

PulseNet Europe – międzynarodowa sieć typowania molekularnego w nadzorze epidemiologicznym chorób szerzących się drogą pokarmową

DARIUSZ WASYL, AHMED ELSEDAWY*, SUSANNA LUKINMAA**

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*International PulseNet Coordinator, Enteric Diseases Laboratory Branch (EDLB), Division of Foodborne, Bacterial, and Mycotic Diseases (DFBMD), National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases (NCZVED), Coordinating Centers for Infectious Diseases (CCID), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333, USA

**Department of Bacterial and Inflammatory Diseases, Enteric Bacteria Laboratory, Public Health Institute (KTL), Mannerheimintie 166, FIN-00300 Helsinki, Finlandia

Wasył D., ElSedawy A., Lukinmaa S.

PulseNet Europe – International Molecular Subtyping Network for Food-borne Disease Surveillance

Summary

The globalization of trade and travel contributes to the spread of food-borne pathogens over long distance and across borders. Contemporary epidemiology and disease control need a new approach to identify the source and route of infection, especially when it originates in a different country than where the illness is originally observed. PulseNet is an international network of laboratories operating in different parts of the world and is dedicated to the molecular surveillance and outbreak detection of food-borne infections. The network was originally initiated by the Centers for Disease Control and Prevention located in Atlanta, USA, as well as several state health departments, in 1996. The goal of PulseNet was to facilitate the molecular subtyping of bacterial food-borne pathogens for epidemiologic purposes. The network began as a national program involving 10 laboratories typing a single pathogen (*Escherichia coli* O157:H7). Today, PulseNet USA includes over 70 participants from state, city and county public health laboratories and federal regulatory agencies. Currently, six food-borne pathogens: *E coli* O157:H7; *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Shigella* and *Vibrio cholerae* are being subtyped, and other bacterial, viral and parasitic organisms will be added soon.

PulseNet International was established with the objective of creating worldwide regional networks utilizing molecular subtyping methods and sharing information in real-time to provide an early warning on food-borne disease outbreaks, emerging food-borne infections, and acts of food bioterrorism. From 1999 to 2006, 5 PulseNet international networks were progressively established worldwide (in chronological order): PulseNet Canada, PulseNet Europe, PulseNet Asia Pacific, PulseNet Latin America and PulseNet Middle East. These regional PulseNet networks collaborate under the umbrella of PulseNet International.

PulseNet Europe gathers 61 veterinary, food and public health laboratories from 30 countries and, besides PulseNet USA and PulseNet Canada, it is the first international network with a functional central database gathering profiles of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* genomic DNA. Real time sharing of typing results among participating laboratories facilitates the timely recognition of either national or international food-borne outbreaks. Routine fingerprinting enables the identification of clusters of cases that were not initially recognized as outbreaks using the classical epidemiological methods. It also defines the diversity of the micro-organism within space, its source, and time frames. Participants cooperate to modernize and elaborate new typing techniques, as well as to improve interpretative criteria used in epidemiological investigations. These goals are achievable because of the defined rules and common tools that are established throughout the network. The basic PulseNet tools are: harmonized and standardized PFGE protocols for DNA macrorestriction, common endonucleases and molecular weight markers, and a PulseNet-customized software used for image analysis, which allows the electronic sharing of results among participants' local databases and the submission of these results to the central database. The database is accessible only by certified participants in order to insure the quality of the results. The long-term goal of PulseNet Europe, as well as that of other PulseNet international networks, is the improvement of food safety worldwide by means of enhancing surveillance of food-borne diseases and cooperation among food regulatory agencies and industry.

Keywords: epidemiology, food-borne disease

Intensywna produkcja zwierzęca, ogólnoswiatowy handel żywnością i turystyka wpływają na szerzenie się zakażeń wywołanych przez patogeny jelitowe na duże odległości i niezależnie od granic państwowych. Zakażenie może w rzeczywistości mieć źródło w kraju czy regionie innym niż ten, w którym obserwuje się zachorowania. Izolacja czynnika chorobotwórczego nie jest jednak wystarczająca do określenia źródła i dróg szerzenia się zakażenia. Identyfikacja ogniska zatrucia pokarmowego jest często możliwa dopiero na podstawie analizy DNA mikroorganizmów izolowanych na poszczególnych etapach łańcucha pokarmowego, jak: pasza, zwierzęta i środowisko ich chowu, żywność i środowisko jej wytwarzania, i porównanie go z materiałem genetycznym szczepów izolowanych z przypadków chorobowych (1, 2, 6, 10, 12).

