نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۱ تابستان ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.106054

شناسایی مولکولی ژن‌های حدت پلاسمیدی *spv* در سالمونلا انتریتیدیس جداسازی شده از نمونه‌های طیور در ساوه

• **سید امین جعفرزاده صومعه**
دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
• **کیومرث امینی (نویسنده مسئول)**
استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
تاریخ دریافت: مرداد ۹۴ تاریخ پذیرش: آبان ۹۴

Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

چکیده

سالمونلاها از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیک بسیار متنوع بوده و اکثراً برای انسان و سایر حیوانات بیماری‌زا می‌باشند. سالمونلا انتریتیدیس جزء سه سروار با اهمیت و غالب در اکثر کشورهای جهان است. پلاسمیدهای حدت spv، پلاسمیدهایی بزرگ و بسته بوده که فقط در سالمونلاهای خاصی دیده می‌شوند. این پلاسمیدها حامل ژن‌هایی می‌باشند که باعث افزایش حدت، مقاومت سرمی، رشد داخل سلولی و چسبندگی شده و همچنین موجب افزایش ظرفیت ماندگاری این باکتری در بافت‌های خارج روده‌ای در میزبان‌های عفونی می‌شوند. هدف این مطالعه شناسایی ژن‌های جایگاه spv از جمله spvB, spvC و spvR سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های طیور می‌باشد. در این مطالعه مقطعی- توصیفی، تعداد ۵۵ نمونه سالمونلا انتریتیدیس از نمونه‌های طیور منطقه ساوه جمع‌آوری و بعد از کشت بر روی محیط‌های اختصاصی با تست‌های بیوشیمیایی تایید گردیدند. DNA باکتری با کیت استخراج و آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های پلاسمیدی spv در نمونه‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که از مجموع ۵۵ نمونه سالمونلا انتریتیدیس، ۱۸ نمونه (۷/۳۲ درصد) واجد ژن spvR و ۱۶ نمونه (۱/۲۹ درصد) حاوی ژن spvB بوده اند، و ژنspvC در هیچ یک از نمونه‌ها ردیابی نگردید. شیوع بالای ژن‌های spvR و spvB با میزان حدت باکتری کاملاً مرتبط بوده و به نقش این ژن‌ها در بیماری‌زایی دلالت می‌کند. همچنین تغییرات ژنتیکی در سالمونلا می‌تواند در انتقال این عوامل پلاسمیدی بین گونه‌های مختلف موثر باشد.

کلمات کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، ژنهای حدت پلاسمیدی، spvR

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 2-7

Molecular identification of plasmid virulence genes spv in *Salmonella enteritidis* isolated from poultry samples in Saveh

By: Jafarzadeh Somea, A. MSc Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. and Amini, K. (Corresponding Author), Assistant Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

Received: July 2015 Accepted: October 2015

Salmonella bacteria belonging to Enterobacteriaceae family, is important in terms of biochemical and serological aspects which imposes very diverse and important losses to humans and other animals. *Salmonella enteritidis* is one of the three serovars which is important and dominant in most countries of the world. Spv virulence plasmids are large and closed plasmids seen only in certain Salmonella. This virulence plasmid contain genes which give rise to virulence, serum resistance, cell growth and adhesion, as well as increasing the survival capacity of the bacteria in the intestinal tissues of infected hosts. The aim of this study is to identify genes spv position of spvB, spvC and spvR of *Salmonella enteritidis* isolated from poultry samples. In this cross-sectional study, 55 cases of *Salmonella enteritidis* from chicken samples were collected from the Saveh area and cultured on the specific medium which were confirmed by biochemical tests. DNA extraction and PCR test kits was performed to detect spv plasmid genes in the samples. The results showed that out of 55 cases of *Salmonella enteritidis*, 18 samples (32.7%) were spvR gene and 16 samples (29.1%) were spvB gene, and the spvC gene was not detected in any of the samples. The high prevalence of bacterial virulence genes of spvR and spvB was fully associated with the role of these genes in the pathogenesis. Salmonella can cause genetic changes in plasmid transfer between different species.

Key words: : *Salmonella enteritidis*, plasmid virulence genes, *spv*.

