Archive of SID

ردیابی ژن های حدت و انتروتوکسین در سویه های *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از نمونه‌های گوشت و تخم مرغ با روش واکنش زنجیره پلیمراز چندگانه

تکتم خدادادی پور[1]، کیومرث امینی[2]، رزاق محمودی[3]*

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
۳. مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
***نویسنده مسئول:** *r.mahmodi@yahoo.com*

تاریخ دریافت : ۱۳۹٤/۹/۱٤ تاریخ پذیرش : ۱۳۹٤/۱۲/۱۵

چکیده

بیماری‌های منتقله از مواد غذایی یکی از جدی‌ترین معضلات دنیای امروزی بوده و به دلیل مصرف آب یا غذاهای آلوده در انسان بروز می‌نمایند. هدف از مطالعه حاضر، ردیابی ژن‌های حدت و انتروتوکسن در سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از نمونه‌های غذایی با روش واکنش زنجیره پلیمراز چندگانه می باشد. این مطالعه به صورت توصیفی- مقطعی و از ابتدا تا انتهای سال ۱۳۹۳ بر روی ۱۲۵۰ نمونه غیر تکراری غذایی شامل گوشت مرغ و تخم مرغ انجام گردید. روش واکنش زنجیره پلیمراز چند گانه به منظور شناسایی ژن های *Stn*، *sopB*، *slyA*، *spvc* و *Phop/Q* انجام شد. از تعداد ۶۰ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* به ترتیب از گوشت مرغ(۳۵ سویه، ۵۸/۳ درصد)، و تخم مرغ(۲۵ سویه، ۴۱/۶ درصد) بدست آمد. یافته‌های حاصل از مطالعه مولکولی برای شناسایی ژن های حدت نشان داد که تمامی ایزوله ها (۱۰۰ درصد) برای حضور ژن *spvC* منفی بودند. بیشترین و کمترین فراوانی متعلق به ژن های *Phop/Q* و *SopB* و برابر ۳۳/۳ درصد و ۱/۶ درصد می باشد. بررسی ژن های حدت و انتروتوکسین *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده در نمونه های غذایی از حضور ژن‌ها و کارایی روش واکنش زنجیره پلیمراز چندگانه در بررسی های اپیدمیولوژی و ارزیابی انتقال بین گونه‌ای این ژن ها در بین نمونه‌های غذایی می‌تواند مفید باشد.

واژگان کلیدی: ژن انتروتوکسین، ژن حدت، *سالمونلا انتریتیدیس*، مواد غذایی، Multiplex PCR..

مقدمه

عامل حدود ۴۰ درصد از تمامی مسمومیت های غذایی را به سالمونلاها نسبت می دهند. سالمونلاها باکتری-های میله‌ای کوتاه، گرم منفی، فاقد کپسول، متحرک با داشتن تار لرزان پیرامونی (به جزء *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پولوروم*)، بی‌هوازی اختیاری و رشد بهینه آن در ۳۷ درجه سلسیوس با pH=6-8 می‌باشد (Soltani et al., 2005). طبقه‌بندی این میکروارگانیسم‌ها پیچیده است زیرا بجای یک گونه مشخص، مجموعه ای از گونه‌های مختلف را تشکیل می‌دهند. اعضای جنس *سالمونلا* را می‌توان بر اساس اپیدمیولوژی، نوع میزبان، واکنش‌های بیوشیمیایی و ساختار آنتی ژن های O، H و Vi طبقه بندی می‌شوند. این باکتری‌های روده‌ای به سه گونه تقسیم می‌شوند که عبارت می‌شوند از؛ *سالمونلا تیفی*، *سالمونلا کلراسوییس* و *سالمونلا انتریکا* (Kumar et al., 2002). معمولا تمامی سروتیپ‌های سالمونلا برای انسان بیماری زا هستند، اما *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا *سروتیپ انتریتیدیس* که به اختصار به *سالمونلا انتریتیدیس* نیز معرف است، مهم ترین عامل در ابتلا به سالمونلوزیس منتقله از طریق غذا می باشد (Fluit et al., 2005). این بیماری بیشتر در ارتباط با مصرف گوشت، ماکیان، تخم مرغ و شیر است و بنابراین این ارگانیسم یک پاتوژن منتقله از طریق غذا[1]محسوب می شود (Kay et al., 2007). در

