Archive of SID

Veterinary Clinical Pathology, Vol.14, No. 55, Autumn 2020

"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2020.1892589.1257

Evaluation of rapid detection and investigation of the presence of *spv* operon virulence genes in Salmonella isolates using simplex PCR and multiplex PCR molecular methods

Yazdi-Amirkhiz, S.[1], Anzabi, Y.[2, 3]*, Mahmazi, S.[4]

1- MSc Graduate in Genetics, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz. Iran.
3- Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz. Iran.
4- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
*Corresponding author's email: anzabi@iaut.ac.ir
(Received: 2020/2/3 Accepted: 2020/10/12)

Abstract
The traditional methods of diagnosing Salmonella which are time-consuming and sometimes problematic, are still used to identify Salmonella serotypes in clinical and food samples, but with the invention of rapid molecular detection methods, these problems have been largely eliminated. The present study aimed to rapidly detect different Salmonella isolates based on *inv*A chromosomal gene search and also to identify acute isolates containing *spv* operon virulence genes. To this end, 20 human isolates of Salmonella were obtained from hospitals in Tabriz and 20 isolates of this bacterium were isolated from traditional cheese available on Tabriz consumer market. The molecular confirmation of isolates was first evaluated using specific primers of *inv*A gene by simplex PCR method. Then, in order to evaluate the acute strains of the bacterium based on the presence of operon *spv*, the presence of *spv*A, B, C and R genes was examined by multiplex PCR using the relevant specific primers. The results showed that firstly, all isolates had molecular confirmation. Secondly, all 40 tested isolates had 3 *spv*A, C and R genes, but none of them had *spv*B gene. It seems that due to the limitations and problems in the traditional laboratory examination of Salmonella, PCR can be used as a rapid method to detect Salmonella infection. Also, the presence of 3 out of 4 virulence genes of opron *spv* in different Salmonella isolates in Tabriz region should be considered an undesirable finding, which emphasizes the need to further observe principles of control and prevention in animal and human communities.
Conflict of interest: None declared.
Keywords: Salmonella, Rapid diagnosis, *inv*A, *spv*, PCR.

www.SID.ir

Archive of SID

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2020.1892589.1257

ارزیابی تشخیص سریع و بررسی حضور ژن‌های حدت اپرون *spv* در جدایه‌های سالمونلا با استفاده از روش‌های مولکولی simplexPCR و multiplexPCR

سمیه یزدی‌امیرخیز[۱]، یونس انزابی[۲و۳*]، ساناز مهمازی[٤]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

٤- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: anzabi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۱٤ پذیرش نهایی: ۹۹/۷/۲۱)

چکیده

امروزه برای شناسایی و تشخیص سروتیپ‌های سالمونلا در نمونه‌های بالینی و مواد غذائی از روش‌های سنتی تشخیص این باکتری استفاده می‌گردد که وقت‌گیر و گاهی مشکل‌ساز می‌باشند، اما با کشف روش‌های سریع تشخیص مولکولی، این مشکلات تا حد زیادی مرتفع گردیده است. مطالعه حاضر، با هدف تشخیص سریع جدایه‌های مختلف سالمونلا بر اساس جستجوی ژن کروموزومی *inv*A و نیز شناسائی جدایه‌های حاد حاوی ژن‌های حدت اپرون *spv* انجام گردید. بدین منظور تعداد ۲۰ جدایه انسانی سالمونلا از بیمارستان‌های شهر تبریز و ۲۰ جدایه این باکتری که از پنیرهای سنتی عرضه‌شده در بازار مصرف تبریز جدا شده بود، تهیه گردید. ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *inv*A، تائید مولکولی جدایه‌ها با استفاده از روش simplex PCR ارزیابی گردید. در ادامه برای بررسی سویه‌های حاد باکتری مذکور براساس حضور ژن‌های اپرون ***spv*، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوطه، به روش multiplex PCR حضور ژن‌های *spv*A و B ،C ،R بررسی شد. یافته‌ها اولاً نشان‌دهنده تائید مولکولی همه جدایه‌ها بود. ثانیاً همه ٤۰ جدایه مورد آزمایش دارای ۳ ژن *spv*A و C ،R بوده ولی هیچ‌کدام از آن‌ها دارای ژن *spv*B نبودند. به نظر می‌رسد که با توجه به محدودیت‌ها و مشکلات موجود در روش بررسی آزمایشگاهی سنتی سالمونلاها، می‌توان از PCR به عنوان روشی سریع در تشخیص آلودگی به باکتری سالمونلا استفاده کرد. همچنین بایستی وجود ۳ ژن از ٤ ژن حدت اپرون ***spv*** در جدایه‌های مختلف سالمونلا در منطقه تبریز را یافته‌ای نامطلوب تلقی کرد که لزوم رعایت بیشتر اصول کنترل و پیشگیری در جوامع دامی و انسانی را تاکید می‌کند.**

کلیدواژه‌ها: سالمونلا، تشخیص سریع، *invA*، *spv*، PCR.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جنس سالمونلا شامل باسیل‌های کوتاه گرم منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، فاقد اسپور و فاقد کپسول می‌باشد که غالباً به واسطه داشتن تاژک‌های پری‌تریش (peritrichous) دارای حرکت بوده (بجز *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پلوروم* که غیرمتحرک هستند) و عضوی از خانواده آنتروباکتریاسه می‌باشند. بر این اساس، آخرین طبقه‌بندی پذیرفته‌شده برای اعضای این جنس، آن‌ها را به دو گونه *سالمونلا اینتریکا* (*Salmonella enterica*) و *سالمونلا بونگوری* (*Salmonella bongori*) تقسیم می‌کنند. از طرف دیگر، اعضای این جنس، بر اساس نوع آنتی‌ژن‌های سوماتیک (O)، فلاژلی (H) و ویرولانسی (Vi)، به حدود ۲۷۰۰ سروتیپ مختلف تقسیم می‌شوند که بیشترشان برای انسان، دام و پرندگان بیماری‌زا می‌باشند (Rastgar *et al.*, 2008). گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که این باکتری معمولاً از طریق مدفوع انسان، دام و پرندگان دفع شده و باعث آلودگی آب، غذا و محیط می‌شود. لذا انتقال بیماری مذکور از طریق آب و مواد غذایی آلوده صورت گرفته و غالباً انتقال به صورت مستقیم انجام نمی‌شود (D`Austj-y, 1991). سالمونلا یک بیماری‌زای درون سلولی وابسته است که با تکثیر روده‌ای، غالباً ایجاد گاستروآنتریت می‌کند. البته باکتری مذکور می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های سیستمیک مانند تب‌های تیفوئیدی و پاراتیفوئیدی نیز در انسان شود (Sabeghi and Anzabi, 2019).

