

Le projet Salm-gene : une collaboration européenne pour les empreintes génétiques des salmonelles liées à l'alimentation

T.M. Peters¹, C. Maguire¹, E.J. Threlfall¹, I.S.T. Fisher², N. Gill², A.J. Gatto²
Au nom des participants du projet Salm-gene*

¹ Public Health Laboratory Service, Laboratoires des maladies entériques, Londres, Royaume-Uni

² Communicable Disease Surveillance Centre, Londres, Royaume-Uni

Le projet Salm-gene a mené en Europe une évaluation externe d'assurance qualité de la technique de PFGE pour identifier le sérotype, voire le lysotype des salmonelles. Une série de 16 souches de *S. Enteritidis* a été envoyée à 10 laboratoires nationaux de référence pour les salmonelles. En suivant un protocole harmonisé, les profils de PFGE obtenus étaient comparables entre les centres. Dans la plupart des cas, le taux de similitude était de 90%, dépassant souvent les 95%. Ceci suggère que les analyses en PFGE sont reproductibles, et qu'elles sont des outils précieux d'investigation, en association avec les données épidémiologiques.

Introduction

Dans la majorité des pays d'Europe occidentale, *Salmonella* est un pathogène zoonotique dont les réservoirs sont la volaille, le bétail et les porcs. Les salmonelles sont transmises à l'homme par des aliments contaminés tels que le bœuf, le poulet, la dinde et le porc qui représentent les sources principales d'infection. Au cours des dernières années, les salades ont également été impliquées comme véhicules de l'infection (1–3). Le commerce international des animaux destinés à la consommation et des produits alimentaires a entraîné une large dissémination des *Salmonella* à travers l'Union européenne (UE), et des épidémies internationales surviennent régulièrement.

La prévention et le contrôle des salmonelloses dépendent de la détection précoce de l'épidémie par un système de surveillance approprié, basé sur le typage des isolats. La méthode de typage reconnue au niveau international est le sérotypage, suivie du lysotypage pour différencier les sérotypes les plus fréquents. La valeur des méthodes de typage phénotypique comme outils de surveillance est bien établie, mais du fait de la prédominance de certains sérotypes et lysotypes dans de nombreux pays, les empreintes génétiques sont souvent utiles en complément lors d'investigations épidémiques pour lesquelles une discrimination spécifique entre les souches est nécessaire. Un certain nombre de méthodes basées sur l'ADN, comme le ribotypage, les empreintes avec insertion de la séquence 200, et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) sont disponibles, la PFGE étant devenue la référence pour différencier les sérotypes et les lysotypes des souches (4).

L'analyse par PFGE est hautement discriminatoire et peut classer les isolats bactériens en relation avec des situations épidémiques. Il s'agit donc d'une méthode permettant de prendre des décisions d'importance épidémiologique. Dans l'UE, la PFGE a déjà été pratiquée lors d'épidémies internationales de *S. enterica*, comprenant Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Virchow et Hadar, impliquant des produits alimentaires contaminés comme véhicules de l'infection. Elle a également été utilisée dans d'autres parties du monde pour identifier des épidémies d'origine alimentaire liées à Typhimurium, Paratyphi, Agona, Stanley, Saphra et Javiana. Il est intéressant de noter qu'une récente épidémie causée par *S. Stanley* a mis en cause des cacahuètes produites dans un continent, alors que des cas sont apparus dans trois autres (5).

Aux États-Unis, PulseNet US, un réseau pour le typage situé au CDC (Centres for Disease Control and Prevention) à Atlanta, utilise la technologie PFGE pour dépister *E. coli* O157 dans tout le pays, et plus récemment, *S. enterica* (6). Ce modèle ayant prouvé son efficacité

The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis

T.M. Peters¹, C. Maguire¹, E.J. Threlfall¹, I.S.T. Fisher², N. Gill², A.J. Gatto²
on behalf of the Salm-gene project participants*

¹ Public Health Laboratory Service, Laboratory of Enteric Pathogens, London, United Kingdom

² Communicable Disease Surveillance Centre, London, United Kingdom

An external quality assessment of PFGE method to discriminate between salmonella serotypes and lysotypes was carried out by the Salm-Gene project in Europe. A set of 16 strains of *S. Enteritidis* was sent to 9 national salmonella reference laboratories. By using a harmonised protocol, the PFGE profiles produced were comparable between each centre. In most cases, there was at least 90% similarity between isolates tested in the different European laboratories and there was usually >95% similarity. This suggests that PFGE analyses are reproducible and therefore can be used as a valuable investigation tool combined with epidemiological data.

