

“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.<sup>1</sup>, Anzabi, Y.<sup>2,3\*</sup>, Mahmazi, S.<sup>4</sup>

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 *invA* 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 *invA* 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 *spvA*, 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 *spvA*, C and R genes, but none of them had *spvB* 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 operon *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, *invA*, *spv*, PCR.

"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<sup>۱</sup>، یونس انزابی<sup>۲\*</sup>، ساناز مهمازی<sup>۳</sup>

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.

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

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

(دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۹/۷/۲۱)

### چکیده

امروزه برای شناسایی و تشخیص سروتیپ‌های سالمونلا در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی 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 *invA* و نیز شناسایی 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 پنی‌های سنتی عرضه‌شده در بازار مصرف تبریز جدا شده بود، تهیه گردید. ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *invA* 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 B.C.R و *spvA* بررسی شد. یافته‌ها اولاً نشان‌دهنده تائید مولکولی همه جدایه‌ها بود. ثانیاً همه ۴۰ جدایه مورد آزمایش دارای ۳ ژن C.R و *spvA* بوده ولی هیچ‌کدام از آن‌ها دارای ژن *spvB* 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 ۴ 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، *PCR spv invA*

## مقدمه

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 *spvA*، *spvB*، *spvC*، *spvD* و *spvR* می‌باشد (Nogradyn *et al.*, 2008; Ngan Ggy *et al.*, 2010). تاکنون حضور این ژن‌ها در غالب سروتیپ‌های تحت گونه I سالمونلا/انتریکا مثل سالمونلا تیغی‌موریوم، 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 (Hochmann *et al.*, 2006; Lihxh *et al.*, 2007; Mzurkiewicz *et al.*, 2008). در این اپرون ژن *spvR* یک فعال‌کننده رونویسی می‌باشد که جدا از ژن‌های ساختاری رونویسی، به پروموتورها 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،

جنس سالمونلا شامل باسیل‌های کوتاه گرم منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، فاقد اسپور و فاقد کپسول می‌باشد که غالباً به واسطه داشتن تازک‌های 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/انتریکا (*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 گاستروانتریت 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

مقاومت سرمی، رشد داخل سلولی و چسبندگی شده و همچنین موجب افزایش ظرفیت ماندگاری این باکتری در بافت‌های خارج روده‌ای در میزبان‌های عفونی می‌شوند، لذا سویه‌های فاقد این پلاسمید حدت، 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 عفونت‌های 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 جدا شده از عفونت‌های سیستمیک، معمولاً ژن‌های حدت *spv* را حمل می‌کنند و با توجه به بررسی‌های انجام شده نشان داده‌اند که سلول‌های T کمکی ( $CD4^+$ ) برای کنترل بیماری‌هایی که عامل آن سالمونلای *spv* مثبت می‌باشد، الزامی می‌باشند. بر این اساس تب تیفوئیدی سالمونلائی تفاوت‌های اساسی از نظر پاتوژنژ و ایمونولوژی با سندرم باکتری می‌غیرتیفوئیدی دارد. سالمونلا قادر به تکثیر در سلول‌های اپی‌تلیال روده بوده و پس از ۱۸-۲۴ 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 روش‌های 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 میکروبی‌شناسی در این خصوص، مورد مطالعه مقایسه‌ای قرار گیرد. با توجه به این‌که ژن کروموزومی *invA* 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 غذایی 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 می‌شوند، لذا مطالعه حاضر با هدف شناسایی سریع (بر اساس جستجوی ژن اختصاصی *invA*) 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 میکروبی‌شناسی 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 میکروبی‌شناسی دو بیمارستان اصلی دولتی شهر تبریز و تعداد ۲۰ جدایه سالمونلا نیز از نمونه‌های پنیر سنتی عرضه شده به بازار مصرف شهر تبریز از بخش بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی

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، سترات 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 تأیید هویت شدند، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس ساده (simplex PCR) با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *invA* (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 تأییدشده با ژن مذکور، از جفت پرایمرهای اختصاصی مربوطه (جدول ۲) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس چندگانه (multiplex PCR) استفاده گردید. همه پرایمرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر از شرکت SGB (Shanghai Generary Biotech co., Ltd) تهیه گردید.