سالمونلاها، ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی متعددی را حمل می‌نمایند که غالباً در حدت (virulence) و تهاجم این باکتری‌ها نقش عمده و اساسی دارند. در اکثر سروتیپ‌های سالمونلا، پلاسمید - حدت با اندازه‌های مختلف و وابسته به نوع سروتیپ وجود دارد که در غالب سروتیپ‌های *سالمونلا انتریکا*، پلاسمید مذکور، حامل اپرون *spv* می‌باشد که نقش اصلی در بیماری‌زایی این باکتری برای میزبان را عهده‌دار می‌باشد. گزارش شده که اپرون مذکور واجد پنج ژن *spv*A، *spv*B، *spv*C، *spv*D و *spv*R می‌باشد (Nogradyn *et al.*, 2008; Ngan Gjy *et al.*, 2010). تاکنون حضور این ژن‌ها در غالب سروتیپ‌های تحت گونه I *سالمونلا اینتریکا* مثل *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *سالمونلا دابلین*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا کلراسوئیس*، *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پلوروم* به اثبات رسیده‌است. همچنین نشان داده شده که جایگاه ژنتیکی اپرون *spv* در تمامی این سروتیپ‌ها از مشابهت بسیاری برخوردار می‌باشد (Hochmannh *et al.*, 2006; Lihxh *et al.*, 2007; Mzurkiewiczp *et al.*, 2008). در این اپرون ژن *spv*R یک فعال‌کننده رونویسی می‌باشد که جدا از ژن‌های ساختاری رونویسی، به پروموترها متصل شده و برای بیان ژن‌ها مورد نیاز است. این اپرون که اندازه‌اش در حدود ۸ کیلو باز است نقش مهمی در حدت باکتری در برابر میزبان ایفا می‌کند و در تقویت و گسترش سیستمیک پاتوژن نقش دارد. ژن‌های اپرون *spv* در گونه‌های *سالمونلا بونگوری* حضور ندارند ولی در زیر گونه‌های I، II، IIIa، IV و VII *سالمونلا انتریکا* وجودشان مشخص شده‌است. در واقع پلاسمید حدت *spv*، پلاسمیدهای بزرگ وابسته بوده که فقط در سالمونلاهای خاصی دیده می‌شوند. این پلاسمیدها حامل ژن‌هایی می‌باشند که باعث افزایش حدت،

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت سرمی، رشد داخل‌سلولی و چسبندگی شده و همچنین موجب افزایش ظرفیت ماندگاری این باکتری در بافت‌های خارج روده‌ای در میزبان‌های عفونی می‌شوند، لذا سویه‌های فاقد این پلاسمیدحدت، خیلی سریع از طحال پاک می‌شوند (Rastgar *et al.*, 2008). در واقع باکتری‌های مذکور پاتوژن‌های داخل سلولی هستند که می‌توانند بیماری‌های سیستمیک و غیر-سیستمیک در انسان، دام و پرندگان ایجاد کنند. سالمونلاهای غیرتیفوئیدی هم در حیوانات اهلی سراسر دنیا وجود دارند و یک منبع بزرگ برای ایجاد عفونت-های انسانی به حساب می‌آیند. تجزیه و تحلیل ژنتیکی نشان می‌دهد که هر سندروم بالینی نیاز به مجموعه‌های مختلف ژن‌های حدت دارد و سویه‌های مختلف سالمونلا، در ویژگی‌های حدتی خود، متفاوت هستند. گزارش شده است که سویه‌های جداشده از عفونت‌های سیستمیک، معمولاً ژن‌های حدت *spv* را حمل می‌کنند و باتوجه به بررسی‌های انجام شده نشان داده‌اند که سلول‌های T کمکی (CD_4^+) برای کنترل بیماری‌هایی که عامل آن سالمونلای *spv* مثبت می‌باشد، الزامی می باشند. بر این اساس تب تیفوئیدی سالمونلائی تفاوت-های اساسی از نظر پاتوژنز و ایمونولوژی با سندرم باکتریمی غیرتیفوئیدی دارد. سالمونلا قادر به تکثیر در سلول‌های اپی‌تلیال روده بوده و پس از ۲۴-۱۸ ساعت در سلول‌های روده آپوپتوز ایجاد می‌کند. همچنین نشان داده‌اند که توانایی تولید سندرم‌های بالینی مشخص نظیر تب تیفوئیدی و عفونت‌های غیرتیفوئیدی، ناشی از حضور ژن‌های خاصی است که مکرراً بر روی فاژ یا پلاسمید حدت قرار می‌گیرند(Tabatabaei and Firuzi 2009; Mayahi *et al.*, 2017).

با توجه به افزایش روز افزون اهمیت و جایگاه روش-های تشخیص ملکولی در جداسازی و تعیین هویت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در انسان و دام، در مطالعه حاضر تلاش شد که مزیت روش PCR نسبت به روش سنتی میکروب‌شناسی در این خصوص، مورد مطالعه مقایسه‌ای قرار گیرد. با توجه به این‌که ژن کروموزومی *inv*A یکی از مناسب‌ترین توالی‌های اختصاصی برای شناسایی سالمونلاها در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی آلوده می‌باشد (Guiney, 2011; Nosrat *et al.*, 2012) و نظر بر این‌که پنیر سنتی از جمله مواد غذائی پرمصرف در بیشتر نقاط کشور از جمله در مناطق مختلف شهر تبریز می‌باشد و نیز به دلیل وجود احتمال آلودگی آن‌ها به انواع سویه‌های حاد باکتری سالمونلا که از عوامل بسیار مهم تهدیدکننده بهداشت عمومی محسوب می شوند، لذا مطالعه حاضر با هدف شناسائی سریع (بر اساس جستجوی ژن اختصاصی *inv*A) آلودگی احتمالی پنیرهای سنتی مورد استفاده در شهر تبریز و جدایه‌های انسانی به باکتری مذکور که حاوی ژن‌های پلاسمیدی اپرون حدت *spv* هم می‌باشند با استفاده از روش‌های سنتی میکروب‌شناسی و جدید مولکولی یعنی PCR (polymerase chain reaction) انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی در یک بازه زمانی حدود ۲ ماهه تعداد ۲۰ جدایه سالمونلا از نمونه‌های انسانی از بخش میکروب‌شناسی دو بیمارستان اصلی دولتی شهر تبریز و تعداد ۲۰ جدایه سالمونلا نیز از نمونه‌های پنیر سنتی عرضه‌شده به بازار مصرف شهر تبریز از بخش بهداشت مواد غذائی دانشگاه آزاد اسلامی