Introduction

In the majority of countries in Western Europe, *Salmonella* is a zoonotic pathogen with its primary reservoirs being poultry, cattle and pigs. *Salmonella* organisms are transmitted through the food chain to humans with contaminated foodstuffs such as beef, chicken, turkey and pork being important sources of infection. In recent years, salad products have also been implicated as vehicles of infection (1–3). International trade both in food animals and food products ensures that salmonella organisms are widely distributed throughout the European Union (EU), and that international outbreaks occur regularly.

Much salmonellosis prevention and control depends on early outbreak recognition through a suitable surveillance system based on isolate subtyping. The principal internationally accepted method for the subtyping of salmonellas is serotyping, followed by phage typing for discrimination within the most common serotypes. The value of phenotypic typing methods as surveillance tools is well established but because of the predominance of certain serotypes and phage types in many countries, DNA fingerprinting is often used as an adjunct in outbreak investigations in which enhanced strain discrimination is needed. A number of DNA based methods, including ribotyping, insertion sequence 200 fingerprinting, and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) are available. Of these, PFGE has become the gold standard for strain subdivision both within serotypes and phage types (4).

Analysis by PFGE is highly discriminatory and can subdivide bacterial isolates relating to possible outbreak situations. As a method it can therefore be used to make decisions of epidemiological importance. In the EU, PFGE has already been applied to international outbreaks of *S. enterica*, including Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Virchow and Hadar, for which contaminated food products have often been the vehicles. It has also been used elsewhere in the world to establish foodborne outbreaks of Typhimurium, Paratyphi, Agona, Stanley, Saphra, and Javiana. Of particular note is the recent outbreak of Stanley associated with peanuts produced on one continent with cases being identified on three others (5).

In the United States (US), a subtyping network, PulseNet US, based at the Centres for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, uses PFGE technology to track *E. coli* O157 throughout

comme outil de surveillance des maladies d'origine alimentaire, il a été mis en place également au Canada, et se trouve à divers stades de développement dans la région Asie Pacifique et en Amérique latine. Toutefois, le lysotypage des souches de Enteritidis et de Typhimurium n'est pas réalisé en routine aux Etats-Unis.

Le projet de recherche européen Salm-gene a donc été désigné pour évaluer la valeur ajoutée en matière de détection des épidémies du typage moléculaire par PFGE réalisé en routine des deux sérotypes prédominants de *Salmonella*, dans un environnement où le lysotypage en routine est également pratiqué. Pour établir au sein de l'UE la PFGE comme méthode efficace de typage des salmonelles, il est essentiel de convenir au niveau international de tous les paramètres à considérer et de les harmoniser.

Les dix laboratoires participant au projet Salm-gene sont déjà membres d'Enter-net (7), le réseau international de surveillance des infections gastro-intestinales humaines. Les principaux objectifs de Salm-gene sont : i) de développer les procédures de laboratoire standards pour la PFGE et pour le traitement informatique des résultats ; ii) de créer une base de données consultable des profils de PFGE des principaux sérovars de *Salmonella* circulant actuellement en Europe ; iii) de réaliser les empreintes génétiques en temps réel d'un large échantillon de souches de salmonelles dans chacun des pays en utilisant des critères de sélection qui optimisent le pouvoir de détection, et d'analyser les données en continu dans la base de données en ligne ; iv) d'établir un protocole d'assurance qualité externe (AQE) pour la méthode PFGE.

Une bonne harmonisation des techniques de PFGE entre les laboratoires est indispensable pour obtenir des données qui soient comparables. Elle est également fondamentale au projet Salm-gene. Cet article présente les résultats des analyses d'un panel de souches rigoureusement sélectionnées dans chacun des neuf laboratoires participant à Salm-gene suivant un protocole harmonisé.

