 5 kol. ↓ 5 kol. ↓</p> <p>Agar odżywczy Szereg biochemiczny: <b>poz.</b> / neg. Test API 20E: <b>poz.</b> / neg. <b><i>Salmonella spp. 89,4%</i></b></p> <p>Surowica HM 0,85% NaCl <b>poz.</b> / neg. poz. / <b>neg.</b> Surowice w/g schematu Kauffmana-White'a* HM +++, D0 +++, O9 +++, g +++, m +++)</p> <p>* wymagane dochodzenie epidemiolog.</p>	<p>Próbka</p> <p>↓</p> <p>Zbuforowana woda peptonowa</p> <p>0,1ml ↓ 1ml ↓</p> <p>RVS MKKTn</p> <p>XLD WB XLD WB</p> <p>5 kol. ↓ 5 kol. ↓ 5 kol. ↓ 5 kol. ↓</p> <p>Agar odżywczy Szereg biochemiczny: <b>poz.</b> / neg. Test API 20E: <b>poz.</b> / neg. <b><i>Salmonella spp. 89,4%</i></b></p> <p>Surowica HM 0,85% NaCl <b>poz.</b> / neg. poz. / <b>neg.</b> Surowice w/g schematu Kauffmana-White'a* HM +++, D0 +++, O9 +++, g +++, m +++)</p> <p>* wymagane dochodzenie epidemiolog.</p>

**Tabela 10.** Zestawienie wyników posiewu pięciu przez dwóch analityków

Wynik					
Analityk	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5
Analityk 1	nieobecna	<i>S. Enteritidis</i>	nieobecna	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Analityk 2	nieobecna	<i>S. Enteritidis</i>	nieobecna	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Enteritidis</i>

**Tabela 11.** Poziom kontaminacji użytych szczepów i określenie granicy wykrywalności

Pożywka płynna	Poziom kontaminacji na nie wybiórczym podłożu agarowym	Użyty szczep		
		<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Paratyphi B</i>
Płyn Ringera	$10^{-7}$ j.t.k./1 ml	86 / 97 / 67 / 77 / 83	55 / 76 / 84 / 64 / 59	71 / 66 / 79 / 74 / 81
	$10^{-8}$ j.t.k./1 ml	19 / 6 / 8 / 12 / 15	16 / 6 / 6 / 15 / 19	11 / 10 / 10 / 7 / 12
	$10^{-9}$ j.t.k./1 ml	<b>1 / 1 / 0 / 0 / 2</b>	<b>2 / 1 / 0 / 1 / 3</b>	<b>1 / 1 / 2 / 0 / 2</b>
	$10^{-10}$ j.t.k./1 ml	0 / 0 / 0 / 0 / 0	0 / 0 / 0 / 0 / 0	0 / 0 / 0 / 0 / 0

stwierdza się obecność 1 j.t.k. w jednostce objętości. Potwierdza to sprawdzenie metody w warunkach laboratoryjnych na poziomie zanieczyszczenia –  $10^{-9}$  j.t.k./1 ml (tab. 12), na którym stwierdzono od 0 do 3 j.t.k, a po etapach namnażających od 0 do 20 j.t.k.

Opracowana metodyka badawcza wykrywania i izolacji bakterii *Salmonella* w wodach powierzchniowych metodą filtracji membranowej, spełniła postawione założenia w zakresie doboru selektywnie namnażających pożywek płynnych i agarowych i uniemożliwienie lub w znacznym stopniu ograniczenie wpływu drobnoustrojów pochodzących ze środowiska. Zminimalizowanie wpływu mikroflory towarzyszącej i przeszkadzającej w wykryciu chorobotwórczych bakterii jest możliwe dzięki pożywce RVS i MKTTn. Zastosowanie pożywki XLD i WB umożliwia wykrycie i izolację typowych i laktozododatnich pałeczek *Salmonella* spp. Kombinacja powyższych pożywek daje możliwość izolacji pojedynczych kolonii w celu dalszej diagnostyki biochemicznej i serologicznej (niezbędnej w dochodzeniu epidemiologicznym).

Metodyka umożliwia wybór pomiędzy tradycyjnym badaniem – szeregiem biochemicznym, a komercyjnym zestawem API 20E. Świadczy o tym stopień zgodności (AC) pomiędzy wynikami badań identycznych próbek (dodatnich i ujemnych) uzyskanych za pomocą obu metod, który wynosi 100%.

Granica wykrywalności metody określona na poziomie od 1 do 3 j.t.k. pozwala na wykrycie pałeczek *Salmonella* spp. Wykazano czułość (selektywność) i specyficzność metody umożliwiające wyizolowanie obecnego drobnoustroju bądź nie wykrycie *Salmonella*, wtedy gdy jest on nieobecny w badanej próbce.