Odległości między laboratoriami, ich wydajność diagnostyczna, granice międzypaństwowe a także ograniczenia dotyczące przewozu materiałów zakaźnych powodują, że badania nie mogą być wykonane w jednym laboratorium. Sposobem na przezwycięzenie tych trudności jest PulseNet – międzynarodowa sieć laboratoriów zdolnych do wykonania charakterystyki molekularnej patogenów i przekazywania wyników analiz na drodze elektronicznej (3, 5, 9).

Celem artykułu jest zapoznanie lekarzy weterynarii oraz osób zajmującym się higieną żywności i pasz z zakresem oraz zasadami działania sieci PulseNet Europe.

Co to jest PulseNet Europe

PulseNet Europe jest siecią laboratoriów zajmujących się molekularnym typowaniem *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i werotoksycznych *Escherichia coli*, bakterii najczęściej wywołujących zatrucia pokarmowe w Europie. Skupia ona obecnie 61 laboratoriów weterynaryjnych zajmujących się higieną żywności lub ochroną zdrowia publicznego z 30 krajów europejskich. Analogiczne sieci laboratoriów działają w innych regionach świata (12). Laboratoria uczestniczące w PulseNet Europe deklarują wzajemną współpracę, która ma charakter dobrowolny i nie pociąga za sobą skutków prawnych i finansowych. Każde z laboratoriów uczestniczy w projekcie w zakresie odpowiadającym jego własnym potrzebom, możliwościom i zasobom finansowym (12).

PulseNet USA i sieci regionalne

Pierwsza sieć laboratoriów należących do projektu PulseNet została zainicjowana przez CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) w USA w 1996 r. (11). Obserwowany na początku lat 90. wzrost liczby zatruc pokarmowych wywołanych przez shiga-toksyczne szczepy *Escherichia coli* (STEC) spowodował, że liczba zleceń na wykonanie charakterystyki molekularnej tego patogenu przekraczała możliwości laboratoriów CDC, a czas oczekiwania na wynik ograniczał jego przydatność do podejmowania działań w ognisku epidemiologicznym. Dlatego też badania epidemiologiczne zdecentralizowano, a wystandaryzowane techniki typowania epidemiologicznego zostały przekazane do laboratoriów regionalnych. Skróciło to czas oczekiwania na wynik badania i pozwoliło zidentyfikować ogniska cho-

rowe nie wykrywane stosowanymi wcześniej metodami.

Sieć PulseNet USA, obejmująca pierwotnie 10 laboratoriów, skupia obecnie ponad 70 laboratoriów APHL (Association of Public Health Laboratories), USDA-FSIS (United States Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service Laboratory), FDA-CFSAN (United States Food and Drug Administration – Centers for Food Safety and Applied Nutrition), Center for Veterinary Medicine ze wszystkich 50 stanów USA i Puerto Rico (3, 11). Obiektem zainteresowania sieci PulseNet USA była początkowo *Escherichia coli* O157:H7. W 1996 r. w centralnej bazie danych zgromadzono profile elektroforetyczne 191 szczepów tego patogenu (11), a w 2004 r. już ponad 40000 profili szczepów należących do *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* i *Vibrio cholerae* (3).

Projekt rozszerzał się nie tylko o nowe gatunki bakterii, ale jego założenia były poprzez nowo powołany PulseNet International propagowane w innych regionach świata. Od 2000 r. funkcjonuje PulseNet Canada. Chociaż ciągle trwa budowa powołanej w 2002 r. PulseNet Asia-Pacific, niektórzy partnerzy sieci mają już sprawnie funkcjonujące systemy krajowe (np. PulseNet Japan, PulseNet New Zealand, PulseNet Korea). PulseNet Europe i PulseNet Latin America powstały w 2003 r. Najmłodszym członkiem PulseNet International jest sieć PulseNet Middle East zainicjowana w grudniu 2006 r. Każda z sieci regionalnych jest zarządzana przez Komitet Sterujący, na którego czele stoi koordynator projektu. Koordynatorzy projektów regionalnych są członkami Komitetu Sterującego PulseNet International, który pod przewodnictwem CDC wyznacza nowe obszary badań prowadzonych w ramach nadzoru nad występowaniem chorób szerzących się drogą pokarmową, opracowuje nowe metody typowania i moderuje współpracę sieci regionalnych (12).

