جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۱ ، بهـار ۱۳۸۵
صفحات: ۱ - ۱۲

تشخیص سریع باکتری عامل حصبه به روش Multiplex PCR بر اساس ژنهای tyv, invA, prt ، تعیین ردیف و مقایسه سکانس سویه جدا شده از ایران با بانک ژن

علی کرمی[ه] Ph.D. ، زینب احمدی [*] M.Sc. ، زهرا سفیری [*] M.Sc.

چکیــده

هدف: تشخیص سریع مولکولی باکتری سالمونلاتیفی عامل بیماری حصبه

روش بررسی: برای راه اندازی روش تشخیص سریع و اختصاصی عامل حصبه از روش PCR سریع استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی توالی ژنهای prt, tyv, invA واقع در کروموزوم سالمونلا تیفی انتخاب گردید. DNA ژنومی از سویه های مختلف استاندارد سالمونلا و انواع ایزوله های بالینی استخراج و با استفاده از مخلوطی از پرایمرهای ذکر شده جهت تشخیص دقیق و سریع مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی ویژگیهای این باکتری، از سایر باکتری های خانواده انتروباکتریاسه و همچنین کوکسی‌های گرم مثبت استفاده شد. جهت بررسی حساسیت از دو روش شمارش کلنی و رقت ژنوم استفاده شد. جهت افزایش دقت و سرعت آزمایش و کاهش زمان تشخیص، بهینه سازی های مختلفی در برنامه و شرایط واکنش صورت گرفت.

یافته‌ها: بررسی این روش در سویه های استاندارد و بالینی مشخص نمود که پرایمرها اختصاصی است و محصولات با اندازه مورد نظر تولید گردید. این پرایمرها با هیچکدام از انتروباکتریاسه ها، سایر سالمونلاها و همچنین کوکسی‌های گرم مثبت محصولی را ایجاد نکرد. روشUniplex PCR سالمونلا را از سایر باکتریها و روش Multiplex PCR سالمونلا تیفی را از سایر سالمونلا ها تفکیک می نماید. بررسی حساسیت این روش با شمارش کلنی و همچنین رقت ژنوم نشان داد که این روش قادر است ۱ تا ۱۰ کپی ژنوم و یا ۱۰- ۱ واحد کلنی (CFU) باکتری سالمونلا تیفی را بطور اختصاصی تشخیص دهد. با کوتاه نمودن مراحل آزمایش در دستگاههای متداول چرخه حرارتی مدت فرایند PCR به ۳۲ دقیقه کاهش یافت و کل زمان مورد نیاز تشخیص تا کسب پاسخ نهایی کمتر از ۹۰ دقیقه می باشد. برای تایید صحت محصولات ایجاد شده در PCR این قطعات تعیین ترادف (Sequencing) گردیدند. مقایسه توالی های حاصل از سویه جدا شده از بیمار ایرانی با بانک ژن مشخص نمود که ترادف قطعات مربوط به ژنهای prt وtyv ۱۰۰ درصد با ژنهای مرجع شباهت دارند و ترادف مربوط به ژن invA سویه ایران با سه نوکلئوتید تفاوت با سویه مرجع واجد ۹۹ درصد مشابه می باشد. یافته دیگر این بود که با استفاده از پرایمر S3-S4 می توان سالمونلا انفانتیس و هاوانا را نیز از یکدیگر تفکیک نمود .

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، روش مولتی پلکس PCR واحدی جهت تشخیص سریع و تفکیک سالمونلاتیفی از سایر انتروباکتریاسه‌ها و همچنین تفکیک از سایر باکتری‌های خانواده سالمونلاها حاصل گردید که می‌تواند جهت تشخیص سریع این عامل در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

سکانس های محصولات PCR با شماره هایAY771364, AY771362, AY771363 در بانک ژن جهانی ثبت گردیده است.

واژه های کلیدی: سالمولا تیفی،ژنوم، تشخیص سریع مولکولی، PCR

دریافت مقاله: ۸۴/۱/۲۴، اصلاح مقاله: ۸۴/۹/۶، پذیرش مقاله: ۸۴/۱۰/۱۷

[ه]مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده طب رزمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا ...« عج»، تهران ـ ایران
*مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشکده طب رزمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا ...« عج»
آدرس پست الکترونیکی:Alikarami 1@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقـدمـه

