Archive of SID

مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1389، دوره دوم، شماره ششم، صفحه 38-33

تعیین گروه های سرمی سالمونلاهای جدا شده از طیور و شناسایی ژن hilA به روش PCR

جعفر اکبرمهر[1]

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد سراب

نویسنده مسؤول: دکتر جعفر اکبر مهر، دانشکاه آزاد اسلامی واحد سراب، گروه میکرو بیولوژی آذربایجان شرقی ، شهرستان سراب
ja_mehr@yahoo.com

دریافت: 89/4/12 پذیرش: 89/7/15

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلوز یکی از بیماری های مهم عفونی مشترک بین انسان وحیوانات است. مواد غذایی تهیه شده گوشت طیور آلوده ویا فراورده های جنبی آنها از مهمترین منابع آلودگی سالمونلوز در انسان به حساب می آیند. ژن **hilA (locus A) Hyperinvasive** داری نقش بسیار مهمی در بیماری زایی سالمونلا می باشد. این ژن با رمز نمودن پروتئین های تنظیمی نسخه برداری باعث بیان ژن های مهاجم وتسهیل نفوذ سالمونلا به داخل سلول های پوششی روده می شود. هدف ازانجام این تحقیق جداسازی و تعیین گروه های سرمی سالمونلا از طیور و شناسایی ژن **hilA** در آنها با استفاده از روش **PCR** بود.

روش بررسی: در این مطالعه مجموعا **520** نمونه(شامل **400** نمونه مرغ ،**30** نمونه شترمرغ و **90** نمونه کبوتر) از روده ، کبد و طحال طیور جمع آوری و به منظور جداسازی سالمونلا تحت آزمایشات باکتریولوژیک قرار گرفتند. آزمایش تعیین گروه سرمی با استفاده از آنتی سرمهای اختصاصی روی سالمونلاهای جدا شده انجام شد. همچنین آزمایش **PCR** با استفاده از یک زوج پرایمر اختصاصی ژن **hilA** جهت شناسایی وارزیابی این ژن در سالمونلا های جدا شده انجام گرفت.

یافته ها: نتایج آزمایش های باکتریولوژیک از مجموع **520** نمونه مورد آزمایش در این تحقیق تعداد **45** نمونه **(8/65%)** از نظر آلودگی به سالمونلا ها دارای نتایج مثبت بودند. میزان شیوع سالمونلا در مرغ، شترمرغ و کبوتر به ترتیب **7/25%** ، **6/66%** و **15/55%** تعیین گردید. همچنین پس از تعیین گروه های سرمی، سالمونلاهای جدا شده در **4** گروه سرمی **D1** ،**B**، **C1** و**C2** طبقه بندی شدند که گروه سرمی **D1** داری بیشترین فراوانی**(53/3%)** بوده است. بر اساس نتایج **PCR** ژن **hilA**، این ژن با ایجاد باند **854 bp** در تمامی سالمونلاهای جدا شده شناسایی گردید.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد اولا سالمونلوز در کبوتر دارای شیوع نسبی بیشتری در مقایسه با سایر طیور مورد آزمایش در این تحقیق بوده و گروه سرمی **D1** سالمونلا از گروه های سرمی غالب در طیور می باشد. ثانیا ژن **hilA** در گروه های سرمی مختلف سالمونلاها و در گونه های مختلف پرندگان دراندازه یکسان قابل شناسایی است.

واژه های کلیدی: واکنش زنجیره ای پلی مراز،طیور، سالمونلا،**hilA**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سالمونلوز (Salmonellosis) یکی از مهمترین بیماری های عفونی مشترک بین انسان و دام است که توسط گونه های مختلف سالمونلا ها ایجاد می شود. این باکتری ها متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) بوده که تاکنون بالغ بر 2700 گونه مختلف از این میکروارگانیسم ها در نقاط مختلف دنیا شناسایی شده است(1). سالمونلا ها دارای گسترش جغرافیایی وسیعی بوده و قادر به ایجاد عفونت در طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله انسان می باشند. سبزیجات، فرآورده های لبنی، محصولات دریایی، مواد گوشتی به ویژه گوشت ماکیان، تخم مرغ و فرآورده های جانبی آن از مهمترین منابع آلودگی سالمونلا در انسان محسوب می شود (2). پرندگان نیز به عفونت های سالمونلایی حساس بوده و توسط گونه های مختلفی از این باکتری ها آلوده می شوند. سالمونلوز پرندگان علاوه بر آن که باعث تلفات قابل توجه در مرغداریها خصوصاً جوجه های زیر دو هفتگی می شود و از این طریق خسارات چشمگیری را به اقتصاد کشور وارد می نماید، بعنوان یک بیماری منتقله از طریق مواد غذایی به انسان محسوب شده و از نظر بهداشت عمومی جامعه نیز حائز اهمیت فراوانی است(2).