W Europie sieć PulseNet sięga do doświadczeń Salm-gene – projektu badawczego realizowanego w ramach 5. Programu Ramowego UE, którego celem była harmonizacja metod molekularnych stosowanych do różnicowania *Salmonella* (2, 4, 6, 10). Do listopada 2006 r. PulseNet Europe funkcjonował w strukturach sieci doskonałości MedVetNet, wirtualnego centrum chorób odzwierzęcych w Europie (<http://www.medvetnet.org>). Projekt był koordynowany przez Statens Serum Institute, Kopenhaga, Dania. W tym czasie powstała struktura organizacyjna sieci i podpisano list intencyjny pomiędzy uczestnikami. Do centralnej bazy danych PulseNet Europe włączono zasoby bazy Salm-gene, która zawierała blisko 20000 profili genomowego DNA szczepów *Salmonella* reprezentujących serowary i typy fagowe najczęściej występujące w krajach Wspólnoty oraz setki profili *Listeria monocytogenes* i VTEC (6). Ponadto stworzono internetowe forum dyskusyjne – PNE forum, które służy wymianie doświadczeń pomiędzy uczestnikami oraz informacji dotyczących szerzących się zakażeń (5, 7). Tym samym PulseNet Europe jest trzecią, a wziąwszy pod uwagę fakt, że PulseNet USA i PulseNet Canada skupiają wyłącznie laboratoria krajowe, pierwszą międzynarodową siecią regionalną PulseNet, która posiada w pełni funkcjonalną centralną bazę danych (12). W 2007 roku planowane jest ustalenie zasad współpracy sieci Pulse-

Net Europe z Europejskim Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC) oraz Europejskim Urzędem ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA).

Cele PulseNet Europe

Podstawowym zadaniem PulseNet Europe, podobnie jak i innych regionalnych sieci PulseNet, jest zastosowanie metod molekularnych w nadzorze epidemiologicznym nad występowaniem zakażeń pokarmowych w Europie oraz w dochodzeniu epidemiologicznym prowadzonym w ognisku chorobowym. Uczestnicy projektu są w stanie w czasie rzeczywistym przeprowadzić porównanie profili elektroforetycznych DNA czynników etiologicznych uzyskanych na terenie dowolnego kraju, w którym znajdują się laboratoria należące do sieci. Badanie takie umożliwi odpowiednio wczesne wykrycie ogniska choroby i związków między ogniskami występującymi zarówno na terenie danego kraju, jak też szerzących się poza jego granicami. Ten ostatni element jest szczególnie istotny, gdyż dotychczas stosowane metody nie były dostatecznie skuteczne w wykrywaniu międzynarodowych ognisk chorobowych (9). Stosowanie metod molekularnych do rutynowej charakterystyki izolatów powoduje, że PulseNet Europe umożliwia odpowiednio wczesne wykrycie nowych ognisk chorobowych. Określenie związków pomiędzy zachorowaniami incydentalnymi umożliwia identyfikację ognisk chorobowych nie wykrywanych klasycznymi metodami epidemiologicznymi (12). Taki przykład wykrycia ogniska zatrucia pokarmowego opisuje Nielsen i wsp. (8). W ognisku tym nie notowano wzrostu liczby przypadków chorobowych, a dopiero rutynowa charakterystyka izolatów przy użyciu PFGE wykazała związki pomiędzy nimi i pozwoliła stwierdzić, że zakażeń wywołanych przez *Escherichia coli* O157 nie można uznać za sporadyczne. Niebagatelne znaczenie mają badania o charakterze populacyjnym, które pozwalają określić zmienność czynnika chorobotwórczego w czasie lub przestrzeni. Przykładem tych ostatnich jest ocena zmienności szczepów *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium izolowanych na przestrzeni kilkunastu lat od Finów, którzy ulegli zakażeniu w czasie wyjazdów turystycznych (6). Inne badania wykazały różnorodność genetyczną izolatów STEC i dowiodły, że większość zakażeń na charakter sporadyczny (8). Perspektywicznie sieci PulseNet należy traktować jako ogólnoświatową sieć laboratoriów współpracujących z instytucjami kontrolującymi żywność i bezpieczeństwo publiczne oraz z przemysłem w celu poprawy bezpieczeństwa żywności, a tym samym poprawy jakości życia konsumentów na całym świecie (2, 11).