Méthodes

Les participants au projet Salm-gene comprennent le Laboratoire des pathogènes entériques (agissant comme coordinateur du projet en collaboration avec le réseau de surveillance Enter-net, CDSC, Royaume-Uni), et huit autres laboratoires de référence nationaux en Europe. Chaque centre participant a reçu une série de 16 souches de *S. enterica* pour l'évaluation externe de l'assurance qualité de la méthode. Ces souches incluaient les sérovars Typhimurium, Enteritidis, Hadar, Virchow, Agona, Heidelberg, Indiana, Montevideo, Mbandaka, Livingstone, Anatum, London, Senftenberg et Poona ; ainsi que deux lysotypes de Typhimurium et Enteritidis. Ces souches ont été sélectionnées pour donner une large gamme de profils PFGE, avec des bandes bien définies dans toutes les zones du gel.

Un protocole commun de PFGE utilisant le système CHEF® de Bio-Rad a été établi. Il impliquait une lyse des cellules par la protéinase K, ➤

the country, and this has recently been extended to *S. enterica* (6). Having demonstrated its effectiveness as a tool for foodborne disease surveillance, this model has been implemented in Canada and is at various stages of development in the Asia Pacific region and South America. However, phage typing of Enteritidis and Typhimurium strains is not undertaken routinely in the US.

The Salm-gene EU research project was therefore designed to assess the added value for outbreak recognition of routine molecular subtyping, using PFGE in particular, of the two predominant salmonella serotypes in an environment where phage-typing is also employed routinely. To establish PFGE as an effective method

for the subtyping of *Salmonella* within the EU, it is essential that all parameters are internationally agreed and harmonised.

The ten laboratories participating in the Salm-gene project are already members of Enter-net (7), the international surveillance network for human gastrointestinal infections. The main aims of Salm-gene are: i) to develop standard laboratory operating

procedures for PFGE and for computer recognition of the results, ii) to create a searchable database of PFGE profiles for the major *Salmonella* serovars currently in circulation within Europe, iii) to DNA fingerprint in real time a large sample of salmonella strains in each of several countries, using selection criteria that maximise outbreak detection power, and analyse the data continuously in the online database, iv) to establish an external quality assurance (EQA) scheme for PFGE.

Satisfactory harmonising of PFGE testing across laboratories is essential if comparable data are to be collected and is fundamental to the Salm-gene project. We report the results of testing a panel of carefully selected strains in each of the nine participating Salm-gene laboratories, using a harmonised protocol.

Methods

Participants in the Salm-gene project include the Laboratory of Enteric Pathogens (acting as the Project Co-ordinator in conjunction with the Enter-net surveillance hub, Communicable Disease Surveillance Centre, United Kingdom) together with eight other national reference laboratories within Europe. Each participating centre received a set of 16 *S. enterica* strains to be used for EQA of the method. These strains included the serovars Typhimurium, Enteritidis, Hadar, Virchow, Agona, Heidelberg, Indiana, Montevideo, Mbandaka, Livingstone, Anatum, London, Senftenberg, and Poona; two phage types of Typhimurium and Enteritidis were included. These strains were selected to provide a wide variety ➤