سالمونلا ها مطابق جدول کافمن وایت و بر اساس دارا بودن پادگن O به گروه های سرمی مختلفی طبقه بندی می شوند. در این طبقه بندی هر گروه از این باکتری ها حداقل دارای یک پادگن O اختصاصی است که پادگنO اصلی نیز نامیده می شود. گروه های سرمی سالمونلا ها با حروف بزرگ لاتین از A-Z نامگذاری می شوند. برخی از گروه ها نیز بر اساس واجد بودن پادگن های فرعی دارای تحت گروه هایی هستند که با اعداد مشخص می گردند. برای مثال گروه های سرمی C, D به ترتیب به تحت گروه های D1,D2 و C1,C2 تقسیم می شوند. گروه های سرمی A-E در برگیرنده تمامی سروتیپ های بیماری زا و مهم سالمونلا ها در انسان و حیوانات است(3). *سالمونلا گالیناروم* (*S.gallinarum*) و *سالمونلا پلوروم* (*S.pullorum*) که از گونه های متحرک و اختصاصی طیور هستند در گروه سرمی D1 طبقه بندی می شوند. همچنین *سالمونلا انتریتیدیس* (*S.enteritidis*) و *سالمونلا تیفی موریوم*(*S.typhimurium*) که از شایع ترین سرو وارهای طیور محسوب می شوند و از نظر بهداشت عمومی و انتقال به انسان از اهمیت ویژه ای بر خوردار هستند به ترتیب در گرو های سرمی B و D1 قرار دارند(4، 5).

سالمونلا ها جهت بقای خود در یاخته های میزبان و ایجاد عفونت از مکانیسم های ژنتیکی پیچیده ای استفاده می نمایند. مراحل مختلف عبور از سد اسید معده ، تهاجم به بافت پوششی مخاط روده و ورود به داخل سلول های فاگوستیک با بهره گیری از این مکانیسم ها امکان پذیر می شود. در سالمونلا ها ژن های حدتی وجود دارد که فعال شدن سایر ژن ها که در نقاط مختلف کروموزوم را تنظیم می نماید بطوریکه موتاسیون در این ژن های تنظیم کننده باعث کاهش میزان حدت سالمونلا می شود. ژن ***hil A*** یکی از ژن های مهاجم سالمونلا ها است که با رمز نمودن پروتئین های تنظیم کننده نسخه برداری باعث بیان ژن های مهاجم در سالمونلا می شود. با بیان شدن و فعالیت ژن های مهاجم، زمینه نفوذ باکتری و استقرار آن در سلول های پوششی روده مهیا می گردد(9 -6) .

اگر چه مطالعات و تحقیقات زیادی همه ساله در مناطق مختلف جهان در خصوص سالمونلا ها انجام می گیرد با این حال به علت تنوع گونه ای و گستردگی طیف میزبانی سالمونلا ها ضرورت تحقیقات گسترده در خصوص شناسایی و مطالعه این باکتری ها بیشتر احساس می گردد. طی دو دهه اخیر استفاده از روش های مولکولی، خصوصا واکنش زنجیره ای پلی مراز تحول شگرفی را در خصوص شناسایی دقیق اجرام بیماری زا فراهم نموده است، بطوریکه امروزه از بررسی تنوع ژنتیکی باکتری ها که با استفاده از روش های فوق انجام می شود، بعنوان ابزاری جهت تعیین هویت باکتری ها استفاده می گردد. بر اساس مطالب گفته شده و با توجه به اهمیتی که سالمونلوز پرندگان در اقتصاد و بهداشت عمومی جامعه دارد در این تحقیق علاوه بر جداسازی و تعیین گروه های سرمی سالمونلا های طیور، ژن ***hilA*** که یکی از ژن های مهاجم محسوب می شود، در سالمونلا های جدا شده از سه پرنده مختلف (مرغ،شتر مرغ، کبوتر) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