1. Food-borne pathogens

www.SID.ir

Archive of SID

ایران بیشترین مواد غذایی مسئول در انتقال سالمونلا تخم مرغ و گوشت مرغ می باشند (Shaigan et al., 2014). شایع ترین فرم بالینی سالمونلوزیس؛ گاستروانتریت بوده که با تب، کرامپ شکمی و اسهال همراه است (Jamshidi et al., 2009). از عوامل بیماریزایی سالمونلا می توان به زنده ماندن و تکثیر آن ها در درون ماکروفاژها اشاره کرد. همچنین وجود سیستم ترشحی تیپ III که در غشای خارجی ارگانیسم قرار دارد، در انتقال پروتئین های افکتور به درون سیتوزول سلول میزبان نقش دارد. هم چنین این باکتری در روده انتروتوکسین و سیتوتوکسین هایی را تولید می کند که برای سلول های میزبان آسیب زا هستند (Ngan et al., 2010). *سالمونلا* پس از بلع و عبور از معده می تواند به سلولهای M واقع در پلاک های پیر در بخش انتهایی رودۀ کوچک حمله نماید. این سلولها آنتی ژن های خارجی را جهت پاکسازی به ماکروفاژهای لایۀ زیرینی انتقال می دهند. دو نوع مجزا از سیستم ترشحی نوع III هستند. جزیرۀ بیماری زائی *سالمونلا* نوع SPI-1[1] واسطۀ تهاجم اولیه به مخاط روده و SPI-2 در ایجاد بیماری سیستمیک نقش دارند (Jones et al., 2007). *سالمونلا* دارای یک پلاسمید ویرولانس به نام *spv* می باشد که ژنهای بیماری‌زایی *pef*، *traT*، *rck* و *rsk* روی آن کد می شوند. سه ژن *traT*، *rck* و *rsk* در مقاومت سرمی و مقاومت به کمپلمان در باکتری نقش دارند. ژن *pef* در ارتباط با فیمبریه سالمونلا می باشد. پروتئین های *Sip* و *Sop* نیز توسط سیستم ترشحی تیپ ۳[2] (TSS III) باکتری ترشح می شود. چهار پروتئین اصلی Sip (A، B، C و D) توسط یک اپران پلی سیسترونیک منفرد کد می شوند که در مجاورت لوکوس *inv/ spa* قرار گرفته است. پروتئین های *SipB/C/D* در انتقال یکسری افکتور پروتئین به درون میزبان نقش دارند. ژن *SopE* در خارج از SPI-I قرار دارد و روی یک فاژ معتدل جای گرفته است که در همه سویه های *سالمونلا* وجود ندارد. پروتئین *SopE* از طریق مبادله نوکلئوتید گوانین روی Rho GTPase CDC42 و Rac در تحریک برهم زدن غشا سلول میزبان و در نتیجه تهاجم *سالمونلا* نقش دارد. *SipA* سبب ممانعت از دپلیمریزاسیون اکتین می شود (Espi et al., 2005). همچنین SIP-I با کد کردن پروتئینی به نام *phoP/phoQ* سبب حفاظت باکتری از دفنسین های فاگوسیتی دخیل در واکنش های کشتار غیر وابسته به اکسیژن می شود، بنابراین به بقای باکتری در ماکروفاژ کمک می کند. حداقل دو انتروتوکسین در سالمونلاهای مولد عفونت گوارشی تولید می شود. اولین انتروتوکسین یک پروتئین کوچک با وزن مولکولی ۳۰-۲۵ کیلودالتون بوده که با اتصال به گانگلیوزید GM1 سبب افزایش سطح مونوفسفات حلقوی (cAMP) و درنتیجه ترشح فراوان مایعات و الکترولیت ها می گردند. انتروتوکسین دوم بزرگتر بوده (۱۰۰ کیلودالتون) و از نظر ساختمانی و مکانیسم عمل غیر وابسته به توکسین اول می باشند(Prager et al., 1995). لذا، با توجه به شیوع بیماری گاستروانتریت در انسان و شیوع ۴۰ درصد از موارد گاستروانتریت سالمونلایی، هدف از مطالعه حاضر ردیابی ژنهای *Stn*، *sopB*، *slyA*، *spvc* و *Phop/Q* در سویه های *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از نمونه های غذایی به روش M-PCR می باشد.