سالمونلا انتریکا سروتایپ تیفی (سالمونلا تیفی) باکتری عامل بیماری تیفوئید یا حصبه می باشد که بیش از ۱۶ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا و سبب حدود ۶۰۰ هزار مورد مرگ می‌باشد. (۱) جنس سالمونلا از خانواد انتروباکتریاسه متشکل از ۲۲۰۰ سروتایپ است و براساس سیستم طبقه بندی جدید، جنس سالمونلا به هشت زیر گونه ۱، ۲، ۳ آ، ۳ ب، ۴، ۵، ۶ و ۷ طبقه‌بندی گردیده است که زیر گروه ۵ به نام Salmonella Bongori و بقیه در خانواده Salmonella Enterica قرار می‌گیرند. بیش از ۶۰ ٪ سالمونلا های جدا شده از بیماران و ۹۰ درصد سروتایپ‌های بیماری‌زا در انسان و جانوران خونگرم از زیر گروه ۱ می‌باشند. این زیر گروه شامل انواع سالمونلاهای اصلی چون تیفی، تیفی موریوم، پاراتیفی، آنتریتیدیس، هاوانا، دربی، دوبلین، انفنتیس و چند نوع دیگر می‌باشد. (۲،۳) سایر زیر گروه‌ها شامل سالمونلا اریزونا یا زیر گروه ۳ آ و سالمونلا بونگوری مسئول بیماریزایی در حیوانات خونسرد می‌باشند و به ندرت در انسان ایجاد بیماری می‌کنند. همه سالمونلا، به استثناء سالمونلا تیفی که فقط سبب بیماری‌زایی در انسان و نخستی‌های عالی می‌باشد برای انسان، پستانداران و پرندگان بیماری‌زا می‌باشند. به همین جهت سرایت ان از طریق آب، مواد غذایی، مدفوع و ادرار انسان، پستانداران و پرندگان بیمار و آلوده می‌باشد. سالمونلا پارا تیفی بیماری شبه حصبه ایجاد می‌کنند و از خانواده سالمونلا اینتریتیدیس می‌باشند. اکثر سالمونلاها به استثناء سالمونلا تیفی که فقط تب روده ای ایجاد می‌کند، یکی از سه عارضه تب روده‌ای، سپتی سمی و مسمومیت غذایی را ایجاد می‌نمایند. (۴) جهت تشخیص آزمایشگاهی باکتری عامل حصبه در نمونه‌های کلینیکی از کشت خون، مغز استخوان، سواب رکتال و کشت مدفوع،

کشت ادرار و همچنین آزمایشات دیگری چون الایزا و ایمونوفلورسنت استفاده می‌شود که تمام این روشها وقت‌گیر و غیر قابل استفاده جهت تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری است. (۶،۵)

با توجه به اهمیت و بیماریزایی گسترده این عامل و کلًا سایر باکتری‌های این گروه که سبب بیماری حصبه بطور اختصاصی در انسان و بیماریهای مختلف در دامهای می‌شود، روشها و کیت‌های بسیار متعددی تهیه شده است. با توجه به توسعه و اهمیت روشهای ملکولی بدلیل دقت و حساسیت آن در تشخیص عوامل بیماری‌زای میکروبی اخیراً کیت‌هایی نیز بر اساس روشهای ملکولی تهیه شده است که دارای دقت بسیار خوبی در تشخیص سالمونلاها می‌باشند ولیکن کیت تشخیصی که بطور اختصاصی عامل سالمونلا تیفی را بطور سریع تشخیص دهد صرفاً در اختیار سازمانهای نظامی و دفاعی است و بطور عمومی در اختیار مراکز بهداشتی نمی‌باشد.

در بین انواع سالمونلاهای شناخته شده باکتری سالمونلا تیفی در فهرست عوامل بیولوژیک نظامی قرار گرفته است. اهمیت این عامل بدلیل سهولت تهیه و تولید آن و همچنین آسانی بکارگیری آن جهت آلوده نمودن افراد می‌باشد. سوابق بسیاری از بکارگیری این عامل در عملیات بیولوژیک و بیوتروریستی وجود دارد. بررسی کارایی عوامل مختلف بیولوژیک از نظر آلوده کردن افراد نشان داده است که ۱ گرم کشت باکتری سالمونلا تیفی معادل ۱۰۰ گرم عامل شیمیایی اعصاب "V" و معادل ۲۰ هزار گرم سم سیانید پتاسیم اثر دارد. (۱) در بررسی دیگری ذکر شده است که مصرف ۱۰۰ میلی لیتر آب (نصف لیوان) از یک منبع ۵ میلیون لیتری که با ۱۲۰۰ گرم باکتری سالمونلا تیفی و یا ۵ کیلوگرم سم بوتولینوم و یا ۷ کیلوگرم سم استافیلوکوک آلوده شده باشد سبب بیماری شدید فرد می‌شود. در حالی که برای مسموم نمودن این حجم از منبع آب با سموم شیمیایی به ۱ تن سیانید پتاسیم نیاز است. (۴)

ژنتیک باکتری سالمونلا تیفی . ژنوم کامل باکتری سالمونلا تیفی عامل حصبه سروتایپ CT18 در سال ۲۰۰۱ بطورکامل تعیین ردیف گردید. این باکتری دارای یک ژنوم حلقوی به اندازه ۴۸۰۹۰۳۷ جفت باز است. علاوه بر آن پلاسمیدهای مهم این باکتری که شامل پلاسمید مقاومت دارویی چند گانه multiple drug-resistance incH1 plasmid [pHCM1) با اندازه ۲۱۸۱۵۰ جفت باز و پلاسمید [pHCM2) با اندازه ۱۰۵۱۶ جفت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