مقدمه

سالمونلاها از باکتری‌های مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که از نظر بیوشیمیایی و سرولوژیک بسیار متنوع می‌باشند و اکثر آنها برای انسان و سایر حیوانات بیماریزا هستند. تمام سروتیپ‌های سالمونلا می‌تواند در حیوانات بیماریزا بوده و در انسان نیز بیماری‌هایی نظیرگاستروانتریت، تب روده‌ای (تیفوئید و پاراتیفوئید) و باکتریمی را به وجود آورد. گاستروانتریت شایع‌ترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان می‌باشد که توسط سروتیپ‌های سالمونلا به ویژه سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس ایجاد می‌گردد. سالمونلا انتریتیدیس جزء سه سروار با اهمیت و غالب در اکثر کشورهای جهان است. مخزن اصلی این سروار گله‌های طیور، گوشت و تخم‌مرغ نپخته آلوده است که منبع و ناقل مهمی جهت عفونت‌های انسانی محسوب می‌گردند (۱). پلاسمیدهای حدت SPV، پلاسمیدهایی بزرگ و بسته بوده که فقط در سالمونلاهای خاصی دیده می‌شوند. این پلاسمیدها حامل ژنهایی می‌باشند که باعث افزایش حدت، مقاومت سرمی، رشد داخل سلولی و چسبندگی شده و همچنین موجب افزایش ظرفیت ماندگاری این باکتری در بافتهای خارج روده‌ای در میزبانهای عفونی می‌شوند. سویه‌های فاقد پلاسمید حدت خیلی سریع از طحال پاک می‌شوند (۲). بسیاری از سرووارها مانند سالمونلا دابلین، سالمونلا تیفی موریوم وسالمونلا انتریتیدیس دارای پلاسمیدهای حدتی هستند که در اکثر جدایه‌ها مشترک است. اگرچه پلاسمیدهای اختصاصی سروار (SSP) در سرووارهای متعدد از نظر محتوایی یکسان نیستند ولی یک منطقه فوق العاده حفاظت شده به نام spv (ژن حدت پلاسمیدی سالمونلا) که مسئول حدت می‌باشد وجود دارد. spvR که پلی پپتیدی با وزن ۳۳ کیلودالتون است همانند lysR جزء پروتئین‌های تنظیم‌گر می‌باشد. spvR یک پروتئین با اثر تنظیمی مثبت می‌باشد، برای بیان سایر قسمتهای دیگر ضروری است و بعنوان یک فعال‌کنندهٔ رونوشت‌برداری ژنهای پائین دستی spvA,B,C,D در طی مرحلهٔ رکود رشد عمل می‌کند. پروتئین spvR میزان رونوشت‌برداری اولیه از پروموتورهای spvR را افزایش می‌دهد (۱۲). هدف این مطالعه شناسایی ژنهای جایگاه spv از جمله spvB, spvC و spvR سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های طیور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کشت نمونه‌ها: در این مطالعه مقطعی- توصیفی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از فرمول $n=z^2P(1-P)/d^2$ و خطای قابل قبول ۰/۰۵، تعداد ۱۵۰ نمونه مدفوع از نمونه‌های طیور منطقه ساوه در اردیبهشت ۱۳۹۳تا آبان ماه ۱۳۹۳جمع آوری شد. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و کروم آگار سالمونلا کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند (۱۵, ۴).

استخراج DNA و آزمون PCR: برای استخراج DNA از کیت باکتریهای گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استفاده گردید. مخلوط‌های استفاده شده جهت انجام واکنش PCR به این شرح می‌باشد: ۱۰X PCR buffer (۷۵ mM Tris-HCl, pH ۹,۰, ۲ mM MgCl۲, ۵۰ mM KCl, ۲۰ (NH۴)۲SO۴(mM), (CinaGen, Iran), به میزان ۲/۵ میکرولیتر، (dNTP mix۵۰) ۱۰ µM به میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرهای (۲۵ pmol) تهیه شده از شرکت سیناژن از هرکدام ۱ میکرولی‌تر، آنزیم (۱U Ampli Taq polymerase) به میزان ۱ میکرولیتر، نمونه DNA ۲ میکرولیتر که در نهایت با آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر می‌رسد. مطابق منابع مورد استفاده برنامه آزمون PCR بدین شرح می‌باشد: مرحله دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال مطابق جدول ۱در دماهای ذکر شده به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (تعداد ۳۵ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول ۱ ذکر شده است (۱۴, ۶). سویه استاندارد سالمونلا انتریتیدیس با ۱۶۲۱ RTCC به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. آزمون PCR در دستگاه TECHNE انجام شد و محصول نهایی در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شد. سپس نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ انتقال داده شده و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه (۱۹ version) و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج تشخیص باکتری