مواد و روش کار

2. Salmonella Pathogen Island

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری و جداسازی باکتری

در این مطالعه توصیفی–مقطعی[1] که در طی یک بازه زمانی ۱۲ ماهه از ابتدای سال ۱۳۹۳ لغایت انتهای ۱۳۹۳ انجام شد تعداد ۱۲۵۰ نمونه غذایی مختلف اعم از گوشت مرغ و تخم مرغ (از هر نوع ۶۲۵ عدد) از مناطق مختلف شهر تهران جمع آوری شد. سپس تمامی نمونه ها در شرایط استریل و با استفاده از محیط راپاپورت به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شدند. به منظور جداسازی *سالمونلا* از نمونه‌های تحت مطالعه از دستورالعمل استفاده شده در مطالعات پیشین استفاده شد (نصرتی و همکاران، ۱۳۹۱). به طور خلاصه؛ پس از همگن کردن ۲۵ گرم از گوشت مرغ و انتقال به محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۶٪ عصاره مخمر (TSYEB[2]) حجم محیط را به ۲۲۵ میلی لیتر رسانیده و این محیط برای یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد. سپس یک میلی لیتر از محیط مذکور را به ۱۰ میلی لیتر تتراتیونات براث تلقیح کرده و طبق شرایط بالا انکوبه شدند. بدین منظور حدود ۵ الی ۱۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی براث حاوی عصاره مخمر حاوی نمونه را بر روی محیط XLD و کروم آگار سالمونلا کشت داده و کلنی های رشد یافته با استفاده از تست های روزمره و استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی مانند: TSI، اوره، سیمون سیترات آگار و MRVP تایید گردیدند. آزمون سروتایپینگ برای مشخص نمودن آنتی ژن های سوماتیک(O)، فلاژله(H) و کپسولی(Vi) با استفاده از آنتی سرم های پلی والان و مونو والان به روش آگلوتیناسیون اسلایدی تهیه شده از شرکت بهار افشان انجام گردید. از سویه رفرانس *سالمونلا انتریتیدیس* ATCC 13076 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Soto et al., 2005).

واکنش زنجیر های پلیمراز چندگانه

به منظور استخراج DNA ، تمامی جدایه ها به مدت یک شبانه روز بر روی محیط (TSB) تریپتیکاز سوی براث (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس، استخراج DNA ژنوم طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer، کره) انجام گردید. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. به منظور ردیابی ژنهای حدت و انتروتوکسین در سویه های *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از نمونه های غذایی با استفاده از روش M-PCR از توالی های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (جدول۱) (Sara et al., 2006). در نهایت، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/µl)، $MgCl_2$ (3 mM) و dNTPs (0.4mM)، ۰/۶ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۰/۷ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۱۲/۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) در مقایسه با سویه

1. Cross-sectional
2. Tryptone soy yeast extract broth

www.SID.ir

Archive of SID

استاندارد *سالمونلا انتریکا* زیر گروه انتریکا *سروار انتریتیدیس* ATCC 13076 به عنوان کنترل مثبت و پسودوموناس آئروژینوزا COL-1 به عنوان کنترل منفی الکتروفورز گردید (Soto et al., 2006).

جدول۱- ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده (Sara et al., 2006).