جداسازی و کشت میکربی: در این بررسی که از تاریخ آبان ماه سال 1388 لغایت فروردین ماه سال 1389 در استان

www.SID.ir

Archive of SID

آذربایجان شرقی انجام گرفت، جمعا 520 نمونه (شامل 400 نمونه مرغ ،30 نمونه شتر مرغ و 90 نمونه کبوتر) مورد آزمایش میکروبی قرار گرفتند. نمونه ها از روده ،کبد و طحال طیور جمع آوری و جهت غنی سازی ابتدا در محیط غنی کننده سلنیت F(مرک) کشت داده شدند. سپس نمونه ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از انقضای این مدت نمونه ها از محیط مایع غنی کننده به محیط های جامد انتخابی رشد سالمونلاها انتقال یافتند. برای این منظور از محیط کشت جامد مک کانکی و گزیلوز - لیزین - دی اکسی کلات (XLD) استفاده گردید. سالمونلا ها در محیط XLD ایجاد کلنی هایی با مرکز سیاه رنگ می نمایند. هچنین این باکتری ها در محیط آگار مک کانکی ایجاد کلنی های بی رنگ تا خاکستری نموده که از پرگنه های لاکتوز مثبت و صورتی رنگ کلی فرم ها قابل تفکیک می باشند. با مشاهده پرگنه های رشد یافته با ویژگی های فوق آزمایش های بیوشیمیایی اوره آز ، اندول ، MR ، VP و سیترات در مورد آنها انجام گرفت. با مقایسه نتایج بدست آمده با جدول بیوشیمیایی آزمایشهای IMViC که سالمونلا ها به ترتیب دارای نتایج اندول منفی، MR مثبت، VP منفی و سیترات مثبت هستند تشخیص قطعی این باکتری ها صورت گرفت(10).

بعد از شناسایی بیوشیمیاخئیی سالمونلا جهت تعیین گروه سرمی آنها آزمایش سرمی آگلوتیناسیون روی لام با استفاده از آنتی سرم های اختصاصی انجام شد. برای این کار از کیت سرمی اختصاصی سالمونلا (دیفکو) استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون غلیظی با استفاده از پرگنه مشکوک و سرم فیزیولوژی روی لام شیشه ای تهیه، سپس یک قطره از سرم پلی والان O به مجموعه اضافه گردید. ایجاد آگلوتیناسیون در مدت زمان کمتر از 2 دقیقه بعنوان واکنش مثبت تلقی شد(3). سپس آزمایش با آنتی سرم های گروه های A ، B ، C ، D سالمونلا تکرار وگروه های سرمی سالمونلا های مورد آزمایش تعیین گردید.

استخراج DNA وآزمایش PCR : جهت استخراج DNA از کشت 24 ساعته باکتری در محیط لوریا برتانی استفاده گردید. برای این کار از یک کلنی از باکتری رشد یافته در محیط فوق همراه با 50 میکرولیتر آب مقطر استریل در داخل لوله های مخصوص PCR شیرابه تهیه گردید و پس از تکان دادن و مخلوط نمودن به مدت 10 دقیقه در حرارت 100 درجه سانتی گراد دستگاه بن ماری قرارگرفت. سپس محتوی لوله به مدت 5 دقیقه با سرعت 14000 rpm سانتریفوژ و از مایع رویی جهت انجام آزمایش PCR استفاده شد(۵،۱۱). در این تحقیق جهت انجام آزمایش PCR مطابق روش (Cardona - Castro 2002) از یک زوج پرایمر اختصاصی ژن *hilA* با توالی زیر استفاده شد(12). همچنین از ژن *hilA* *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC 14025 بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

Forward 5' - CGG AAG CTT ATT TGC GCC ATG CTG AGG TAG - 3'

