



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8379
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 636.09:579.842.1/.2:577.21(477)

Detection of virulence genes and plasmid replicons in *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, which were allocated during 2014–2017 on the territory of Ukraine

N.M. Rublenko, A.M. Golovko, O.M. Derybin

State Scientific-Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 12.02.2018
Received in revised form
09.03.2018
Accepted 15.03.2018

Rublenko, N.M., Golovko, A.M., & Derybin, O.M. (2018). Detection of virulence genes and plasmid replicons in *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, which were allocated during 2014–2017 on the territory of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 20(83), 405–410. doi: 10.15421/nvlvet8378

State Scientific-Control Institute
of Biotechnology and Strains
of Microorganisms
Donetska str., 30,
Kyiv, 03151, Ukraine.
Tel.: +38-063-128-90-17
E-mail: rublenko@biocontrol.com.ua

The article presents the results of the identification of virulence and antibiotic resistance genes, as well as plasmid replicons in isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, which were isolated on the territory of Ukraine during 2014–2017. Also, plasmid replicons were identified for further determination of the type of plasmids contained in the genome of the isolates. The ability of *Salmonella* to obtain new properties is well known. The most common way is gaining of genetic information as a result of conjugation. In this case, genes encoding factors of pathogenicity, adhesion, virulence, or antibiotic resistance are localized on mobile genetic elements: replicons, transposons, or plasmids. The purpose of the work was to investigate isolates for the presence of genes of virulence, antibiotic resistance and replicons of plasmids in 50 isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, isolated during 2014–2017 in Ukraine. The research was carried out by polymerase chain reaction with primers for 10 target genes/loci (*invA*, *agfB*, *sefA*, *prt*, *sul1*, 5'-3'CS, *tetG*, *pN*, *pFIA*, *pFIIA*) followed by visualization in agarose gel electrophoresis. It was found that 100% of all strains (50/50) had *invA* and *agfB* genes. *SefA* and *prt* genes were identified in 44% (22/50) and 58% (29/50) isolates, respectively. The sulfonamide resistance gene *sul1* was detected in only four isolates, including 2 *S. enteritidis* isolates from Odesa and Kyiv oblasts, one isolate *S. Virchow*, and one unidentified isolate. The resistance gene for *tetG* tetracyclines was found only in 34% of isolates (17/50). The conservative sequence of integron *In104* was detected in 52% of isolates (26/50). Replicon plasmid *pN* was detected in 68% of isolates (34/50), *pFIIA* – in 44% (22/50). Replicon *pFIA* is found in 8% (4/50) isolates. Solving the problem of non-typhoid salmonellosis is possible by controlling the epidemiological and epizootiological situation. According to WHO, more than 90 million cases of non-typhoid infection are reported annually. The cause of disease were mostly *Enteritidis* and *Typhimurium*. The variety and widespread distribution of *salmonella* is due primarily to their ability to adapt to the organism that they infect. The results obtained are important for determining the pathogenicity of isolates circulating in a particular area, as well as expanding the possibilities for tracking the source of infection.

Key words: salmonella, virulence genes, plasmids, isolates, antimicrobial resistance genes.

Виявлення генів вірулентності та репліконів плазмід у *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, що були виділені впродовж 2014–2017 років на території України

Н.М. Рубленко, А.М. Головко, О.М. Дерябін

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ, Україна

У статті наведено результати ідентифікації генів вірулентності та антибіотикорезистентності, а також репліконів плазмід в ізолятах *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, що були виділені на території України впродовж 2014–2017 років. Також здійснено ідентифікацію репліконів плазмід для подальшого визначення типу плазмід, що містяться у геномі ізолятів. Відомо здатність сальмонел до отримання нових властивостей шляхом накопичення генетичної інформації в результаті кон'югації. В даному випадку гени, що кодують фактори патогенності, адгезії, вірулентності чи антибіотикорезистентності локалізуються на мобільних генетичних елементах: репліконах, транспозонах або на плазмідах. Метою роботи було дослідити ізоляти на наявність