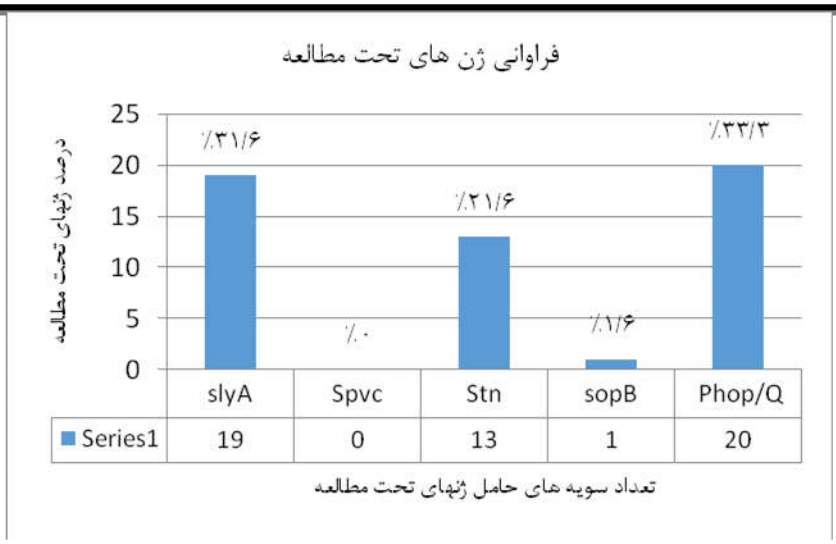
	ژن هدف	توالی پرایمر(5’ to 3’)	موقعیت ژنی و عملکرد	طول محصول (bp)
ژن عامل حدت	*slyA*	F=GCCAAAACTGAAGCTACAGGTG R=CGGCAGGTCAGCGTGTCGTGC	Transcriptional regulator	۷۰۰
	Spvc	F=ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA R=TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA	Virulence plasmid	۴۲۴
	Phop/Q	F=ATGCAAAGCCCGACCATGACG R=GTATCGACCACCACGATGGTT	Regulatory System	۲۹۹
	sopB	F=GATGTGATTAATGAAGAAATGCC R=GCAAACCATAAAAACTACACTCA	SPI5	۱۱۷۰
ژن کد کننده انتروتوکسین	*Stn*	F=TTAGGTTGATGCTTATGATGGACACCC R=CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG	Enterotoxin	۶۱۷

نتایج

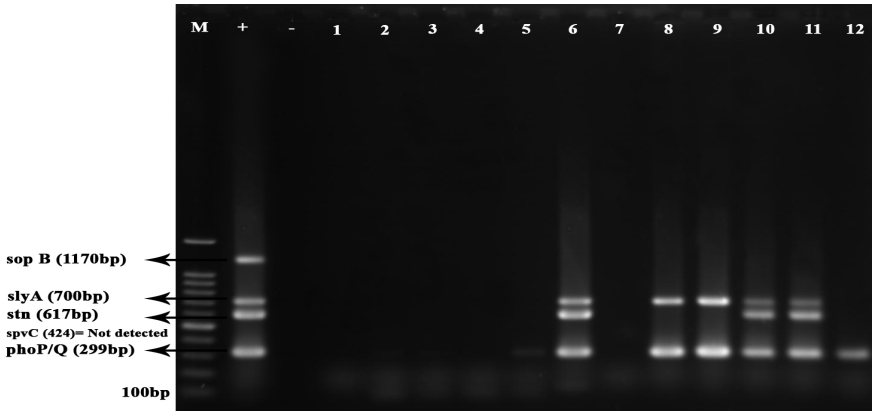
نتایج نشان داد که از مجموع نمونه های تحت مطالعه تعداد ۶۰ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* به ترتیب از گوشت مرغ (۳۵ سویه، ۵۸/۳ درصد)، و تخم مرغ (۲۵ سویه، ۴۱/۶ درصد) بدست آمد. همچنین مطالعه گروه های سرمی با استفاده از آنتی سرم سالمونلای تهیه شده از شرکت بهار افشان نشان داد که تمامی ۶۰ جدایه سالمونلای به دست آمده متعلق به گروه سرمی گروه D۱ یا *سالمونلا انتریتیدیس* بودند. یافته‌های حاصل از مطالعه مولکولی برای شناسایی ژن های حدت نشان داد که تمامی ایزوله ها (۱۰۰ درصد) برای حضور ژن *spvC* منفی بودند و بنابراین هیچ سویه‌ای ژن *spvC* را حمل نمی کرد. نتایج توزیع ژن های تحت مطالعه نشان داد که بیشترین فراوانی و کمترین متعلق به ژن *Phop/Q* و *SopB* و برابر ۳۳/۳ درصد و ۱/۶ درصد می باشد. نتایج مربوط به فراوانی ژن های تحت مطالعه در نمودار ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در نمودار ۱ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱- تعداد و درصد شیوع ژن های تحت مطالعه



تصویر ۱- نتیجه آزمایش PCR چند گانه بر روی تعدادی از جدایه ها به ترتیب: مارکر 100 bp (سیناژن، ایران)، C^+ کنترل مثبت (*سالمونلا انتریتیدیس* ATCC ۱۳۰۷۶)، C^-(پسودوموناس آئروژینوزا COL-1).