Reveres 5'- GCA TGG ATC CCC GCC GGC GAG ATT GTG - 3'

PCR در یک حجم 50 میکرو لیتری شامل پرایمر (از هر یک) 20 µm ، آنزیم *Taq* DNA پلیمراز 0.5U ، dNTPs (0.20 Mm) ، TrisHCl (100 mM) ، KCl (500mM) ، $MgCl_2$ (25 mM) ، DNA ژنومیک سالمونلا های 3 µl. مراحل مختلف PCR در دستگاه ترموسایکلر بدین شرح بود: دناتوراسیون اولیه در 94 درجه سانتی گراد بمدت 3 دقیقه طی 30 چرخه شامل 94 درجه سانتی گراد بمدت 1 دقیقه ،65 درجه سانتی گراد بمدت 1 دقیقه ،72 درجه سانتی گراد بمدت 1 دقیقه ،72 درجه سانتی گراد بمدت 10 دقیقه. پس از انجام PCR بمنظور تفکیک قطعات تکثیر شده و بررسی محصولات PCR در ژل آگاروز 1/2 % الکتروفورز گردید. به این منظور نمونه ها با بافر بارگذاری به نسبت 6 به 1 مخلوط و داخل چاهک های موجود در ژل آگاروز انتقال داده شد. سپس با استفاده از جریان الکتریسیته 70 ولت عمل الکتروفورز انجام شد. پس از گذشت 1 ساعت از برقراری جریان برق عمل الکتروفورز پایان و ژل آگاروز در داخل آب اتیدیوم بروماید به مدت ده دقیقه رنگ آمیزی شد. در پایان کار قطعات رنگ آمیزی شده توسط دستگاه آشکار ساز و با استفاده از نور ماورای بنفش عکسبرداری شد. اندازه قطعات با استفاده از مارکر (Fermentase)250 bp اندازه گیری و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

از مجموع 520 نمونه جمع آوری شده از طیور مورد آزمایش در این تحقیق تعداد 45 نمونه(8/65%) از نظر آلودگی به

www.SID.ir

Archive of SID

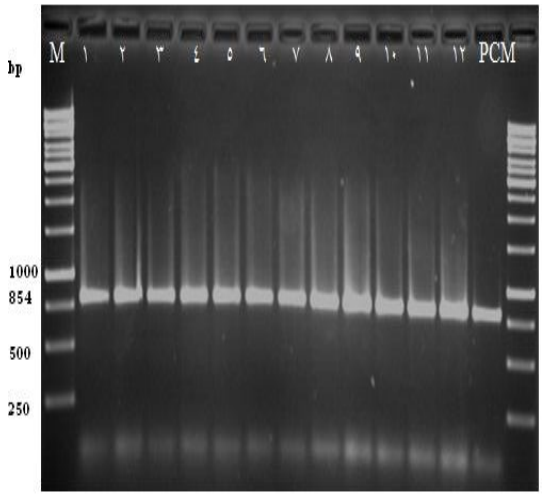
سالمونلا ها دارای نتیجه مثبت بودند. میزان شیوع سالمونلا در مرغ، شتر مرغ وکبوتر به ترتیب 7/25% ، 6/66% و 15/55% تعیین گردید. همچنین پس از تعیین گروه های سرمی، سالمونلا های جدا شده در 4 گروه سرمی C1،B، D1 وC2 طبقه بندی شدند که گروه سرمی D_1 داری بیشترین فراوانی(53/3%) بوده است. فراوانی گروه های سرمی B ، C1 و C2 در کل نمونه های مورد آزمایش به ترتیب 26/66% ، 11/11% و 8/88% تعیین گردید.

جدول زیر نتایج آزمایش های میکروبی و سرمی نمونه ها را به تفکیک نوع طیور مورد آزمایش نشان می دهد. طیور در این تحقیق ، تولید باند 854 bp نمود و حضور ژن *hilA* در تمامی نمونه های مورد آزمایش به اثبات رسید.