генів вірулентності, антибіотикорезистентності та репліконів плазмід у 50 ізолятах *Salmonella enterica subsp. enterica*, виділених протягом 2014–2017 рр. в Україні. Дослідження проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з праймерами на 10 таргетних ділянок (*invA*, *agfB*, *sefA*, *prt*, *sull*, 5'-3'CS, *tetG*, *pN*, *pFIA*, *pFIIA*) з подальшою візуалізацією за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Згідно з аналізом ампліфікації таргетних ділянок виявлено, що 100% усіх досліджуваних штампів (50/50) мали гени *invA* та *agfB*. Гени *sefA* та *prt* було виявлено у 44% (22/50) та 58% (29/50) ізолятів відповідно. Ген резистентності до сульфаніламідів *sul1* було виявлено лише у чотирьох ізолятах, серед яких 2 ізоляти *S. Enteritidis*, виділені в Одеській та Київській областях, один ізолят *S. Virchow*, а також один не типовий ізолят. Ген резистентності до тетрациклінів *tetG* знайдено лише у 34% ізолятів (17/50). Консервативну послідовність інтегрон *In104* виявлено у 52% ізолятів (26/50). Реплікон плазмід *pN* було виявлено у 68% ізолятів (34/50), *pFIA* – у 44% (22/50). Реплікон *pFIIA* виявлено у 8% (4/50) ізолятів. Вирішення проблеми не тифоїдного сальмонельозу можливе шляхом контролю за епідеміологічного та епізоотологічного ситуацією. За даними ВООЗ щорічно реєструється більше 90 млн. випадків інфікування не тифоїдними сальмонелами, серед яких домінують серовари *Enteritidis* та *Typhimurium*. Різноманітність та широке розповсюдження сальмонели викликане насамперед їх здатністю адаптуватися до організму, який вони інфікують. Отримані результати є важливими для визначення патогенності ізолятів, що циркулюють на окремій території, а також розширюють можливості для відстеження джерела інфекції.

Ключові слова: сальмонела, гени вірулентності, плазмід, ізоляти, гени антибіотикорезистентності

Вступ

Бактерії роду *Salmonella* – збудник нетифоїдного сальмонельозу, який є одним із найбільш розповсюджених зоонозів. Рід сальмонела поділяється на 2 види: *Salmonella bongori* та *Salmonella enterica*. Останній має 6 підвидів, один з яких – *S. enterica subsp. enterica* містить більше 2700 сероварів (Grimont and Weill, 2007). Найбільш розповсюдженими у природі є серовари *S. Typhi*, *S. Paratyphi* (A, B, C) – збудники черевного тифу і паратифу, які виділяють лише від людей (Shyrobokov, 2011). Серед збудників сальмонельозу виділяють значну кількість різноманітних сероварів підвиду *S. enterica subsp. enterica*, так звані нетифоїдні сальмонели.

Джерелом сальмонельозної інфекції можуть бути молоко, м'ясо, яйця та харчові продукти, які піддалися недостатній термічній обробці (European Food Safety Authority..., 2017; Chousalkar et al., 2018). Також зрідка фіксуються спалахи сальмонельозу, викликані забрудненням фруктів, овочів та спецій (Zweifel and Roger, 2012; European Food Safety Authority..., 2017; Mba-Jonas et al., 2018).

Однією з причин того, що сальмонела впродовж багатьох років залишається небезпечним патогеном є велика антигенна різноманітність бактерії та їхня висока генетична мінливість. Сальмонели здатні здійснювати кон'югацію, результатом якої є генетичні елементи, що надають бактерії нових властивостей (Aviv et al., 2016). Часто це гени факторів патогенності у складі помірних фагів (Switt et al., 2015; Rublenko et al., 2016). Також можливе приєднання мобільних генетичних елементів: репліконів, транспозонів та плазмід. Останні здатні накопичувати гени антибіотикорезистентності (Chen et al., 2018).

Ґрунтовне дослідження цього аспекту є важливим для вирішення проблеми зростаючої резистентності бактерій до антибактеріальних засобів. Щодо комбінації генів вірулентності та антибіотикорезистентності у популяціях сальмонели, які циркулюють на території України є досить мало даних, тому доцільним є дослідити це питання.

Мета роботи: дослідити ізоляти на наявність генів вірулентності, антибіотикорезистентності та репліконів плазмід у ізолятах *Salmonella enterica subsp. enterica*, виділених протягом 2014–2017 рр. в Україні.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктом дослідження були 50 ізолятів виду *Salmonella enterica*, підвиду *enterica*, виділених на території України впродовж 2014–2017 років. Розподіл досліджених культур за сероваріантами представлено у таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл досліджених ізолятів за сероваріантами

Серовар	Кількість ізолятів, використаних у дослідженні
<i>Enteritidis</i>	22/50
<i>Typhimurium</i>	10/50
<i>Infantis</i>	4/50
<i>Virchow</i>	3/50
<i>Gallinarum</i>	7/50
<i>Heidelberg</i>	2/50
Не типовані	1/50

Ізоляти висівали на бульйон Luria Bertani Miller (AppliChem, Німеччина), культивували протягом 24 годин за температури 37 °C та переносили на чашки з твердим середовищем Luria Bertani Lennox (Carl Roth, Німеччина). Через 24 години відбирали поодинокі колонії та виділяли ДНК за допомогою набору «ДНК-сорб» (Ампліпрайм, Російська Федерація).