Narzędzia PulseNet

Wyniki charakterystyki molekularnej patogenów jelitowych uzyskiwane w różnych krajach są nieporównywalne, nawet gdy stosowana jest ta sama technika typowania epidemiologicznego (9). Dodatkowo, w większości krajów europejskich laboratoria weterynaryjne, medyczne i higieny żywności działają niezależnie od siebie. Brak porównywalności wyników istotnie ogranicza moc nawet najbardziej nowoczesnych metod typowania epidemiologicznego. Przewyciężeniem tego problemu może

być zachowanie ściśle określonych reguł przy wykonywaniu oznaczeń i gromadzenie wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach w centralnej bazie danych (4, 6, 11).

Podstawowym narzędziem stosowanym przez laboratoria uczestniczące w sieci PulseNet Europe jest analiza makrorestrykcyjna genomowego DNA bakterii przy użyciu elektroforezy w odwracalnym polu elektrycznym (PFGE – Pulse Field Gel Electrophoresis). Spośród wielu metod analizujących polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych zastosowanie PFGE w stosunku do patogenów jelitowych wykazało wysoką czułość, specyficzność, moc różnicującą i zgodność epidemiologiczną. Optymalizacja odczynników i warunków reakcji oraz harmonizacja i standaryzacja protokołu oznaczenia w badaniach międzylaboratoryjnych gwarantują wysoką zgodność wewnątrzlaboratoryjną i międzylaboratoryjną metody oraz jej odporność na zakłócenia (1, 3, 7, 9-11). Protokół wykonania badania określa również enzymy restrykcyjne oraz parametry rozdziału elektroforetycznego fragmentów DNA, który jest prowadzony w aparatach systemu CHEF (Contour-Clamped Homogenous Electric Field Electrophoresis, CHEF-DRII, CHEF-DRIII lub CHEF-Mapper, Bio-Rad Laboratories). Zastosowanie wspólnego wzorca masy molekularnej umożliwia normalizację i analizę porównawczą uzyskanego obrazu żelowego. Wzorcem tym jest szczep *Salmonella* Braenderup H9812, którego genom po restrykcji XbaI daje 18 fragmentów DNA o masie molekularnej w zakresie 20,5-1135 kb (4). Zakres wielkości fragmentów wzorca obejmuje większość z zakresów uzyskiwanych przez uczestników PulseNet, niezależnie od badanej bakterii i stosowanego enzymu restrykcyjnego (2, 4). Element ten stanowi jednocześnie kontrolę wewnętrzną przygotowania próbki DNA i procesu restrykcji materiału genetycznego.

Do analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych uzyskiwanych w wyniku PFGE stosowany jest program BioNumerics (Applied Maths, Belgia). Producent dostosował program do potrzeb sieci, zaopatrując go w ponad 75 tzw. skryptów PulseNet Europe. Umożliwia on normalizację profilu elektroforetycznego, porównanie go z innymi profilami oraz zachowanie w lokalnej bazie danych tworzonej w laboratorium. Program daje również możliwość wymiany profili elektroforetycznych badanych szczepów na drodze elektronicznej pomiędzy bazami danych poszczególnych uczestników, a także ich przesyłanie do centralnej bazy danych projektu PulseNet Europe (4, 5). Baza ta jest zlokalizowana i administrowana przez Health Protection Agency (Londyn, Anglia) (7). Laboratoria mają prawo wglądu do zasobów bazy oraz do uczestnictwa w badaniu biegłości PulseNet Europe EQAS. Pozytywny wynik organizowanego corocznie badania biegłości laboratoriów jest podstawą do uzyskania certyfikatu. Tylko certyfikowane laboratoria mogą przysyłać uzyskiwane wyniki do centralnej bazy (5, 12). Poprawność wprowadzanych danych jest weryfikowana przez kuratorów – osoby z laboratoriów w Danii, Francji i Anglii dysponujące doświadczeniem w zakresie elektroforezy PFGE i analizy obrazu żelowego, które mają również prawo do nazywania, zgodnie z przyjętą nomenklaturą, dotychczas nie stwierdzanych profili elektroforetycznych i ich wprowadzania do zasobów bazy (5, 7).