واحد تبریز تحت شرایط استاندارد تهیه و با استفاده از ظروف و وسایل استریل به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی 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 ۸-۱۲ 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، سیمون-سترات آگار، لیزین آیرون آگار، آبگوشت متیل‌رد-وژس پرسکوئر (Methylred-Vogesproskauere broth) و نیز آزمایش ONPG (Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -Galactoside test) و

جدول ۱- مشخصات و ردیف پرایمرهای استفاده شده و محصول تکثیر یافته مربوط به ژن کروموزومی *invA*

منبع	اندازه محصول PCR (bp)	ردیف بازهای آلی نوکلوتیدهای پرایمرها (5'-3')	ژن هدف
Chaudhary <i>et al.</i> , 2015	۲۸۴	F: GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA R: TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	<i>invA</i>

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

منبع	اندازه محصول PCR (bp)	ردیف بازهای آلی نوکلوتیدهای پرایمرها (5'-3')	ژن هدف
Amini <i>et al.</i> , 2010	۳۱۰	F: CAG GTT CCT TCA GTA TCG CA R: TTT GGC CGG AAA TGG TCA GT	<i>spvR</i>
Amini <i>et al.</i> , 2010		F: GTCAGACCCGTAAACAGT R: GCACGCAGAGTACCCGCA	<i>spvA</i>
Amini <i>et al.</i> , 2010	۶۰۴	F: ACGCCTCAGCGATCCGCA R: GTACAACATCTCCGAGTA	<i>spvB</i>
Amini <i>et al.</i> , 2010	۱۰۶۳	F: ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA R: TGTCTTCTGCATTTGCCACCATCA	<i>spvC</i>
	۵۷۱		

۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۴۰۰ 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 ۴۰۰ میکرولیتر از بافر شماره ۲ شستشو اضافه گردید 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 ۶۵ درجه سلسیوس به تیوب‌ها اضافه شده و به مدت ۳-۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع حاصله در این مرحله DNA استخراج شده می‌باشد. لازم به ذکر است با توجه به این‌که برای انجام واکنش PCR حداقل به ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر از DNA‌های استخراج شده خالص نیاز وجود دارد، لذا برای تعیین کیفیت و کمیت آن‌ها از دستگاه نانودرآپ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

- مراحل استخراج DNA کروموزومی جدایه‌ها: بدین منظور با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی (CINNAPURE- Cat No:PR881613) ۴۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی استریل در تیوب‌های بزرگ نام‌گذاری شده، 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 ۴۰۰۰ 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 ۴۰۰ 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 به دست آمده به داخل میکروتیوب‌های فیلتردار استوانه‌ای شکل منتقل و به مدت ۱ دقیقه با سرعت

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 ۴ دقیقه دمای ۹۴ 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 ۴۰ ثانیه استفاده شد. بالاخره در سیکل آخر هم برای توسعه نهایی محصول آزمایش PCR از همان دما در مدت ۷ دقیقه استفاده گردید.

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

- مراحل استخراج DNA پلاسمیدی جدایه‌ها: با توجه به این که 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 به صورت مولکولی و بر اساس بررسی حضور ژن اختصاصی *invA* تأیید 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 ارائه شده

جدول ۳- ترکیبات مورد استفاده در واکنش simplex PCR

مقدار مورد استفاده	نام ترکیب
۵ میکرولیتر	10X PCR بافر
۳۴/۶ میکرولیتر	آب مقطر دوبار تقطیر استریل دیونیزه
۱/۵ میکرولیتر	کلرید منیزیم
۱ میکرولیتر	پرایمر جلورونده
۱ میکرولیتر	پرایمر معکوس
۰/۵ میکرولیتر	مخلوط بازهای آلی سه‌فسفاته
۰/۴ میکرولیتر	آنزیم DNA پلی‌مراز
۶ میکرولیتر	DNA کروموزومی الگو

دقیقه با انجام ۳۵ چرخه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه، عمل بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

- آزمایش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (multiplex-PCR) برای بررسی حضور ژن‌های اپرون *spv* با استفاده از ترکیبات ارائه شده در جدول ۴، در طی برنامه multiplex PCR عمل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و واسرشته‌سازی اصلی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱

