بررسی ژن های حدت پلاسمیدی در سروتیپ های مختلف *سالمونلا انتریکا* جدا شده در ایران

دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی[1*] دکتر حسن تاج بخش[1]

دریافت مقاله: ۲۱ اردیبهشت ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۱۸ آذر ماه ۱۳۸۲

هدف: بررسی حضور ژن spv در جدایه های سروتیپ های مختلف *سالمونلا انتریکا*.

طرح: مطالعه مشاهده ای.

نمونه ها: تعداد صد و سی و هشت نمونه سالمونلای جدا شده در بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی.

روش: در این تحقیق از روش افزوده سازی با پرایمرهای PG48 و PG44 برای بررسی ژن تنظیم کننده حدت پلاسمیدی در سروتیپ های مختلف استفاده شد.

نتایج: در افزوده سازی ژن spvR *سالمونلا آبورتوس اویس*، *انترایتیدیس*، *تیفی موریوم*، *دابلین* و *براندبورگ* همگی باندهایی با وزن ۸۹۰ جفت باز را به طور مشخص ایجاد کردند. سروتیپ *بویس موربیفیکانس*، *تیفی* و *سنفتنبرگ* باندهای ضعیف و غیر اختصاصی تولید کردند. سروتیپ *نیوپورت* هیچ محصولی را در این روش نشان نداد.

نتیجه گیری: جدایه های سروتیپ های سالمونلا *بویس موربیفیکانس*، *تیفی*، *سنفتنبرگ* و *نیوپورت* فاقد ژن تنظیم کننده حدت پلاسمیدی هستند. علاوه بر این از روش افزوده سازی ژن spvR به خوبی می توان در مشخص نمودن حضور یا عدم حضور پلاسمیدهای حدت در سروتیپ های مختلف *سالمونلا* بهره برد.

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۲، ۱۴۰-۱۳۷.

واژه های کلیدی: پلاسمید حدت، *سالمونلا*، *بویس موربیفیکانس*، *تیفی*، *سنفتنبرگ*، *نیوپورت*.

Study of *Salmonella* plasmid virulence genes (spv) in *Salmonella enterica* serovars isolated in Iran

Nikbakht, Gh.,[1] Tadjbakhsh, H.[1]

[1] *Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

Objective: To study the presence of spv genes among different *Salmonella* serovars that isolated in veterinary microbiology departement.

Design: Observation study.

Samples : A total of 138 *Salmonella* strains belonged to 9 different serovars were studied.

Procedure: In this study we applied PCR method using PG44 and PG48 primers to amplify spvR gene in different serotypes.

Results: In PCR amplification, serotyps *S.abortusovis*, *S.dublin*, *S.typhimurium* and *S.brandburg* developed the 890 bp amplicons. *S.typhi*, *S.senftenberg* and *S.bovismorbificans* have yielded nonspecific bands of different sizes. *S.newport* revealed no band in amplification.

Conclusion: *Salmonella* serotypes such as typhi, *senftenberg* and *bovismorbificans* with nonspecific bands in PCR amplification does not share virulence plasmids. Furthermore, spvR loci could be considered as a good marker for presence or absence of virulence plasmids in different *Salmonella* serotypes. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 2: 137-140, 2004.***

Key words: Spv, *Salmonella*, *Typhi*, *Senftenberg*, *Bovismorbificans*, *Newport*.

Corresponding author email:nikbakht@ut.ac.ir

به طور کلی عوامل حدت در *سالمونلاها* را بر اساس کنترل ژنتیک آنها می توان به دو گروه عمده تقسیم نمود: عوامل حدت کرومزومی و پلاسمیدی. پلاسمید های بزرگ با اندازه های ۲۸۵-۵۰ کیلو باز بسته به سرووار در *سالمونلا انتریکا* شناسایی شده اند. تجزیه و تحلیل های ایزوژنیک بر روی حاملین پلاسمیدی و سویه هایی که پلاسمید آنها دستکاری شده نشان داده که پلاسمید برای حدت لازم است. پلاسمید حدت در سروارهای متعددی از *سالمونلا انتریکا* حامل اپرون spv (حدود ۸ کیلو باز) است که نقشی در حدت باکتری برای میزبان دارد (۲،۲۴).

