

فراوانی SPI-3 در میان سروتایپ‌های سالمونلا تایفی، پاراتایفی B و پاراتایفی C

- **مرجان باقری نجف‌آباد:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **فهیمة باغبانی آرانی*:** گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **سیدمهدی سادات:** بخش تحقیقات هیپاتیت، ایدز و ویروس‌های منتقله از خون، گروه تحقیقات ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران
- **صابر خدرزاده:** گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۳

چکیده

سالمونلا با تنوع سروتایپی زیادی که دارد یکی از عوامل عفونت گوارشی محسوب شده که شیوع گسترده‌ای در دنیا دارد. بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زا در سالمونلا بر روی جزایر پاتوژنیسیته (SPIs) قرار دارد. این مطالعه بر روی چگونگی توزیع ۲ ژن مربوط به SPI-3 (misL و mgtC) در میان سروتایپ‌های سالمونلا تایفی، سالمونلا پاراتایفی C، سالمونلا پاراتایفی B جدا شده از بیماران ایرانی، انجام پذیرفت. بیست و پنج سویه سالمونلا که از بیماران با علائم سالمونلوزیس جداسازی شده بودند و متعلق به سروتایپ‌های تایفی، پاراتایفی C و پاراتایفی B بودند، در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR جهت بررسی حضور ژن‌های misL و mgtC مورد بررسی قرار گرفتند. از میان ۲۵ نمونه سالمونلا ۲۰ سویه (۸۰٪) از لحاظ حضور SPI-3 مثبت بودند. حضور ژن misL در میان سروتایپ‌های سالمونلا تایفی (۱۰۰٪)، سالمونلا پاراتایفی C (۳۳٪) و سالمونلا پاراتایفی B (۲۵٪) بوده و حضور ژن mgtC برای سروتایپ‌های سالمونلا تایفی (۹۷٪)، سالمونلا پاراتایفی C (۳۳٪) و سالمونلا پاراتایفی B (۰٪) گزارش می‌گردد. حضور بالای SPI-3 در میان سویه‌های سالمونلای جدا شده از بیماران ایرانی اطلاعات پایه‌ای را پیرامون ژن‌های بیماری‌زایی و ویژگی‌های ملکولی سه سروتایپ مختلف سالمونلا در ایران فراهم می‌کند. این مطالعه اولین گزارش در رابطه با بررسی حضور SPI-3 در ایران می‌باشد.

کلمات کلیدی: سالمونلا، جزایر پاتوژنیسیته (PI)، PCR، misL، mgtC



مقدمه

سالمونلاها عامل تب روده‌ای، گاستروانتریت، باکتری می و سپتیسمی در انسان می‌باشند که اغلب از طریق تماس مستقیم و یا مصرف غذا و آب آلوده به مدفوع انسان یا حیوان و همچنین توسط ناقلین بدون علامت منتقل می‌شوند (Giannella, 1996). طبقه‌بندی سالمونلاها در مقایسه با سایر اعضای انتروباکتریاسه پیچیده‌تر می‌باشد. در حال حاضر در طبقه‌بندی کافمن وایت بیش از ۲۴۰۰ سروتایپ شرح داده شده است که براساس ساختمان آنتی‌ژنیکی دیواره سلولی (آنتی‌ژن O) و آنتی‌ژن فلاژلر (H) می‌باشد (Murray و همکاران، ۲۰۰۳). اکثر این سروتایپ‌ها به‌ندرت برای انسان بیماری‌زا می‌باشند و گونه‌های بیماری‌زای انسانی اغلب در سروگروپ‌های A, B, C1, C2, D, E1-E4 قرار دارند (Connie و همکاران، ۲۰۰۷؛ Winn و همکاران، ۲۰۰۶). بیماری‌زایی در این باکتری پیچیده بوده و شامل تهاجم به سلول میزبان و راه‌اندازی فرایندهای درون سلولی است که منجر به بیماری می‌گردد. همچنین سالمونلا از مکانیسم‌هایی که باعث بقاء در سلول میزبان و یا فرار باکتری از سیستم ایمنی می‌شود نیز بهره می‌گیرد. در این مکانیسم‌ها، ژن‌های متنوعی دخیل هستند که مهم‌ترین المنت ژنتیکی موثر در بیماری‌زایی سالمونلا جزایر پاتوژنیسیته سالمونلا (SPIs) می‌باشد. تاکنون حدود ۲۱ SPI در سالمونلا شناسایی شده است که برخی از آن‌ها در جهان شیوع بالاتری داشته (مانند SPI 15, 9, 11, 13) و برخی نیز اختصاصی سویه هستند (SPI 10, 15, 17, 19, 21). تعدادی از جزایر پاتوژنیسیته نیز در سروگروه‌های مختلفی قرار می‌گیرند (SPI 7, 11) (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۰؛ Sara و همکاران، ۲۰۰۶).