www.SID.ir

Archive of SID

واحد تبریز تحت شرایط استاندارد تهیه و با استفاده از ظروف و وسایل استریل به آزمایشگاه میکروب‌شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در کوتاه‌ترین زمان و در کنار یخ خشک و در درون ظروف مخصوص حمل نمونه‌های میکروبی (cool box)، انتقال یافت. سپس جهت اطمینان از هویت جدایه‌های مذکور، از همه آن‌ها به‌طور جداگانه به میزان کافی برداشت گردید و تحت شرایط استریل به درون محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion broth) (Merck-Germany) مایع، جهت غنی‌سازی و افزایش تعداد باکتری‌ها منتقل شده و به مدت ۱۲-۸ ساعت در دمای ۴۳ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه یک لوپ پر از رسوب هریک از نمونه‌های غنی‌شده (پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰) در سطح محیط‌های کشت جامد انتخابی مکانکی آگار و سالمونلا-شیگلا آگار جهت جداسازی سالمونلاها بشکل پرگنه خالص، بصورت چند خطی منطقه‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. برای شناسایی هویت فنوتیپی کلنی‌های رشد یافته هم، از محیط‌های افتراقی TSI agar (Triple Sugar Iron agar)، SIM (Sulfide-Indole-Motility)، اوره‌آگار، سیمون‌سیترات‌آگار، لیزین‌آیرون‌آگار، آبگوشت متیل‌رد-وژس‌پرسکوئر (Methylred-Vogesproskaure broth) و نیز آزمایش ONPG (Ortho-Nitrophenyl-β-Galactoside test) و همچنین آنتی‌سرم‌های اختصاصی مربوطه (شرکت بهار افشان، تهران، ایران) استفاده شد. در نهایت با مراجعه به جداول باکتری‌شناسی اختصاصی و بر اساس پروتکل ارائه‌شده توسط کوئین و همکاران، باکتری‌های جداشده با ویژگی‌های بیوشیمیایی لاکتوز منفی، H_2S مثبت، سیترات مثبت، متیل‌رد مثبت، اوره‌آز منفی و لیزین‌دکربوکسیلاز مثبت که به آزمایشات سرولوژیکی اختصاصی هم جواب مثبت دادند، به عنوان یک جدایه متعلق به گونه *سالمونلا انتریکا* در نظر گرفته شد (Quinn *et al.*, 2002; Jafari *et al.*, 2017). لازم به ذکر است که همه محیط‌های کشت استفاده‌شده در تحقیق حاضر، ساخت شرکت مرک آلمان (Merck-Germany) بود.

در ادامه در مورد تمامی جدایه‌های سالمونلا که به صورت فنوتیپی تائید هویت شدند، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ساده (simplex PCR) با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *inv*A (جدول ۱) برای شناسایی مولکولی آن‌ها استفاده شد (Guiney, 2011; Nosrat *et al.*, 2012). همچنین جهت تشخیص حضور ژن‌های حدت پلاسمیدی اپرون *spv* در جدایه‌های تائیدشده با ژن مذکور، از جفت پرایمرهای اختصاصی مربوطه (جدول ۲) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (multiplex PCR) استفاده گردید. همه پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر از شرکت SGB (Shanghai Generary Biotech co., Ltd) تهیه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات و ردیف پرایمرهای استفاده‌شده و محصول تکثیریافته مربوط به ژن کروموزومی *inv*A

ژن هدف	ردیف بازهای آلی نوکلوتیدهای پرایمرها (5´-3´)	اندازه محصول PCR (bp)	منبع
*inv*A	F: GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA R: TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	۲۸٤	Chaudhary *et al.*, 2015

جدول(۲)- مشخصات و ردیف پرایمرهای استفاده شده و محصولات تکثیر یافته مربوط به ژن‌های پلاسمیدی اپرون *spv*

ژن هدف	ردیف بازهای آلی نوکلوتیدهای پرایمرها (5´-3´)	اندازه محصول PCR (bp)	منبع
***spv*R**	F: CAG GTT CCT TCA GTA TCG CA R: TTT GGC CGG AAA TGG TCA GT	۳۱۰	Amini *et al.*, 2010
***spv*A**	F: GTCAGACCCGTAAACAGT R: GCACGCAGAGTACCCGCA		Amini *et al.*, 2010
***spv*B**	F: ACGCCTCAGCGATCCGCA R: GTACAACATCTCCGAGTA	٦۰٤	Amini *et al.*, 2010
***spv*C**	F:ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA R:TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA	۱۰٦۳ ٥۷۱	Amini *et al.*, 2010

- **مراحل استخراج** DNA **کروموزومی جدایه‌ها:** بدین منظور با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی (CINNAPURE- Cat No:PR881613) ٤۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی استریل در تیوب‌های بزرگ نام‌گذاری‌شده، ریخته شد. سپس در زیر هود و با استفاده از فیلدوپلاتین حلقه حدود یک سوم از نمونه‌ها در داخل سرم فیزیولوژی حل شده و ورتکس گردید. در ادامه محتویات مذکور ۵ دقیقه در دور ٤۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا دو فاز ایجاد شود. مایع رویی با استفاده از سمپلر خالی شد. در ادامه مقدار ۱۰۰ میکرو-لیتر بافر لیزکننده و ۲۰ میکرولیتر از آنزیم ریبوتیناز به میکروتیوب‌ها اضافه گردید و ورتکس شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ٤۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده به میکروتیوب‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۰ ثانیه در دور تند ورتکس شد. در ادامه ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب‌دهنده اضافه شده و با دور تند حدود ۵ ثانیه ورتکس گردید و محلول به‌دست آمده به داخل میکروتیوب‌های فیلتردار استوانه‌ای شکل منتقل و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ٤۰۰ میکرولیتر از بافر شماره ۱ شستشو به داخل میکروتیوب‌ها ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ٤۰۰ میکرولیتر از بافر شماره ۲ شستشو اضافه گردیده و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه مجدداً سانتریفیوژ شد. در ادامه مایع حاصله در پایین میکروتیوب فیلتردار دور ریخته شد و دوباره سانتریفیوژ گردید. در ادامه ستون‌ها به میکروتیوب‌های جدید منتقل شده و ۵۰ میکرولیتر بافر با دمای ٦۵ درجه سلسیوس به تیوب‌ها اضافه شده و به مدت ۵-۳ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع حاصله در این مرحله DNA استخراج‌شده می‌باشد. لازم به ذکر است با توجه به این‌که برای انجام واکنش PCR حداقل به ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر از DNAهای استخراج‌شده خالص نیاز وجود دارد، لذا برای تعیین کیفیت و کمیت آن‌ها از دستگاه نانودرآپ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده گردید (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, USA).