بعد از کشت و تایید حضور باکتری سالمونلا، آزمون‌های بیوشیمیایی با محیط‌های افتراقی TSI (Triple Sugar Iron Agar)، IMViC انجام و باکتری سالمونلا تایید گردید. جهت تعیین سروار، سروتایپینگ نمونه‌ها با آنتی‌سرم بهارافشان) انجام و گروه سرمی نیز تعیین گردید و نمونه‌های سالمونلا انتریتیدیس شناسایی شد و در نهایت تعداد ۵۵ نمونه باکتری جداسازی گردید.

نتایج آزمون PCR

نتایج آزمون ملکولی نشان داد که از مجموع ۵۵ نمونه سالمونلا انتریتیدیس جداسازی شده از نمونه‌های طیور بیشترین فراوانی مربوط به ژن spvR بوده و ژن spvC در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نگردید. توزیع فراوانی هر یک از ژن‌ها به تفکیک بر حسب تعداد و درصد در نمودار ۱ ذکر شده است. نتایج محصول PCR بر روی ژل آگارز و باندهای تشکیل شده به همراه مارکر در شکل ۱ مشخص شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

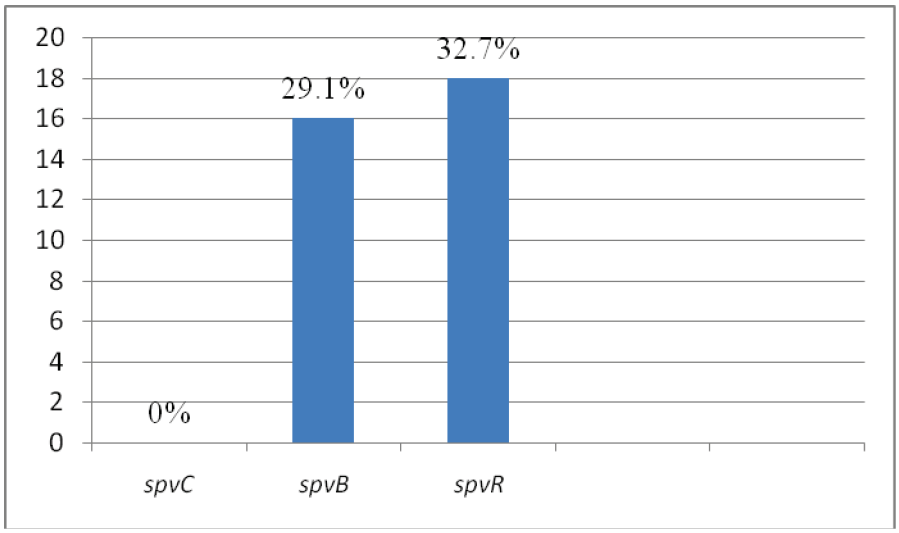
سالمونلوز از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی است که گسترش جهانی دارد و به صورت مشترک در انسان و حیوان دیده می‌شود. دو سروار شایع این باکتری در حیوانات و انسان شامل سالمونلا انتریتیدیس و تیفی موریوم می‌باشد (۱). همت‌زاده و سالمی (۱۳۷۳) فراوان‌ترین سروار جدا شده در انسان، طیور و سایر دامها در استان چهارمحال و بختیاری را در ایران سالمونلا انتریتیدیس معرفی نمودند (۵). روش‌های تشخیص، سالمونلاها بر اساس مدت زمان صرف شده برای تشخیص این اجرام به دو گروه روشهای متداول و روشهای سریع طبقه‌بندی می‌نماید (۱۶). یکی از کاربردهای مفید تحقیق حاضر استفاده از محیط رامباخ و کروم آگار به جای محیط‌های کاربردی دیگر بود که پس از غنی‌سازی کردن در محیط راپاپورت واسیلیادیس مستقیماً بر روی این دو محیط برده می‌شد. در محیط کروم آگار باکتری ۶-۵ ساعت بعد از کشت شروع به ایجاد