باز که شباهت زیادی به پلاسمید بیماری‌زایی باکتری عامل طاعون دارد نیز بطور کامل تعیین ردیف شده است، مشخص شده است که این ژنوم تعداد ۲۰۴ ژن را در خود جای داده است. (۷) علاوه بر این سویه ژنوم سروتایپ Ty2 نیز در سال ۲۰۰۳ بطور کامل تعیین ردیف گردیده و مشخص شده است که اندازه ژنوم آن ۴۷۹۱۹۶۱ جفت باز می‌باشد. با مقایسه ژنوم کامل دو سویه مختلف سالمونلا تیفی Ty2 and CT18 مشخص می‌شود که اندازه ژنوم آنها تفاوت بسیار اندکی دارد. این بررسی نشان داد که فقط ۲۹ ژن بطور اختصاصی متعلق به سویه Ty2 است در حالی که ۸۴ ژن بطور اختصاصی متعلق به سویه CT18 است و در عین حال نکته جالب این است که سویه Ty2 فاقد دو پلاسمید مقاومت دارویی شناخته شده در CT18 است. اطلاعات ژنتیکی بسیاری شامل ۱۳۷۷۰ پروتئین و ۹۷۳۳ ژن از باکتری‌های سالمونلا تیفی در بخش تاکسونومی بانک ژنوم وجود دارد. این اطلاعات ارزشمند در زمینه تشخیص، درمان و پیشگیری و سایر موارد کاربرد گسترده دارد. (۹،۸) روشهای تشخیصی متداول این باکتری در نمونه های بالینی و غیر بالینی بسیار طولانی و جهت تعیین سروتایپ و ژنوتایپ زمان بیشتری لازم دارد. روشهای مولکولی سبب افزایش سرعت و دقت تشخیص عامل حصبه گردیده است.

در حال حاضر روش تشخیص اصلی مورد نظر در مراکز بهداشتی درمانی نیروهای نظامی و همچنین در برنامه دفاع بیولوژیک به روش تشخیص سریع PCR متمرکز گردیده است و البته در این سیستم‌ها از دستگاههای بسیار سریع PCR موسوم به Rapid PCR مبتی بر روش Real time استفاده می‌شود که این دستگاهها بسیار گران قیمت و نیازمند مواد خاصی می‌باشند. (۱۰، ۱۱) روش بکار گرفته در این تحقیق با استفاده از دستگاه PCR متداول موجود در آزمایشگاهها و با روشی بسیار ساده و سریع صورت گرفته و برای افزایش دقت، سه ژن مختلف بعنوان هدف استفاده شده است تا امکان هرگونه خطا در تشخیص کاهش یابد.

روش بررسی

باکتریها . سویه‌های‌های سالمونلا جدا شده از بیمار از آزمایشگاه تهیه شد این نمونه‌ها در تشخیصی بیمارستان بقیه ا...«عج» محیطهای بلاد آگار و مک کانکی کشت داده شده و بر اساس روشهای بیوشیمیایی آزمایش و تایید گردید. جهت استاندارد نمودن آزمایش، سویه‌های استاندارد سالمونلا از آزمایشگاه رفرانس ، E.coliوزارت بهداشت تهیه شد. سایر انتروباکتریاسه‌ها از جمله: ، استافیلوکوک طلائی و Enterobacter ، Klebsiella وProtus استرپتوکوک نیز از آزمایشگاه بیمارستان بقیه ا...«عج» تهیه شد. سوشهای مزبور در محیطهای کشت متداول میکروبی کشت و مورد اسفاده قرار گرفت. سویه‌های کلینیکال مورد استفاده در این تحقیق شامل: Salmonella thyphimuirum, Salmonella parathyphi A, Salmonella parathyphi B, Salmonella infantis, Salmonella havana

سویه‌های استاندارد سالمونلا تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت شامل:

Salmonella thyphimuirum, Salmonella parathyphi A, Salmonella parathyphi B, Salmonella parathyphi C, Salmonella enteritidis

مواد شیمیایی از شرکت مرک، $MgCl_2$ بافر، نوکلئوتیدها و آنزیم Taq از شرکت‌های داخلی تهیه گردید. در این تحقیق از دستگاه Mastercycler gradient ساخت شرکت اپندورف آلمان، جهت چرخه های حرارتی استفاده شد. از دستگاه الکتروفورز افقی کوچک ساخت شرکت پایا پژوهش (مشهد) و منبع تغذیه آن با بافر TBE ۰/۵ جهت الکتروفورز استفاده شد. جهت بررسی ژل از دستگاه UVIdoc ساخت شرکت UVItec انگلیس استفاده شد.

مارکر ملکولی ۱۰۰ جفت باز شرکت فرمنتاز شامل ۱۱ باند ۸۰، ۱۰۰، ۵۰۰،۴۰۰،۳۰۰،۲۰۰ (باند ضخیم‌تر)۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۳۰ جفت باز استفاده شد که البته باند ۸۰ جفت باز بدلیل غلظت بسیار کم در ژل قابل مشاهده نمی باشد

پرایمرها . پرایمرها بر اساس ردیف‌های سه بخش اساسی از ژنوم ژنوم باکتری سالمونلا تیفی بشرح زیر تهیه و با استفاده از نرم افزارهای DNASIS [HITACHI, Tokyo, Japan) ، (۱۲) Blast و OLIGO, Version 6.71 ساخت شرکت Hitachi از نظر ساختار و شباهت با سایر میکرو ارگانیسمهای مشابه بررسی

