

## ردیابی ژن های حدت و انتروتوکسین در سویه های سالمونلا انترتییدیس جدا شده از نمونه های گوشت و تخم مرغ با روش واکنش زنجیره پلیمرز چندگانه

تکتم خدادادی پورا<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲</sup>، رزاق محمودی<sup>۳\*</sup>

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 پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۴

### چکیده

بیماری های منتقله از مواد غذایی یکی از جدی ترین معضلات دنیای امروزی بوده و به دلیل مصرف آب یا غذاهای آلوده در انسان بروز می نمایند. هدف از مطالعه حاضر، ردیابی ژن های حدت و انتروتوکسین در سویه های سالمونلا انترتییدیس جدا شده از نمونه های غذایی با روش واکنش زنجیره پلیمرز 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 پلیمرز چند گانه به منظور شناسایی ژن های *spvC*، *slyA*، *sopB*، *Stn* و *Phop/Q* انجام شد. از تعداد ۶۰ سویه سالمونلا انترتییدیس به ترتیب از گوشت مرغ (۳۵ سویه، ۵۸/۳ درصد)، و تخم مرغ (۲۵ سویه، ۴۱/۶ درصد) بدست آمد. یافته های 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 انترتییدیس جدا شده در نمونه های غذایی از حضور ژن ها و کارایی روش واکنش زنجیره پلیمرز چندگانه در بررسی های اپیدمیولوژی و ارزیابی انتقال بین گونه های این ژن ها در بین نمونه های غذایی می تواند مفید باشد.

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

### مقدمه

روده ای به سه گونه تقسیم می شوند که عبارت می شوند از؛ سالمونلا تیفی، سالمونلا کلراسوییس و سالمونلا انتریکا (Kumar et al., 2002). معمولاً تمامی سروتیپ های سالمونلا برای انسان بیماری زا هستند، اما سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سروتیپ انترتییدیس که به اختصار به سالمونلا انترتییدیس 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 ارگانیزم یک پاتوژن منتقله از طریق غذا محسوب می شود (Kay et al., 2007). در

عامل حدود ۴۰ درصد از تمامی مسمومیت های غذایی را به سالمونلاها نسبت می دهند. سالمونلاها باکتری های میله ای کوتاه، گرم منفی، فاقد کپسول، متحرک با داشتن تار لرزان پیرامونی (به جزء سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پولوروم)، بی هوازی اختیاری و رشد بهینه آن در ۳۷ درجه سلسیوس با pH=6-8 می باشد (Soltani et al., 2005). طبقه بندی این میکروارگانیزم ها پیچیده است زیرا بجای یک گونه مشخص، مجموعه ای از گونه های مختلف را تشکیل می دهند. اعضای جنس سالمونلا را می توان بر اساس اپیدمیولوژی، نوع میزبان، واکنش های بیوشیمیایی و ساختار آنتی ژن های O، H و Vi طبقه بندی می شوند. این باکتری های

1. Food-borne pathogens

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 فاز 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 دپلمیریزاسیون اکتین می شود (Espi et al., 2005). همچنین *SIP-I* با کد کردن پروتئینی به نام *phoP/phoQ* سبب حفاظت باکتری از دفنسنین 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 در نتیجه 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

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 ترشخی تیپ III که در غشای خارجی ارگانیسیم 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 روده کوچک حمله نماید. این سلولها آنتی ژن های خارجی را جهت پاکسازی به ماکروفاژهای لایه زیرینی انتقال می دهند. دو نوع مجزا از سیستم ترشخی نوع III هستند. جزیره بیماری زائی سالمونلا نوع 1<sup>1</sup> *SPI-I* واسطه تهاجم اولیه به مخاط روده و *SPI-2* در ایجاد بیماری سیستمیک نقش دارند (Jones et al., 2007). سالمونلا دارای یک پلاسمید ویروانس به نام *spv* می باشد که ژنهای بیماریزایی *rsk* و *rck*، *traT*، *pef* روی آن کد می شوند. سه ژن *rsk* و *rck* 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 ترشخی تیپ 2<sup>3</sup> (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 *spa/inv* قرار گرفته

ATCC 13076 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Soto et al., 2005).

واکنش زنجیر های پلیمرز چندگانه به منظور استخراج DNA، تمامی جدایه ها به مدت یک شبانه روز بر روی محیط (TSB) تریپتیکاز سوی برات (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/نتریتیدی جدا شده از نمونه های غذایی با استفاده از روش M-PCR از توالی های اختصاصی الیگونوکلوئیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (جدول ۱) (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) 3 mM MgCl<sub>2</sub> 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 گرادیانته 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

جمع آوری و جداسازی باکتری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی<sup>۱</sup> 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 میکروبی شناسی منتقل شدند. به منظور جداسازی سالمونلا از نمونه های 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 برات حاوی ۰/۶ عصاره مخمر (TSYEB) حجم محیط را به ۲۲۵ میلی لیتر رسانیده و این محیط برای یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد. سپس یک میلی لیتر از محیط مذکور را به ۱۰ میلی لیتر تتراتیونات برات تلقیح کرده و طبق شرایط بالا انکوبه شدند. بدین منظور حدود ۵ الی ۱۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی برات 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/نتریتیدی

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

استاندارد سالمونلا انتریکا زیر گروه انتریکا سرووار / انتریتیدیس ATCC 13076 به عنوان کنترل مثبت  
و پسووموناس آئروژینوزا COL-1 به عنوان کنترل منفی الکتروفورز گردید (Soto et al., 2006).  
جدول ۱- ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده (Sara et al., 2006).