پلاسمیدی که حامل ژن spv است به عنوان پلاسمید حدت معرفی می شود. نقش spv هنوز کاملاً مشخص نیست ولی در موش بر روی رشد کامل *تیفی موریوم* در حفره داخل یاخته ای (فاگوزوم) مؤثر است. البته این ژن عوامل بالقوه حدت را نیز در *سالمونلاها* (مثل فیمبریه) رمز می کند(۲،۱۰).

اپرون spv که واجد پنج ژن spv A, spv B, spv C, spv D, spv R می باشد در جنس *سالمونلا* بسیار حراست شده است (۱). همان گونه که ذکر شد نقش پلاسمید حدت در بیماریزایی *سالمونلا* هنوز به صورت یک راز باقی مانده است (۵،۲۶). اپرون spv برای ایجاد فاز سیستمیک بیماری توسط سروتیپ های *کلراسوئیس* در خوک، *گالیناروم* در جوجه، *دابلین* در گاو، *تیفی موریوم* و *انترایتیدیس* در موش لازم است. شواهد اپیدمیولوژیکی این عقیده را تقویت می کند که اپرون spv برای بیماریزایی خارج روده ای یا ایجاد عفونت سیستمیک توسط سروتیپ های غیر تیفوئیدی در حیوانات خونگرم و انسان مورد نیاز است (۴).

لوسی spv درجنس *سالمونلا* توزیع فیلوژنتیک متمایزی را پدید آورده است. ژن های spv در گونه *سالمونلا بونگوری* حضور ندارند ولی درتحت گونه های I، II، IIIa، IV، و VII *سالمونلا انتریکا* مشخص شده اند. (۴،۵،۱۶) در تحت گونه I ژن های spv بر روی پلاسمیدهای بزرگ حدت قرار گرفته اند. به نظر می رسد که تحت گونه های II، IIIa، IV و VII *سالمونلا انتریکا* ژن های مشابهی را در کرومزوم خود حمل می کنند (۱،۱۶).

چنان که گزارش شده برخی از سروتیپ های *سالمونلا* پلاسمیدهای حدت را ندارند و تمامی باکتری های جدا شده از سروتیپی که واجد پلاسمید حدت است، دارای پلاسمید حدت نیستند (۲۶).

۱) گروه آموزشی میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.
*) نویسنده مسؤول nikbakht@ut.ac.ir

بر این اساس ما در این تحقیق با استفاده از روش PCR به بررسی حضور ژن های حدت پلاسمیدی در برخی سروتیپ های مختلف *سالمونلا انتریکا* که تاکنون در بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی جدا گردیده و شناسایی شده اند پرداختیم.

مواد و روش کار

این تحقیق بر روی ۱۳۸جدایه *سالمونلا* از ۹سروتیپ مختلف صورت گرفت. فهرست سروتیپ ها و تعداد جدایه های مورد آزمایش در هر سروتیپ در جدول ۱ آمده است. لازم به ذکر است که ۱۲ عدد از جدایه های سروتیپ *تیفی* مربوط به کشور پاکستان بوده و سویه SU40 سویه ای از *سالمونلا آبورتوس اویس* است که پلاسمید آن خارج شده و فاقد پلاسمید می باشد (۲۵).

ابتدا با بررسی خواص بیوشیمیایی ارتباط باکتری های جدا شده به جنس *سالمونلا* مشخص گشته و سپس سروتیپ آنها با روش استاندارد آگلوتیناسیون تعیین شد. در مورد تمامی جدایه ها آزمون PCR جهت تشخیص ژن حدت پلاسمیدی (spv R) صورت گرفت.

استخراج DNA ژنومی از طریق جوشاندن و براساس روش پیشنهادی Holmes و Quigley در سال ۱۹۸۱ صورت گرفت (۱۱). یک یا دو کلنی کاملا مشابه از کشت باکتری بر روی محیط جامد لوریا برتانی (LB) در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گشته سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار می گرفت. پس از سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه مایع رو برای آزمون PCR استفاده می شد.

از آنجایی که ژن spvR در اپرن spv نقش اساسی داشته و حضور یا عدم حضور آن می تواند معرف وجود یا فقدان فعالیت اپرن حدت پلاسمیدی باشد، از پرایمرهای اختصاصی این ژن در روش افزوده سازی استفاده شد (۱۷).

