

بررسی وجود فاکتورهای ویروالانس در سالمونلا انتريتيديس جدا شده از نمونه‌های غذایی به روش Multiplex-PCR

صدیقه میرزاده^۱، رزاق محمودی^{۲*}، کیومرث امینی^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران.

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۳ / پاییز ۹۵ / مسلسل ۶۹

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۶/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۵/۷/۳

*** مقدمه:** سالمونلا انتريکا سروتايب انتريتيديس يکي از مهم ترين عوامل مسبب سالمونلوزيس غير تيفوئيدی می باشد که از نظر بالینی شدت کمتری نسبت به تب تيفوئیدی دارد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژن های ویروالانس در سویه های سالمونلا انتريتيديس جدا شده از نمونه های غذایی به روش Multiplex-PCR می باشد.

*** مواد و روش ها:** این مطالعه توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۳ بر روی ۱۲۵۰ نمونه غیر تکراری غذایی انجام گردید. روش PCR چندگانه به منظور شناسایی ژن های *aggA* و *spi4D*، *mgtC*، *ttrC*، *invA* انجام شد.

*** یافته ها:** در مجموع تعداد ۶۰ سویه سالمونلا انتريتيديس به ترتيب ۳۷ سویه از گوشت مرغ (۶۱/۶٪) و ۲۳ سویه از تخم مرغ (۳۸/۴٪) بدست آمد. بیشترین و کمترین فراوانی متعلق به ژن های *mgtC* و *spi4D* و برابر ۵۱/۶٪ و ۱/۳٪ می باشد.

*** بحث و نتیجه گیری:** بررسی ژن های حدت در سالمونلا انتريتيديس جدا شده در نمونه های غذایی به دلیل فراوانی شاخص های ویروالانس و کارایی روش M-PCR در بررسی های اپیدمیولوژی و ارزیابی انتقال بین گونه ای این ژن ها در بین نمونه های مختلف می تواند مفید باشد.

*** واژه های کلیدی:** سالمونلا انتريتيديس، مواد غذایی، ژن های حدت، Multiplex PCR.

*آدرس مکاتبه: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی.

پست الکترونیک: r.mahmodi@yahoo.com

مقدمه

ارگاناسم‌های جنس سالمونلا یکی از عوامل مهم در ایجاد بیماری‌های عفونی منتقله از طریق مواد غذایی (Food-Borne Pathogens) در سراسر دنیا محسوب می‌شود (۱). مواد غذایی با منشأ حیوانی از قبیل تخم مرغ و گوشت مرغ و گاو منابع مناسبی برای رشد سالمونلاها به حساب می‌آیند (۲). این ارگاناسم‌ها به شکل باسیل‌های کوتاه، گرم منفی، فاقد کپسول و اسپور، دارای فلاژل پیرامونی (به جز سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پولوروم)، متحرک و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد (۳). به طور کلی اعضای این جنس را می‌توان بر اساس اپیدمیولوژی، نوع میزبان، واکنش‌های بیوشیمیایی و ساختار آنتی ژن‌های O، H و Vi طبقه بندی نمود و بر این اساس به سه گونه سالمونلا تیفی، سالمونلا کلراسوییس و سالمونلا انتریکا تقسیم می‌شوند که تمامی سروتیپ‌ها برای انسان بیماری‌زا می‌باشند، اما سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم و سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس از مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی برای انسان و حیوان در جهان به شمار می‌روند (۴،۵). گاستروانتریت شایع‌ترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی است که توسط این دو سروتیپ ایجاد می‌گردد و با تب، دردهای ماهیچه‌ای شکمی و اسهال همراه است (۶). از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی سالمونلا می‌توان به زنده ماندن و تکثیر آن‌ها در درون ماکروفاژها اشاره کرد. همچنین، سیستم ترشحی تیپ III (T3SS) در انتقال پروتئین‌های افکتور (Effector Proteins) به درون سیتوزول سلول هدف نقش دارد (۷). همچنین، این دو سروتیپ حاوی پلاسمیدهای حدت می‌باشند. از جمله ژن‌های ویروالانس می‌توان به *invE/A*، *atrC*، *mgtC*، *spi4D* و *agfA* در جنس سالمونلا اشاره کرد (۸). این ژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌نمایند که در مقابله با سیستم ایمنی، کمپلمان و مرگ داخل سلول نقش دارند (۹). عنصر ژنتیکی مهم دیگری که نقش اساسی در پاتوژنز این دو باکتری ایفا می‌کنند جزایر پاتوژنیسیته سالمونلاها به نام SPIs می‌باشد