Tableau 1 / Table 1 Taux de similarité des profils PFGE pour les 16 souches de <i>S. Enteritidis</i> analysées dans neuf laboratoires / Similarity rate of the PFGE profile for the 16 <i>S. Enteritidis</i> strains analysed by nine European laboratories									
% similarité des souches par pays / % similarity for strains by country									
Isolat de <i>S. enterica</i> <i>S. enterica</i> isolate	Pays Country A	Pays Country B	Pays Country C	Pays Country D	Pays Country E	Pays Country F	Pays Country G	Pays Country H	Pays Country I
Typhimurium	94.9	98.4	98.4	95.4	98.4	91.3	91.3	94.9	94.9
Typhimurium	97.1	97.1	97.1	94.3	97.1	93.8	90.6	97.1	97.1
Enteritidis	95.8	100.0	100.0	96.0	100.0	95.6	95.6	100.0	100.0
Enteritidis	95.9	100.0	100.0	100.0	100.0	90.0	95.6	100.0	95.6
Hadar	93.1	100.0	100.0	100.0	100.0	88.9	92.3	100.0	100.0
Virchow	93.9	100.0	100.0	97.1	93.7	91.7	97.0	100.0	97.0
Agona	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.2	95.6	100.0	100.0
Heidelberg	95.3	98.4	98.4	98.4	100.0	93.7	91.3	98.4	98.4
Indiana	97.1	100.0	100.0	93.7	96.8	84.6	96.8	97.1	96.8
Montevideo	98.3	98.3	98.3	91.3	98.1	87.9	94.7	98.3	90.9
Mbandaka	96.8	100.0	100.0	90.3	96.5	95.6	96.3	100.0	100.0
Livingstone	90.6	100.0	100.0	100.0	92.3	85.7	91.7	94.6	95.2
Anatum	98.6	100.0	100.0	97.0	97.0	91.7	96.8	95.5	100.0
London	94.3	98.0	98.0	93.8	97.8	93.1	93.8	90.9	94.0
Senftenberg	100.0	100.0	100.0	90.0	96.5	90.0	96.5	100.0	88.9
Poona	96.2	100.0	100.0	96.0	91.7	95.6	96.0	100.0	96.2

► une série de lavage à 50°C, suivie d'une digestion par *Xba*I à 30U (4h minimum à 37°C). Les conditions de l'électrophorèse étaient les suivantes : Pulsations : initiale 2s ; finale 64s ; 6V/cm ; 14°C, 22 h (CHEF DR1I®), 20h (CHEF DR1I®), 18h (CHEF Mapper®). Les fragments de restriction d'ADN ont été séparés sur des gels d'agarose à 1 % (Bio-Rad Pulsed Field Certified or Seakem Gold) avec pour marqueur de référence moléculaire une souche de *S. Braenderup* (gracieusement fournie par PulseNet US, CDC) comme marqueur de référence moléculaire.

Les images des gels ont été échangées sous format TIFF (tag image file format). Les profils PFGE ont été analysés avec le logiciel BioNumerics en utilisant le coefficient de Dice et la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages, méthodes des moyennes de paires non ajustées), avec une limite de tolérance de 1,5% et une optimisation de 1,5%. Les profils de PFGE ont été assignés temporellement et les types ont été définis en fonction des différences d'une ou de plusieurs bandes entre les souches.

Résultats et discussion

Les profils de PFGE de la série de *S. enterica* pour les contrôles externes de l'assurance qualité contenaient entre 12 et 20 fragments chromosomiques séparables, allant d'environ 20 à 1140 kb. En utilisant une méthode PFGE harmonisée avec des paramètres définis pour l'électrophorèse, les images des gels obtenues étaient comparables entre chaque centre, en dépit de légères différences dans la préparation de l'ADN (tableau 1). Dans la plupart des cas, il y avait au moins 90% de similitude entre les isolats analysés dans les différents laboratoires européens, le taux de similitude dépassant souvent 95%. Les différences dans la distribution des fragments étaient liées à l'absence ou à la faible visibilité des bandes correspondant aux masses moléculaires les plus petites, inférieures à 30 kb (figure 1).

Les laboratoires de référence participant à ce projet sélectionnent et analysent actuellement entre 500 et 1000 isolats de *S. enterica* supplémentaires, correspondant aux sérotypes d'intérêt épidémiologique dans leur pays. L'enregistrement et la transmission électroniques des données entre les laboratoires signifient que ces isolats n'ont pas besoin

► of PFGE profiles such that well defined chromosomal fragments were present in all areas of the gel.