**Tabela 12.** Poziom kontaminacji użytych szczepów po etapie namrażania na płynnych pożywkach selektywnych i określenie granicy wykrywalności

Pożywka płynna	Rozcieńczenie szczepu	Użyty szczep / Pożywka agarowa											
		S. Enteritidis				S. Typhimurium				S. Paratyphi B			
		XLD	WB	XLD	WB	XLD	WB	XLD	WB				
MKKTn	10 <sup>-7</sup>	>100/>100/>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100
	10 <sup>-8</sup>	>100/>100/>100/>100/>100	100/80/>100/100/>100	60/40/30/10/60	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	60/60/30/20/60	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100
	10 <sup>-9</sup>	75/60/45/50/80	80/10/0/20/0	2/10/0/0/1	80/0/70/0/0	3/9/15/0/0/	0/0/5/10/5	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0
	10 <sup>-10</sup>	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0
RVS	10 <sup>-7</sup>	>100/>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100
	10 <sup>-8</sup>	>100/>100/>100/>100/>100	40/0/10/0/10	>100/>100/>100/>100	15/30/45/10/0	80/100/100/45/30	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100	>100/>100/>100/>100
	10 <sup>-9</sup>	20/10/0/0/0	10/0/0/0/5	0/0/2/5/0	0/0/1/1/1	70/50/10/15/25	0/0/3/5/5	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0
	10 <sup>-10</sup>	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0	0/0/0/0/0

Metodę sprawdzono w warunkach konkretnego laboratorium. Udowodniono, iż metoda może być zastosowana w warunkach laboratoryjnych poprzez wykazanie zgodności wyników uzyskanych w warunkach powtarzalności (ten sam wykonawca, to samo laboratorium, ta sama aparatura, w krótkim czasie) i odtwarzalności (ta sama matryca a różne warunki badania, tzn. różni wykonawcy, inne serie testów, pożywek). Sprawdzenie metody w warunkach powtarzalności i odtwarzalności umożliwia porównywanie porównań międzylaboratoryjnych.

#### 4. WNIOSKI

1. W oparciu o analizę wzrostu na pożywkach agarowych próbek wody powierzchniowej wytypowano:
  - a. RVS i MKKTn – dwie płynne pożywki namnażające, ponieważ:
    - wykazały się najwyższą selektywnością (również dla bakterii *Salmonella*)
    - selektywność w kolejności: RVS, MKKTn, SC, SF,
    - czynniki selektywne zawarte w pożywkach RVS i MKKTn najlepiej hamowały wzrost obfitej flory towarzyszącej,
  - b. XLD i WB – dwie selektywne pożywki agarowe, ponieważ:
    - pożywka XLD jest idealną pożywką do wykrywania typowych bakterii *Salmonella* spp.,
    - jedyną pożywką umożliwiającą wykrycie laktozodatnich *Salmonella* jest agar z siarczynem bizmutu wg Wilson – Blair'a. Na pożywce WB szczepy *S. Paratyphi* B i w mniejszym stopniu *S. Typhimurium* wykazały wzrost z charakterystycznym, metalicznym połyskiem, natomiast *S. Enteritidis* – wzrost w postaci zielono-czarnych kolonii.
2. Wyeliminowano pożywkę BGA, ponieważ wykazała obfity wzrost mikroflory towarzyszącej (*E. coli*, *P. aeruginosa*), która hamowała wzrost bakterii *Salmonella*. W przypadku czystych hodowli *Salmonella* odnotowano wzrost zlewny – charakterystycznych i niecharakterystycznych kolonii (z matrycy), który uniemożliwiał izolację pojedynczych kolonii, niezależnie od zastosowanego selektywnie namnażającego płynnego podłoża.
3. Na pożywce SS wszystkie serotypy rosły charakterystycznie w postaci kolonii przezroczystych lub lekko żółtych, w większości z czarnym środkiem. Podobny wzrost wykazywały *Proteus mirabilis* i *Proteus vulgaris* pochodzące z matrycy.
4. Wykazano, że metoda jest selektywna, specyficzna, powtarzalna i odtwarzalna w warunkach laboratoryjnych.
5. Granica wykrywalności metody została określona na poziomie od 1 do 3 j.t.k.
6. Prawdopodobieństwo podania wyniku fałszywego w zakresie biochemicznej identyfikacji bakterii *Salmonella* opracowaną metodą referencyjną w stosunku do metody alternatywnej (API 20E) wynosi 0%.