- **مراحل استخراج** DNA **پلاسمیدی جدایه‌ها:** با توجه به این‌که ژن‌های اپرون *spv* مورد بررسی در این مطالعه بر روی پلاسمید قرار دارند، بنابراین در این مرحله، از جدایه‌هایی که در مرحله قبلی سالمونلا بودن آن‌ها به‌صورت مولکولی و بر اساس بررسی حضور ژن اختصاصی *inv*A تائید شده بود، مجدداً با استفاده از کیت استخراج شرکت کیاژن (QIAprep Spin Miniprep Kit) و طبق پروتکل کیت مربوطه، عمل استخراج DNA پلاسمیدی انجام گردید.

-آزمایش زنجیره‌ای پلی‌مراز ساده (simplex PCR) برای بررسی حضور ژن *invA*: با استفاده از ترکیبات ارائه‌شده در جدول ۳، برنامه simplex PCR مورد استفاده به این صورت انجام شد که در سیکل اول برای انجام عمل واسرشت سازی اولیه به مدت ٤ دقیقه دمای ۹٤ درجه سلسیوس بر روی نمونه‌ها اعمال گردید. همچنین در سیکل‌های اصلی هم که ۳۵ بار تکرار شدند جهت انجام عمل مذکور از همان دما ولی به مدت ۳۰ ثانیه و برای اتصال از دمای ۷۰ درجه سلسیوس طی همان مدت زمان و برای عمل توسعه هم از دمای ۷۲ درجه سلسیوس به ٤۰ ثانیه استفاده شد. بالاخره در سیکل آخر هم برای توسعه نهایی محصول آزمایشPCR از همان دما در مدت ۷ دقیقه استفاده گردید.

جدول ۳- ترکیبات مورد استفاده در واکنش simplex PCR

نام ترکیب	مقدار مورد استفاده
10X PCR بافر	۵ میکرولیتر
آب مقطردوبارتقطیر استریل دیونیزه	۳٤/٦ میکرولیتر
کلرید منیزیوم	۱/۵ میکرولیتر
پرایمر جلورونده	۱ میکرولیتر
پرایمر معکوس	۱ میکرولیتر
مخلوط بازهای آلی سه‌فسفاته	۰/۵ میکرولیتر
آنزیم DNA پلی‌مراز	۰/٤ میکرولیتر
DNA کروموزومی الگو	٦ میکرولیتر

-آزمایش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (multiplex-PCR) برای بررسی حضور ژن‌های اپرون *spv* با استفاده از ترکیبات ارائه شده در جدول ٤، در طی برنامه multiplex PCR، عمل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ٤ دقیقه و واسرشته-سازی اصلی در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه با انجام ۳۵ چرخه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، عمل بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- ترکیبات مورد استفاده در واکنش multiplex PCR

مقدار مورد استفاده	نام ترکیب
مستر میکس	۱۲/۵ میکرولیتر
آب مقطردوبارتقطیر استریل دیونیزه	۹/۵ میکرولیتر
کلرید منیزیوم	۰/۸ میکرولیتر
آنزیم DNA پلی‌مراز	۰/٤ میکرولیتر
پرایمر جلورونده	۰/٤ میکرولیتر بطور جداگانه از هر یک از ٤ پرایمر
پرایمر معکوس	۰/٤ میکرولیتر بطور جداگانه از هر یک از ٤ پرایمر
DNA پلاسمیدی الگو	۱میکرولیتر

در نهایت قطعات تکثیر یافته در PCRهای انجام‌شده، بر روی ژل الکتروفورز ۱ درصد و با استفاده از نور UV (ultraviolet) دستگاه Box™ gel documentation (شرکت سینژن کمبریج، انگلستان) در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز مشاهده، بررسی و پس از تفکیک، مورد عکسبرداری قرار گرفت.

لازم به ذکر است که در مراحل مختلف مطالعه حاضر از سویه استاندارد باکتری (ATCC: 9270) *Salmonella enterica* به عنوان کنترل مثبت و نیز از سویه استاندارد باکتری (ATCC: 25922) *Escherichia coli* به‌عنوان کنترل منفی که هردو از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده بود، استفاده شد.

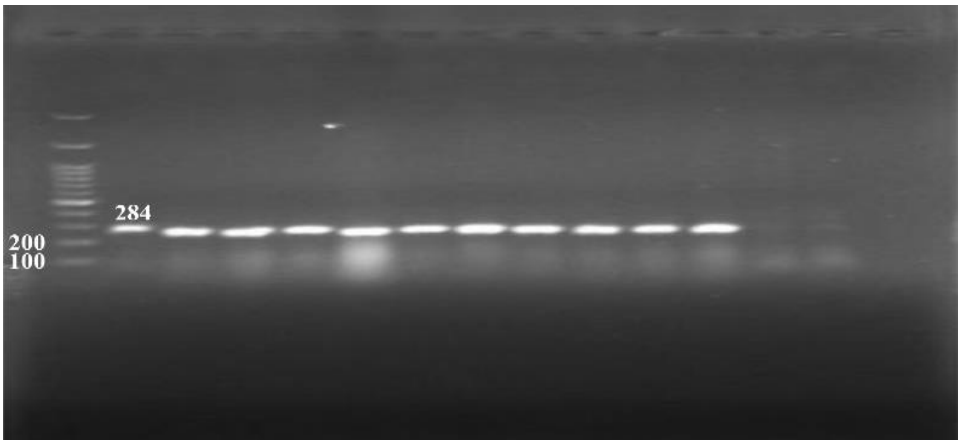
- **تحلیل آماری داده‌ها**: یافته‌های حاصله به‌شکل آمار توصیفی ارائه گردید. برای مقایسه نتایج مربوط به جدایه‌های مختلف سالمونلا از نرم‌افزار spss نسخه ۲۲ و آزمون آماری *t*-student در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ استفاده گردید.