ژن هدف	توالی پرایمر (5' to 3')	موقعیت ژنی و عملکرد	طول محصول (bp)
<i>slyA</i>	F=GCCAAAAGTGAAGCTACAGGTG R=CGGCAGGTCAGCGTGTCGTGC	Transcriptional regulator	۷۰۰
<i>SpvC</i>	F=ACTCCTTGCACAACCAATGCGGA R=TGTCTTCTGCATTTCCGCCACCATCA	Virulence plasmid	۴۲۴
<i>Phop/Q</i>	F=ATGCAAAGCCCGACCATGACG R=GTATCGACCACCACGATGGTT	Regulatory System	۲۹۹
<i>sopB</i>	F=GATGTGATTAATGAAGAAATGCC R=GCAAACCATAAAAACTACACTCA	SPI5	۱۱۷۰
<i>Stn</i>	F=TTAGGTTGATGCTTATGATGGACACCC R=CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG	Enterotoxin	۶۱۷

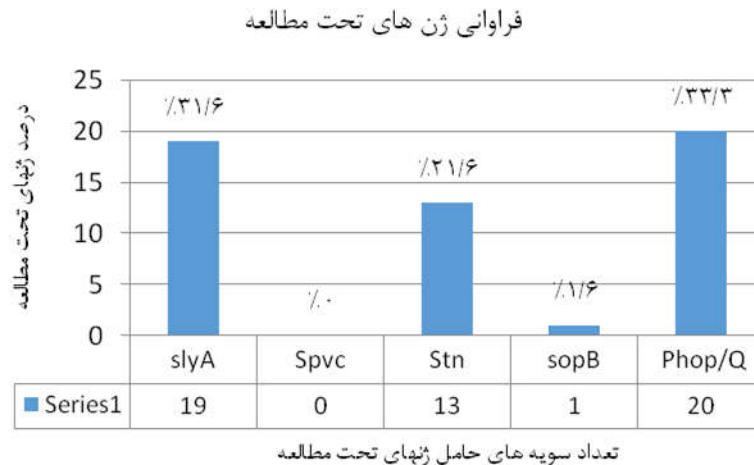
ژن عامل حدت

ژن کد کننده  
انتروتوکسین

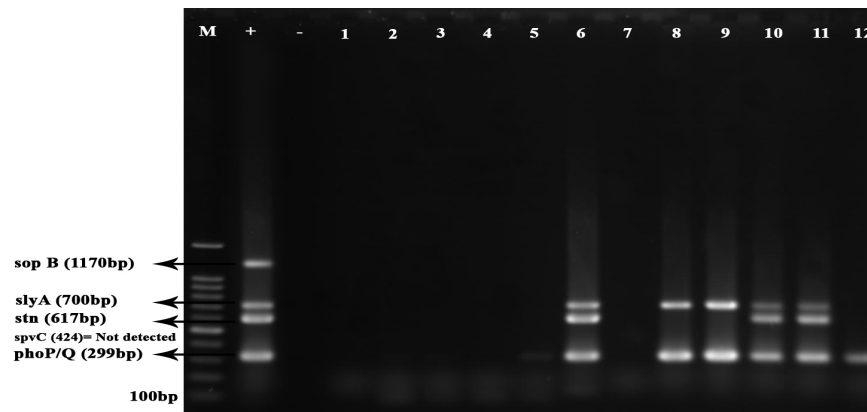
## نتایج

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.

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



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<sup>+</sup> کنترل مثبت (سالمونلا انتریتیدیس ۱۳۰۷۶ ATCC)، C<sup>-</sup> (پسودوموناس آئروژینوزا COL-1).

## بحث

بوده و عمل آن ایجاد حدت در باکتری می باشد. امکان دست رفتن پلاسمید حدت 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 سرووار 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 نمونه ها واجد ژن *spvC* بودند. از مجموع

سالمونلوز یکی از مهمترین بیماریهای عفونی و مشترک است که گسترش جهانی دارد که در انسان به صورت بیماریهای متفاوتی ظاهر دو سرووار 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*

شده از نمونه بالینی ژنهای *stn slyA, phoP/Q* را ردیابی کردند. که این با شیوع بیماری ناشی از سالمونلا کاملاً مرتبط می باشد. این نتایج با نتایج مطالعه پیش رو کاملاً 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 *stn slyA, phoP/Q* 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 نمونه های غذایی نشان داد که اولاً از حیث میزان حضور ژن ها و کارآیی روش PCR چندانکه در بررسی های اپیدمیولوژی و ثانیاً ارزیابی انتقال بین گونه ای این ژن ها بین نمونه های 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 می رسد مطالعه و تحقیق در این رابطه می تواند در جهت پیشگیری از بیماری مفید باشد.

جدایه ها ۱۰ درصد مربوط به سرووارهای 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 انتریتیدیس 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 می شود. 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 می کند 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 تمامی ۸۰ سویه سالمونلا انتریتیدیس جدا

جناب آقای مهندس ابوالفضل مقدم که در انجام مراحل

عملی این تحقیق یاری نمودند اعلام می‌دارد.

تشکر و قدردانی

نگارنده این مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد

### منابع

1. 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 در پزشکی (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., Vandavelde, 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
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*

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.
- bongori* and other Enterobacteriaceae. FEMS Immunol Med Microbiol. 12: 47-50.
12. Soto, S.M., Rodriguez, 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.



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

Toktam Khodadadipour <sup>1</sup>, Kumarss Amini <sup>2</sup>, Razzagh Mahmoudi <sup>3\*</sup>

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](mailto: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.