An agreed protocol for PFGE was performed using the Bio-Rad CHEF® system. This involved proteinase K lysis of cells, a series of washes at 50°C followed by digestion with 30U *Xba*I (minimum 4h, 37°C). Electrophoresis conditions were as follows: RAMP – Initial 2s; Final 64s; 6V/cm; 14°C, 22h (CHEF DR1I®), 20h (CHEF DR1I®), 18h (CHEF Mapper®). DNA macrorestriction fragments were resolved on 1% agarose gels (Bio-Rad Pulsed Field Certified® or Seakem Gold®) with a *S. Braenderup* strain (kindly supplied by PulseNet US, CDC) as a molecular reference marker.

Gel images were exchanged in tag image file format (TIFF files). PFGE patterns were analysed with BioNumerics software using Dice coefficient and Unweighted Pair Group Method of Averages (UPGMA) with a 1.5% tolerance limit and 1.5% optimisation. Pulsed field profiles were assigned on a temporal basis and types were designated on the basis of one or more band differences between strains.

Results and discussion

PFGE profiles for the external quality assessment of the set of *S. enterica* demonstrated between 12 and 20 resolvable chromosome fragments, ranging from approximately 20 kb to 1 140 kb. By using a harmonised method for PFGE with defined parameters for electrophoresis, the gel images produced were comparable between each centre despite slight variations in DNA preparation (table 1). In most cases, there was at least 90% similarity between isolates tested in the different European laboratories and there was usually >95% similarity. Where there were differences in banding patterns, this was due to the absence/faintness of the smallest bands on the gel, with molecular masses of <30 kb (figure 1).

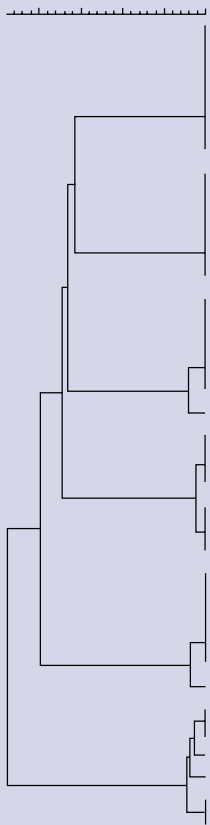
Reference laboratories participating in this project are currently in the process of selecting and testing a further 500–1 000 *S. enterica*

Figure 1

Exemple d'arbre (UPGMA) de profils PFGE de *S. enterica*
Example dendrogram (UPGMA) of *S. enterica* PFGE profiles

Dice (opt : 0.50 %) Tol 1.50 % - 1.5 % (H>0.0 % S>0.0 %) (0.0 % - 100.0 %)
PFGE PFGE

100 80 60 40 20



England Agona PT 15
Scotland Agona PT 15
Denmark Agona PT 15
Spain Agona PT 15
Finland Agona PT 15
Germany Agona PT 15
England Hadar PT 11
Scotland Hadar PT 11
Denmark Hadar PT 11
Finland Hadar PT 11
Germany Hadar PT 11
Spain Hadar PT 11
England Enteritidis PT 6a
Scotland Enteritidis PT 6a
Denmark Enteritidis PT 6a
Finland Enteritidis PT 6a
Germany Enteritidis PT 6a
Spain Enteritidis PT 6a
Scotland Heidelberg
Denmark Heidelberg
Spain Heidelberg
England Heidelberg
Finland Heidelberg
Germany Heidelberg
England Enteritidis PT
Scotland Enteritidis PT
Denmark Enteritidis PT
Spain Enteritidis PT
Germany Enteritidis PT
Finland Enteritidis PT
Scotland Typhimurium PT 208
Spain Typhimurium PT 208
England Typhimurium PT 208
Finland Typhimurium PT 208
Denmark Typhimurium PT 208
Germany Typhimurium PT 208

Résultats obtenus en utilisant le coefficient de Dice et le logiciel BioNumerics pour six des laboratoires européens participant au projet Salm-gene. L'échelle des taux de similarités est sur l'axe horizontal.
Results obtained using Dice correlation and BioNumerics software for six of the European laboratories participating in the Salm-gene project. A scale of percentage similarities is along the horizontal axis.

d'être envoyés. Les profils PFGE transmis en fichiers TIFF sont en cours d'analyse avec le logiciel BioNumerics au laboratoire coordinateur, où ils sont stockés dans une base de données centrale et comparés à ceux d'une banque d'empreintes génétiques. A chaque nouveau profil est attribué un identifiant unique qui est ajouté à la banque des profils PFGE. Cet identifiant est un code à six lettres associé à un numéro de quatre chiffres. Par exemple, le premier code barre de *S. Enteritidis* digéré par l'enzyme *XbaI* est dénommé SENTXB.0001.