اگرچه اندازه، ساختار و عملکرد این SPIها و نیز توزیع آن‌ها در سروتایپ‌های مختلف تفاوت دارد اما دارای یک سری ویژگی‌های کلی مشترک هستند. به‌عنوان نمونه عموماً اندازه بزرگی (حدود ۲۰۰-۱۰۰ kbp) داشته و محتوای C+G متفاوت از دیگر قسمت‌های ژنوم باکتری دارد. این موتیف‌های ژنتیکی از طریق انتقال افقی در طی تکامل سالمونلا وارد ژنوم باکتری شده و امکان بیماری‌زایی به باکتری بخشیده است. جزیره پاتوژنیسیته ۳ از مهم‌ترین SPIها در سالمونلا بوده که اندازه‌های حدود ۱۷ kb داشته و محتوای C+G در آن ۴۷/۵٪ می‌باشد. همچنین دارای ژن‌های مهمی مانند *misL* و *mgtC* می‌باشد (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۰؛ Garth و Hensel، ۲۰۰۶).

سروگروه‌هایی از سالمونلا که حاوی ژن *mgtC* می‌باشند می‌توانند در محیطی با مقدار mg^{2+} پایین رشد کنند. این ژن توسط سیستم *phoP-phoQ* تنظیم می‌شود که این سیستم به رشد باکتری در مقدار کم mg^{2+} کمک می‌کند و می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور مهم در بیماری‌زایی نیز عمل کند. *misL* نیز ژن کدکننده نوعی پروتئین چسبنده است که در SPI-3 قرار دارد. این پروتئین با اتصال به فیبرونکتین سطح سلول میزبان باعث اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده شده و در افزایش قدرت تهاجم باکتری سالمونلا نقش دارد. به این ترتیب این دو ژن نقش مهمی در بیماری‌زایی سالمونلا ایفا می‌کنند (Eduardo و Ephraim، ۲۰۰۹؛ Dorsey و همکاران، ۲۰۰۵). از آن‌جائی که از یک طرف فراوانی حضور جزایر پاتوژنیسیته در سویه‌های مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد و از طرف دیگر ارتباط مستقیم با شدت بیماری‌زایی سویه‌ها دارد، لازم است توزیع حضور این جزایر بیماری‌زایی در مناطق مختلف به‌ویژه نواحی که این باکتری اندمیک است بررسی گردد تا نتایج آن هم در مدیریت بهداشتی کشور و هم برای مطالعات پایه ژنتیکی سویه‌های بومی یک منطقه مورد استفاده قرار گیرد. لذا در این مطالعه حضور ژن‌های *misL* و *mgtC* مربوط به SPI3 در سروتایپ‌های سالمونلا تایفی، سالمونلا پاراتایفی C و سالمونلا پاراتایفی B مورد بررسی قرار گرفت. چنین دیدگاهی در مطالعات دیگری نیز که در کشورهایی مانند ایتالیا (Zagaglia و همکاران، ۱۹۹۹)، فرانسه (Haeghebaert و همکاران، ۲۰۰۳)، برزیل (Dias De Oliveira و همکاران، ۲۰۰۳)، آمریکا (Rodriguez و همکاران، ۱۹۹۰)، کلمبیا (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۰) و هند (Bhowmick و همکاران، ۲۰۱۱) انجام شده، به چشم می‌خورد که به نوعی بیان‌گر اهمیت موضوع می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد مطالعه حاضر از نوع تحقیقی می‌باشد. سالمونلای مورد استفاده در این تحقیق طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۹۰ از بیمارستان‌های مختلف در ۳ شهر تهران، تبریز و مشهد از بیمارانی با علائم کلینیکی عفونت سالمونلایی (تب، اسهال و استفراغ، انتشار عفونت در خون و ...) جداسازی شده‌اند. به این صورت که نمونه گرفته شده از بیمار (اسهال، ادرار، خون و یا بیوپسی مغزاستخوان) ابتدا در آزمایشگاه روی محیط مک‌کانکی آگار کشت داده شد. سپس با استفاده از آزمایش‌های



تایید کیفیت DNA از نسبت جذب نوری DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و نیز از الکتروفورز DNA روی ژل ۱/۸٪ استفاده شد.

