بررسی وجود فاکتورهای ویرولانس در سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های غذایی به روش Multiplex-PCR

صدیقه میرزاده[1]، رزاق محمودی[2*]، کیومرث امینی[3]

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 انتریکا سروتایپ انتریتیدیس یکی از مهم‌ترین عوامل مسبب سالمونلوزیس غیرتیفوئیدی می‌باشد که از نظر بالینی شدت کمتری نسبت به تب تیفوئیدی دارد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های ویرولانس در سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های غذایی به روش **Multiplex-PCR** می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۳ بر روی ۱۲۵۰ نمونه غیرتکراری غذایی انجام گردید. روش **PCR** چندگانه به‌منظور شناسایی ژن‌های **invA**،**ttrC**، **mgtC**، **spi4D** و **agfA** انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع تعداد ۶۰ سویه سالمونلا انتریتیدیس به ترتیب ۳۷ سویه از گوشت مرغ (۶۱/۶٪) و ۲۳ سویه از تخم مرغ (۳۸/۴٪) بدست آمد. بیشترین و کمترین فراوانی متعلق به ژن‌های **mgtC** و **spi4D** و برابر ۵۱/۶٪ و ۱/۳٪ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی ژن‌های حدت در سالمونلا انتریتیدیس جدا شده در نمونه‌های غذایی به دلیل فراوانی شاخص‌های ویرولانس و کارایی روش **M-PCR** در بررسی‌های اپیدمیولوژی و ارزیابی انتقال بین گونه‌ای این ژن‌ها در بین نمونه‌های مختلف می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، مواد غذایی، ژن‌های حدت، **Multiplex PCR**.

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

پست الکترونیک: r.mahmodi@yahoo.com

مقدمه

ارگانیسم‌های 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 منشاء حیوانی از قبیل تخم مرغ و گوشت مرغ و گاو منابع مناسبی برای رشد سالمونلاها به‌حساب می‌آیند (۲). این ارگانیسم‌ها 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). به‌طور 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 بیماری زا می‌باشند، اما سالمونلا انتریکا سروار تیفی موریوم و سالمونلا انتریکا سروار 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 ویرولانس می‌توان به invE/A، ttrC، 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 دفنسین‌های 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 بقاء 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 بقاء ارگانیسم در شرایط کم Mg^{2+} و بقاء درون ماکروفاژی لازم است و ممکن است در تنظیم پتانسیل غشا با فعال کردن پمپ Na^{+}/K^{+} ATPase دخالت کند. SPI4 برای بقاء درون ماکروفاژی و ترشح توکسین نقش دارد. مشابه SPI1، SPI5 نیز با پروسه انتروپاتوژنز، التهاب و ترشح کلراید مرتبط است (۱۲،۱۳). در اکثر سروارهای سالمونلا، پلاسمیدی ویرولانس به نام پلاسمید V با اندازه مختلف و وابسته به نوع سروار 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 Virulence) را حمل می‌کنند و مسئول رشد سریع و بقاء سالمونلا در میزبان برای ایجاد عفونت سیستمیک هستند (۱۴). ژن‌های ویرولانس مستقر در این جزایر نقش بسیار با اهمیتی 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 ویرولانس و فاکتورهای مقاومتی در میان گونه‌های جنس سالمونلا اهمیت

فوق‌العاده‌ای دارند (۱۵). لذا هدف از انجام این مطالعه شناسایی ژن‌های invA، ttrC، mgtC، spi4D و agfA 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 به‌صورت 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. به‌منظور جداسازی سالمونلا از نمونه‌های تحت مطالعه از دستورالعمل استفاده شده در مطالعات پیشین توسط نصرتی و همکاران استفاده شد (۱۶). به‌طور 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 میلی‌لیتر 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 ازجمله TSI، اوره، سیمون سیترات آگار و MRVP تأیید گردیدند. آزمون سروتایپینگ 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 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis ATCC 13076 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چند گانه