Ідентифікацію таргетних генів і ділянок (*invA*, *agfB*, *sefA*, *prt*, *sull*, 5'-3'CS, *tetG*) та репліконів плазмід (*pN*, *pFIA*, *pFIIA*) проводили у полімеразній ланцюговій реакції з використанням відповідних праймерів (таблиця 2).

Результати ампліфікації візуалізували за допомогою методу електрофорезу в агарозному гелі із концентрацією 1,5% (1,2% – для репліконів плазмід) та зберігали електрофореграми для подальшого аналізу із використання системи Gel Doc RX (Biorad, США).

Таблиця 2

Олігонуклеотидні праймери, використані у дослідженні

Ген	Послідовність праймерів	Розмір фрагменту	Автори
invA	5'-TCATCGCACCCGTCAAAGGAACC-3' 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA-3'	285	(Borges et al., 2013)
agfB	5'-TGATGTTGACAATACTGGGTGCG-3' 5'-CGATATACTGGCATCGTTGGCAT-3'	293	Дане дослідження
sefA	5'-GCCGTACACGAGCTTATAGA-3' 5'-ACCTACAGGGGCACAATAAC-3'	310	(Amini et al., 2010)
Prt	5'-ATGGGAGCGTTTGGGTTC-3' 5'-CGCCTCTCCACTACCAACTTC-3'	624	(Hong et al., 2008)
pFIA	5'-CCATGCTGGTCTAGAGAAGGTG-3' 5'-GTATATCCTTACTGGCTCCGCAG-3'	462	(Mezal et al., 2014)
pN	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3' 5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'	559	(Ahmed et al., 2006)
pFIIA	5'-CTGTCGTAAGCTGATGGC-3' 5'-CTCTGCCACAAACTTCAGC-3'	270	(Mezal et al., 2014)
tetG	5'-CAGCTTTCGGATTCTTACGG-3' 5'-GATTGGTGAGGCTCGTTAGC-3'	844	(Ahmed et al., 2006)
SulI	5'-GTGACGGTGTTCGGCATTCT-3' 5'-TGAGTGCATAACCACCAGCC-3'	378	(Ahmed et al., 2006)
5'-3'CS	5'-GGCATCCAAGCAGCAAGC-3' 5'-AAGCAGACTTGACCTGAT-3'	1009	(Ahmed et al., 2006)

Результати та їх обговорення

Згідно з аналізом ампліфікації таргентних ділянок виявлено, що 100% усіх досліджуваних штамів (50/50) мали гени *invA* та *agfB*. Гени *sefA* та *prt* було виявлено у 44% (22/50) та 58% (29/50) ізолятів відповідно.

Ген резистентності до сульфаніламідів *sulI* було виявлено лише у чотирьох ізолятах, серед яких 2 ізоляти *S. Enteritidis*, виділені в Одеській та Київській

областях, один ізолят *S. Virchow*, а також один не типовий ізолят.

Ген резистентності до тетрациклінів *tetG* знайдено лише у 34% ізолятів (17/50).

Консервативну послідовність 5'-3'CS інтегону *In104* виявлено у 52% ізолятів (26/50).

Реплікон плазмід *pN* було виявлено у 68% ізолятів (34/50), *pFIIA* – у 44% (22/50). Реплікон *pFIA* виявлено у 8% (4/50) ізолятів.

Загальні результати представлено у таблиці 3.

Таблиця 3

Загальні результати виявлення генів вірулентності, антибіотикорезистентності, консервативної ділянки інтегону та репліконів плазмід

Досліджені ізоляти	<i>invA</i>	<i>agfB</i>	<i>sefA</i>	<i>prt</i>	<i>pFIA</i>	<i>pN</i>	<i>pFIIA</i>	<i>tetG</i>	<i>sulI</i>	5'-3'CS
<i>S. Enteritidis VM2</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>S. Enteritidis PN</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>S. Enteritidis 1</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. Enteritidis 2</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis 3</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>S. Enteritidis 4L</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. Enteritidis 5</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>S. Enteritidis 6L</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>S. Enteritidis 7</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>S. Enteritidis 8</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>S. Enteritidis 9</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis 10</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>S. Enteritidis 11</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>S. Enteritidis S1</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. Enteritidis GT</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis 71</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. Enteritidis DNI</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>S. Enteritidis 981</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis 10M</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>S. Enteritidis 11M</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. Enteritidis S1</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>S. Enteritidis GT</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>S. Typhimurium 1</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>S. Typhimurium 2</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>S. Typhimurium 3</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-