جدول ۴- ترکیبات مورد استفاده در واکنش multiplex PCR

مقدار مورد استفاده	نام ترکیب
مستر میکس	۱۲/۵ میکرولیتر
آب مقطر دوبار تقطیر استریل دیونیزه	۹/۵ میکرولیتر
کلرید منیزیم	۰/۸ میکرولیتر
آنزیم DNA پلی‌مراز	۰/۴ میکرولیتر
پرایمر جلورونده	۰/۴ میکرولیتر بطور جداگانه از هر یک از ۴ پرایمر
پرایمر معکوس	۰/۴ میکرولیتر بطور جداگانه از هر یک از ۴ پرایمر
DNA پلاسمیدی الگو	۱ میکرولیتر

### یافته‌ها

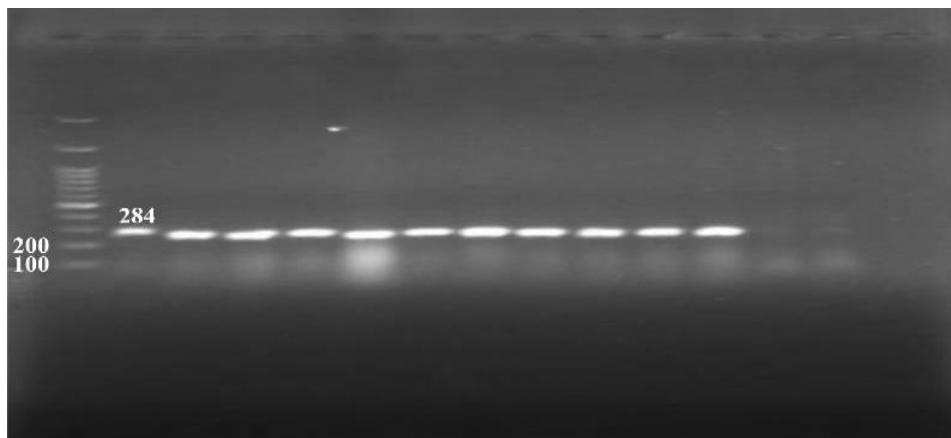
در مطالعه حاضر، با استفاده از روش کشت میکروبی سنتی متداول، هر ۴۰ جدایه سالمونلای مربوط به نمونه‌های اخذ شده بیمارستانی و نمونه‌های پنیر - سنتی، تائید هویت فنوتیپی شدند. همچنین با استفاده از روش PCR ساده و بر مبنای جستجوی حضور ژن *invA* تائید مولکولی نیز گردیدند (شکل ۱). همچنین با استفاده از آزمایش PCR چندگانه و بر مبنای جستجوی حضور ژن‌های حدت مربوط به اپرون *spv* همه جدایه‌های 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 *svpA*، *svpC* و *svpR* حضور داشتند، در حالی که در هیچ‌یک از نمونه‌های ذکر شده، ژن *svpB* مشاهده نگردید. همچنین از نظر آماری هم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

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.

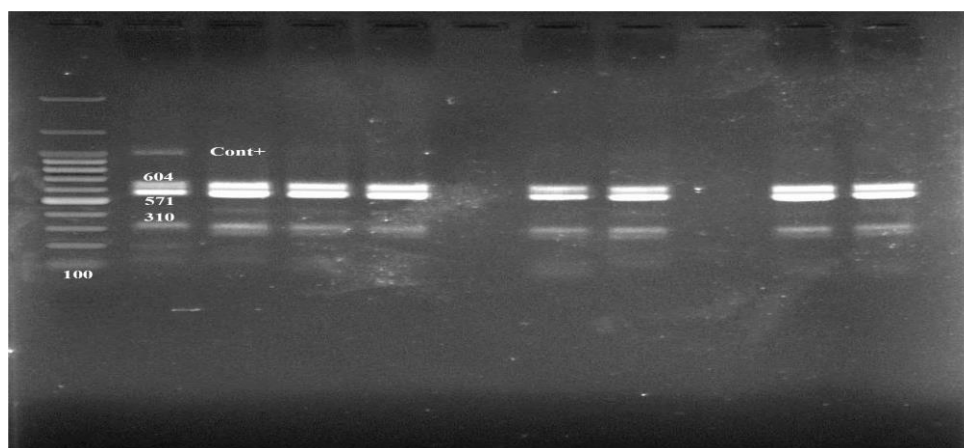
لازم به ذکر است که در مراحل مختلف مطالعه حاضر از سویه استاندارد باکتری (ATCC: 9270) *Salmonella enterica* به عنوان کنترل مثبت و نیز از سویه استاندارد باکتری (ATCC: 25922) *Escherichia coli* به عنوان کنترل منفی که هر دو از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده بود، استفاده شد.