La PFGE donne des empreintes stables et reproductibles, avec des fragments bien définis qui représentent le génome dans son intégralité. Cette stabilité est vitale pour utiliser la PFGE comme méthode de typage des souches. Nous utilisons un protocole harmonisé qui tient compte de certaines variations techniques entre les centres européens. Si l'harmonisation des méthodes de préparation et de digestion de l'ADN n'a pas été considérée comme essentielle, en revanche, la standardisation des paramètres de l'électrophorèse, elle, était un pré-requis absolu. Lors de la mise en place du projet Salm-gene, des consultations avec le réseau PulseNet aux Etats-Unis et au Canada ont permis d'assurer la comparabilité des données entre l'Europe et l'Amérique du Nord.

Les résultats préliminaires des contrôles externes d'assurance qualité montrent qu'il est possible de reproduire des résultats dans différents centres et de transmettre ces informations à une base de données centrale via l'Internet. Cette évaluation a lieu tous les six mois pour assurer la fiabilité des résultats obtenus avec les procédures standardisées.

La nomenclature des profils dans ce schéma sert à faciliter la communication entre les laboratoires. Bien que ce système ne soit pas destiné à « classer » les bactéries, il est important d'établir des numéros de profils reconnus par tous pour chacune des empreintes, des différences au niveau d'une seule bande devant être considérées comme significatives. Il est prévu que ceci serve de base pour échanger des informations entre laboratoires. Cependant, la lecture des différences pour une seule bande et l'identification des profils PFGE ne prouvent pas à elles seules de façon irrévocable la clonalité des isolats. De telles associations ne devraient pas être considérées sans preuve épidémiologique. L'application en pratique serait que les pathogènes responsables d'épidémies d'origine alimentaire dans les différents pays de l'UE puissent être identifiés d'après leurs empreintes génétiques, combinées à d'autres données de typage et aux éléments épidémiologiques. Ceci fournirait une base solide pour l'instauration de stratégies d'intervention adaptées.

Une base de données en ligne sur Internet est en cours de développement. Il sera possible d'y rechercher des informations sur les sérotypes et lysotypes de salmonelles les plus prévalents en Europe. Les participants transmettent par voie électronique toutes les empreintes génétiques et les informations épidémiologiques associées au réseau coordinateur, qui les intègre dans la base de données centrale en ligne. Cette base internationale de données sera développée, gérée et maintenue par le centre de coordination et sera accessible à tous les participants via Internet. La base de données épidémiologique sera analysée en routine et les résultats seront renvoyés à tous les participants. Les retombées relevant du domaine public et les rapports seront présentés et publiés par le centre épidémiologique coordinateur du projet.

Des recommandations seront émises pour intégrer les empreintes génétiques d'ADN au système national de surveillance basé sur les laboratoires des isolats humains de *Salmonella*. Elles s'appuieront sur le rapport coût/efficacité des différentes méthodes de laboratoires, les critères d'échantillonnage, et l'incidence de certains lysotypes. ■

isolates, representing currently defined serotypes of epidemiological importance within their country. Electronic recording and transmission of data between laboratories means that these isolates do not need to be exchanged. The PFGE patterns sent as TIFF files are being analysed using BioNumerics software at the coordinating laboratory where the profiles are stored in a central database and compared to a library of such patterns. Each new pattern is given a unique designation and added to the library of PFGE profiles. This designation is in the form of a six letter code together with a four digit numerical identifier. For example, the first pattern for *S. Enteritidis* digested with the enzyme *XbaI* is SENTXB.0001.