<i>S. Typhimurium 4L</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. Typhimurium 5</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. Typhimurium 6L</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. Typhimurium 7</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium 8</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium 9</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium PN061</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium 10</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. Infantis PN 07</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. Infantis 12</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. Infantis M8</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. Infantis 1</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>S. Virchow L116</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>S. Virchow 1</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>S. Virchow P23</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>S. Gallinarum B</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. Gallinarum 1</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. Gallinarum 2</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. Gallinarum 3</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. Gallinarum 27</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. Gallinarum 11</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. Gallinarum 8</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. Heidelberg SM2</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>S. Heidelberg</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>S. enterica spp.</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+

Вирішення проблеми нетифоїдного сальмонельозу лежить у площині контролю за епідеміологічного та епізоотологічною ситуацією. За даними ВООЗ щорічно реєструється більше 90 млн. випадків інфікування не тифоїдними сальмонелами (Majowicz et al., 2010). Домінування сероварів має регіональні особливості. Так, наприклад, із 90-х років 20 століття в Європі домінує серовар *Enteritidis* (Peters et al., 2007). Другим за розповсюдженістю є *S. Typhimurium*. Різноманітність та широке розповсюдження сальмонели викликане насамперед їх здатністю адаптуватися до організму, який вони інфікують. Серовари *Dublin*, *Choleraesuis* та *Abortusovis*, які викликають системну інфекцію у ВРХ, овець та свиней і відповідно є адаптованими до даних видів тварин, можуть також викликати сальмонельоз у людини (Steinbach et al., 2000). Проте у переважній більшості випадків збудником нетифоїдного сальмонельозу є убіквітарні серовари: *Enteritidis*, *Newport*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Heidelberg*, *Anatum* (Steinbach et al., 2000). Відомо, що у 8% випадків така інфекція, за несвоєчасного лікування, супроводжується бактеріємією (Ahmetova et al., 2012).

Проте у всіх сероварів інфекційний процес починається з адгезії до апікальних мембран ентероцитів та М-клітин у тонкому кишечнику (Jepson and Clark, 2001). Необхідним елементом для здійснення адгезії є фімбрії. Адгезивний апарат організовано у вигляді кластерів по 4–15 генів, в складі кожного є гени регуляторних білків та структурні (Dufresne and France, 2017). Деякі типи фімбрій є консервативними для окремих сероварів. Так, для серовару *Enteritidis* специфічними є тонкі агрегативні фімбрії типу SEF14, які беруть участь у формуванні біоплівки (Ogunniyi et al., 1997). Ген *sefA*, що кодує фімбріальний антиген, широко використовується в молекулярній діагностиці для диференціації сальмонел, що належать до серовару *Salmonella Enteritidis* (Woodward et al., 2000). В той

час, як ген *agfB* було виявлено у всіх досліджених ізолятів. Фімбріальний генний кластер *agfABC* є консервативним для всієї родини Enterobacteriaceae та включає основні три гени: *agfA* – велика субодиниця, *agfB* – білок-нуклеатор та *agfC* – оксидоредуктаза (Pan and Liu, 2002). Ще одним консервативним геном, але вже для роду *Salmonella*, є ген *invA*. Останній разом із 16S РНК використовується для ідентифікації сальмонел (Bäumler et al., 1997).

Значне розповсюдження сальмонел пов'язане із високою антигенною різноманітністю та значною генетичною мінливістю. Це досягається, в першу чергу, завдяки здатності до набуття генів шляхом горизонтального переносу (Nielsen et al., 2014).

Значну роль в цьому процесі відіграють плазмиди – позакромосомні молекули ДНК. Вони можуть нести гени вірулентності та резистентності до антибактеріальних препаратів.

Для класифікації плазмід розроблено схему, що базується на відмінностях механізму реплікації. Виявлено, що плазмиди з одним типом реплікації є не сумісними, тобто не здатними до співіснування в межах одного клону (Carattoli et al., 2005). На основі цього побудовано поділ плазмід грамнегативних бактерій на групи несумісності. Така система була розроблена в першу чергу для відслідковування шляхів розповсюдження плазмід, що несуть гени антибіотикорезистентності, а також появу нових позакромосомних елементів.