که واسطه تهاجم اولیه به مخاط روده است. همچنین SPI-I با کد کردن پروتئینی به نام *phoP/phoQ* سبب حفاظت باکتری از دفسین‌های فاگوسیتی دخیل در واکنش‌های کشتار غیر وابسته به اکسیژن می‌شود، بنابراین به بقای باکتری در ماکروفاژ کمک می‌کند (۱۰). هر کدام از ژن‌های SPI1 و SPI2 به‌طور جداگانه سبب کد شدن سیستم ترشحی تیپ ۳ (T3SS) می‌شوند که از نظر ساختار و عملکرد با هم متفاوت بوده و سبب انتقال افکتور پروتئین‌ها به درون سیتوزول سلول میزبان می‌شوند (۱۱). همچنین SPI3 برای بقای درون ماکروفاژ و رشد در شرایط کم Mg^{2+} در طول فاز سیستمیک ضروری است. ژن *mgtC* با کد کردن پروتئینی به نام *MgtC* در بقای ارگاناسم در شرایط کم Mg^{2+} و بقای درون ماکروفاژی لازم است و ممکن است در تنظیم پتانسیل غشا با فعال کردن پمپ Na^+/K^+ ATPase دخالت کند. SPI4 برای بقای درون ماکروفاژی و ترشح توکسین نقش دارد. مشابه SPI1، SPI5 نیز با پروسه انتروپاتوژنز، التهاب و ترشح کلراید مرتبط است (۱۲،۱۳). در اکثر سرووارهای سالمونلا، پلاسمیدی ویروالانس به نام پلاسمید V با اندازه مختلف و وابسته به نوع سرووار وجود دارد که از خانواده Incompatibility Group IncFII هستند. تمامی V پلاسمیدها یک ناحیه بسیار حفاظت شده ۸kb دارند که پنج ژن مختلف به نام‌های *spvRABCD* (Salmonella Plasmid) را حمل می‌کنند و مسئول رشد سریع و بقای سالمونلا در میزبان برای ایجاد عفونت سیستمیک هستند (۱۴). ژن‌های ویروالانس مستقر در این جزایر نقش بسیار مهمی در عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها دارند و در تهاجم سالمونلاها شرکت می‌کنند. مثلاً گروهی از ژن‌ها تحت عنوان *inv A/B/C/D* وجود دارند که در ورود سالمونلا به سلول‌های اپیتلیال نقش ایفا می‌کنند. این جزایر، هم از نظر اندازه و هم از نظر محتوای ژنی بسیار متفاوت به نظر می‌رسند و در انتقال ژن‌های ویروالانس و فاکتورهای مقاومتی در میان گونه‌های جنس سالمونلا اهمیت

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چند گانه

به منظور تکثیر ژن‌های *spi4D*, *mgtC*, *ttrC*, *invA* و *agfA* ابتدا تمامی جدایه‌ها به مدت یک شبانه روز بر روی محیط تریپتی کیس سوی براث (TSB) (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس، استخراج DNA ژنومی طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer، کره) انجام گردید. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad، USA) و $OD_{260/280\text{nm}}$ استفاده گردید. به منظور ردیابی فاکتورهای ویروالانس در سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های غذایی با استفاده از روش M-PCR از توالی‌های اختصاصی الیگونوکلوئیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (۱۷). در نهایت، واکنش M-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۶/۲ میکرولیتر Taq DNA PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی $dNTPs$ و 3 mM MgCl_2 ، $0.5\text{ U}/\mu\text{l}$ polymerase و 4 mM ، 0.7 mM میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت 0.8 mM میکرومولار، 0.7 mM میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و $4/6\text{ mM}$ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۲ سیکل به صورت زیر انجام گرفت. مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام گرفت. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیديوم بروماید ($0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$) در مقایسه با سویه استاندارد سالمونلا انتریکا زیر گروه انتریکا سرووار انتریتیدیس ATCC 13076 الکتروفورز گردید.