جدول ۱ . سکانس پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

S1:	gag	gaa	ggg	aaa	tga	agc	ttt	t	
S2:	tag	caa	act	gtc	tcc	cac	cat	ac	
S3:	ctt	gct	atg	gaa	gac	ata	acg	aac	c
S4:	cgt	ctc	cat	caa	aag	ctc	cat	aga	
S12:	gta	ttg	ttg	att	aat	gag	atc	cg	
S13:	ata	tta	cgc	acg	gaa	aca	cgt	t	

جدول ۲. مشخصات پرایمرها

ژن / پروتئین	اندازه محصول	جایگاه ژن، پلاسمید/کروموزوم	شماره پرایمر
Prt and CDP-tyvelose epimerase gene (tyv)	۶۱۵bp	کروموزوم	S1-S2
paratose synthase (prt)	۲۵۹bp	کروموزوم	S3-S4
(invA) gene	۳۷۳bp	کروموزوم	S11-S12

جدول۳ . مقادیر و ترکیبات استفاه شده در فرایند PCR

ردیف	مواد	مقدار
۱	آب مقطر تزریقی	۱۰ میکرولیتر
۲	بافر X ۱۰	۲/۵ میکرولیتر
۳	MgCl2 mM	۰/۷۵ میکرولیتر
٤	dNTP mix (100mM each)	۰/۵ میکرولیتر
٥	پرایمر F	٥ پیکومول
٦	پرایمر R	٥ پیکومول
۷	DNA	۱ میکرولیتر
۸	Taq	۲/۵ واحد
۹	جمع	۲۵ میکرولیتر

و انتخاب گردید (جدول ۱). پرایمرهای دریافتی بر اساس غلظت ذکر شده توسط شرکت سازنده پرایمر، در آب مقطر تزریقی با غلظت ۱۰۰ پیکو مول تهیه شده و سپس با رقت از آن غلظت ۲۰ پیکومول تهیه و جهت استفاده در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت و استخراج DNA . باکتریهای تهیه شده در محیط کشت جامد و محیط مایع لوریا ،تلقیح و در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ـ۱۸ ساعت کشت شد علاوه بر بررسی کلنیها از نظر شکل و ساختار و بخصوص ویژگی‌های کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست‌های بیوشیمیایی نیز انجام گرفت. سپس از ۱/۵ تا ۵ میلی لیتر از کشت مایع DNA ژنومی به روشهای متداول (۱۳) استخراج گردید.

انجام PCR بروی نمونه‌های استاندارد. مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه ژنومی تهیه شده به لوله‌های حاوی ترکیبات مندرج در جدول ۲ اضافه شده و در دستگاه Master cycler اپندورف که دارای ویژگی بررسی گرادیان دمایی است قرار گرفته و با برنامه زیر PCR انجام گردید، مرحله اول ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۰ چرخه شامل سه مرحله ۹۴ درجه ۳۰ نانیه، ۵۵ درجه ۱ دقیقه ،۷۲ درجه ۱ دقیقه و مرحله نهایی در

۷۲ درجه برای ۵ دقیقه. برای سهولت کار در تمام آزمایشات Master mix تهیه شد.

پس از خاتمه برنامه مقدار ۵ تا ۱۰ میکرولیتر از محصول با ۱ تا ۲ میکرولیتراز بافر مخصوص نمونه‌گذاری (GLB) مخلوط شده و در ژل آگاروز ۱ ٪ قرار داده شد. پس از قرار دادن وزن ملکولی، الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از خاتمه الکتروفورز، ژل در محلول حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و پس از شستشو در بافر، در روی دستگاه ماورا بنفش بررسی و عکسبرداری شد (جدول ۳).

آزمایش بروی نمونه‌های کلینیکال . یک میکرو لیتر از ژنوم استخراجی از سوش‌های کلینیکال به لوله PCR واجد ترکیبات فوق با هر سه جفت پرایمرهای در دمای اتصال ۵۷ درجه توسط برنامه مشابه PCR صورت گرفت. پس از خاتمه چرخه‌ها ۱۰ میکرولیتر از محصول در ژل اگاروز بررسی گردید.

PCR گرادیان جهت تعیین دمای مناسب اتصال پرایمرها . جهت تعیین بهترین دمای اتصال پرایمرها از سیستم گرادیان دما استفاده شد. پروفایل حرارتی گرادیان شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه، و سپس در شرایط گرادیان دمایی با شیب ۱۰ از /۴۷ تا ۶۷/۱ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و سپس ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه به تعداد ۳۶ سیکل انجام شد.

بررسی اختصاصی بودن پرایمرها با دو روش PCR و Multiplex PCR . از باکتری‌های E.coli - Klebsiella Proteuse - Enterobacter و جفت پرایمرهای ۱۲ برای انجام Uniplex و از هر سه جفت پرایمر برای بررسی مولتی پلکس استفاده شد. برنامه دمایی مشابه روش فوق و دمای اتصال ۵۷ درجه می باشد. از نمونه‌های استافیلوکوک و استرپتو کوک جدا شده از بیمار نیز با هر سه جفت پرایمر جهت بررسی بیشتر اختصاصیت استفاده گردید.