Класичним методом визначення типу плазмід є виявлення репліконів методом гібридизації із міченими молекулами ДНК. Проте цей метод є досить складним та довготривалим. Із впровадженням молекулярних методів у діагностику було розроблено метод ПЛР-типуювання плазмід шляхом ідентифікації репліконів різних типів плазмід (Couturier, 1988). Це значно спрощує виявлення типів плазмід та в подальшому

може бути допоміжним методом для виявлення плазмід, що несуть гени антибіотикорезистентності.

У плазмідах сальмонел на сьогодні виявлено генетичні детермінанти резистентності до сульфаніламідів, тетрациклінів, та β -лактамів. Однак, за літературними даними, гени резистентності до тетрациклінів можуть варіюватися, і для сальмонел відомі додаткові гени резистентності до даного класу препаратів.

Відомо також, що гени антибіотикорезистентності здатні накопичуватися на консервативних ділянках інтегру (Carattoli et al., 2005). Останній може мати як хромосомну, так і плазмідну локалізацію.

Вищенаведені дані є важливими для визначення патогенності ізолятів, що циркулюють на окремій території, а також розширюють можливості для відстеження джерела інфекції. Також необхідно зазначити, що в умовах значного зростання антибіотикорезистентності серед збудників бактеріальних інфекцій існує необхідність для контролю не лише використання антибактеріальних препаратів, а й періодичне відстеження змін у даному питанні. Останнім часом опубліковані результати досліджень демонструють зменшення поширення детермінанти резистентності до β -лактамів *bla*CMY2 в умовах обмеженого використання цефтіофуру (Kataoka et al., 2017).

Висновки

1. Виявлено 100% наявність гену, що кодує агрегативні фімбрії – *agfB*, та гену інвазивного білку *invA* у всіх досліджених ізолятах *Salmonella enterica*.

2. Ген *sefA* виявлено у штаммах та ізолятах, що відносяться до серовару *S. Enteritidis*.

3. Встановлено, що 68% досліджуваних ізолятів містять у своєму геному реплікон плазмиди *pN*, 44% – *pFIIA*, 8% – реплікон *pFIA*

4. Виявлено гени резистентності до бета-лактамів, сульфаніламідів, тетрациклінів, та консервативну послідовність інтегру.

Перспективи подальших досліджень. Варто провести розширену ідентифікацію генів антибіотикорезистентності та типування плазмідного профілю ізолятів.

References

Grimont, P., & Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf.

Shyrobokov, V.P. (2011). Medychna mikrobiolohiia, virusolohiia, imunolohiia. Pidruchnyk. Vinnytsia: Nova knyha (in Ukrainian).

European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control (2017). Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections linked to Polish eggs. EFSA Supporting Publications. 14(12). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1353>.

European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control (2017). Multi-country outbreak of new *Salmonella enterica* 11:z41:e,n,z15 infections associated with sesame

seeds. EFSA Supporting Publications. 14(6). doi: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1256.

Chousalkar, K., Gast, R., Martelli, F., & Pande, V. (2018). Review of egg-related salmonellosis and reduction strategies in United States, Australia, United Kingdom and New Zealand. *Critical reviews in microbiology*. 44(3), 290–303. doi: 10.1080/1040841X.2017.1368998.

Mba-Jonas, A., Culpepper, W., Hill, T. et al. (2018). A Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Agona Infections Associated With Consumption of Fresh, Whole Papayas Imported From Mexico – United States, 2011. *Clinical Infectious Diseases*. 66(11), 1756–1761. doi: 10.1093/cid/cix1094.

Zweifel, C., & Roger, S. (2012). Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases. *Food Research International*. 45(2), 765–769. doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.024.

Aviv, G., Rahav, G., & Gal-Mor, O. (2016). Horizontal transfer of the *Salmonella enterica* serovar *Infantis* resistance and virulence plasmid *pESI* to the gut microbiota of warm-blooded hosts. *MBio*. 7(5), e01395-16. doi: 10.1128/mBio.01395-16.

Rublenko, N.M., Derjabin, O.M., Golovko, A.M., Pynchuk, N.G. (2016). Viyavlennja ta analiz poshirennja geniv pomirnih bakteriofagiv u shtamah *Salmonella enterica*. *Naukovij visnik veterinarnoї medicini*. 1, 95–102. http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvvm_2016_1_18.