از سویه استاندارد *Salmonella enteritidis* ATCC:13076 جهت کنترل مثبت واکنش‌های PCR استفاده گردید. برای بررسی حضور SPI-3 در سویه‌های مورد مطالعه، دو ژن مختلف از این SPI یکی در محدوده ۵' (*misL*) و دیگری در محدوده ۳' (*mgcC*) که در واقع مرز راست و چپ این SPI هستند، انتخاب گردید. سپس واکنش PCR جهت ارزیابی حضور این دو ژن در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه قطعات تکثیری در جدول ۱ نشان داده شده است.

بیوشیمیایی استاندارد جنس سالمونلا تشخیص و جداسازی گردید. در نهایت برای تعیین سروتایپ‌های موردنظر در این مطالعه (تایفی، پاراتایفی B و پاراتایفی C)، باکتری جدا شده به مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ارسال گردید و با روش استاندارد آگلوتیناسیون روی لام با استفاده از آنتی سرم‌های اختصاصی سروتایپ‌های موردنظر مشخص گردید. در نهایت سویه‌های سالمونلای جدا شده جهت نگهداری در محیط کشت نوترینت برات حاوی ۲۰٪ گلیسرین و در شرایط دمایی ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

برای تخلیص DNA ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت برات (۵ میلی‌لیتر) کشت داده شده و سپس DNA ژنومی با استفاده از کیت Bioflux-Bioer خالص‌سازی گردید. برای بررسی کمی DNA استخراج شده از اسپکتوفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده گردید تا غلظت DNA استخراج شده برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر به دست آید. هم‌چنین برای

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

اندازه محصول (bp)	توالی نوکلئوتید پرایمر (۵'→۳') (Forward/Reverse)	جایگاه ژن در SPI	نام قطعه تکثیری
۶۵۵	TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT/ ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	۳'	<i>MgcC</i>
۹۸۶	GACGTTGATAGTCTGCCATCCAG/ CAATGCCGCCAGTCTCCGTGC	۵'	<i>misL</i>

فراوانی هر ژن در هر گروه سروتایپی توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ انجام شد.

نتایج

در این مطالعه ۲۵ نمونه سالمونلا که از بیمارانی با علائم سالمونلوزیس جدا شده بود مورد مطالعه قرار گرفت. این سویه‌ها مربوط به ۳ سروتایپ مختلف تایفی (۱۸ سویه)، پاراتایفی B (۴ سویه) و پاراتایفی C (۳ سویه) بودند. پس از استخراج DNA از نمونه‌های مورد مطالعه، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن (*mgcC* و *misL*) PCR صورت گرفت. پس از الکتروفورز، محصولات PCR مربوط به ژن *misL* باند ۹۸۶ bp را نشان داد (شکل ۱).

هر واکنش PCR حاوی ۱/۵ میلی‌مول یون منیزیم (MgCl₂)، ۰/۲ میلی‌مول dNTP، ۴۰ نانوگرم از ژنوم باکتری، ۱ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase و ۱۵ پیکوگرم از هر پرایمر می‌باشد. PCR در شرایط دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر DNA در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱ دقیقه انجام شد. هم‌چنین دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و تکثیر نهایی واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. واکنش PCR در ۳۵ سیکل انجام شد.

سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ ژل رد و با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شدند و نتایج حاصله تحت نور UV مورد آنالیز قرار گرفت. محاسبه

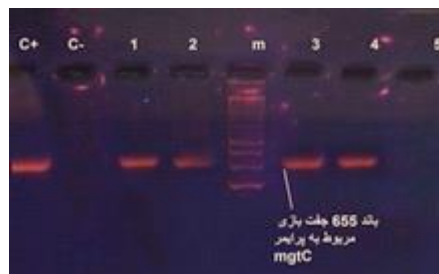




شکل ۱: الکتروفورز با پرایمر اختصاصی *misL* باند ۹۸۶ bp برای نمونه های شماره ۱، ۲، ۳ مشاهده می شود. سالمونلا تایفی: چاهک ۱. سالمونلا پاراتایفی C: چاهک ۲. سالمونلا پاراتایفی B: چاهک ۳. C+: کنترل مثبت (سویه استاندارد: *Salmonella enteritidis*- ATCC: 13076). کنترل منفی (C-). M: مارکر ۱۰۰۰bp

باند مورد نظر در کنترل مثبت و عدم حضور آن در کنترل منفی واکنش، صحت انجام واکنش را تأیید می کند.