- تحلیل آماری داده‌ها: یافته‌های حاصله به شکل 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  $p < 0/05$  استفاده گردید.





شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز شده محصولات simplex PCR در مورد جدایه های سالمونلا که همگی بانندی به اندازه 284bp که مربوط به حضور ژن اختصاصی *invA* هست را نشان می دهند. چاهک ۲ مربوط به کنترل مثبت و چاهک انتهایی مربوط به کنترل منفی است. سایز مارکر مورد استفاده از نوع smobio (1Kb) DNA ladder می باشد.



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز شده محصولات multiplex PCR در مورد جدایه های سالمونلا که در آن باندهای اختصاصی مربوط به همه ژن های مورد نظر بجز ژن *spvB* مشاهده می شود. اندازه ژن های *spvA*، *spvB*، *spvC* و *spvR* به ترتیب ۶۰۴، ۵۷۱، ۳۱۰ و ۱۰۶۳ bp می باشد. چاهک شماره ۲ مربوط به کنترل مثبت بوده و سایز مارکر مورد استفاده در چاهک ۱ از نوع smobio (1Kb) DNA ladder می باشد.

## بحث و نتیجه گیری

استفاده از روش PCR باکتری سالمونلا را در نمونه های غذایی ردیابی کرده و حساسیت ۱۰۰ درصدی را برای آن گزارش نموده اند (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. یافته های نامبرده نشان داد که صحت و حساسیت این روش در

استفاده از روش مولکولی PCR بر اساس ردیابی قطعات ژنوم باکتری ها، حساسیت و ویژگی فوق العاده و سرعت بالایی را برای تشخیص آن ها فراهم نموده، به طوری که با این روش می توان 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

شده PCR بر اساس جستجوی ژن *invA*، 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 *invA* (ژن عمومی در همه سروتیپ‌های سالمونلا/ایتتریکا) و با استفاده از روش PCR simplex و مشاهده باندهای با اندازه ۲۸۴ bp در ژل الکتروفورز شده محصول PCR مذکور، قادر به تشخیص بسیار سریع و دقیق حضور باکتری سالمونلا در جدایه‌های انسانی و جدایه‌های مواد غذایی با منشأ دامی شدیم. ضمن این‌که در مورد نمونه مربوط به باکتری بیماری‌زای/شریشیا کولای که به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد، در ژل مذکور، هیچ باندهای تولید نشد. در واقع این یافته با گزارشات متعدد گذشته که ژن *invA* 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/ایتتریکا 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 تأیید کرد. اهمیت یافته اخیر زمانی بیشتر مشخص می‌شود که توجه داشته باشیم که سالمونلا یکی از باکتری‌های بیماری‌زای مهم در انسان می‌باشد و سرعت تشخیص و به عبارت دقیق‌تر، عامل زمان برای پیشگیری از فاجعه در حال وقوع ناشی از همه‌گیری سالمونلوزیس فاکتور بسیار مهمی است و می‌تواند

مقایسه با روش متداول کشت بالاتر بوده است (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 شناسایی 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 ۴۰ جدایه سالمونلا با استفاده از روش PCR ساده تأیید 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 نمونه‌های مختلف انسانی و مواد غذایی با منشأ دامی را نشان نمی‌دهد. در این ارتباط در سال ۲۰۰۷ اریکسون و اسپان سه روش کشت، الیزا 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 تأثیر نوع سالمونلای موجود و ترکیب بستری است که سالمونلا در آن قرار دارد (Erikson and Aspan, 2007). البته در عین حال نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش مولکولی بهینه‌سازی-