به‌منظور تکثیر ژن‌های invA، ttrC، mgtC، spi4D 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 OD۲۶۰/۲۸۰nm استفاده گردید. به‌منظور ردیابی فاکتورهای ویرولانس در سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از نمونه‌های غذایی با استفاده از روش M-PCR از توالی‌های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (۱۷). در نهایت، واکنش M-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۶/۲ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (۰/۰۵ U/µl)، $MgCl_2$ (۳ mM) و dNTPs (۰/۴ mM)، ۰/۷میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۰/۷ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۴/۶ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۲ سیکل به‌صورت 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 اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) در مقایسه با سویه استاندارد سالمونلا انتریکا زیر گروه انتریکا سروار انتریتیدیس ATCC 13076 الکتروفورز گردید.

جدول ۱. توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه

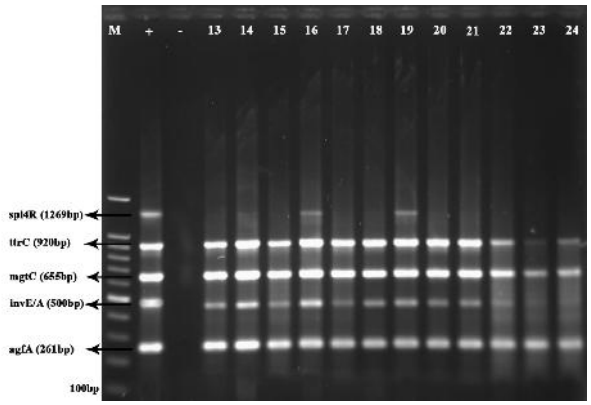
طول قطعه مورد نظر (bp)	توالی پرایمر (۳ ۵)	قطعه ژنی مورد نظر
۵۰۰	F=5' -GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3' R' =5-CCAAACYACTASGTTATCT-3'	InvE/A
۹۲۰	F=5' -GATGGTGTTTGGTCGCATA-3' R=5' -CGAATGCGCAGCACCAG-3'	ttrC
۶۵۵	F=5' -AAAATCTGGGTACGCAAACG-3' R=5' -ACATTATCCGCTGGAACAGG-3'	mgtC
۱۲۶۹	F=5' -TCGACACACCTTGGTCTGAA-3' R=5' -AACTTCCAACTTTGCCATGC-3'	Spi_4D
۲۶۱	F=5' -TACAAGGGATTCGGCATCG-3' R=5' -TAATGGCCTGTTCCCATGTG-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 D۱ یا سالمونلا انتریتیدیس بودند. یافته های حاصل از مطالعه مولکولی برای شناسایی ژن‌های ویرولانس مشخص نمود که تنها ۲ ایزوله (۳/۳۳٪) حامل ژن spi4D بودند. این نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین فراوانی توزیع ژن‌های ویرولانس 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 ویرولانس تحت بررسی				
invA	ttrC	mgtC	spi_4D	agfA
۲۱(٪۳۵)	۲۹(٪۴۸/۳)	۳۱(٪۵۱/۶)	۲(٪۳/۳)	۲۴(٪۴۰)



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

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 بیلیون 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 ویرولانس 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 ویرولانس یا پلاسمید ویرولانس باعث تکثیر و افزایش باکتری‌ها در سیستم رتیکولو 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 ویرولانس 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 بقاء 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. حسنیه و همکاران (۲۳) در پژوهشی به‌عنوان شناسایی ژن‌های invA، ttrC، mgtC و agfA در سالمونلا انتریتیدیس دریافتند که ژن‌های ttrC و mgtC 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، mgtC 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 ۹۱/۲٪ و spvC در ۹۰/۲٪ 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 ویرولانس 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 حدّت بیماری علاوه بر ژن‌های پلاسمید حدت (invA) سایر ژن‌های دیگر نظیر ttrC، mgtC، 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, Dezfoulian 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. Tsolis 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)