برای تشخیص حضور ژنهای حدت پلاسمیدی از پرایمر های زیر استفاده شد:

PG48: 5' CCC CGG GAA TTC GCT GCA TAA GGT CAG AGG G 3'

PG44: 5' CCC CGG GAT CCA TGG ATT TCT TGA TTA ATA AA 3'

پرایمرهای فوق قابلیت تشخیص ژن تنظیم کننده ژن های حدت پلاسمیدی spvR را دارا می باشند. در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، غلظت مواد استفاده شده به ازای هر واکنش به قرار زیر است:

۵/۱ MgCl2 میلی مول، ۲۰۰ dNTPs میکرومول، از هر پرایمر ۲۵ پیکومول و ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده از باکتری ها. چرخه های حرارتی شامل دو مرحله بودند. مرحله اول با ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و مرحله دوم که طی ۳۰ چرخه صورت گرفت و هر چرخه شامل سه گام بود. ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه (گام اول)، ۵۰ درجه ۶۰ ثانیه (گام دوم) و ۷۲ درجه به مدت ۱۲۰ ثانیه (گام سوم) (۲۳).

نتایج

در صورتی که سروتیپ مورد آزمایش واجد ژن های حدت پلاسمیدی باشد در افزوده سازی با پرایمر spvR باندهایی با وزن ۸۹۰ جفت باز ایجاد خواهد کرد. چنانکه در تصویر ۱ مشخص می شود، برخی سروتیپ های غیر تیفوئیدی *سالمونلا* مثل *سالمونلا آبورتوس اویس*، *انتراتیدیس*، *تیفی موریوم*، *دابلین* و *براندبورگ* همگی باندهایی با وزن ۸۹۰ جفت باز را به طور مشخص ایجاد کرده اند.

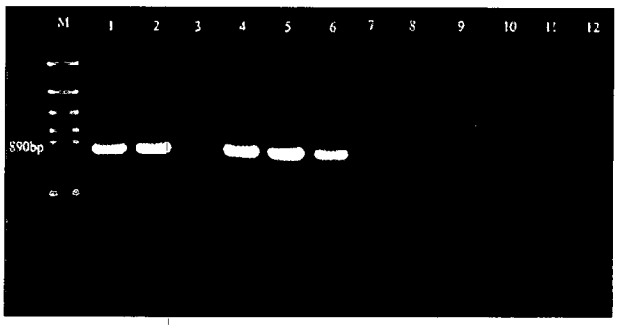
جدول ۱ - فهرست سروتیپ های *سالمونلا* و تعداد جدایه های مورد آزمایش در هر سروتیپ.

سروتیپ	تعداد
تعدادسروتیپ *سالمونلا آبورتوس اویس*	۸۲
سالمونلا انتراتیدیس	۱۶
سالمونلا تیفی موریوم	۷
سالمونلا دابلین	۶
سالمونلا تیفی	۲۰
سالمونلا سنفتنبرگ	۲
سالمونلا نیوپورت	۲
سالمونلا بویس موربیفیکانس	۱
سالمونلا براندبورگ	۱
SU40	۱
جمع	۱۳۸

سروتیپ های *سالمونلا تیفی*، *سنفتنبرگ*، *نیوپورت*، *بویس موربیفیکانس* و سویه ای از *سالمونلا آبورتوس اویس* که فاقد پلاسمید می باشد در افزوده سازی محصولات ۸۹۰ جفت باز را تولید نکرده اند (تصویر ۱). در بین سروارهای فوق در مورد سروتیپ *بویس موربیفیکانس*، *تیفی* و *سنفتنبرگ* باندهای ضعیف و غیر اختصاصی تولید شده است. این باندها در بین جدایه های مختلف *تیفی* و *سنفتنبرگ* پروفایل های متفاوتی را نیز نشان داده اند. سروتیپ *بویس موربیفیکانس* دو باند غیر اختصاصی در نواحی تقریباً ۱/۵ کیلو باز و ۸۹۰ باز ایجاد نموده است. سرتیپ *نیوپورت* و سویه SU40 که فاقد پلاسمید است در افزوده سازی هیچ باند مشخصی را نشان نمی دهند. *سالمونلا سنفتنبرگ* باندی بسیار ضعیف در ناحیه تقریباً ۷۰۰ جفت باز ایجاد کرده است. جدایه های مختلف سروتیپ *تیفی* سه پروفایل مختلف و متمایز را نشان داده اند (ستونهای ۹، ۱۰ و ۱۱ از تصویر۱). هر سه پروفایل *تیفی* باندهای ضعیف در نواحی ۸۹۰ جفت باز را دارا هستند. در یکی از پروفایل های سروتیپ اخیر باندی نسبتاً قوی در ناحیه حدود ۱/۵ کیلوباز یعنی مشابه با سروتیپ *بویس موربیفیکانس* به چشم می خورد (ستون ۹).