کوتاه نمودن زمان و تشخیص سریع به روش یونی پلکس و مولتی پلکس . پرایمرهای مورد استفاده در این مرحله جفت پرایمرهای اساسی تفکیکی ۱ و ۱۲ می‌باشد. در این روش برنامه اصلی مورد استفاده در آزمایشات فوق از نظر زمانی کوتاه می‌گردد. بدین نحو که هر بار اقدام به کاهش یک فاکتور می‌شود به ترتیب کاهش زمان مرحله اول PCR (جدا شدن دو رشته)، سپس کاهش مرحله دوم یا زمان اتصال پرایمرها و سپس مراحل بعد. در خاتمه از تعداد چرخه‌ها کاسته می‌شود تا جایی که با کمترین چرخه محصول مشاهده شود و در نهایت برنامه مناسب تشخیص سریع بدست می‌آید. برنامه زمانی تشخیص سریع شامل ۱ سیکل ۱ دقیقه‌ای و سپس ۷ ثانیه در ۹۴ درجه ، ۷ ثانیه در ۵۷ درجه و ۷ ثانیه در ۷۲ درجه به تعداد ۲۰ سیکل و ۱ سیکل نهایی ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه می‌باشد.

تعیین حساسیت (Sensetivity) . تعیین حساسیت به دو روش شمارش کلنی و غلظت DNA صورت گرفت.

تعیین تعداد باکتری در نمونه بروش شمارش کلنی . یک کلنی ایزوله در ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سا نتی گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفت. روز بعد ۱۰ لوله حاوی ۹۰۰ میکرولیتر محیط مایع استریل تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از کشت به لوله اول اضا فه شد (رقت ۱/۱۰) پس از مخلوط کردن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این لوله به لوله دوم و به همین طریق تا لوله ۱۰ ادامه یافت. همزمان با تهیه رقت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد اضافه شده و کاملا در سطح محیط پخش گردید. پلیتها در دمای ۳۷ درجه در طول شب قرار گرفت. پس از رشد کامل، پلیتهای واجد بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی شمارش و محاسبه گردید. جهت افزایش دقت این آزمایش ۳ بار تکرار شد. همزمان با تهیه رقت از هر کدام از رقتهای تهیه شده ۲ میکرولیتر به لوله‌های PCR حاوی ترکیبات لازم اضافه شده و در دمای اتصال ۵۷ درجه آزمایش شد.

بررسی حساسیت با غلظت ژنوم . غلظت ژنوم استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. سپس با رقتهای مختلف از ژنوم PCR انجام شد.

تایید محصول به روش تعیین ردیف PCR (Sequencing) . با هر سه جفت پرایمر و ژنوم سالمونلا تیفی جدا شده از بیمار PCR با شرایط و برنامه تعیین شده در حجم ۱۰۰ میکرولیتر انجام شد. سپس محصولات تکثیر شده همراه با پرایمر های Forward و Reverse هر قطعه جـهت

تعیین ترادف به شرکت مربوطه ارسال گردید.

آنالیز سکانس . ردیف‌های دریافتی شامل سکانس حاصل از پرایمر های F و R هر قطعه از نظر دقت و هم‌پوشانی (overlap) با هم بررسی گردید. با توجه به کوتاهی اندازه قطعات انتظار بود که مقدار زیادی هم‌پوشانی وجود داشته باشد. برای شناسایی هم‌پوشانی از برنامه DNASIS ver 2/6 ساخت شرکت هیتاچی استفاده شد. بدین شکل که فایل نوشتاری سکانس پرایمر F با Reverese Complement سکانس پرایمر R مقایسه گردید و با استفاده از برنامه ALIGN به هم متصل و با ویرایش آن سکانس اصلی برای هر قطعه حاصل شد. سکانس‌های حاصل با برنامه BLASTN 2.2.9 (۱۲) با بانک ژن مقایسه و شباهت‌ها و تفاوت‌ها شناسایی گردید. از برنامه DNASIS نیز جهت مقایسه دو سکانس حاصل از این تحقیق با سکانس مرجع و شناسایی میزان شباهت و تفاوت نوکلئوتیدهای دو سکانس استفاده شد.

یافتــه‌هــا

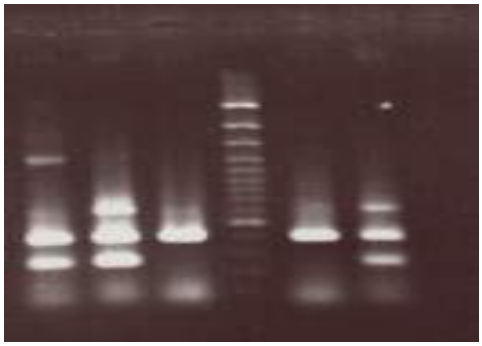
Uniplex PCR وMultiplex PCR سویه‌های استاندارد . همچنان که در شکل ۱ دیده می‌شود نتیجه بررسی نمونه‌ها با هر سه جفت پرایمر نشان داد که پرایمرها به شکل مولتی پلکس سه باند با اندازه‌های ۶۱۵، ۳۷۳ و۲۵۸ جفت باز را در سویه سالمولا تیفی استاندارد و باکتری سالمونلا تیفی جدا شده از بیمار ایجاد کرده است. در خانه شماره ۱ مربوط به سالمونلا پارا تیفی A فقط دو باند ۳۷۳ و ۲۵۸ را ایجاد نموده است. نکته مهم این است که پرایمر S12-S13 که بر اساس ژن InvA می‌باشد برای سالمونلاهای infantis و سالمونلا هاوانا فقط باند ۳۷۳ را ایجاد کرده است.