Współpraca w PulseNet

Zakres współpracy pomiędzy laboratoriami i sieciami regionalnymi reguluje list intencyjny. Uczestnicy sieci deklaruje wolę przekazywania do centralnej bazy danych wyników prowadzonych badań epidemiologicznych wraz z określonym zestawem danych demograficznych i epidemiologicznych, takich jak np. źródło i data izolacji czy profil oporności na antybiotyki szczepu. Mają też prawo, w zależności od własnych potrzeb i posiadanych zasobów, inicjować i uczestniczyć w badaniach proponowanych przez inne laboratoria uczestniczące w sieci. Regionalne sieci PulseNet mają prawo wglądu do baz innych sieci międzynarodowych, z którymi podpisane zostały listy intencyjne. Współpracują w zakresie opracowywania i modyfikacji procedur badawczych, wzorców, a także zapewnienia i kontroli jakości badań. Wymianie doświadczeń i informacji służą również organizowane spotkania i warsztaty, a także internetowe fora dyskusyjne (3, 12).

Krajowe Laboratorium Referencyjne – *Salmonella* Zakładu Mikrobiologii PIWet-PIB rozpoczęło współpracę z siecią PulseNet Europe w 2004 roku. List intencyjny został podpisany w sierpniu 2006 r. W tym czasie uczestniczono w szkoleniu PulseNet Europe (PFGE Training Week, Health Protection Agency, Colindale Avenue, London, Anglia, luty 2006) i warsztatach poświęconych zastosowaniu programu BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgia, wrzesień 2006). W 2006 r., po udziale w badaniu biegłości (PulseNet Europe EQAS, kwiecień 2006) i otrzymaniu certyfikacji laboratorium otrzymało dostęp do bazy danych PulseNet Europe. Pierwsze profile genomowego DNA szczepów *S. Hadar* zostały przesłane do bazy w listopadzie 2006 r. Zasoby bazy są wykorzystywane w badaniach naukowych i diagnostyce rutynowej prowadzonej w laboratorium.

PulseNet a podejście naukowe

Badania prowadzone w laboratoriach sieci PulseNet mają również wymiar naukowy. Wyniki uzyskane przy pomocy zharmonizowanych metod badawczych mogą być bezpośrednio odnoszone do badań w innych laboratoriach (6). Efekty prac badawczych prowadzonych w laboratoriach uczestniczących w projekcie znajdują odzwierciedlenie w licznych publikacjach naukowych. Liczba publikacji odwołujących się do PulseNet wzrosła z 8 dostępnych w latach 1996-1999 do 40 opublikowanych w 2006 r. Czterdzieści cztery artykuły są indeksowane w Medline PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), 43 wymieniono na stronie domowej PulseNet USA (<http://www.cdc.gov/pulsenet/publications>). Kolejne 29 doniesień zamieszczono w Morbidity and Mortality Weekly Report (<http://www.cdc.gov>), a 22 w EuroSurveillance Weekly (<http://www.eurosurveillance.org>) (data dostępu: 29 grudnia 2006 r.).