Switt, A.I., Sulakvelidze, A., Wiedmann, M., Kropins, A.M., Wishart, D.S., Poppe, C., & Liang, Y. (2015). *Salmonella* phages and prophages: genomics, taxonomy, and applied aspects. *Methods Mol. Biol.* 1225, 237–287. doi: 10.1007/978-1-4939-1625-2_15.

Chen, K., Dong, N., & Zhao, S. (2018). Identification and characterization of conjugative plasmids that encode ciprofloxacin resistance in *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62(6), AAC.00575-18. doi: 10.1128/AAC.00575-18.

Borges, K.A., Furian, T.Q., Borsoi, A., Moraes, H.L., Salle, C.T., & Nascimento, V.P. (2013). Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 33(12), 1416–1422. doi: 10.1590/S0100-736X2013001200004.

Amini, K., Salehi, T.Z., & Nikbakht, G. (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. *African Journal of Microbiology Research*. 4(21), 2202–2210. http://www.academicjournals.org/article/article1380368955_Amini%20et%20al.pdf.

Hong, Y., Liu, T., Lee, M.D., Hofacre, C.L., Maier, M., White, D.G., Ayers, S., Wang, L., Berghaus, R., & Maurer, J.J. (2008). Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC microbiology*. 8, 178. doi: 10.1186/1471-2180-8-178.

Mezal, E.H., Sabol, A., Khan, M.A., Ali, N., Stefanova, R., & Khan, A.A. (2014). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during

2010. *Food microbiology*. 38, 67–74. doi: 10.1016/j.fm.2013.08.003.
- Ahmed, M., Hussein, A., & Shimamoto, T. (2006). *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 59(2), 184–190. doi: 10.1093/jac/dkl471.
- Majowicz, S., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kir, M., & O'Brien, S.J. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 50(6), 882–889. doi: 10.1086/650733.
- Peters, T.M., Berghold, C., Brown, D., Coia, J., Dionisi, A.M., Echeita, A. et al. (2007). Relationship of pulsed-field profiles with key phage types of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Europe: results of an international multi-centre study. *Epidemiology & Infection*. 135(8), 1274–1281. doi: 10.1017/S0950268807008102.
- Steinbach, G., Lauterbach, L., Methner, U. (2000). Studies of the phenomenon of host adaptation in *Salmonella*. *Zoonoses and Public Health*. 47(9), 707–719. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244872>.
- Ahmetova, D.G., Berdygulova, Zh.A., Evtyhova, E.B., & Shustov, A.V. (2012). Sal'monelly: molekularnyye mehanizmy prispoboblennosti i faktory virulentnosti. *Biotekhnologija. Teorija i praktika*. 1, 3–24 (in Russian).
- Jepson, M.A., & Clark, M.A. (2001). The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes and infection*. 3(14–15), 1183–1190. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755406>.
- Dufresne, K., & France, D. (2017). *Salmonella* Fimbriae: What is the Clue to Their Hairdo? *Current Topics in Salmonella and Salmonellosis*. InTech. 4, 59–79. doi: 10.5772/67189.
- Ogunniyi, A.D., Kotlarski, I., & Manning, P.A. (1997). Role of SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infection and immunity*. 65(2), 708–717. <http://iai.asm.org/content/65/2/708.short>.
- Woodward, M., Sojka, M., Sprigings, K., & Humphrey, T.J. (2000). The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *Journal of medical microbiology*. 49(5), 481–487. doi: 10.1099/0022-1317-49-5-481.
- Pan, T.M., & Liu, Y.J. (2002). Identification of *Salmonella enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 35(3), 147–151. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12380786>.
- Bäumler, A.J., Gilde, A.J., & Tsolis, R.M. (1997). Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *Journal of bacteriology*. 179(2), 317–322. <http://jb.asm.org/content/179/2/317.full.pdf>.
- Nielsen, K., Bøhn, T., & Townsend, J. (2014). Detecting rare gene transfer events in bacterial populations. *Frontiers in microbiology*. 4, 415. doi: 10.3389/fmicb.2013.00415.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., & Falbo, V. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*. 63(3), 219–228. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- Couturier, M. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews*. 52(3), 375–395. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3054468>.
- Kataoka, Y., Murakami, K., Torii, Y., & Kimura, H. (2017). Reduction in the prevalence of AmpC β -lactamase CMY-2 in *Salmonella* from chicken meat following cessation of the use of ceftiofur in Japan. *Journal of global antimicrobial resistance*. 10, 10–11. doi: 10.1016/j.jgar.2017.05.003.