یافته‌ها

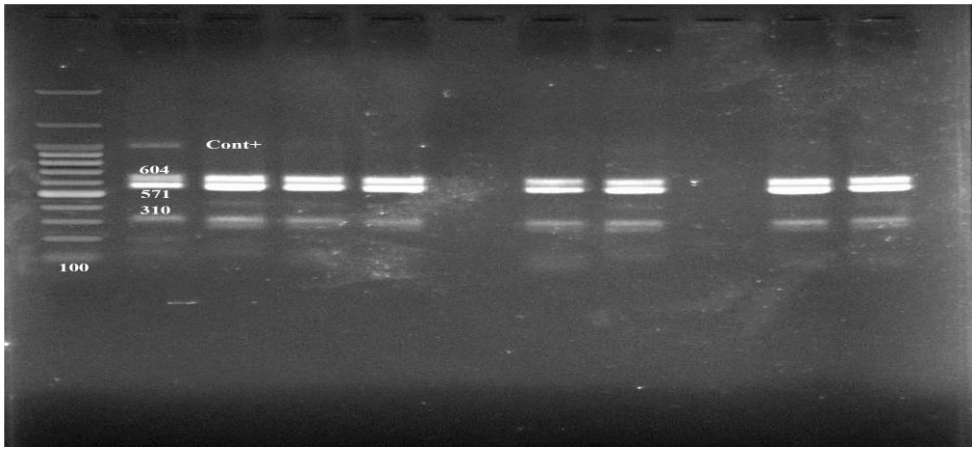
در مطالعه حاضر، با استفاده از روش کشت میکروبی سنتی متداول، هر ٤۰ جدایه سالمونلای مربوط به نمونه‌های اخذ شده بیمارستانی و نمونه‌های پنیر - سنتی، تائید هویت فنوتیپی شدند. همچنین با استفاده از روش PCR ساده و بر مبنای جستجوی حضور ژن *invA* تائید مولکولی نیز گردیدند (شکل ۱). همچنین با استفاده از آزمایش PCR چندگانه و بر مبنای جستجوی حضور ژن‌های حدت مربوط به اپرون *spv* همه جدایه-های مذکور از نظر حضور ژن‌های اپرون مذکور بررسی شدند. نتایج حاصله نشان داد هم در جدایه‌های پنیر سنتی و هم در جدایه‌های انسانی، ۳ ژن *svp*A، *svp*C و *svp*R حضور داشتند، در حالی‌که در هیچ‌یک از نمونه-های ذکر شده، ژن *svp*B مشاهده نگردید. همچنین از نظر آماری هم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورزشده محصولات simplex PCR در مورد جدایه‌های سالمونلا که همگی باندی به اندازه 284bp که مربوط به حضور ژن اختصاصی *inv*A هست را نشان می‌دهند. چاهک ۲ مربوط به کنترل مثبت و چاهک انتهائی مربوط به کنترل منفی است. سایز مارکر مورد استفاده از نوع smobio (1Kb) DNA ladder می‌باشد.



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورزشده محصولات multiplex PCR در مورد جدایه‌های سالمونلا که در آن باندهای اختصاصی مربوط به همه ژن‌های مورد نظر بجز ژن *spv*B مشاهده می‌شود. اندازه ژن‌های *svp*A، *svp*B، *svp*C و *svp*R به ترتیب ٦٠٤، ١٠٦٣، ٥٧١ و ٣١٠ جفت باز (bp) می‌باشد. چاهک شماره ۲ مربوط به کنترل مثبت بوده و سایز مارکر مورد استفاده در چاهک ۱ از نوع smobio (1Kb) DNA ladder می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از روش مولکولی PCR بر اساس ردیابی قطعات ژنوم باکتری‌ها، حساسیت و ویژگی فوق‌العاده و سرعت بالائی را برای تشخیص آن‌ها فراهم نموده، به طوری‌که با این روش می‌توان بیش از یک میلیارد کپی از یک قطعه از DNA باکتری مورد نظر را در عرض ۲ تا ۳ ساعت تولید کرد. در این ارتباط در سال ۱۹۹۳ با استفاده از روش PCR باکتری سالمونلا را در نمونه‌های غذایی ردیابی کرده و حساسیت ۱۰۰ درصدی را برای آن گزارش نموده‌اند (Hoseinpour *et al.*, 2013). در سال ۱۹۹۸ بایلی روش BAX-PCR را برای ردیابی سالمونلا در مواد غذایی مورد استفاده قرارداد و نتایج آن را با روش استاندارد کشت مقایسه نمود. یافته‌های نامبرده نشان داد که صحت و حساسیت این روش در

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه با روش متداول کشت بالاتر بوده‌است (Bailey, 1998). همچنین بایلی در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۳ از روش BAX-PCR برای ردیابی سالمونلا در نمونه گوشت ماکیان استفاده نمود. در این مطالعه هم از میان ۱۲۲ نمونه گوشت مرغی که به طور تجربی با باکتری سالمونلا آلوده شده بودند، ۱۱۱ مورد با روش PCR و ۱۱۳ مورد با روش کشت از نظر آلودگی به سالمونلا مثبت تشخیص داده شدند. اما در مورد ردیابی سالمونلا از نمونه‌های هات‌داگ با روش PCR تعداد ۱۹ مورد از ۳۰ مورد و با روش کشت فقط ۱۰ مورد از ۳۰ مورد به عنوان نمونه مثبت شناسائی شدند. این یافته هم برتری و حساسیت بیشتر روش PCR را نسبت به روش کشت معمولی نشان داد (Bailey and cosby, 2003). اما در پژوهش حاضر همه ٤٠ جدایه سالمونلا با استفاده از روش PCR ساده تائید مولکولی شدند یعنی بین روش کشت سنتی و روش مولکولی PCR از این نظر اختلافی مشاهده نشد که این یافته با اکثر تحقیقات اشاره شده همخوانی نشان نداده و برتری و ترجیح روش مولکولی بر روش کشت جهت جداسازی سالمونلاها در نمونه-های مختلف انسانی و مواد غذائی با منشأ دامی را نشان نمی‌دهد. در این ارتباط در سال ۲۰۰۷ اریکسون و آسپان سه روش کشت، الایزا و PCR را از نظر قدرت ردیابی سالمونلا در نمونه‌های مدفوع ماکیان، خوک و احشام مورد ارزیابی قرار دادند. یافته‌های این محققان نشان داد که دقت، حساسیت و ویژگی روش‌های به کار گرفته شده به شدت تحت تاثیر نوع سالمونلای موجود و ترکیب بستری است که سالمونلا در آن قرار دارد (Erikson and Aspan, 2007). البته درعین حال نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش مولکولی بهینه‌سازی-شده PCR بر اساس جستجوی ژن *inv*A، روشی مناسب جهت تشخیص سریع باکتری بیماری‌زای سالمونلا در نمونه‌های انسانی و مواد غذایی آلوده است و احتمالاً می‌توان آن را جایگزین روش‌های تشخیصی سنتی در آزمایشگاه‌ها نمود، به‌طوری‌که با استفاده از پرایمرهای ژن *inv*A (ژن عمومی در همه سروتیپ‌های *سالمونلا اینتریکا*) و با استفاده از روش PCR simplexو مشاهده باندی به اندازه ۲۸٤ bp در ژل الکتروفورزشده محصول PCR مذکور، قادر به تشخیص بسیار سریع و دقیق حضور باکتری سالمونلا در جدایه-های انسانی و جدایه‌های مواد غذائی با منشأ دامی شدیم. ضمن این‌که در مورد نمونه مربوط به باکتری بیماریزای *اشریشیا کولای* که به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد، در ژل مذکور، هیچ باندی تولید نشد. در واقع این یافته با گزارشات متعدد گذشته که ژن *inv*A را که با بیماری‌زایی سالمونلاها در ارتباط می‌باشد و در عین حال کاملاً اختصاصی بوده و فقط در این باکتری وجود دارد و به عنوان ژنی مناسب برای جستجوی مولکولی سروتیپ‌های *سالمونلا اینتریکا* گزارش کرده‌اند (Zahraei-Salehi *et al.*, 2006)، کاملاً مطابقت داشته و در عین حال حساسیت و ویژگی روش تشخیصی PCR جهت جستجوی سالمونلاها را دوباره تائید کرد. اهمیت یافته اخیر زمانی بیشتر مشخص می-شود که توجه داشته باشیم که سالمونلا یکی از باکتری-های بیماری‌زای مهم در انسان می‌باشد و سرعت تشخیص و به عبارت دقیق‌تر، عامل زمان برای پیشگیری از فاجعه درحال وقوع ناشی از همه‌گیری سالمونلوزیس فاکتور بسیار مهمی است و می‌تواند