فوق العاده‌ای دارند (۱۵). لذا هدف از انجام این مطالعه شناسایی ژن‌های *agfA*, *spi4D*, *mgtC*, *ttrC*, *invA* در سویه‌های سالمونلا اینتریتیدیس بدست آمده از نمونه‌های مختلف غذایی با روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ایزولاسیون باکتری

در این مطالعه توصیفی- مقطعی که از ابتدا تا انتهای سال ۱۳۹۳ انجام شد، تعداد ۱۲۵۰ نمونه غذایی مختلف به صورت کاملاً تصادفی و شامل تخم مرغ و گوشت مرغ (از هر نوع ۶۲۵ عدد) از مناطق مختلف شهر تهران جمع آوری شد. سپس تمامی نمونه‌ها در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان منتقل شدند. به منظور جداسازی سالمونلا از نمونه‌های تحت مطالعه از دستورالعمل استفاده شده در مطالعات پیشین توسط نصرتی و همکاران استفاده شد (۱۶). به طور خلاصه پس از هموژنایز کردن ۲۵ گرم از گوشت مرغ و انتقال به محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۶٪ عصاره مخمر (TSYEB) حجم محیط را به ۲۲۵ میلی لیتر رسانیده و این محیط به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. سپس یک میلی لیتر از محیط مذکور را به ۱۰ میلی لیتر تتراتیونات براث (ساخت شرکت مرک، کشور آلمان) تلقیح کرده و طبق شرایط بالا انکوبه شدند. همچنین، پس از شستشوی پوسته تخم مرغ با استفاده از اتانول ۷۰٪ مانند مراحل بالا اقدام شد. بدین منظور حدود ۵ الی ۱۰ میکرولیتر از محیط TSYEB حاوی نمونه را بر روی محیط XLD کشت داده و کلنی‌های رشد یافته با استفاده از تست‌های روزمره و استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی از جمله TSI، اوره، سیمون سیترات آگار و MRVP تأیید گردیدند. آزمون سروتاپینگ برای مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های سوماتیک (O)، فلاژله (H) و کپسولی (Vi) با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی والان و مونو والان به روش آگلوتیناسیون اسلایدی انجام گردید. از سویه رفرانس

جدول ۱. توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای به کار رفته در این

مطالعه

طول قطعه مورد نظر (bp)	توالی پرایمر (۳' ۵')	قطعه ژنی مورد نظر
۵۰۰	InvE/A F=5 - GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3 R =5-CCAAACYACTASGTTATCT-3	InvE/A
۹۲۰	ttrC F=5 -GATGGTGTGGTTCGCATA-3 R=5 -CGAATGCGCAGCACCAG-3	ttrC
۶۵۵	mgtC F=5 -AAAATCTGGGTACGCAAACG-3 R=5 -ACATTATCCGCTGGAACAGG-3	mgtC
۱۲۶۹	Spi4D F=5 -TCGACACACCTTGGTCTGAA-3 R=5 -AACTTCCAACCTTGCCATGC-3	Spi4D
۲۶۱	agfA F=5 -TACAAGGGATTCCGCATCG-3 R=5 -TAATGGCCTGTCCCATGTG-3	agfA

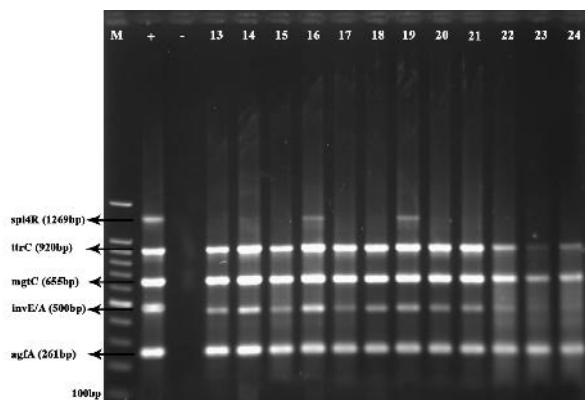
یافته‌ها

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از مجموع نمونه‌های تحت مطالعه تعداد ۶۰ سویه سالمونلا انتریتیدیس ۳۷ سویه از گوشت مرغ (۶۱/۶٪) و ۲۳ سویه از تخم مرغ (۳۸/۴٪) بدست آمد. همچنین مطالعه گروه‌های سرمی با استفاده از آنتی سرم سالمونلای تهیه شده از شرکت بهار افشان نشان داد که تمامی ۶۰ جدایه سالمونلای بدست آمده متعلق به گروه سرمی D1 یا سالمونلا انتریتیدیس بودند. یافته‌های حاصل از مطالعه مولکولی برای شناسایی ژن‌های ویروالانس مشخص نمود که تنها ۲ ایزوله (۳/۳۳٪) حامل ژن spi4D بودند. این نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین فراوانی توزیع ژن‌های ویروالانس متعلق به ژن mgtC (۵۱/۶٪) و spi4D (۳/۳٪) می‌باشد. نتایج مربوط به فراوانی ژن‌های تحت مطالعه در جدول ۱ و یافته‌های حاصل از الکتروفورز محصولات M-PCR در تصویر ۱ نشان داده شده است.