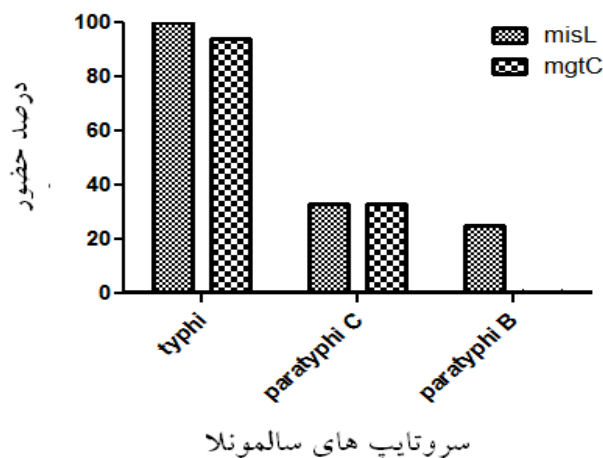
همچنین باند ۶۵۵bp مربوط به ژن *mgtC* طبق شکل ۲ در نمونه های مثبت مشاهده گردید. در هر واکنش PCR حضور



شکل ۲: نتایج الکتروفورز ژن *mgtC* باند ۶۵۵bp برای نمونه های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ مشاهده می شود. سالمونلا تایفی: چاهک ۱. سالمونلا پاراتایفی C: چاهک ۲. سالمونلا تایفی: چاهک ۳. سالمونلا پاراتایفی B: چاهک ۴. سالمونلا پاراتایفی B: چاهک ۵. C+: کنترل مثبت (*Salmonella enteritidis* ATCC: 13076). C-: کنترل منفی. M: مارکر ۱۰۰۰bp

تنها ۱ نمونه در سالمونلا پاراتایفی B مثبت بود و در سالمونلا پاراتایفی C هم ۱ نمونه از ۳ نمونه مورد مطالعه مثبت بودند. به طور کلی ۸۰٪ نمونه ها برای این ژن مثبت می باشد.

فراوانی حضور ژن *misL* در میان سروتایپ های مورد مطالعه در شکل ۳ دیده می شود به طوری که در سالمونلا تایفی در همه ۱۸ سویه مورد مطالعه این ژن وجود داشت در صورتی که



شکل ۳: نتایج مربوط به درصد حضور ژن *misL* و ژن *mgtC* در میان سروتایپ های سالمونلا

Iginocchio و Casadesu (۲۰۱۲) نیز حضور ژن‌های *misL* و *mgtC* در ۹۰٪ سویه‌های کلینیکی مورد مطالعه (سالمونلا پاراتایفی B، سالمونلا گروه C و سالمونلا تایفی) گزارش شد (۱۰). در مجموع نتایج این مطالعات و نیز مطالعه حاضر بیان‌گر حضور بالای این ناحیه بیماری‌زا در سویه‌های کلینیکی می‌باشد اگرچه لزوماً حضور ۱۰۰٪ این ژن‌ها در نمونه‌های کلینیکی دیده نمی‌شود. این نتایج از یک طرف بیان‌گر اهمیت این ناحیه در بیماری‌زایی سالمونلا می‌باشد و از طرف دیگر بیان‌گر تفاوت مکانیسم‌های بیماری‌زایی و طیف متنوعی از قدرت بیماری‌زایی در سویه‌های سالمونلا می‌باشد. همچنین وجود اختلاف اندک در تعداد ژن‌های مثبت گزارش شده در مطالعات مختلف می‌تواند به علت وجود مناطق جغرافیایی مختلف و یا موتاسیون در تعدادی از ژن‌ها می‌باشد.

Patit paban و همکاران (۲۰۰۲) روی ۳۱ سویه سالمونلا جدا شده از منابع غذایی فاسد در کشور تایوان حضور و یا عدم حضور ژن‌های SPI-3 را مورد بررسی قرار داد، نتایج به دست آمده مشابه نتایج مطالعه اخیر بوده و حضور ژن *mgtC* را در ۹۵٪ سویه‌ها و *misL* را در ۸۰٪ سویه‌ها گزارش می‌کند. سویه‌های این مطالعه متعلق به سروتایپ‌های تایفی، پاراتایفی B، A، C، اینتریدیپتیس و سالمونلا گروه A بودند (۱۳).