www.SID.ir

Archive of SID

منجر به قطع به موقع چرخه عفونت در جامعه انسانی گردد.

اما از طرف دیگر نکته مهم این‌که در پژوهش حاضر با استفاده از روش مولکولی multiplex PCR مشخص شد که ٤٠ جدایه تعیین‌هویت‌شده سالمونلا به روش سنتی میکروبیولوژیکی و نیز تائیدهویت‌شده به روش مولکولی simplex PCR، همگی حاوی حداقل ۳ ژن از ژن‌های حدت مجموعه اپرون *spv* هستند. مخصوصاً حضور ژن اصلی این اپرون حدت یعنی ژن *spv*R در همه جدایه‌های سالمونلا یافته‌ای با پیش‌آگهی بد تلقی می‌گردد، چرا که این ژن بر شدت و حدت بیماری سالمونلوزیس تاثیر بالایی دارد و حضور سالمونلاهای دارای ژن مذکور می‌تواند موجب گسترش عفونت‌های مربوطه، در جامعه انسانی شده و این امر می‌تواند خطری از نظر بهداشت مواد غذائی محسوب - گردد. در این ارتباط گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که سالمونلاها، انواعی از ژن‌های کروموزومی و پلاسمیدی را حمل می‌کنند که در حدت و تهاجم این باکتری نقش عمده و اساسی دارند. در این ارتباط امینی و همکاران عنوان نمودند که باکتری سالمونلا جهت ایجاد عفونت عمومی در مدل‌های تجربی موش - آزمایشگاهی نیاز به پلاسمید حدت *spv* دارد، به‌طوری- که با حذف ژن‌های اپرون *spv*، حدت نیز به شدت کاهش می‌یابد. همچنین گزارش شده که پلاسمید حدت مذکور باعث عدم اتصال لیزوزوم به فاگوزوم در سلول- های دفاعی شده و از طرفی باعث مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های دفاعی بدن نیز می‌گردد (Amini *et al.*, 2010). در تحقیقی هم گزارش کرده‌اند که هر گونه جهش در ژن‌های اپرون *spv* باعث کاهش حدت سالمونلاها در آزمایشات مربوط به مدل حیوانی می‌گردد. همچنین مشخص شده با این‌که ژن‌های *spv*B و *spv*A نقش تعیین کننده‌ای در این اپرون بازی می‌نمایند، ولی عامل حدت را بیشتر به ژن‌های *spv*C و *spv*R نسبت داده‌اند (Nikbakht and Tadjbakhsh, 2004). نظر براین‌که در تحقیق حاضر حضور هر دو ژن مذکور در همه جدایه‌های مورد مطالعه سالمونلا مشاهده شد، لذا بازهم یافته‌ای مهم و البته با پیش آگهی بد تلقی می‌شود چرا که تجزیه و تحلیل اپرون *spv* نشان داده که مخصوصاً *spv*R، یک ژن حدت ضروری است و فقط جدایه‌های بدون *spv*R سالمونلاها می- توانند غیربیماری زا و یا غیرحاد باشند که در مورد هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر این امر صدق نمی‌کند. همچنین در این ارتباط امینی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشتارگاهی در کرمان با جمع‌آوری ۱۰۰۱ نمونه از طیور و انجام آزمون‌های میکروبیولوژی و سرولوژی، ٦٨ مورد از آن‌ها را آلوده به سالمونلا گزارش کردند. در ادامه هم با استفاده از روش multiplex PCR، عامل ۳۵ مورد از آلودگی‌ها (۵۱ درصد موارد) به عنوان *سالمونلا انتریتیدیس* شناخته شده و حضور ژن‌های *spv*A، *spv*B و *spv*C هم برابر با ۸۸/٦ درصد گزارش شد که این یافته‌ها از نظر بهداشت مواد غذایی حائز اهمیت گزارش گردید (Amini *et al.*, 2010). یافته‌های بخش مولکولی تحقیق مذکور با نتایج پژوهش حاضر همخوانی کامل ندارد، چرا که در تحقیق حاضر اولاً حضور ژن *spv*B مشاهده نشد و ثانیاً حضور ۳ ژن *spv*A، *spv*C و *spv*R هم با فراوانی ۱۰۰ درصد ملاحظه شد. در مطالعه‌ای که اولیویرا و همکاران در سال ۲۰۰۳ در برزیل در مورد حضور ژن‌های *inv*A،