بررسی اختصاصی بودن پرایمرها . شکل ۲ نتایج مولتی پلکس هر سه جفت پرایمر را با باکتری‌های غیر اختصاصی و نمونه شاهد سالمونلا را نشان می‌دهد. همچنان که دیده می‌شود جفت پرایمرS12-S13 فقط با نمونه سالمونلا تیفی جدا شده از بیمار محصول با اندازه صحیح را ایجاد نموده (خانه۵) . بررسی PCR با باکتری‌های دیگر شامل ای کولای، کلبسیلا، پروتئوس و انتروباکتر که از خانواده انتروباکتریاسه هستند باندی ایجاد نکرد که نشان دهنده اختصاصی بودن این پرایمر است.

تعیین حساسیت . محاسبه غلظت ژنوم مشخص نمود که غلظت DNA ژنومی معادل۷۵ نانوگرم در میکرولیتر می‌باشد. همچنان که در شکل ۳ یده می‌شود بررسی با رقت‌های مختلف تا رقت $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ ژنوم با زوج پرایمر ۳ (شکل ۳) باند مناسب را نشان می‌دهد که حساسیت روش بسیار مناسب است. با توجه به اینکه تعداد کپی ژنوم برابر $1/5\times 10^{7}$ در ۷۵ نانوگرم است در واقع هر نانوگرم ژنوم واجد ۲×10^{6} کپی می‌باشد. در نتیجه حساسیت روش معادل ۱ تا ۱۰ کپی است و چون هر باکتری یک کپی از ژنوم را دارد بنابراین حساسیت روش معادل ۱ تا ۱۰ باکتری می‌باشد. بررسی حساسیت به روش شمارش کلنی نیز این نتیجه را تایید نمود.

کوتاه کردن زمان تشخیص . نتیجه بررسی زمان‌های مختلف جهت کوتاه کردن زمان واکنش PCR به دو روش یونی پلکس و مولتی پلکس با جفت پرایمرهای ۱ و ۱۲ با نمونه کلینیکی در شکل ۴ نشان می‌دهد که کوتاه‌ترین زمان ممکن از بین انواع برنامه‌های بررسی شده ۳۲ دقیقه می باشد و در این زمان محصولات صحیح ایجاد شده است. در خانه شماره ۱ محصول ۶۱۵ جفت بازی حاصل از جفت پرایمرهای ۱ دیده می‌شود که با توجه به زمان بسیار کوتاه اتصال پرایمر و گسترش آن یعنی ۷ ثانیه شفافیت و غلظت باند بسیار مناسب و ارزشمند است. باند ۳۷۳ در خانه ۲ مربوط به جفت پرایمرهای ۱۲ است. در خانه شماره ۳ هر دو جفت پرایمر فوق به شکل مولتی پلکس در زمان ۳۲ دقیق آزمایش شده‌اند هر دو باند ۳۷۳ و ۶۱۵ جفت به وضوح دیده می‌شوند.

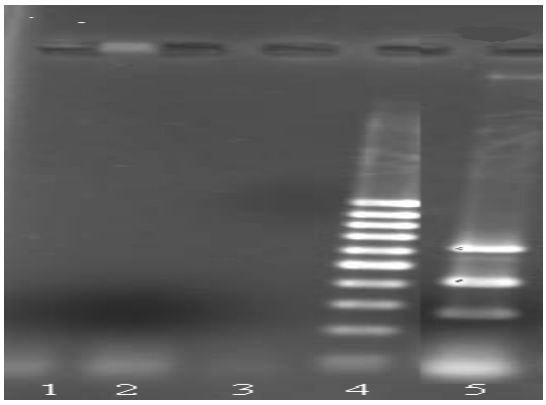
تایید محصول . دقیق‌ترین روش تایید محصول PCR تعیین ردیف قطعه مورد نظر و مقایسه ان با سکانس‌های مشابه است. با توجه به عدم وجود سایت مناسب برش آنزیمی جهت انجام AFLP جهت تایید محصولات سه گانه، از روش تعیین ردیف قطعه PCR استفاده شد. به دلیل کوچکی اندازه قطعات هر قطعه دو بار تعیین ردیف شد تا دقت نتایج سکانس افزایش یابد. ترادف



۱ ۲ ۳ ٤ ٥ ٦

شکل ۱: نتایج PCR نمونه های کلینیکال

شماره ۱: باندهای ۳۷۳ و ۲۵۸ مربوط به سالمونلا پارا تیفی A
شماره ۲: باندهای ۶۱۵، ۳۷۳ و ۲۵۸ مربوط به سالمونلا تیفی جداشده از بیمار
شماره۳: باند ۳۷۳ مربوط به سالمونلا infantis
شماره ۴: وزن مولکولی
شماره۵: باند ۳۷۳ مربوط به سالمونلا havana
شماره۶: باندهای ۶۱۵، ۳۷۳ و ۲۵۸ مربوط به سالمونلاتیفی استاندارد