بحث

ژن های حدت پلاسمیدی به طور گسترده ای در سروتیپ های مختلف *سالمونلا* مورد بررسی قرار گرفته اند. تاکنون حضور این ژن ها درغالب سروارهای تحت گونه ۱ *سالمونلا انتریکا* مثل *تیفی موریوم*، *دابلین*، *انتراتیدیس*، *کلراسوئیس* و *گالیناروم* بیوتیپ های *گالیناروم* *پولوروم*به اثبات رسیده است. لوسی spv در تمامی این سروتیپ ها از مشابهت بسیاری برخوردار است (۷،۸،۹). در تحت گونه I در خصوص عدم حضور ژن های حدت پلاسمیدی



تصویر ۱- نتایج افزوده سازی ژن spvR در مورد سروتیپ های *آبورتوس اویس*(ستون ۱)، *انتراتیدیس* (ستون ۲)، *بویس موربی فیکانس* (ستون ۳)، *تیفی موریوم* (ستون ۴)، *دابلین* (ستون ۵)، *براندبورگ* (ستون ۶)، *نیوپورت* (ستون ۷)، *سنفتنبرگ* (ستون ۸)، *تیفی* (ستون ۹ و۱۰و ۱۱) و SU40 (ستون ۱۲). M : مارکر مورد استفاده که ladder 100bp plus (Fermentas) DNA بوده است.

به سروتیپ های *تیفی*، *پاراتیفی* A و B و *سندایی* اشاره شده است. البته ذکر شده که این سروتیپ ها از طریقی غیر وابسته به spv باعث تب روده ای می شوند (۴،۱۶)، ما نیز در این تحقیق عدم حضورمشخص ژن spvR را در جدایه های مختلف سروتیپ *سالمونلا تیفی* به تأیید رساندیم. بنا بر اطلاعات موجود تمامی اعضای تحت گونه I *سالمونلا* که قادرند عفونت کشنده در موش ایجاد کنند حامل اپرون spv هستند، اما عرضه این اپرن به سروتیپ *تیفی* باعث اعطای حدت به این "پاتوژن واجد میزبان اختصاصی" نمی شود. به علاوه اپرون spv در غالب جدایه های سروتیپ *گالیناروم* وجود دارد ولی باز این اجرام باعث بیماری در موش نمی شوند (۴). بنابراین سروتیپ های *تیفی* و *گالیناروم* باید فاقد عوامل حدتی باشند که در کرومزوم سایر سروتیپ ها موجود است. آنچه در این تحقیق باید مورد توجه قرار گیرد تولید باندهای متعدد و در مواردی کاملا مشخص بوده که با وزنهایی متفاوت در افزوده سازی مشاهده می شوند. این باندها با آنچه در استفاده ازاین روش برای ژن spv R مورد انتظار بود (۸۹۰ جفت باز) بسیار متفاوت اند. نتایج PCR بر روی جدایه های مذکور نشان می دهد که ردیفهای مشابهی با ژنهای spv در گنجینه ژنومی *سالمونلا تیفی* موجود است. مقایسه نتایج به دست آمده از سروتیپ *تیفی* با سویه SU40 که فاقد پلاسمید است، حضور این ژن ها را در پلاسمید باکتری محتمل تر می سازد. البته مشخص نمودن جایگاه ژن های حدت پلاسمیدی مشابه آنچه که در مورد سروار *آریزونا* گزارش شده است نیازمند تحقیقات بیشتری است (۱۶).