حضور بالای این جزیره بیماری‌زایی هم در نمونه‌های غذایی و هم کلینیکی تأییدی بر انتقال بیماری از طریق منابع غذایی است. کما این که می‌توان از این مناطق به عنوان مارکرهای ژنتیکی ردیابی عفونت نیز استفاده کرد. هرچند برای توسعه این دیدگاه کاربردی لازم است مطالعات بیش‌تری در نمونه‌های بالینی، غذایی و محیطی انجام شود. در مجموع مطالعه روی فراوانی SPIها در سویه‌های مربوط به یک ناحیه جغرافیایی خاص، دیدگاه جدیدی است که منجر به افزایش دانش پایه پیرامون المنت‌های ژنتیکی و مکانیسم‌های بیماری‌زایی سالمونلاهای اندمیک مناطق جغرافیایی مختلف می‌گردد و این مطالعه برای اولین بار چنین اطلاعاتی را در تعداد اندکی از سویه‌های تیفوئیدی بومی ایران فراهم می‌کند و لازم است که جهت تکمیل اطلاعات حاصله مطالعات مشابهی روی تعداد نمونه‌های بیش‌تر و با منابع مختلف صورت پذیرد.

توزیع ژن *mgtC* در میان سروتایپ‌های مورد مطالعه نیز در شکل ۳ مشاهده می‌شود. بیش‌ترین حضور *mgtC* در سالمونلا تایفی (۹۴٪) دیده می‌شود در حالی که هیچ‌کدام از سویه‌های پاراتایفی B برای این ژن مثبت نبودند. در سالمونلا پاراتایفی C هم ۱ نمونه مثبت بود (۳۳٪). فراوانی کلی این ژن در نمونه‌های بررسی شده ۷۲٪ می‌باشد.

با توجه به این که ژن *mgtC* در مرز سمت چپ و ژن *misL* در مرز سمت راست SPI-3 قرار دارند و فراوانی کلی این دو ژن به ترتیب ۷۲٪ و ۸۰٪ می‌باشد. بنابراین فراوانی قطعی حضور SPI-3 ۸۰ درصد (۲۰ ایزوله) می‌باشد در عین حال که توزیع آن در سروتایپ‌های مختلف متفاوت است.

بحث

در دهه‌های اخیر اطلاعات در رابطه با ساختار و عملکرد بیماری‌زایی، فاکتورهای بیماری‌زا و سایر عوامل موثر در بیماری‌زایی در سروتایپ‌های مختلف سالمونلا بسیار گسترده و وسیع شده است. هرچند اطلاعات در رابطه با حضور عناصر بیماری‌زا در این باکتری خصوصاً در مناطق جغرافیایی که حضور سالمونلا به صورت اندمیک گزارش می‌شود (مانند ایران) نیاز به تحقیق بیش‌تری دارد. از طرفی، با توجه به حضور SPIها در باکتری بیماری‌زای سالمونلا و نقش مهم آن‌ها در ایجاد بیماری‌زایی، روش‌های نوین در رابطه با شناسایی این عوامل بیماری‌زا در باکتری، توسعه و گسترش یافته است (Hakdong و همکاران، ۲۰۱۱). لذا مطالعه حاضر به منظور تهیه اطلاعاتی پیرامون حضور ژن‌های بیماری‌زایی مربوط به SPI3 در سویه‌های تیفوئیدی بومی ایران صورت پذیرفت که نتایج حاصله حضور گسترده SPI-3 را در میان سروتایپ‌های سالمونلا تایید می‌کند. براساس نتایج به دست آمده ژن‌های *mgtC*، *misL* (SPI-3) با حضور تقریبی ۸۰٪ در این مطالعه تایید شدند. حضور ۱۰۰٪ برخی از این ژن‌ها مانند *misL* برای تایفی مشاهده شده است. در مطالعه‌ای مشابه که توسط Ochman و Groisman (۱۹۹۷) صورت گرفت مشاهده شد که در میان ۶۵ نمونه سالمونلای گرفته شده از بیماران با علائم سالمونلوزیس، ژن *mgtC* که مسئول تامین انرژی باکتری برای زنده ماندن در ماکروفاژهای درون سلولی در شرایط Mg^{+2} می‌باشد در ۱۰۰٪ سویه‌های مورد بررسی از جمله سالمونلا تایفی، سالمونلا پاراتایفی A و B و سالمونلا اینفینیتیس مثبت گزارش شده است (۱۲). در مطالعه انجام شده توسط