Laboratoria uczestniczące w projekcie modernizują i opracowują metody badawcze. Przykładem jest zastąpienie komercyjnych wzorców masy molekularnej DNA markerem przygotowywanym w laboratorium na bazie szczepu wzorcowego (4). Do upowszechnienia PFGE i zastosowania techniki w rutynowych badaniach istotnie przyczyniło się skrócenie czasu przygotowania próbki z 3-4 dni do kilku godzin (9). PFGE może również po-

średnio uzupełniać tradycyjne metody służące określeniu struktury antygenowej autoaglutynujących szczepów *Escherichia coli* (8). W laboratoriach należących do PulseNet opracowano techniki wykorzystujące zmienną liczbę powtórzeń tandemowych, VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), które charakteryzują się większą niż PFGE uniwersalnością, swoistością, czułością i zgodnością epidemiologiczną. Szczególnie użyteczne do różnicowania patogenów jelitowych, a tym samym zwiększenia skuteczności dochodzenia epidemiologicznego, są MLVA (Multiple-Locus VNTR Analysis) i SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Metody te mogą uzupełniać, a w przyszłości zastąpić PFGE (3). Wnioski z wieloletnich doświadczeń PulseNet USA pozwoliły na zmianę proponowanych przez Tenover i wsp. (13) kryteriów interpretacji profili elektroforetycznych w kontekście badań epidemiologicznych prowadzonych w ognisku wywołanym przez patogeny jelitowe (1).

Podsumowując należy stwierdzić, że PulseNet Europe i inne regionalne sieci PulseNet przyczyniają się do wzmocnienia nadzoru epidemiologicznego nad występowaniem zatruc pokarmowych i poprawy jakości dochodzenia epidemiologicznego w ognisku. Z drugiej strony udział w projekcie istotnie podnosi wiarygodność i wydajność diagnostyczną laboratorium.

Piśmiennictwo

1. Barrett T. J., Gerner-Smidt P., Swaminathan B.: Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in food-borne disease investigations and surveillance. *Food-borne Pathog. Dis.* 2006, 3, 20-31.
2. Fisher I. S., Threlfall E. J.: The Enter-net and Salm-gene databases of food-borne bacterial pathogens that cause human infections in Europe and beyond: an international collaboration in surveillance and the development of intervention strategies. *Epidemiol. Infect.* 2005, 133, 1-7.
3. Gerner-Smidt P., Hise K., Kincaid J., Hunter S., Rolando S., Hyytia-Trees E., Ribot E. M., Swaminathan B.: PulseNet USA: a five-year update. *Food-borne Pathog. Dis.* 2006, 3, 9-19.
4. Hunter S. B., Vauterin P., Lambert-Fair M. A., Van Duynne M. S., Kubota K., Graves L., Wrigley D., Barrett T., Ribot E.: Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 1045-1050.
5. Lucas C., Lukinmaa S.: Bioinformatics technology in PulseNet Europe. MED-VET-NET Second Annual Scientific Meeting, Malta 3-6 May 2006.
6. Lukinmaa S., Nakari U. M., Liimatainen A., Siitonen A.: Genomic diversity within phage types of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Foodborne Pathog. Dis.* 2006, 3, 97-105.
7. Lukinmaa S. on behalf of the PulseNet Europe partners.: PulseNet Europe an network of European food, public health and veterinary laboratories. MED-VET-NET Second Annual Scientific Meeting, Malta 3-6 May 2006.
8. Nielsen E. M., Scheutz F., Torpdahl M.: Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. *Food-borne Pathog. Dis.* 2006, 3, 81-87.
9. Peters T. M., Maguire C., Threlfall E. J., Fisher I. S. T., Gill N., Gatto A. J.: The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Eurosurveillance* 2003, 8, 46-50.
10. Ribot E. M., Fair M. A., Gautom R., Cameron D. N., Hunter S. B., Swaminathan B., Barrett T. J.: Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Food-borne Pathog. Dis.* 2006, 3, 59-67.
11. Swaminathan B., Barrett T. J., Hunter S. B., Tauxe R. V.: PulseNet: the molecular subtyping network for food-borne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2001, 7, 382-389.
12. Swaminathan B., Gerner-Smidt P., Ng L. K., Lukinmaa S., Kam K. M., Rolando S., Gutierrez E. P., Binsztein N.: Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to food-borne disease outbreaks and emerging food-borne diseases. *Food-borne Pathog. Dis.* 2006, 3, 36-50.
13. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2233-2239.

Adres autora: dr Dariusz Wasyl, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: wasyl@piwet.pulawy.pl