جدول 1. نتایج آزمایش های میکروبی و سرمی سالمونلاهای جدا شده از طیور

نوع طیور	تعداد نمونه مورد آزمایش	موارد مثبت		فراوانی گروه های سرمی							
				D_1		B		C_1		C_2	
		%	تعداد	%	تعداد	%	تعداد	%	تعداد	%	تعداد
مرغ	400	7/25	29	55/17	16	24/13	7	10/34	3	10/34	3
شترمرغ	30	6/66	2	100	2	0	0	0	0	0	0
کبوتر	90	15/55	14	42/85	6	35/71	5	14/28	2	7/14	1
جمع	520	8/65	45	53/33	24	26/66	12	11/11	5	8/88	4

بحث



شکل 1. نتایج PCR ژن hilA در سالمونلا های جداشده از طیور ، M: مارکر؛PC :کنترل مثبت(ژن hilA سالمونلا تیفی موریوم ATCC 14025)؛ باندهای ۱،۲،۳،۴ مربوط به گروه های مختلف سرمی سالمونلا های جدا شده از مرغ؛ باند های ۵،۶،۷،۸،۹،۱۰ مربوط به گروه های مختلف سرمی سالمونلا های جدا شده از کبوتر؛ باندهای۱۱،۱۲ مربوط به گروه سرمی D1 از سالمونلا های جدا شده از شتر مرغ

مطابق نتایج مندرج در جدول 1 از مجموع 520 نمونه مورد آزمایش در این تحقیق تعداد 45 نمونه (8/65%) آلودگی به سالمونلا ها را نشان دادند. همچنین بالا بودن شیوع نسبی سالمونلوز در کبوتر (15/55%) و غالب بودن گرو ه سرمی D1 در سالمونلا های جدا شده از هر سه میزبان مورد آزمایش (مرغ، شتر مرغ، کبوتر) از دیگر نتایج اپیدمیولوژیکی این تحقیق را شامل می گردد. اگرچه گزارش قابل استنادی در خصوص میزان شیوع سالمونلوز در کبوتر و شتر مرغ در ایران جهت مقایسه با نتایج حاصل ازتحقیق حاضر وجود ندارد ولی مطالعات محققین در مناطق مختلف ایران شیوع سالمونلوز در مرغداری ها و آلودگی گوشت مرغ به سالمونلا ها را به اثبات رسانده است. بر اساس تحقیقی که توسط زهرایی و همکاران در سال 2006 در استان فارس انجام شد از تعداد 192 نمونه طیور مورد آزمایش 30 نمونه (15/62%) آلودگی به سالمونلا ها را نشان دادند، بعلاوه گروه سرمی D1 سالمونلا بعنوان گروه سرمی غالب در این مطالعه اعلام گردید(5) که با نتایج تحقیق حاضر داری همخوانی است. همچنین جلالی و همکاران طی یک بررسی در سال 2008 میزان آلودگی گوشت خام طیور به سالمونلا در شهرستان اصفهان را 17/91% اعلام نمودند(13).

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات محققین در سایر ممالک دنیا نیز نشان می دهد که سالمونلوز پرندگان دارای گسترش جهانی است. Pasmans و همکاران طی مطالعات خود که در سال 2004 در کشور بلژیک انجام شد از مجموع 114 نمونه مدفوع کبوتر مورد آزمایش از 26 نمونه (22/8%) *سالمونلا تیفی موریوم* از تیپ فاژی(PT) 99 را جدا نمودند که در مقایسه با تحقیق حاضر رقم بالاتری را نشان می دهد(14). همچنین Vanhooser و همکاران شایع ترین سرو وار سالمونلا در شتر مرغ را *سالمونلا تیفی موریوم* (گروه سرمی D1) گزارش نمودند (15) . در تحقیق حاضر نیز دو سروار از سالمونلا های جدا شده از شتر مرغ از گروه سرمی D1 هستند. بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق با توجه به اهمیتی که گوشت پرندگان در تغذیه انسان دارد شیوع سالمونلوز(8/65%) در پر ندگان عواقب بهداشتی نامطلوبی را در جامعه در پی خواهد داشت. همچنین شیوع نسبتا بالای سالمونلوز در کبوتر(15/55%) علاوه بر گسترش فزاینده عفونت سالمونلایی در مرغداری ها سلامت پرورش دهندگان این پرنده را نیز بطور جدی تهدید می نماید.