جدول ۲. تعداد و درصد عوامل حدت در ۶۰ سویه سالمونلا

انتریتیدیس تحت بررسی

فراوانی (%) فاکتورهای ویروالانس تحت بررسی	invA	ttrC	mgtC	spi4D	agfA
۲۱ (۳۵٪)	۲۹ (۴۸٪)	۳۱ (۵۱٪)	۲ (۳٪)	۲۴ (۴۰٪)	



تصویر ۱. نتیجه آزمایش PCR چند گانه بر روی تعدادی از سویه‌ها. M: DNA مارکر ۱۰۰ bp (سیناژن، ایران)، C+: کنترل مثبت (سالمونلا انتریتیدیس ۱۳۰۷۶ ATCC)، C-: کنترل منفی (اشریشیا کلی 25922 ATCC)

بحث و نتیجه گیری

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی است که گسترش جهانی دارد و در انسان و گونه‌های مختلف حیوانات به اشکال مختلفی ظاهر می‌گردد. هرساله در سراسر دنیا، ۱/۳ بلیون مورد عفونت روده‌ای همراه با اسهال ناشی از سالمونلاهای غیرتیفوئیدی که منجر به ۳ میلیون مرگ شده است و نیز ۱۶/۶ میلیون مورد تب تیفوئیدی که نزدیک به ۶۰۰ هزار کشته را به همراه داشته گزارش می‌شود (۱۸). در مطالعه حاضر بیشترین و کمترین فراوانی ژن‌های ویروالانس تحت مطالعه به ترتیب متعلق به ژن mgtC و spi4D به ترتیب برابر با ۵۱/۶٪ و ۳/۳٪ می‌باشد. همچنین، میزان فراوانی invA و ttrC به ترتیب ۳۵٪ و ۴۸/۳٪ گزارش شده که میزان آن با نتایج سایر محققین متفاوت می‌باشد (۱۹). علت این امر می‌تواند ناشی از نوع نمونه مواد غذایی در برابر سایر نمونه‌ها و منبع آن باشد. ماتسوی و همکاران (۲۰) در ژاپن با تحقیقی که بر روی موش‌ها انجام دادند عنوان کردند که در عفونت‌های سیستمیک سالمونلا تیفی موریوم ژن‌های مسئول ویروالانس یا پلاسמיד ویروالانس باعث تکثیر و افزایش باکتری‌ها در سیستم ریکولو اندوتلیال و ماکروفاژهای حیوان می‌گردد. حذف ژن‌های ttrC باعث