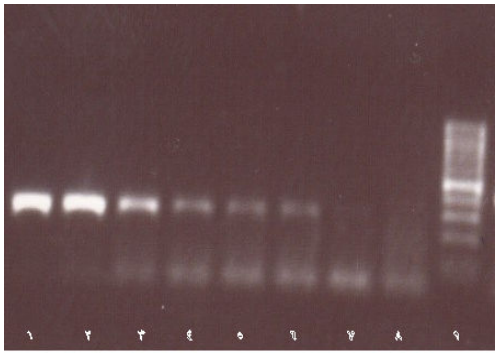


شکل ۲. Multiplex PCR پرایمرهای S1-S2، S3- S4 و S12-S13 با باکتری های غیر سالمونلا

شماره ۱: باکتری E.coli
شماره ۲ : باکتری Klebsiella
شماره ۳ : : باکتری Proteuse
شماره ۴ : وزن مولکولی
شماره ۵: کنترل مثبت (سه باند ۲۵۸- ۳۷۳- ۶۱۵)

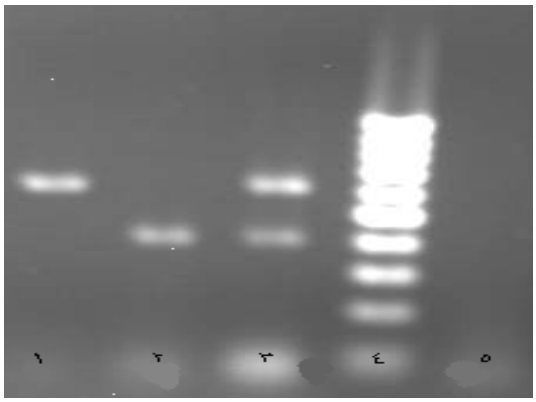
شماره‌های AY771363, AY771362, AY771364 در بانـــک ژن جهانی ثبت گردید و قابل دسترسی محققین است.

نتایج حاصل آنالیز ترادف سکانس های محصولات



شکل۳. نتیجه محصول PCR با رقتهای مختلف ژنوم با پرایمر S3- S4

شماره ۱: نمونه ژنوم خالص
شماره ۲: رقت 10^{-1} ، شماره ۳: رقت 10^{-2}
شماره ۴: رقت 10^{-3}
شماره ۵: رقت 10^{-4}
شماره ۶: رقت 10^{-5}
شماره ۷: رقت 10^{-6}
شماره ۸: کنترل منفی ، شماره ۹: وزن مولکولی



شکل ۴. PCR یونی پلکس و مولتی پلکس با زمان کوتاه ۳۲ دقیقه

شماره ۱: محصول PCR با پرایمر S1-S2 (اندازه باند ۶۱۵)
شماره ۲: محصول PCR با پرایمر S12-S13 (اندازه باند ۳۷۳)
شماره ۳: محصول Multiplex PCR با پرایمرهای S12- S2 ,S1-S13
شماره ۴: وزن مولکولی ، شماره ۵: کنترل منفی

PCR . مقایسه ترادف مربوط به پـرایمرهای S1-S2 با سـکانس مرجع tyv در بانک ژن نشان دهنده شباهت ۱۰۰٪ آن با ژن CDP-tyvelose epimerase سرو تایپ Ty2 سالمونلا تیفی با شماره ژن بانکAF332602- AF332602 است. این ژن توسط

جدول ۴ . مقایسه ترادف محصول PCR پرایمرهای ۱۲ و ژن invA از بانک ژن

رشته فوقانی سکانس حاصل از محصول PCR و رشته تحتانی سکانس ژن مرجع می باشد . نوکلئوتید های متفاوت با حروف درشت تر در جایگاه ۱۲۴ و ۲۳۲ و ۲۳۳ مشخص گردیده است.

```
Salmonella enterica invasion protein [invA) gene,
Identities = 401/404 [99%)

gtattgttgattaatgagatccgtgttgaacaatttacggtctattttgatttgatgcga 61
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
gtattgttgattaatgagatccgtgttgaacaatttacggtctattttgatttgatgcga 1275

gtggtaaattattccgatgaagttgtttcctttggcattaatccaacaatccatcagcaa 121
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
gtggtaaattattccgatgaagttgtttcctttggcattaatccaacaatccatcagcaa 1335

ggaagcagtcagtatttctgggtaacgcatgaagagggggagaaactccgggagcttggc 181
|| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ggtagcagtcagtatttctgggtaacgcatgaagagggggagaaactccgggagcttggc 1395

tatgtgttgcggaacgcgcttgatgagctttaccactgtctggcggtgacgctggcgcgc 241
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||
tatgtgttgcggaacgcgcttgatgagctttaccactgtctggcggtgaccgtggcgcgc 1455

aacgtcaatgaatatttcggtattcaggaaacaaaacatatgctggaccaactggaagcg 301
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
aacgtcaatgaatatttcggtattcaggaaacaaaacatatgctggaccaactggaagcg 1515

aaatttcctgatttacttaaagaagtgctcagacatgccacggtacaacgtatatctgaa 361
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
aaatttcctgatttacttaaagaagtgctcagacatgccacggtacaacgtatatctgaa 1575

Query: 362  gttttgcagcgtttgttaagcgaacgtgtttccgtgcgtaatat 405
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1576 gttttgcagcgtttgttaagcgaacgtgtttccgtgcgtaatat 1619
```

P.C Woo, (۲۰۰۰) از یک نمونه بالینی در بیمارستان دانشگاه هنگ‌کنگ چین شناسایی و تعیین ردیف گردیده است. (۱۴) با توجه به نتیجه آنالیز بدلیل اختصاصی بودن بسیار بالای آن که با هیچ عامل دیگری از این خانواده و انتروباکتریاسه‌ها شباهت نداشته از نظر تشخیص واجد اهمیت ویژه است.