شناسایی ژن ***hilA*** در سالمونلاهای جدا شده از طیور از دیگر اهداف این تحقیق بود. همان گونه که قبلا نیز ذکر گردید این ژن رمز کننده پروتئین تنظیمی نسخه برداری است که باعث فعال شدن ژن های مهاجم در سالمونلا می شود و بدینوسیله نقش بسیار مهمی را در بیماری زایی سالمونلا ایفا می نماید. در تحقیق حاضر ژن ***hilA*** توسط یک زوج پرایمر اختصاصی مورد شناسایی قرار گرفته است . همان گونه که در شکل 1 نشان داده شده است ژن ***hilA*** در تمامی سالمونلاهای جدا شده از طیور که متعلق به 4 گروه سرمی مختلف بودند مشاهده گردید. این ژن تولید باندهایی به اندازه 854 bp نموده است. تعدادی از محققین در مناطق مختلف دنیا ژن ***hilA*** در سالمونلاها رامورد مطالعه قرار دادند. Sanchez و همکاران در سال 2004 با استفاده از تکنیک PCR ژن ***hilA*** روی نمونه های کلینیکی اقدام به شناسایی تیفوئید در انسان نمودند (6).

همچنین Pathmanathan و همکاران در سال 2003 با استفاده از روش PCR مستقیم، ژن ***hilA*** را در 33 سویه از سالمونلا مورد شناسایی قرار دادند(11). Churi و همکاران درسال 2010 میزان بیان ژن ***hilA*** در *سالمونلا تیفی موریوم* را با افزایش درجه حرارت اندازه گیری نمودند. محققین فوق نشان دادند که حداکثر بیان این ژن در درجه حرارت 45 درجه سانتی گراد صورت می گیرد و با برگشت درجه حرارت به 37 درجه سانتی گراد میزان بیان ژن به حداقل خود رسیده و بعد از گذشت 2 ساعت قابل اندازه گیری نمی باشد(17). Rishi و Rike در سال 2007 نشان دادند سالمونلا تیفی موریوم با بیان ژن ***hilA*** در مقابل اسید های چرب فرار از خود مقاومت نشان می دهند که این عمل باعث افزایش قدرت بیماری زایی باکتری می شود (18). Ellermeier و همکاران در سال 2003 نقش پروتئین RtsA را که باعث بیان ژن ***hilA*** می شود را مورد بررسی قرار دادند (7). Guo و همکاران در سال2000 با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن ***hilA*** و استفاده از روش ***PCR*** موفق به جداسازی *سالمونلا مونته ویدئو* از گوجه فرنگی خام شدند (19).

در تحقیق حاضر ژن ***hilA*** از 45 سویه سالمونلا که از سه میزبان مختلف از پرندگان (مرغ، کبوتر و شتر مرغ) جدا شد مورد شناسایی قرار گرفت و هیچ گونه تفاونی از نظر حضور و اندازه ژن ***hilA*** در سالمونلا های جدا شده از سه میزبان فوق مشاهده نگردید. با توجه به اینکه بررسی تنوع ژنتیکی میکروارگانیسم ها به عنوان یکی از ابزارهای مهم جهت شناسایی و تعیین هویت آنها مورد استفاده قرار می گیرد جهت کسب اطلاعات بیشتر در خصوص تنوع ژنتیکی ***hilA*** لازم است مطالعات وسیع تری در سروارها و میزبان های مختلف سالمونلاها انجام پذیرد.

نتیجه گیری

از اطلاعات بدست آمده از این تحقیق در خصوص ژن ***hilA*** می توان نتیجه گیری کلی نمود که این ژن صرف نظر از نوع میزبان و گروه سرمی در اندازه مشابه در سویه های مختلف سالمونلاهای ماکیان وجود دارد .

تشکر و قدردانی

در پایان از جناب آقای دکتر کاظمی زاده ریاست محترم واحد سراب و جناب آقای مهندس طاهری معاون محترم پژوهشی واحد که در تأمین هزینه این تحقیق با بنده همکاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم ، همچنین از خانم مریم بابایی و ابوالفضل برزگر که در انجام امور آزمایشگاهی این طرح بنده را یاری نمودند تقدیر و تشکر می نمایم .