PFGE produces reproducible, stable fingerprints with well resolved fragments that represent the entire genome. It is this stability that is crucial for PFGE as a strain typing method. We use a harmonised PFGE protocol that takes into account some of the technical variation between different European centres. While standardisation of DNA preparation and digestion were not considered to be essential, standardisation of the parameters for electrophoresis was considered to be an absolute requirement. During the development of the Salm-gene project, there has also been consultation with PulseNet in the US and Canada to ensure comparability of data between Europe and North America.

The initial results from the EQA data show that it is possible to reproduce results at different centres and transfer this information electronically to a central database. The EQA scheme takes place every six months to ensure integrity of the results obtained with the standardised procedures.

Nomenclature of profiles in this scheme is for ease of communication between laboratories. While not intended as a 'bacterial classification' system, it is important to establish universally recognised profile numbers for each unique pattern with single band differences being considered potentially significant. It is intended that this will serve as the basis for exchange of information between laboratories. However, the reporting of single band differences and the identity of PFGE profiles alone does not prove unequivocally whether isolates are related or not. Such information should be considered together with epidemiological evidence. The practical application will be that the organisms responsible for food related outbreaks of salmonellosis in different countries in the EU can be compared on the basis of their DNA fingerprints, together with other subtyping data and epidemiological information, thereby providing a sound basis for the introduction of appropriate intervention strategies.

We are currently creating an online, web-based searchable database of information for the most prevalent salmonella serotypes and phage types within Europe. Participants submit all DNA fingerprints and associated epidemiological information electronically to the coordinating hub where it is incorporated into the central web-based database. This international database will be developed, managed and maintained at the coordinating hub and will be accessible to all participants via the internet. The epidemiological database will be routinely analysed and results reported back to all participants. Public domain outputs and reports will be developed and published by the epidemiological coordinating centre for the project.

Recommendations will be developed for incorporating DNA fingerprinting into national laboratory based surveillance of human salmonella isolates, based on the cost effectiveness of different laboratory methods, sampling criteria, and the incidence of particular phage types. ■

Remerciements / Acknowledgements

Le projet Salm-gene est financé par la Direction générale de la recherche de la Commission européenne dans le cadre du Programme 5 (contrat QLK2-CT-2001-1940). / The Salm-gene project is funded by Directorate General RESEARCH of the European Commission under the Framework Programme 5 (Contract QLK2-CT-2001-1940).

* Liste des participants au projet Salm-gene / Participants in Salm-gene are:

The Laboratory of Enteric Pathogens, England and Wales, the Bakteriologisch-serologische Untersuchungsanstalt, Austria; Statens Seruminstitut, Denmark; National Public Health Institute, Finland; Robert Koch-Institut, Germany; Instituto Superiore di Sanita, Italy; National Institute of Public Health & the Environment, the Netherlands; Scottish Salmonella Reference Laboratory, Scotland and Instituto de Salud Carlos III, Spain with the reference laboratory at the Pasteur Institute, France acting as the software compatibility advisor, and the Communicable Disease Surveillance Centre, England & Wales being the epidemiological co-ordinating centre.

References

1. Horby PW, O'Brien SJ, Adak GK, Graham C, Hawker JI, Hunter P, et al. (2002). A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiol Infect*, in press.
2. Crook PD, Aguilera JF, Threlfall EJ, O'Brien SJ, Sigmundsdóttir G, Wilson D, et al. A European outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Definitive Phage Type 204b linked with consumption of lettuce. *Clin Microbiol Infect*, in press.
3. Ward LR, Maguire C, Hampton MD, de Pinna E, Smith HR, Threlfall EJ. A collaborative investigation of an outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport in England and Wales in 2001 associated with ready-to-eat salad vegetables. *Commun Dis Public Health* 2002; **5**: 301-5.
4. Threlfall EJ, Ridley AM, Hampton MD. Technical advances in the bacteriological laboratory: methods for DNA analysis. *PHLS Microbiol Digest* 1996; **13**: 138-40.
5. Little C. *Salmonella* Stanley and *Salmonella* Newport in imported peanuts - update. *Eurosurveillance Weekly* 2001; **5**: 011025.
6. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, and the CDC PulseNet Task Force. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**: 382-9.
7. IST Fisher, on behalf of the Enter-net participants. The Enter-net international surveillance network - how it works. *Eurosurveillance* 1999; **4**: 52-5.
<http://www.eurosurveillance.org/em/v04n05/0405-222.asp>