بحث

سالمونلوز یکی از مهمترین بیماریهای عفونی و مشترک است که گسترش جهانی دارد که در انسان به صورت بیماریهای متفاوتی ظاهر دو سروار شایع این باکتری در حیوانات و انسان شامل *سالمونلا انتریتیدیس* و *تیفی موریوم* می باشد (Ahmed et al., 2000). Pan و همکاران در سال ۲۰۰۲ در تایوان (Pan et al., 2002) نشان دادند که ۹۲ درصد (۲۶ سویه) از ۲۸ جدایه *سالمونلا انتریتیدیس* حامل ژن *spv* بودند که این میزان شیوع با مطالعه پیش رو همخوانی ندارد و این می تواند در نتیجه نوع نمونه و اختلاف مکانی مطالعات صورت گرفته باشد. پلاسمید حدت دارای اوپران *spv* بوده و عمل آن ایجاد حدت در باکتری می‌باشد. امکان از دست رفتن پلاسمید حدّت در طول زمان وجود دارد. Ling و همکاران جهت (Ling et al., 2009) جداسازی سریع سالمونلا و حضور ژن حدت *spvC* به صورت توأم با دو آغازگر *InvA* و *spvC* در نمونه ها با منشاء غذایی و محیطی از روش PCR چندگانه استفاده نمودند. از مجموع ۴۱۰ جدایه مربوط به ۵۸ سروار که طی سال های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ از نمونه های با منشاء مدفوع، غذا و آب در چین جدا گردیده بود در تمامی جدایه ها ژن *invA* را مشاهده کردند، اما فقط ۱۵ درصد نمونه‌ها واجد ژن *spvC* بودند. از مجموع

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌ها۱۰ درصد مربوط به سروارهای *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا دربی* بودند که حضور ژن *invA* و *spvC* به صورت توأم در *سالمونلا انتریتیدیس* ۹۰ درصد و در *سالمونلا تیفی موریوم* ۲۲ درصد و در *سالمونلا دربی* منفی گزارش شد. Amini و همکاران در سال ۲۰۱۰ (Amini et al., 2010) از روش مولتی پلکس PCR برای تعیین و شناسایی همزمان ژن های *invA* و *spvC* و از روش PCR ساده برای تعیین ژن های *spvA* و *spvB* در *سالمونلا انتریتیدیس* استفاده کردند. آنالیز نمونه ها نشان داد که ژنهای *spvA*، *spvB* و *spvC* در ۹۰ درصد از سوش های *سالمونلا انتریتیدس* جدا شده از منابع انسانی و ۱۰۰ درصد در گونه های جدا شده از منابع گاوی وجود دارد. در صورتی که در مطالعه ما این ژن در هیچ یک از نمونه ها شناسایی نگردید و این اختلاف می تواند در نتیجه تفاوت در نوع نمونه مورد مطالعه (نمونه بالینی انسان و نمونه دام در مقایسه با نمونه غذایی باشد). ژن های *stn* ،*slyA*, *phoP/Q* علیرغم اینکه در جزایر بیماریزای سالمونلا قرار نگرفته-اند، نقش مهمی در بیماریزایی این باکتری داشته و ترشح سالمولیزین از طریق تنظیم نسخه برداری ژن ها در داخل ماکروفاژها کد می‌شود. سالمولایزین که در واقع همولیزین یالمونلا می باشد توسط ژن *slyA* کد می شود (Nosrati et al., 2012 and Soto et al., 2006). به دلیل اینکه سالمونلا باکتری درون سلولی اختیاری است این امر کمک شایانی به بقای جرم در داخل سلول های اپی تلیوم روده می‌کند و عوامل حدت نیز در ایجاد بیماریهای سیستمیک به همین دلیل نقش بسزایی دارند (Rotger et al., 1999). سوتو و همکاران در سال ۲۰۰۶ (Soto et al., 2006) در تمامی۸۰ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از نمونه بالینی ژنهای *phoP/Q*، *slyA*، *stn*را ردیابی کردند. که این با شیوع بیماری ناشی از سالمونلا کاملاً مرتبط می باشد. این نتایج با نتایج مطالعه پیش رو کاملا مغایر است زیرا تمامی ایزوله ها (۱۰۰ درصد) از نظر وجود *spv* منفی بوده و این امر می تواند بیانگر غیرمهاجم شدن این باکتریها گردد. در مطالعه پیش رو بیشترین شیوع ژن‌های حدت مربوط به ژن *phoP/Q* بود که در مقایسه با مطالعه Ling و همکاران (Ling et al., 2009) در تحقیق حاضر نیز میزان شیوع ژن های *phoP/Q*، *slyA*، *stn* بیشتر بوده که کاملاً با منشا ایجاد آن و تولید توکسین باکتری در داخل روده مرتبط می باشد. در تحقیق حاضر از مجموع تمامی ۶۰ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* تعداد ۱۳ جدایه (۲۱٪/۶) دارای ژن *stn* بودند که با مطالعه موروکار و همکاران از هند همخوانی ندارد. این محققین در سال ۲۰۰۳ دریافتند که از ۸ سویه سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه های انسانی و دامی تمامی جدایه ها (۱۰۰٪) دارای ژن *stn* بودند که این اختلاف می تواند در نتیجه اختلاف جغرافیایی و منشا نمونه ها باشد(Murugkar et al., 2003).