جدول ۱- توالی پرایمرهای حدت باکتری سالمونلا انتریتیدیس مورد استفاده در آزمون Multiplex-PCR

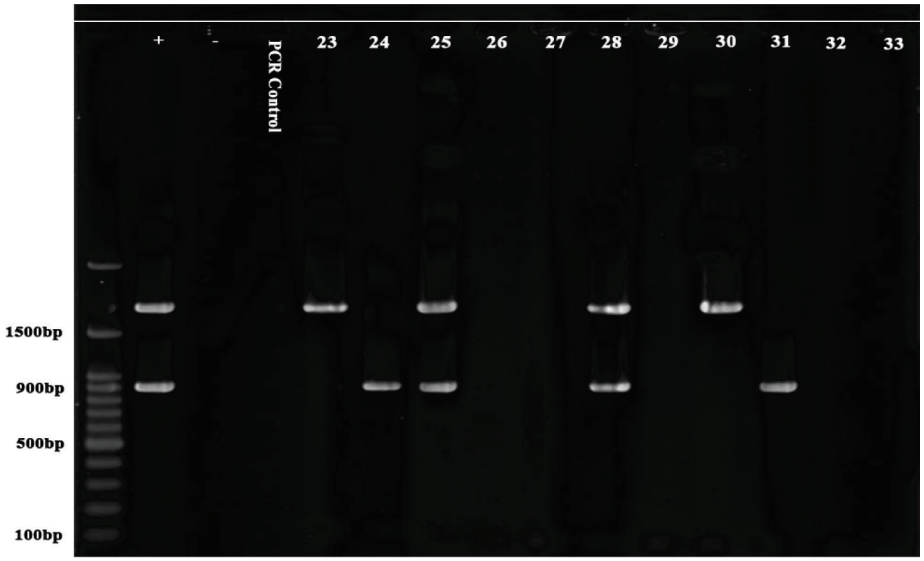
منبع	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال	ژن هدف	توالی نوکلوتیدی پرایمرها (۵'-۳')	نام پرایمرهای حدت
۱۴	۶۶۹	۴۲ °C	***spvC***	CGGAAATACCATCTACAAATA	spvC۱
			spvC	CGGAAATACCATCTACAAATA	spvC۲
۶	۱۷۷۶	۵۵ °C	***spvB***	CGGAAATACCATCTACAAATA	spvB.F
			spvB	CGGAAATACCATCTACAAATA	SpvB.R
۶	۸۹۴	۵۵ °C	***spvR***	CGGAAATACCATCTACAAATA	SpvR.F
			spvR	CGGAAATACCATCTACAAATA	SpvR.R

کلنـــی رنگی و بعد از ۴۸ ســـاعت نیز از بین می‌رفت، امـــا بر روی محیط رامباخ پس از ۲۴ ســـاعت کلونی‌های رنگی ایجاد و به صورت ثابت تا زمان نگهداری باکتری باقی می‌ماند. جالب توجه اینکه دقیقاً نتایج رشـــد کلنی قرمز رنگ واضـــح در محیط رامباخ با نتایج بیوشـــیمیایی هم‌خوانی کامل داشته و اســـتفاده از این محیط به دلیل ویژگی بالا، سرعت بالا واقتصادی بودن را در اپیدیمی‌های بزرگ با منشـــاء غذایی و ســـایر موارد روده‌ای در انسان و حیوانات توصیه می‌نمائیم.