کاهش میزان حدت گردید. به‌وسیله موتاسیون در ژن‌های سکانس *ttrC* صفت ایجاد حدت به‌وسیله این پلاسمیدها در سالمونلا تیفی موریوم به اثبات رسید. آلفونس و همکاران (۲۱) سن، ژنتیک و محیط را فاکتورهای اصلی در میزان حدت باکتری بر اساس نوع میزبان و نوع باکتری دانستند. پلاسمیدهای حدت و یا ژن‌های دخیل در ویروالانس به‌طور مستقیم در واکنش بین میزبان- باکتری دخالتی ندارند اما اغلب این ژن‌ها پروتئین‌هایی به نام افکتور پروتئین را کد می‌نمایند که در واکنش بین میزبان و باکتری دخالت می‌نمایند و این پروتئین‌های تأثیر گذار نقش مهمی در بقا و تکثیر سالمونلا دارند. نیکبخت و همکاران (۲۲) به بررسی حضور ژن *spi4D* در سالمونلاها با روش PCR ساده بر روی سروتیپ‌های متفاوت سالمونلا پرداختند و عنوان گردید که از این ژن می‌توان در شناسایی سویه‌های مختلف سالمونلا استفاده شود که این یافته با مطالعه حاضر مغایرت دارد و این اختلاف می‌تواند در نتیجه نوع نمونه باشد. حسینی و همکاران (۲۳) در پژوهشی به‌عنوان شناسایی ژن‌های *invA*، *ttrC*، *mgfC* و *agfA* در سالمونلا انتریتیدیس دریافتند که ژن‌های *ttrC* و *mgfC* در ۹۰٪ از سویه‌های جدا شده از منابع انسانی و ۱۰۰٪ در گونه‌های جدا شده از منابع گاوی وجود دارد. مقایسه نتیجه مطالعه آنها با تحقیق حاضر در ارتباط با میزان شیوع ژن‌های *ttrC*، *mgfC* و ژن *invA* نشان می‌دهد که این ژن‌ها دارای درصد بالایی بوده ولی از نظر میزان فراوانی ارقام متفاوت دارند که می‌تواند ناشی از نوع نمونه (نمونه بالینی و دامی در مقایسه با نمونه غذایی) باشد؛ بنابراین می‌توان استنباط کرد که سویه‌های منتقله از طریق غذا دارای فاکتورهای حدت کمتر و بنابراین پاتوژنیسیته کمتری در مقایسه با سویه‌های بدست آمده از نمونه بالینی می‌باشند. سوی و همکاران (۲۴) با مطالعه بر روی ایزوله‌های سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از بچه خوک‌های دارای اسهال نشان دادند که همه ایزوله‌ها دارای ژن *invA* هستند

و فقط ۱۴٪ از ایزوله‌ها دارای ژن *ttrC* می‌باشند. اولیویرا و همکاران (۲۵) نشان دادند که تمامی ۱۰۲ سویه سالمونلا انتریتیدیس مورد مطالعه‌شان، حاوی ژن تهاجم *inv* بودند، ژن حدت *spvR* در ۹۱٪ و *spvC* در ۹۰٪ نمونه‌ها یافت شد. تجزیه و تحلیل اپران SPV نشان داد *spvR* ژن حدت ضروری است در حالی که *spvC* نقش جانبی دارد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت نمونه بدون ژن *spvR* غیر بیماریزا در حالی که در نبود ژن *spvC* بیماریزایی خفیف باشد. رنجبر و همکاران (۲۶) در تشخیص سریع سالمونلا تیفی به روش PCR با استفاده از ژن *invA* در نمونه‌های مواد غذایی، نشان دادند که روش مولکولی PCR بهینه شده، روشی مناسب جهت تشخیص سریع سویه‌های بیماریزای سالمونلا تیفی می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان روشی جایگزین برای روش‌های رایج و مرسوم به کار گرفته شود. ارزیابی ژن‌های پلاسمید ویروالانس در مورد نمونه‌های مواد غذایی، آب و خاک که از منابع بالقوه عفونت‌های سالمونلایی می‌باشند توصیه می‌گردد. جهت حصول نتایج بهتر و واضح‌تر به لحاظ گرفتن باندهایی با اندازه و قطرهای مساوی قبل از انجام آزمون PCR، از DNA استخراج شده اسپکتروفتومتری به عمل آید. با توجه به اینکه در ایجاد حدت بیماری علاوه بر ژن‌های پلاسمید حدت (*invA*) سایر ژن‌های دیگر نظیر *ttrC*، *mgfC*، *spi4D* و *agfA* دخالت دارند لازم است این ژن‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرند. توصیه می‌گردد که از روش M-PCR به‌منظور پایش اپیدمیولوژیک جدایه‌های باکتری استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و گروه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم و دکتر علیرضا مختاری جهت همکاری در انجام طرح تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(6): 882-889.
2. Bhattacharya SS, Das U, Choudhury BK. Occurrence & antibiogram of *Salmonella* Typhi & *S. Paratyphi A* isolated from Rourkela, Orissa. *Indian J Med Res*. 2011; 133(4): 431-433.
3. Bernal-Bayard J, Ramos-Morales F. *Salmonella* Type III Secretion Effector SlrP Is an E3 Ubiquitin Ligase for Mammalian Thioredoxin. *J Biol Chem*. 2009; 284(40): 27587-27595.
4. Arena ET, Auweter SD, Antunes LCM, Vogl AW, Han J, Guttman JA, et al. The Deubiquitinase Activity of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Effector, SseL, Prevents Accumulation of Cellular Lipid Droplets. *Infect Immun*. 2011; 79(11): 4392-4400.
5. Cano DA, Martínez-Moya M, Pucciarelli MG, Groisman EA, Casadesús J, García-Del Portillo F. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Response Involved in Attenuation of Pathogen Intracellular Proliferation. *Infect Immun*. 2001; 69(10): 6463-6474.
6. Abrahams GL, Muller P, Hensel M. Functional dissection of SseF, a type III effector protein involved in positioning the salmonella-containing vacuole. *Traffic*. 2006; 7(8): 950-965.
7. Figueira R, Holden DW. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology*. 2012; 158: 1147-1161.
8. Shaigan Nia S, Rostami F, Safarpour dehkordi F, Rahimi E, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, et al. Isolation and Evaluation Virulence Factors of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* in Milk and Dairy Products. *Iran J Med Microbiol*. 2014; 8 (1): 54-61.
9. Dutta S, Das S, Mitra U, Jain P, Roy I, Ganguly SS, et al. Antimicrobial Resistance, Virulence Profiles and Molecular Subtypes of *Salmonella enterica* Serovars Typhi and Paratyphi A Blood Isolates from Kolkata, India during 2009-2013. *PLoS ONE*. 2014; 9(8): e101347.
10. Bueno SM, Santiviago CA, Murillo AA, Fuentes JA, Trombert AN, Rodas PI, et al. Precise Excision of the Large Pathogenicity Island, SPI7, in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *J Bacteriol*. 2004; 186(10): 3202-3213.
11. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect*. 2000; 2(2): 145-156.
12. Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest*. 2001; 107: 775-780.
13. Chang CC, Ou JT. Excess production of interleukin-12 subunit p40 stimulated by the virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the early phase of infection in the mouse. *Microb Pathog*. 2002; 32(1): 15-25.