نتیجه گیری

بررسی ژن‌های حدت و انتروتوکسین *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از نمونه‌های غذایی نشان داد که اولاً از حیث میزان حضور ژن‌ها و کارآیی روش PCR چندگانه در بررسی‌های اپیدمیولوژی و ثانیاً ارزیابی انتقال بین گونه‌ای این ژن‌ها بین نمونه‌های غذایی می-تواند مفید باشد. با توجه به مشکلات بهداشتی و درمانی زیاد و خسارات اقتصادی که این بیماری در سطح کشور هم در پزشکی و هم در حیطه دامپزشکی ایجاد می کند به نظر می‌رسد مطالعه و تحقیق در این رابطه می‌تواند در جهت پیشگیری از بیماری مفید باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

نگارنده این مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد جناب آقای مهندس ابوالفضل مقدم که در انجام مراحل عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد.

منابع

۱. . نصرتی ش, سبکبار آ, دزفولیان م, تبرایی ب, فلاح ف. بررسی شیوع سروتیپهای سالمونلا تیفی موریوم، تیفی و اینتریتیدیس در مواد غذایی در مرکز درمانی بیمارستان مفید. پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی). دوره ۳۶ ، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۴۳ تا ۴۸.

2. Soltani Banavandi, M.J., Shahhosseiny, M.H., shahbazzadeh, D., Karimi, V., Mirzahoseini, H., Mahboudi, F., Abachi, M., and Javadi, G. 2005. Selective Amplification of *prt*, *tyv* and *inv* A Genes by multiplex PCR for rapid detection of *salmonella typhi*, Iranian Biomed J. 9: 135-8.
3. Kumar, A., Arora, V., Bashamboo, A., and Ali, S. 2002. Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction: implications in diagnosis of typhoid fever. Infect Genet and Evol. 2: 107-10.
4. Fluit, A.C. 2005. Towards more virulent and antibiotic resistant Salmonella. Immunol Med Microbiol. 43: 1-11.
5. Kay, R.S., Vandevelde, A.G., Fiorella, P.D., Crouse, R., Blackmore, C., and Sanderson, R. 2007. Outbreak of health care –associated infection and colonization with multidrug –resistant *Salmonella enterica* serovar Senftenberg in Florida. Infect Control Hosp Epidemiol. 28: 805-811.
6. Shaigannia, S., Rostami, F., Safarpour dehkordi, F., Rahimi, E., Yahaghi, E., and Khodaverdi Darian, E. 2014. Isolation and Evaluation Virulence Factors of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* in Milk and Dairy Products. Iran J Med Microbiol. 8:54-61.
7. Jamshidi, A., Bassami, M.R., and Afshari-Nic, 2009. S. Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran**.** Int J Vet Res. 3: 43-48.
8. Ngan, GJ., Ng, L.M., Lin, R.T., and Teo, JW. 2010. Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of *Salmonella enterica* serovars *Typhi* and *Paratyphi* A. Res Microbiol. 161: 243-48.
9. Jones, M.A., Hulme, S.D., Barrow, P.A., and Wigley, P. 2007. The *Salmonella* Pathogenicity Island 1 and Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in the chicken. Avian Pathol. 36:199-203.
10. Espi, E., and Vaillant, V. 2005. International outbreak of *Salmonella* Stourbridge infection results of epidemiological food and veterinary investigations in France. Euro Surveill. 10:1-13.
11. Prager, R., Fruth, A., and Tschape, H. 1995. Salmonella enterotoxin (*stn*) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella*