لوکوس(جایگاه ژنی) spv پلاســـمید حدت مشـــتمل بر ۵ ژن شـــامل spv (R, A, B, C, D) می‌باشـــد که یک مجموعه ژنومی را ســـازمان‌دهی می‌نمایـــد (۱۰). در مطالعه درخشـــنده و همکاران که در ســـال ۲۰۱۳ بر روی نمونه‌های سروتیپ‌های مختلف ســـالمونلا جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شـــیراز انجام شد، مشـــخص گردید که در بین ۱۵ نمونه سالمونلا انتریتیدیس، میـــزان فراوانی ژنهای spvR ۶۰ درصد، spvC ۹۳/۳ درصد و spvB ۴۶/۶ درصد می‌باشـــد (۳). همچنین در تحقیقات خود به این نکته نیز اشاره نمودند که تغییرات ژنتیکی در سالمونلا می‌تواند در انتقال عوامل حدت پلاســـمیدی بین گونه‌های مختلف موثر باشـــد. همچنین در نتیجه



نمودار ۱- توزیع فراوانی ژن‌های حدت باکتری سالمونلا انتریتیدیس مورد مطالعه بر حسب تعداد و درصد



شکل ۱- نتایج M-PCR بر روی ژل آگارز از چپ به راست: مارکر (100 bp)، جدایه کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های ۳۲، ۵۲، ۸۲ و ۰۳ حاوی ژن spvB با طول باند (1776 bp) و نمونه‌های ۴۲، ۵۲، ۸۲و ۱۳ واجد ژن spvR با طول باند (894 bp)

تحقیقی در ایران میزان شیوع ژنهای spv بالای ۴۰٪ گزارش شده است (۳). در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر میزان شیوع این ژن در منطقه ساوه کمتر از مطالعات ذکر شده می‌باشد. نیکبخت و همکاران (۱۳۸۲) به بررسی حضور ژن spvR در جدایه‌های سروواریهای مختلف سالمونلا انتریکا با حضور آغازگر PG۴۸-PG۴۴ مربوط به spvR در ۱۳۸ جدایه سالمونلا از ۹ سروار مختلف پرداختند. جدایه‌های سروواریهای سالمونلا بویس، تیفی، سفتنبرگ و نیوپورت فاقد ژن spvR یا ژن تنظیم‌کنندهٔ حدّت پلاسمیدی بودند. در مقابل سروواریهای انتریتیدیس، تیفی موریوم، دابلین، براندبورگ این ژن شناسایی شد (۱۱). در تحقیق حاضر نیز با توجه به شیوع بالای ژن spvR می‌توان گفت که نمونه‌های سالمونلا انتریتیدیس جمع‌آوری شده در منطقه ساوه دارای قدرت تهاجمی بالایی بوده که با توجه به شیوع این ژن و میزان جداسازی در نمونه‌ها کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. ژن‌های spvA و spvC دارای تغییرات ژنومی بالاتری به واسطهٔ انتقال جانبی نسبت به ژن spvB می‌باشند (۲). در نتیجه تحقیق ما نیز عدم جداسازی ژن spvC می‌تواند موید همین مطلب باشد که تغییر ژنومی این ژن در میزان جداسازی و شناسایی آن تاثیر مستقیم دارد. کوریتا و همکاران (۲۰۰۳) عنوان نمودند که باکتری سالمونلا جهت ایجاد عفونت عمومی در مدل‌های موشی و آزمایشگاهی نیاز به پلاسمید حدت spv دارد. با حذف ژن‌های اوپرون spv، حدت نیز به شدت کاهش می یابد. پلاسمید حدت باعث عدم اتصال لیزوزوم به فاگوزرم در سلولهای دفاعی، شده و از طرفی باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولهای دفاعی، نیز می‌گردد. با ایجاد جهش در این ناحیه، تأثیرات حدت به شدت کاهش یافت (۸). ماتسوئی و همکاران (۲۰۰۱) عنوان نمودند که هر گونه جهش در ژن‌های اوپران spv باعث کاهش حدت در آزمایش مدل حیوانی آن می‌گردد. spvB و spvA نقش تعیین‌کننده‌ای در این اوپرون بازی می‌نمایند و عامل حدت را بیشتر به spvB و spvR نسبت داده‌اند (۹). جنیکوا و همکاران (۲۰۰۰) با جداسازی سالمونلا در نمونه‌های غذایی با روش ترکیبی ایمنومگنتینگ و آزمایش PCR با دو جفت پرایمر invA و spvC به منظور افزوده‌سازی قطعه ژنوم کروموزومی invA و پلاسمیدی spvC استفاده نمودند. مشخص شد که ترکیب این دو روش جهت جداسازی سالمونلا از نمونه‌های غذایی که فاقد چربی و یا بار زیاد میکروبی هستند کارآیی بالاتری دارد (۷). ساروج و همکاران (۲۰۰۷) در هندوستان به بررسی وجود ژنهای کروموزوم invA و پلاسمیدی spvC با روش M-PCR پرداختند. از ۲۸ جدایهٔ سالمونلا تیفی موریوم همگی واجد ژن invA بوده و فقط تعداد محدودی واجد ژن spvC به صورت توأم با ژنinvA بودند. در مدل موشی حضور ژن invA جهت تهاجم باکتری به سلول‌ها و ژن spvC جهت عمومی شدن روند بیماری ضروری می‌باشد (۱۳). در تحقیق حاضر نیز در مقایسه با نتایج سایر محققین بیشترین میزان فراوانی از ژن‌های spvR و spvB گزارش شده که شیوع بالاتر این دو ژن با میزان حدت باکتری کاملاً مرتبط بوده و به نقش این ژن‌ها در بیماری‌زایی دلالت می‌کند. همچنین تغییرات ژنتیکی در سالمونلا می‌تواند در انتقال این عوامل پلاسمیدی بین گونه‌های مختلف موثر باشد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم، مهندس رامین خاکی جوان و آقای دکتر علیرضا مختاری که در انجام مراحل عملی این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Amini K, Salehi TZ, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashraf-ganjooei SB, (2010), Molecular detection of invA and spv virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran; *African J Microbiol Res.* (4):2202-10.