## LITERATURA

1. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 27 listopada 2002 roku w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia. Dz. U. Nr 204 z 2002 r., poz. 1728.
2. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 października 2002 roku w sprawie wymagań, jakim powinna odpowiadać woda w kąpieliskach. Dz. U. Nr 183 z 2002 r., poz. 1530.
3. Kałużewski S., Szych J.: Nowelizacja metodyki wykrywania i identyfikacja pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae. PZH. Zakład Promocji Zdrowia i Szkolenia Podyplomowego, Warszawa 1999.
4. Burbianka M., Pliszka A., Burzycka H.: Mikrobiologia żywności. PZWL, Warszawa 1983.
5. Kołożeń-Krajewska D.: Wirusy mutanty atakują. Część II. Bezpieczeństwo i higiena żywności. 2/19/2005.
6. Smyła A., Piotrowska-Seget Z., Tyfłewska A.: Patogenic bacteria hazard in surface waters. *Acta UNC Pr. Limn.* 23, 2003.
7. Czajkowska D.: Salmonella w żywności jako przyczyna chorób ludzi. Diagnostyka źródłem dobrego zdrowia. Wyd. BioMerieux Polska, 2003.
8. Stypułkowska-Misiurewicz H.: Zatrucia pokarmowe Salmonella. *Laboratorium Medyczne* 5/2004.
9. Dohm H., Strzelczyk E.: Żyjące lecz nie dające się hodować bakterie. *Post. Microbiol.*, 43, 3, 2004.
10. Pawelec D.P., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Atenuowane szczepy Salmonella enterica - nośniki heterologicznych antygenów. *Post. Microbiol.*, 39, 2000.
11. Virella V. G.: Mikrobiologia i choroby zakaźne. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2000.
12. Zaremba M.L., Baranowski J.: Mikrobiologia Lekarska dla studentów medycyny. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997.
13. Rzędzicki J., Boś M.: Sytuacja epizootyczna patogenów zakażeń pokarmowych (salmonelozji). Wyd. PIWet, Puławy 1998.
14. Przybylska A.: Ogniska zbiorowych zatruc i zakażeń pokarmowych o etiologii bakteryjnej w Polsce w latach 1990-1996. *Przegląd Epidemiologiczny*, 52, 1998.
15. Przybylska A.: Zatrucia i zakażenia pokarmowe w 1998. *Przegląd Epidemiologiczny*, 54, 2000.
16. Przybylska A.: Ogniska zbiorowych zatruc i zakażeń pokarmowych w Polsce w latach 1985-1999. *Przegląd Epidemiologiczny*, 55, 2001.
17. Przybylska A.: Zatrucia i zakażenia pokarmowe w 2001. *Przegląd Epidemiologiczny*, 57, 2003.
18. Kowal. A., Świdarska-Bróż M.: Oczyszczanie wody. PWN, Warszawa-Wrocław 1996.
19. Metodyka wykrywania i izolacji *Salmonella* z wód powierzchniowych i ścieków. Wydawnictwo Metodyczne Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa 2001.
20. PN-A-82055:1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella*.
21. PN-EN ISO 6579:2003. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.

22. PN-A-04023:2001. Mikrobiologia żywności. Wykrywanie i identyfikacja drobnoustrojów z *Enterobacteriaceae*.
23. PN-EN ISO 16140:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Protokół walidacji metod alternatywnych.
24. Pytel J., Rubinkiewicz R.: Metodyka wykrywania i izolacji bakterii Salmonella z wód powierzchniowych. Opracowanie i walidacja. Materiały seminarium „Doskonalenie funkcjonowania laboratorium mikrobiologicznego – woda”, str. 1–15, Gdańsk 2006.

### **Selection of the base and verification of salmonella bacteria detection and isolation method in the surface waters using membrane filtration**

#### **Summary**

The article presents the methodology of detection and isolation of Salmonella bacteria in surface waters using membrane filtration. Liquid propagating and selective agar bouillons have been chosen to detect the typical and untypical serotypes. The bullions have been chosen to eliminate the perturbations from accompanying micro flora during process of Salmonella bacteria detection. Formulated methodology should help to detect both epizootic serotypes of Salmonella like *S. Typhi*, *S. Paratyphi*.

The methodology was verified in the laboratory conditions by validation process covering: determination of detection threshold, comparison with standard methods like API 20E test (comparison of standard method with the alternative one), probability of false result determination.

It was showed that selective factors contained in the RVS and MKKTn bullions slowed the growth of rich accompanying flora in the surface waters and XLD bullion is the ideal base for the typical *Salmonell* ssp. bacteria.

The only one of the verified bullions which enabled detection of lactose-positive *Salmonella* bacteria was agar with bismuth sulfite according to Wilson-Blair. The method was verified and it was observed that it is selective and reproducible in the laboratory conditions. The detection threshold was established at the level from 1 to 3 of the colony forming units.