www.SID.ir

Archive of SID

bongori and other Enterobacteriaceae. FEMS Immunol Med Microbiol. 12: 47–50.

12. Soto, S.M., Rodrıguez, I., Rosario Rodicio, M., and Vila, J. 2006. Carmen Mendoza. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* and mapping on macrorestriction profiles. Journal of Medical Microbiology. 55: 365-373.
13. Ahmed, R., Soule, G., and Demczuck, W.H. 2000. Epidemiologic typing of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. J Clin Microbiol. 38: 2403-2406.
14. Pan, T.M., and Liu, Y.J. 2002. Identification of *Salmonella Enteritidis* isolate by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microbiol Immuno Infect. 35: 147-151.
15. Ling, J.M.L. 2009. Rapid detection of food-borne pathogens in clinical specimens, food and environmental samples. Hong Kong Med J. 15: 26-29.
16. Amini, K., zahraei salehi, T., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., and Ashrafganjooei, S. 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. Afr J Microbiol. 4: 2002-2010.
17. Rotger, R., and Casadesu, S.J. 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. Int Microbiol. 2: 177-184.
18. MMurugkar, H.V., Rahman, H., and Dutta P.K. 2003. Distribution of virulence genes in Salmonella serovars isolated from man and animals. Indian J Med Res. 117; 66-70.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of virulence and enterotoxin genes in *Salmonella enteritidis* strains isolated from Meat and Egg samples by Multiplex-PCR

Toktam Khodadadipour [1], Kumarss Amini [2], Razzagh Mahmoudi [3]*

1. MSc. in Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.

2. Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

3. Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
***Corresponding author**: *r.mahmodi@yahoo.com*

Received: 5 March 2016 Accepted: 5 December 2015

Abstract

Today, food borne diseases are one of the most serious problems and occur as a result of consumption to contaminated food and water. The aim of the study was evaluation of virulence and enterotoxin genes in *Salmonella enteritidis* strains isolated from food samples by multiplex-PCR. This descriptive, cross-sectional study was performed at 2014 on the 1250 no duplicative and non-repetitive food samples. M-PCR assay was done in order to detection of *Stn*،*sopB*،*slyA*،*spvc* and *Phop/Q* genes. Sixty *Salmonella enteritidis* strains were obtained from poultry meat (35 strains, 58.3%) and eggs (25 strains, 41.6%), respectively. molecular analysis distribution showed all isolates (100%) were absence for *spvC* gene. The highest and lowest prevalence of the genes were related to *Phop/Q* and *SopB*, 33.3% and 1.6%, respectively. Evaluation of virulence genes and enterotoxin in the *Salmonella enteritidis* isolated from the food samples are useful because of presence of the genes and efficacy of M-PCR method in epidemiological investigation and assessment of intraspecies genes transfer in food samples.

Keywords: Enterotoxin gene, Multiplex Polymerase Chain Reaction, *Salmonella enteritidis*, Virulence gene.

www.SID.ir