2- Boyd EF, Hartl DL, (1998), Salmonella virulence plasmid: modular acquisition of the spv virulence region by an F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates; *Genetics.* 149(3):1183-90.

3- Derakhshandeh A, Firouzi R, Khoshbakht R, (2013), Association of three plasmid-encoded spv genes among different Salmonella serotypes isolated from different origins; *Indian J Microbiol.* 53(1):106-10.

4- Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A, (2005), *Diagnostic microbiology*; St Louis: Mosby.

5- Hemmatzadeh F, Salemi A, (1994), Introduction of isolated salmonellae from human and animal and the outlook to epidemiology of salmonellosis in the Chaharmahal Bakhtiary province in Iran; *J Fac of Vet Med Uni of Tehran.* 49(1&2):83-91.

6- Huang R, Wu S, Zhang X, Zhang Y, (2005), Molecular analysis and identification of virulence gene on pRST98 from multi-drug resistant *Salmonella typhi*; *Cell Mol Immunol.* 2(2):136-40.

7- Jeníková G, Pazlarová J, Demnerová K, (2010), Detection of Salmonella in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay; *Int Microbiol.* 3(4):225-9.

8- Kurita A, Gotoh H, Eguchi M, Okada N, Matsuura S, Matsui H, et al, (2003), Intracellular expression of the Salmonella plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells; *Microb Pathog.* 35(1):43-8.

9- Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA, (2001), Virulence plasmid-borne spvB and spvC genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice; *J Bacteriol.* 183(15):4652-8.

10- Namimatsu, T., Asai, T., Osumi, T., Imai, Y., & Sato, S, (2006), Prevalence of the virulence plasmid in *Salmonella typhimurium* isolates from pigs; *J Vet Med Sci.* 68(2), 187-188.

11- Nikbakht, G. R., & Tajbakhsh, H, (2004), Study of salmonella plasmid virulence genes (SPV) in salmonella enterica serovars isolated in Iran; *J Vet.* 137-140.

12- Rotger R, Casadesús J, (2010), The virulence plasmids of Salmonella; *Int Microbiol.* 2(3):177-84.

13- Saroj S, Shashidhar R, Bandekar J; (2008), Genetic Diversity of Food Isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in India; *Food Sci Technol Int.* 14(2):151-6.

14- Swamy SC, Barnhart HM, Lee MD, Dreesen DW, (1996), Virulence determinants invA and spvC in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources; *Appl Environ Microbiol.* 62(10):3768-71.

15- Tille P, (2013): Bailey & Scott's diagnostic microbiology; Elsevier Health Sciences.

16- Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, Winkler ME, (2011), Bacterial pathogenesis: a molecular approach; *American Society for Microbiology* (ASM).