RAPPORT DE SURVEILLANCE

Les infections entériques à *Salmonella* à Guipúzcoa, en Espagne, de 1983 à 2000

J.M. Marimón¹, E. Pérez-Trallero^{1,2}, M. Gomariz¹, C. Rodríguez-Andrés², C. López-Lopategui¹

¹ Service de microbiologie, Hôpital Donostia, Saint-Sébastien, Espagne

² Département de médecine préventive et de santé publique, Faculté de médecine, Université du Pays Basque, Saint-Sébastien, Espagne

L'incidence des infections entériques à *Salmonella* à Guipúzcoa, en Espagne, a été évaluée par l'étude d'une population stable de 1983 à 2000. Seuls les cas confirmés par coproculture ont été inclus. L'incidence annuelle moyenne chez les enfants de moins de deux ans était de 1121 pour 100 000 (IC 95% ; 1 060-1 181). Ce groupe d'âge présentait le risque relatif (RR) le plus élevé, 16,2 fois supérieur à celui des plus de 14 ans. *Salmonella* Enteritidis était le sérotype prédominant (80,4% des cas), suivi de *Salmonella* Typhimurium (11,7%).

Introduction

Dans les pays industrialisés, en Europe et aux Etats-Unis, *Salmonella* est la bactérie la plus souvent associée à la diarrhée chez l'homme. Au cours des dernières années, l'épidémiologie des

SURVEILLANCE REPORT

Salmonella enteric infections in Gipuzkoa, Spain, 1983-2000

J.M. Marimón¹, E. Pérez-Trallero^{1,2}, M. Gomariz¹, C. Rodríguez-Andrés², C. López-Lopategui¹

¹ Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián, Spain

² Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco. San Sebastián, Spain.

The incidence of *Salmonella* enteric infections in Gipuzkoa, Spain, was estimated by studying a stable population between 1983 and 2000. Only stool culture confirmed cases were included. The annual mean rate of infection in children under 2 years old was 1121 per 100 000 (CI 95%; 1060-1181). This age group had the highest relative risk (RR), 16.2-fold higher than the RR of those aged over 14 years. *Salmonella* Enteritidis was the most prevalent serovar (80.4% of all patients), followed by *Salmonella* Typhimurium (11.7%).

Introduction

In industrialised countries of Europe and the United States, *Salmonella* has been the bacteria most frequently associated with human diarrhoea. In the last years the epidemiology

Tableau 1 / Table 1

Distribution par groupe d'âge du nombre de patients présentant une infection entérique à *Salmonella*
Distribution by age group of number of patients with *Salmonella* enteric infection

		1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Total
Enfants (<2 ans) Children (<2 years)	S. Enteritidis	28	42	63	64	71	54	59	58	62	38	48	26	37	34	51	62	44	66	907
	S. Typhimurium	22	18	19	6	11	11	6	16	8	5	13	11	12	11	15	18	18	19	239
	Autres / Others	6	10	30	13	10	2	9	10	20	6	6	12	6	6	7	15	7	5	180
Enfants 2-14 ans Children 2-14 yrs	S. Enteritidis	41	90	137	116	203	133	137	148	148	119	117	69	84	119	135	197	139	131	2 263
	S. Typhimurium	21	13	10	18	6	10	10	15	8	24	19	22	12	36	35	43	28	41	371
	Autres / Others	13	4	9	6	10	5	5	4	15	3	7	8	8	10	12	5	8	7	139
Adultes / Adults (> 14 ans / years)	S. Enteritidis	54	93	236	254	255	244	277	308	215	144	129	81	98	79	82	173	158	169	3 049
	S. Typhimurium	24	24	17	24	19	14	16	18	13	28	14	8	9	13	18	12	20	6	297
	Autres / Others	8	5	14	8	16	16	24	16	46	12	11	17	15	22	17	16	18	8	289
Total		217	299	535	509	601	489	543	593	535	379	364	254	281	330	372	541	440	452	7 734