موضوع جالب توجه دیگر عدم حضور ژن spvR در سروتیپ های *سنفتنبرگ*، *نیوپورت* و *بویس موربیفیکانس* است. *سالمونلا سنفتنبرگ* در گروه E4 و *نیوپورت* و *بویس موربیفیکانس* در گروه C2 جدول کافمن وایت تقسیم بندی شده اند (۱۵). هر سه سروتیپ جزء عوامل عفونت با منشأ غذا محسوب می شوند و در انسان عمدتا باعث گاستروانتریت با علایم تب و اسهال می گردند (۱۸،۱۹،۲۲). سروتیپ های مذکور در دامها با عفونت ملایم و اغلب تحت بالینی همراه اند. تنها گزارشی مبنی بر ایجاد انتریت هموراژیک و گاهی سقط توسط *سالمونلا نیوپورت* در گاو موجود است (۳). هیچ یک از این سروتیپ ها تاکنون مهاجم شناخته نشده اند (۲۲). در گزارشی از Popoff و همکاران در سال ۱۹۸۴ اشاره ای به حضور پلاسمیدهای بزرگ در شمار محدودی از جدایه های *نیوپورت* شده است که مشابه پلاسمیدهای *آبورتوس اویس*، *انتراتیدیس* و *پاراتیفی* C هستند. تاکنون چنین پلاسمیدهایی در *سنفتنبرگ* و *بویس موربیفیکانس* شناسایی نشده اند(۲۱). این گزارشات نیز نتایج مطالعات ما را بر روی سروتیپ های *سنفتنبرگ*، *نیوپورت* و *بویس موربیفیکانس* تأیید می کنند و احتمال عدم حضور ژن های حدت پلاسمیدی را در سروتیپ های مذکور نشان می دهند. براساس اطلاعات ما تحقیق حاضر برای اولین بار عدم حضور ژن spv R را در سروتیپ های *سنفتنبرگ*، *نیوپورت* و *بویس موربیفیکانس* نشان می دهد. به هر حال با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون افزوده سازی ژن spv بر روی سروتیپ های مختلف *سالمونلا* در این بررسی و یافته های دیگر محققین در خصوص پلاسمید های حدت (۲۴، ۲۱، ۹، ۲،۷،۸) چنین به نظر می رسد که حضور یا عدم حضور ژن spvR می تواند ملاک نسبتاً مناسبی در تقسیم بندی *سالمونلا ها* براساس حضور یا عدم حضور پلاسمیدهای حدت یا به عبارتی خانواده های پلاسمیدی باشد.

References

1. Baumler, A.J., Tsolis,R.M., Ficht,T.A. and Adams, L.G. (1998): Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. Infect. Immun. 66: 4579-4587.
2. Chu, C. S., Hong Tsai. C.W., Lin, T. and Liu, J.T.Ou. (2001): Comparative Physical and Genetic Maps of the Virulence Plasmids of *Salmonella enterica* Serovar typhimurium, enteritidis, cholerasuis, and dublin. Infect. Immun. 67: 2611-2614.
3. Clegg, F.G., Chiejina, S.N., Duncan, A.L., Kay, R.N. and Wray, C. (1983): Outbreaks of *Salmonella newport* infection in dairy herds and their relationship to management and contamination of the environment. Vet. Rec. Jun.18. 580-584.
4. Darwin, K.H. and Miller, V. L. (1999): Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev. 12: 405-428.
5. El.Gedaily, A., Paesold,G. and Krause,M. (1965): Expression profile and subcellular location of the plasmid-encoded virulence (Spv) proteins in wild-type *Salmonella dublin*. Infect. Immun. 1997. Aug. 3406-3411.
6. Fierer, J. and Guiney, D.G. (2001): Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. J. Clin. Invest. 775-780.
7. Guiney, D.G., Fang, F.C., Krause, M., and Libby, S. (1994): Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. FEMS. Microbiol. Lett. Nov. 15: 1-9.
8. Guiney, D.G., Fang, F.C., Krause, M., Libby, S., Buchmeier, N.A. and Fierer, J. (1995): Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. Clin. Infect. Dis.Oct. S146-S151.

9. Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F., and Rhen, M. (1907): Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. Mol. Microbiol. 1993. Mar. 825-830.