منابع

- Fimbrial Operon. *Micr Extrem Unusual*. Vol. 11, No. 3, pp: 109-123.
11. Murray, P.; Roudier, C.; Fierer, J. and Guiney, D.G., 2003. Manual of Clinical Microbiology. ASM science. 8th Edition. 2630 p.
 12. Ochman, H. and Groisman, E., 1997. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect, Immun*. Vol. 64, No. 4, pp: 5410-5412.
 13. Petit paban, B.; Lin, J.S. and Hsih, H.Y., 2002. Pulsed field gel electrophoresis for clinical isolated of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. *Vet Microbiol*. Vol. 87, No. 20, pp: 73-80.
 14. Rodriguez, D.C.; Tauxe, R.V. and Rowe, B., 1990. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol Infect*. Vol. 105, pp: 21-27.
 15. Sanchez, M.M.; Cardona-Castr, N.; Canu, N. and Rubino, S., 2010. Distribution of pathogenicity islands among Colombian isolates of *Salmonella*. *Italy J Infect Dev Ctries*. Vol. 4, No. 9, pp: 555-559.
 16. Sara, M.; Soto, I. and Rosario, R., 2006. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *Microbiologica*. Vol. 55, No. 112, pp: 365-373.
 17. Winn, W.C.; Allen, S.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Procop, G.W.; Schreckenberger, P.C. and Woods, G.L., 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 1736 p.
 18. Zagaglia, C.; Sollini, L.; Paludi, D.; Mónica, F.; Piccolomini, R.; Catamo, G.; Calconi, A.; Filetici, E.; Casalino, M. and Nicoletti, N., 1999. Virulence factors of *Salmonella* ser. Enteritidis strains isolated in Italy from food-borne outbreaks. *Int J Immunopathol Pharmacol*. Vol. 12, pp: 89-96.
 1. Bhowmick, P.; Devegowda, D.; Ruwandepika, H.A.D.; Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 2011. Presence of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes in seafood-associated *Salmonella* serovars and the role of the *sseC* gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells. *Microbiology*. Vol. 157, pp: 160-168.
 2. Connie, R. M.; Lehman, D.C. and Manuselis, G., 2007. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd Edition. Saunders Elsevier. 1211 p.
 3. Dias De Oliveira, S.; Rodenbusch, C.R.; Michael, G.B.; Cardoso, M.; Wageck Canal, C. and Brandelli, A., 2003. Detection Of Virulence Genes In *Salmonella Enteritidis* Isolated From Different Sources. *Braz J Microbiol*. Vol. 34, pp: 123-124.
 4. Dorsey, C.W.; Laarakker, M.C.; Humphries, A.D.; Weening, E.H. and Bäumlér, A.J., 2005. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *MisL* is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol*. Vol. 12, No. 35, pp: 196-211.
 5. Ephraim, F. and Eduardo, A., 2009. Control of *Salmonella* pathogenicity island-3 gene expression. *Curr Opin Microbiol*. Vol. 12, No. 25, pp: 199-204.
 6. Garth, L. and Hensel, A., 2006. Intracellular *Salmonella enterica* Redirect Exocytic Transport Processes in *Salmonella* Pathogenicity. *Microbiol RES*. Vol. 127, No. 7, pp: 716-730.
 7. Giannella, R.A., 1996. *Salmonella*. Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch. 578- 610 p.
 8. Haeghebaert, S.; Sulem, P.; Deroudille, L.; Vanneroy-Adenot, E.; Bagnis, O.; Bouvet, P.; Grimont, F.; Brisabois, A.; Le Querrec, F.; Hervy, C.; Espié, E.; De Valk, H. and Vaillant, V., 2003. Two Outbreaks of *Salmonella enteritidis* Phage Type 8 Linked to the Consumption of Cantal Cheese Made with Raw Milk, France, 2001. *Euro surveillance*. Vol. 8, pp: 151-156.
 9. Hakdong, S.H.; Ju-Hoon, L.B.; Jeong, A.L.; Hyeryen, K. and Sangryeol, R., 2011. Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Bacteriophage SPN1S. *Microbiol Immunol*. Vol. 59, No. 12, pp: 1284-1285.
 10. Iginocchiotat, K. and Casadesu, J., 2012. Regulation of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) by Products of the *std*