www.SID.ir

Archive of SID

*spv*R و *spv*C در سالمونلاهای جداشده از منابع مختلف انجام دادند، دریافتند که ژن *inv*A در *سالمونلا انتریتیدیس* جداشده از همه منابع مورد بررسی شامل طیور، خوک، انسان و مواد غذائی یافت می‌گردد، اما فراوانی ژن‌های *spv*R و *spv*C به‌ترتیب ۹۱/۲ و ۹۰/۲ درصد بوده است (Oliveira *et al.*, 2003). نتایج این پژوهش هم در مورد حضور ژن *inv*A با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی و اما در مورد فراوانی ژن‌های حدت *spv*R و*spv*C تا حدودی عدم همخوانی نشان می‌دهد. از طرف دیگر نتایج بررسی حاضر نشان داد که ژن‌های کروموزومی *inv*A و پلاسمیدی *spv*R در همه سالمونلاهای مورد بررسی در مطالعه حاضر حضور دارند. در این ارتباط نتایج تقریباً مشابهی در مطالعه امینی و همکاران نیز گزارش شده است، به‌طوری‌که نامبردگان در بررسی که بر روی ۱۰۰۱ نمونه گوشت مرغ کشتارگاهی در استان کرمان انجام دادند، گزارش کردند که ٦/٧٩ درصد از نمونه‌ها از نظر حضور باکتری سالمونلا مثبت بودند. همچنین آن‌ها نشان دادند که فراوانی ژن‌های *inv*A و *spv*R به‌ترتیب ۱۰۰ و ۸۸/۰٦ درصد بوده است (Amini *et al.*, 2010). که این یافته‌ها با نتایج بررسی ما بسیار مشابهت دارد چرا که نتایج پژوهش ما هم در مورد فراوانی هر دو ژن مذکور در جدایه‌های سالمونلا ۱۰۰ درصد ثبت شده است. از طرف دیگر در مطالعه‌ای از مجموع ٤٠ جدایه مربوط به ۵۸ نوع سروار سالمونلا که طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ از نمونه‌های مدفوع، غذا و آب جدا گردیده بود، در تمامی جدایه‌ها ژن *inv*A مشاهده گردید. از طرف دیگر آنالیز نمونه‌های مذکور هم نشان داد که ژن‌های *spv*A، *spv*B و *spv*C در ۹۰ درصد از سویه‌های جداشده از منابع انسانی و ۱۰۰ درصد از سویه‌های جدا شده از منابع گاوی وجود دارد (de Oliveira *et al.*, 2003). در صورتی که در مطالعه ما ژن‌های *inv*A،*spv*A ، *spv*C و *spv*R در ۱۰۰ درصد از جدایه‌های سالمونلا مشاهده گردید درحالی‌که ژن *spv*B در هیچ‌یک از جدایه‌های مذکور وجود نداشت. به نظر می‌رسد همان‌گونه که تحقیق نیکبخت و تاجبخش برای اولین بار عدم حضور ژن *spv*R را در برخی از سروتیپ‌های سالمونلا نشان داده‌است، نتایج پژوهش حاضر نیز برای اولین بار عدم حضور ژن *spv*B را در همه جدایه‌های بررسی‌شده سالمونلا با منشأ انسانی و مواد غذائی با منشأ دامی نشان می‌دهد (Guerra *et al.*, 2002; Nikbakht and Tadjbakhsh, 2004; Foley, 2008; Amini *et al.*, 2010).

با توجه به نتایج تحقیقات مشابه به نظر می‌رسد که یکی از دلایل اصلی اختلافات مشاهده‌شده بین نتایج پژوهش حاضر با نتایج تحقیقات مذکور می‌تواند بدلیل تفاوت در نوع نمونه‌های مورد مطالعه (نمونه‌های بالینی انسان و نمونه‌های مواد غذائی در مقایسه با نمونه‌های بالینی دامی) باشد. از طرف دیگر این اختلاف می‌تواند در نتیجه تفاوت در مناطق جغرافیایی و منشأ نمونه‌ها نیز باشد. همچنین نشان داده‌اند که امکان از دست رفتن پلاسمید حدّت در طول زمان هم وجود دارد. بالاخره این‌که تفاوت در الگو و شیوع پلاسمید حدت در مطالعه حاضر در مقایسه با نتایج مطالعات دیگر، احتمالاً می تواند به دلیل تفاوت در رعایت بهداشت در بین جمعیت‌های انسانی و یا حیوانی در کشورهای مختلف و همچنین مناطق مختلف یک کشور باشد و این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان استفاده از مواد ضدمیکروبی در درمان انسان و حیوان در

www.SID.ir

Archive of SID

کشورهای مختلف نیز باشد (Nikbakht and Tadjbakhsh, 2004; Zahraei-Salehi and Saeedzadeh, 2005).

با تکیه بر به نتایج پژوهش حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن *inv*A کارایی فوق العاده‌ای در تشخیص نمونه‌های مواد غذایی آلوده به سالمونلا می‌تواند داشته باشد. همچنین از طرف دیگر اثبات حضور حداقل ۳ ژن حدت هم در جدایه‌های انسانی و هم جدایه‌های دامی سالمونلا در تحقیق حاضر در عین حال نشان‌دهنده پیش‌آگهی نامناسبی در مورد سلامت پنیرهای سنتی عرضه شده به بازار مصرف شهر تبریز و نقش احتمالی آن‌ها در گسترش عفونت‌های سالمونلائی در جوامع انسانی می‌باشد. لذا توصیه می‌گردد که جهت حذف باکتری سالمونلا از مواد غذایی، سازمان‌های تولیدکننده اصول ابتدایی را رعایت کرده و از مراکز کنترل کیفی مواد غذایی درخواست گردد که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را جهت حفظ و نگه‌داری مواد غذایی به حداقل برسانند چرا که سالمونلاها یکی از مهم‌ترین عوامل منتقله از غذا در سراسر جهان می‌باشند که به دلیل افزایش مقاومت‌های دارویی در این جنس از باکتری‌ها، این مسأله به عنوان یک مشکل اساسی در دنیا مطرح می‌باشد. البته مطالعات بیشتر و با حجم نمونه بالاتری برای قضاوت نهائی در این خصوص ضروری است.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از نتایج پایاننامه کارشناسی‌ارشد رشته ژنتیک مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان می‌باشد. بدین‌وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی این دانشگاه کمال تشکر را داریم.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع ندارند.