10. Gulig, P.A. and Doyle, T.J. (1993): The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of *Salmonella* in mice. Infect. Immun. 61:504-511.

11. Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114:193-197.

12. Jelesic, Z., Kulauzov, M., and Kozoderovic, G. (2000): [Analysis of the plasmid profile of various *Salmonella* serotypes]. Med. Pregl. Nov. Dec. 564-567.

13. Ji,W.S., Hu, J.L., Qiu, J.W., Pan, B.R., Peng, D.R., Shi, B.L., Zhou, S.J., Wu, K.C. and Fan, D.M. (1907): Relationship between genotype and phenotype of flagellin C in *Salmonella*. World J. Gastroenterol. 2001. Dec. 864-867.

14. Kidgell, C., Pickard, D., Wain, J., James, K., Diem Nga, L.T., Diep, T.S., Levine, M.M.,O'Gaora, P., Prentice, M.B., Parkhill, J., Day, N., Farrar, J. and Dougan,G. (2002): Characterisation and distribution of a cryptic *Salmonella typhi* plasmid pHCM2. Plasmid. May. 159-171.

15. Kaufman, F. (1971): Serological diagnosis of *Salmonella* species Kaufman-White Schema. 9-25.

16. Libby, S.J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Kurth, M., Belcher,C., Fierer, J. and Guiney, D.G. (2002): Characterization of the spv locus in *Salmonella enterica* serovar arizona. Infect. Immun. Jun. 3290-3294.

17. Libby, S.J., Adams , L.G., Ficht, T.A., Allen, C., Whitford, A., Buchmeier, N.A., Bossie, S. and Guiney, G. (1997): The spv gene in *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe *enteritis* and systemic infection in the natural host. Infect. Immun. May. 1786-1792.

18. Lyytikainen, O., Koort, J., Ward, L., Schildt, R., Ruutu, P., Japisson, E., Timonen, M. and Siitonen, A. (2000): Molecular epidemiology of an outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar *newport* in Finland and the United Kingdom.Epidemiol. Infect.Apr. 185-192.

19. Mattila, L., Leirisalo-Repo, M., Pelkonen, P., Koskimies, S., Granfors, K. and Siitonen, A. (1998): Reactive arthritis following an outbreak of *Salmonella bovismorbificans* infection. J. Infect. May. 289-295.

20. Mills-Robertson, F., Addy, M.E., Mensah, P. and Crupper, S.S. (2002): Molecular characterization of antibiotic resistance in clinical *Salmonella typhi* isolated in Ghana.FEMS Microbiol.Lett.Oct. 8:249-253.

21. Popoff, M.Y., Miras, I., Coynault, C., Lasselin, C. and Pardon, P. (1984): Molecular relationships between virulence plasmids of *Salmonella* serotypes *typhimurium* and *dublin* and large plasmids of other *Salmonella* serotypes. Ann.Microbiol. (Paris). May. Jun. 389-398.

22. Ramadan, F., Unni, A.G., Hablas, R. and Rizk, M.S. (1967): *Salmonella*-induced *enteritis*. Clinical, serotypes and treatment. J. Egypt. Public Health. Assoc. 357-367.

23. Rubino, S., Muresu, E., Solinas, M., Santona, M., Paglietti, B., Azara, A., Schiaffino, A., Santona, A., Maida, A. and Cappuccinelli, P. (1998): IS200 fingerprint of *Salmonella enterica* serotype typhimurium human strains isolated in Sardinia. Epidemiol. Infect. 120:215-222.

24. Salyers, A.A and Whitt, D.D. (1994): Bacterial Pathogenesis. Molecular. Biology. USA. (63-89)-(229-243). AMSPress.

25. Uzzau, S., Chitsato, O., Falchi, G, Bruscagin, I., Bacciu, D., Delogu, D., Bossi, L. and Rubino, S. (2001): Identification and Analysis of GIFSY1 and GIFSY2 Pathogenicity Phage in Epidemic Strain of *Salmonella spp.* Isolated in Zimbabwe and in Strain With Diverse Host Specificity. Pakistan J. Microbiol. 1: 9-11.

26. Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D.J, and Olsen, J.E. (2000): Host adapted serotypes of *Salmonella enterica* 268. Epidemiol infect. 125: 229-255.