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Gallegos R, Loredo A, Ojeda G, Vega A. *Identification of Salmonella serotypes isolated from cantaloupe and chile pepper production system in Mexico using PCR-RFLP*. J food protect. 2008; 71(11):2217-2222.

2- Michael PD, Beucha RL. *Food Microbiology 3rd edition*. ASM Press. 2007; 219-187.

3- Zahraei Salehi T. *Salmonella*. Tehran University Publication. 1999; 97-23.

4- Akbarmehr J, zahraei Salehi T, Nikbakht Gh. *Identification of Salmonella isolated from poultry by MPCR technique and evaluation of their hsp groEL gene diversity based on the PCR-RFL analysis*. African J. Microbiol research. 2010; 4(15): 1599-1604.

5- Zahraei Salehi T, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. *The isolation of Antibiotic- Resistant Salmonella from intestine and liver of poultry in Fars province of Iran*. Int J Poul Sci. 2005;4(5): 320-322.

6- Jennifer DB, Boyd MK, BradleyDJ. *Transcription of the Salmonella invasion gene activator , hilA, requires HilD activation in the absence of negative regulators*. J Bacteriol. 2003; 185(2): 525-533.

7- Ellermeier CD, Slauch JM. *RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invation and flagellar genes in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol. 2003;185(17): 5096-5108.

8- Lucas RL, LostrohCP, DiRusso CC, Spector M.P, WannerB.L, Lee CA. *Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in Salmonnela enterica serovar typhimurium* . J Bacteriol. 2000; 182(7): 1872-82.

9- Dunkley KD, McReynolds JL, Hume ME, Dunkley CS ,Callaway TR, Kubena LF, Nisbet J, Ricke SC. *Molting in Salmonella enteritidis- challenged laying hens fed alfalfa crumbles. I. Salmonella enteritidis colonization and virulence gene hilA response*. Poult Sci. 2007;86:1633-1639.

10- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Vet Microbiology* .Wolf publishing;1994.pp:209-236.

11- Pathmanathan SG, Cardona-Castro N, Sanchez-Jimenez MM, Correa-Ochoa MM, Puthucheary S D, Thong KL. *Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene*. J Med Microbiol. 2003; 52:773-776.

12- Cardona-Castro N, Restrepo-Pineda E , Correa-Ochoa M. *Detection of hilA gene sequence in serovars of Salmonella enterica subspecies Enterica.* Mem Inst Oswaldo Cruz.2002; 97:1153-1156.

13- Jalali M, Abedi D, pourbakhsh SD. *Prevalence of Salmonella spp in raw and cooked foods in Isfahan – Iran.* Journal of food safety.2008; 28: 442-452.

14- Pasmans F, Immerseel FV, Hermans K, Heyndrickx M, Collard JM, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Assessment of virulence of pigeon isolates of Salmponella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium variant Copenhagen for human*. J Clin Microbiol. 2004; 52(3):2000-2002.

15- Vanhooser Sl, Welsh RD. *Isolation of Salmponella species from ratites*. J Vet Diagn Ivest. 1995;7:268-269.

16- Sanchez-Jimenez MM, Cardona-Castro N. *Validation of a PCR for diagnosis of typhoid fever and salmonellosis by amplification of the hilA gene in clinical samples from Colombian patients*. J Med Microbiol. 2004; 53:875-878.

17- Churi A, Chalova VI, Zabala-Diaz IB,Woodward CL, Ricke SC. *Increased tempreture influences hilA gene fusion expression in a Salmonella typhimurium poultry isolate*.Food Biotechnology.2010; 24:51-61.

18- Rishi P, Ricke S. *HilA gene expression in SCFAs adapted and inorganic acid challenged Salmonnela enterica serovar Typhimurium*. Nepal Med Coll. 2007 ; 9(3):162-5

19- Guo X, Chen J, Beuchat LR, Brackett RE. PCR detection of Salmonnela enterica serotype M

20- Otevideo in raw tomatoes using primers derived from hilA . Appl Environ Microbiol 66:5248-52.

www.SID.ir