منابع

- Ahmadi, A., Ghorbanali Zadegan, M., Najafi, A., Tavakoli, H. and Mirnejad, R. (2012). Molecular detection of Salmonella typhi in food samples by PCR using invA gene. Journal of Ilam University, 20(1): 8-17. [In Persian]
- Amini, K., Zahraei-Salehi, T., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J. and Ashrafganjooei, S.B. (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): 2202-10.
- Bailey, J. (1998). Detection of Salmonella cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX system. Journal of Food Protection, 61(7): 792-5.
- Bailey, J. and Cosby, D. (2003). Detection of Salmonella from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX PCR system. Journal of Food Protection, 66(11): 2138-40.

www.SID.ir

Archive of SID

- Borges K.A., Furian T.Q., Borsoi, A., Moraes, H.L., Salle, C.T. and Nascimento, V.P. (2003). Detection of virulence-associated genes in Salmonella Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. Pesquisa Veterinaria Brasileira, 33(12): 1416-1422.
- D'Aoust, J.Y. (1991). Pathogenicity of food borne Salmonella. International Journal of Food Microbiology, 12(1): 17-40.
- de Oliveira S.D., Rodenbusch C.R., Michael G.B., Cardoso M.I.R., Canal, C.W. and Brandelli, A. (2003). Detection of virulence genes in Salmonella Enteritidis isolated from different sources. Brazilian Journal of Microbiology, 34(1): 123-124.
- Eriksson, E. and Aspan, A. (2007). Comparison of Culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Veterinary Research, 3(1): 21.
- Foley, S.L. and Lynne, A.M. (2008). Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. Journal of Animal Science, 86(14suppl): 173-87.
- Guerra, B.S.S., Helmuth, R. and Mendoza, M.C. (2002). Characterization of a self-transferable plasmid from Salmonella enterica serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(9): 2977-2981.
- Guiney, D.G. and Fierer, J. (2011). The role of the spv genes in Salmonella pathogenesis. Frontiers in Microbiology, 2(1): 129.
- Hochmann, H., Pust, S., von Figura, G., Aktories, K. and Barth H. (2006). Salmonella enterica spvB ADP-ribosylates actin at position Arginine-177 characterization of the catalytic domain within the spvB protein and a comparison to binary clostridial Actin-ADP-ribosylating toxins. Biochemistry, 45(4): 1271-1277.
- Hoseinpour, M., Sabokbar, A., Batkhtiyari, A. and Parsa, S.H. (2013).Comparison of bacterial culture, ELISA and techniqes for detection of salmomella in poultry meat samples collected from tehran. Journal of Microbial World, 1(14): 62-72. [In persian]
- Jafari, R.A., Ghorbanpoor, M., Zahraei Salehi, T., Mayahi, M. and Gholipour Azar, M. (2017). Serotyping and antibiotic resistance patterns of isolated Salmonella from broiler chickens in Ahvaz. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 4(40): 327-336. [In persian]
- Kumar, R., Surendran, P. and Thampuran N. (2008). Evaluation of Culture, ELISA and PCR assays for the detection of Salmonella in seafood. Letters in Applied Microbiology, 46(2): 221-226.
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li S., et al. (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. Science, 315: 1000-1003.
- Libby, S.J., Adams, L.G., Ficht, T.A., Allen, C., Whitford, H.A., Buchmeier, N.A., et al. (1997). The spv genes on the Salmonella dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. Infection and Immunity, 65(5): 1786-1792.
- Lyytikäinen, O., Koort, J., Ward, L., Schildt, R., Ruutu, P., Japisson, E., et al. (2000). Molecular epidemiology of an outbreak caused by Salmonella enterica serovar Newport in Finland and the United Kingdom. Epidemiology and Infection, 124(2): 185-1892.
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J.A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., et al. (2008). spvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. Molecular Microbiology, 67(6): 1371-1383.
- Mayahi, M., Talazadeh, F., Jafari, R.A. and Keshavarz Zamanian, V. (2017). Isolation of Salmonella from Iranian broiler breeder farms and feed. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 3(43): 263-276. [In persian]
- McEvoy, J., Doherty, A., Sheridan, J., Blair, I. and McDowell, D.(2003). The prevalence of Salmonella spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. Journal of Applied Microbiology, 94(4): 693-700.
- Ngan, G.J., Ng, L.M., Lin, R.T., and Teo, J.W. (2010). Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A. Research in Microbiology, 161(4): 243-248.

www.SID.ir

Archive of SID

- Nikbakht, G.H. and Tadjbakhsh, H. (2004). Study of salmonella plasmid virulence genes (spv) in salmonella enterica serovars isolated in Iran. Journal of Veterinary Research, 59(2): 137-140. [In Persian]
- Nógrády, N., Kardos, G., Bistyak, A., Turcsányi, I., Mészáros, J., Galántai, Z., et al. (2008). Prevalence and characterization of Salmonella infantis isolates originating from different points of the broiler chicken–human food chain in Hungary. International Journal of Food Microbiology, 127(1-2): 162-167.
- Nosrat, S., Sabokbar A., Dezfoolian, M., Tabarraie, B. and Fallah, F. (2012). Prevalence of Salmonella enteritidis, typhi and typhimurium from food products in Mofid hospital. Research in Medicine, 36(1): 43-48. [In Persian]
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing, pp: 109-118.
- Ramadan, F., Unni, A., Hablas, R. and Rizk, M.(1992). Salmonella-induced enteritis. Clinical, serotypes and treatment. The Journal of the Egyptian Public Health Association, 67(3-4): 357-367.
- Rastgar, H., Ghahramani, M.H., Halaj-neyshabouri, S.H., Jalali, M., Anjarani, S. and Khosrokhavar, R. (2008). Isolation and identification of salmonella typhimurium in milk by Conventional and PCR methods. Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 3(10): 45-52. [In Persian]
- Rotger, R. and Casadesús, J. (1992). The virulence plasmids of Salmonella. International Microbiology, 2(1): 177-184.
- Sabeghi, M. and Anzabi, Y. (2019). Determination of serogroup and antibiotic resistance pattern of isolated Salmonella from laying industrial poultry in Tabriz area. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 2(50): 199-211. [In Persian]
- Tabatabaei, A. and Firuzi, R. (2009). Animal diseases due to bacteria. 1st ed., Iran: Tehran University Press, pp: 206-261.
- Zahraei-Salehi, T., Mahzoniae, M.R. and Ashrafi, A. (2006).To Detect invA gene in Salmonella serotypes by PCR. Journal of Veterinary Research, 61(2): 195-199.
- Zahraei-Salehi, T. and Saeedzadeh, A. (2005). Detection of invA gene in isolated salmonella from broilers by PCR method. International Journal of Poultry Science, 4(8): 557-579.

www.SID.ir