سالمونلاها در آزمایشات مربوط به مدل حیوانی می‌گردد. همچنین مشخص شده با این که ژن‌های *spvB* و *spvA* نقش تعیین کننده‌ای در این اپرون بازی می‌نمایند، ولی عامل حدت را بیشتر به ژن‌های *spvC* و *spvR* نسبت داده‌اند ( Nikbakht and Tadjbakhsh, 2004). نظر براین که در تحقیق حاضر حضور هر دو ژن مذکور در همه جدایه‌های مورد مطالعه سالمونلا مشاهده شد، لذا بازم یافته‌ای مهم و البته با پیش آگهی بد تلقی می‌شود چرا که تجزیه و تحلیل اپرون *spv* نشان داده که مخصوصاً *spvR*، یک ژن حدت ضروری است و فقط جدایه‌های بدون *spvR* سالمونلاها می‌توانند 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، ۶۸ 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 *spvA*، *spvB* و *spvC* هم برابر با ۸۸/۶ 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 *spvB* مشاهده نشد و ثانیاً حضور ۳ ژن *spvA*، *spvC* و *spvR* هم با فراوانی ۱۰۰ درصد ملاحظه شد. در مطالعه‌ای که اولیویرا و همکاران در سال ۲۰۰۳ در برزیل در مورد حضور ژن‌های *invA*

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 ۴۰ 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 *spvR* در همه جدایه‌های سالمونلا یافته‌ای با پیش آگهی 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 غذایی 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، به طوری - 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 برنامه‌ریزی شده 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

جداشده از منابع انسانی و ۱۰۰ درصد از سویه‌های جدا شده از منابع گاو وجود دارد ( de Oliveira et al., 2003). در صورتی که در مطالعه ما ژن‌های *spvA*، *spvC* و *spvR* در ۱۰۰ درصد از جدایه‌های سالمونلا مشاهده گردید در حالی که ژن *spvB* در هیچ‌یک از جدایه‌های مذکور وجود نداشت. به نظر می‌رسد همان‌گونه که تحقیق نیکبخت و تاجبخش برای اولین بار عدم حضور ژن *spvR* را در برخی از سروتیپ‌های سالمونلا نشان داده‌است، نتایج پژوهش حاضر نیز برای اولین بار عدم حضور ژن *spvB* را در همه جدایه‌های بررسی شده سالمونلا با منشأ انسانی و مواد غذایی 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 مشاهده شده بین نتایج پژوهش حاضر با نتایج تحقیقات مذکور می‌تواند بدلیل تفاوت در نوع نمونه‌های مورد مطالعه (نمونه‌های بالینی انسان و نمونه‌های مواد غذایی 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 حدت 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 می‌تواند 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 ضد میکروبی در درمان انسان و حیوان در

*spvC* و *spvR* در سالمونلاهای جدا شده از منابع مختلف انجام دادند، دریافتند که ژن *invA* در سالمونلا/نتریتیدیس جدا شده از همه منابع مورد بررسی شامل طیور، خوک، انسان و مواد غذایی یافت می‌گردد، اما فراوانی ژن‌های *spvR* و *spvC* به ترتیب ۹۱/۲ و ۹۰/۲ درصد بوده است (Oliveira et al., 2003). نتایج این پژوهش هم در مورد حضور ژن *invA* با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی و اما در مورد فراوانی ژن‌های حدت *spvR* و *spvC* تا حدودی عدم همخوانی نشان می‌دهد. از طرف دیگر نتایج بررسی حاضر نشان داد که ژن‌های کروموزومی *invA* و پلاسمیدی *spvR* 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، به طوری که نامبردگان در بررسی که بر روی ۱۰۰۱ نمونه گوشت مرغ کشتارگاهی در استان کرمان انجام دادند، گزارش کردند که ۶/۷۹ درصد از نمونه‌ها از نظر حضور باکتری سالمونلا مثبت بودند. همچنین آن‌ها نشان دادند که فراوانی ژن‌های *invA* و *spvR* به ترتیب ۱۰۰ و ۸۸/۰۶ 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 ۴۰ جدایه مربوط به ۵۸ نوع سرووار سالمونلا که طی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ از نمونه‌های مدفوع، غذا و آب جدا گردیده بود، در تمامی جدایه‌ها ژن *invA* مشاهده گردید. از طرف دیگر آنالیز نمونه‌های مذکور هم نشان داد که ژن‌های *spvA*، *spvB* و *spvC* در ۹۰ درصد از سویه‌های

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 کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان می‌باشد. بدین وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی این دانشگاه کمال تشکر را داریم.

### تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع ندارند.

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 *invA* 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 پنی‌های 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

### منابع

- Ahmadi, A., Ghorbanali Zadehan, 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.

- 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 techniques for detection of salmonella 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., Japison, 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.

- 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.