14. Seth-Smith HMB. SPI-7: Salmonella's Vi-encoding pathogenicity island. *J Infect Dev Ctries*. 2008; 2: 267-271.
15. Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294: 95-102.
16. Nosrati S, Azar S, Dezfoulan M, Tabaraee B, Fallah F. Prevalence of Salmonella typhimurium, enteritidis typhimurium serotypes in the foods in Mofid children's Hospital. *Res in Med*. 2012; 36: 43-48. (In Persian)
17. Clements M, Eriksson S, Tezcan-Merdol D, Hinton JC, Rhen M. Virulence gene regulation in Salmonella enterica. *Ann Med*. 2001; 33(3): 178-185.
18. Tsois RM, Adams LG, Ficht TA, Baumler AJ. Contribution of Salmonella typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun*. 1999; 67: 4879-4885.
19. Suez J, Porwollik S, Dagan A, Marzel A, Schorr YI, Desai PT, et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal Salmonella accounted for invasive disease in humans. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58449.
20. Matsui H, Kawakami T, Ishikawa S, Danbara H, Gulig PA. Constitutively Expressed phoP Inhibits Mouse-Virulence of Salmonella typhimurium in a Spv-Dependent Manner. *Microbiol Immunol*. 2000; 44(6): 447-454.
21. Alphons A, Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among Salmonella spp. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 44(3): 251-259.
22. Nikbakht Brojeni GR. Survey of Virulence genes plasmid in various serotype of Salmonella enterica isolated in Iran. 8th Congress of Genetics, Tehran, Iran. 2003; 1-30. (In Persian)
23. Hosnieh F, Amini K, Salehi M. Prevalence of integrons class I and virulence plasmid in the clinical Salmonella Typhimurium strains. *Path Comparative J*. 2014; 11(1): 1153-1158.
24. Cui S, Li J, Sun Z, Hu C, Jin S. Ciprofloxacin-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium, China. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 493-495.
25. Oliveira SD, Rodenbusch CR, Michael GB, Cardoso MIR, Wageck Canal C, Brandelli A. Detection of virulence genes in Salmonella Enteritidis isolated from different sources. *Braz J Microbiol*. 2003; 34(1): 123-124.
26. Ranjbar R, Mohseni A, Moosavi A, Sarshar M, Ahmadi A, Izadi M, et al. The Prevalence of Virulence Sodc1 and Sope1 Genes among the Clinical Serotypes of Salmonella enterica in Tehran, Iran. *J Military Med*. 2014; 16(3): 125-131. (In Persian)