آنالیز سکانس شماره ۲ مربوط به پرایمرهای S3-S4 . مقایسه سکانس ژن prt و سکانس مرجع در بانک ژن شباهت ۱۰۰٪ هر دو سکانس و صحت نتیجه PCR را نشان می‌دهد. این شباهت کامل از نظر تشخیص واجد اهمیت بسیاری است.

آنالیز سکانس شماره ۳ مربوط به پرایمرهای S12-S13 . مقایسه ترادف حاصل از پرایمرهای مبتنی بر ژن invA با ردیف ژن مرجع در بانک ژن نشان داد که سه نوکلوئید تفاوت مشاهده می‌گردد. یک تفاوت در جایگاه ۱۲۴ با تغییر نوکلئوتید a بجای t و دو تغییر در جایگاه ۲۳۲ و ۲۳۳ که نوکلئوتیدهای gc به جای cg تغییر یافته است با این تفاوت‌ها میزان شباهت با سویه مرجع ۹۹ درصد می‌باشد. با توجه به شباهت کامل سکانس‌های قطعات PCR حاصل از ژن tyv و prt با ژن‌های مرجع مقایسه سکانس انها درج نمی‌گردد ولیکن بدلیل

تفاوت مختصر سکانس ژن invA با سکانس مرجع نتیجه سکانس در جدول ۴ مشاهده می‌گردد.

بحـث

روشهای متداول تشخیص سالمونلا ها نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می‌باشد. (۵) از روش PCR جهت تشخیص عامل حصبه و تفکیک آن از سایر انتروباکتریاسه‌ها و همچنین سایر سالمونلاها استفاده شده است. (۱۵) محققین جهت تشخیص ملکولی سالمونلا تیفی پرایمرهای مختلفی بر اساس ردیف ژنهای شناخته شده viaB, prt, tyv, fliC-d, fliC-a، int –flom و spvC را طراحی و برسی نموده اند. (۱۶) در یک بررسی با ۵ جفت پرایمر مبتنی بر ژنهای(prt (rfbS), viaB,fliC tyv (rfbE و با روش مولتی پلکس بخوبی قادر به تشخیص عامل سالمونلا بوده است. (۱۷) تعداد پرایمرهای این روش زیاد بوده در عین حال روش بکارگرفته شده PCR عادی با سرعت متداول است.

در بررسی دیگری جهت تشخیص سالمونلا از ۱۳ پرایمر استفاده شده است. (۱۸) استفاده از پرایمرهای مبتنی بر ژن hilA نیز تنها قادر به شناسایی سالمونلا تیفی موریوم به روش PCR متداول بوده است. (۱۹) بررسی روشهای PCR فوق سریع موسوم به Real time در تشخیص سریع سالمونلا نشان داده است که این روشها می‌تواند کارایی مناسبی داشته باشد ولیکن دستگاه استفاده شده بسیار گران قیمت است. (۲۰) کیت تجاری نیز که با استفاده از یک جفت پرایمر بر اساس ژن invA برای تشخیص سالمونلا تیفی تهیه شده اند وجود دارد (Salmonella One Step (invA gene PCR Screening Kit) (TaKaRa BIOMEDICALS) ولیکن امکان واکنش های غیر اختصاصی با سایر سالمونلا ها و خطای تشخیص با یک جفت پرایمر افزایش می‌یابد. (۲۱)

مقایسه نتایج این تحقیق با تحقیقات مشابه فوق نشان داد که استفاده از ۳ جفت پرایمر در بررسی مولتی پلکس مناسب تر است. پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق بر اساس ژن های invA, tyv, prt می‌باشد. ژن prt (قبلا rfbS نامیده می‌شد) از ژنهای مربوط به آنتی‌ژن O و رمز کننده CDP-paratosesynthase است که سبب تبدیل CDP-4-keto-3,6-dideoxyglucose به CDP-paratose می شود و به دلیل امکان تفکیک دو سویه تیفی و پارا تیفی انتخاب گردید. ژن tyv رمز کننده CDP-tyveloseepimerase است که سبب تبدیل CDP-paratose به CDP-tyvelose می شود و در هر دو باکتری سالمونلا تیفی و پارا تیفی آ وجود دارد ولی این ژن در باکتری سالمونلا پاراتیفی آ بدلیل موتاسیونی که سبب ایجاد رمز توقف در ژن گردیده است قادر به تولید ماده فعال تایولوز اپیمراز نمی‌باشد. بنابر این از این بخش از ردیف ژنی در تفکیک بین دو گونه سالمونلا تیفی و پاراتیفی آ استفاده می‌شود. ژن invA (invA invasion protein) از ژن های مهم مسئول تهاجم باکتری سالمونلا به سلول‌های اپیتلیال است. (۲۲)

در این بررسی نمونه‌های ژنوم باکتری‌های استاندارد و کلینیکال سالمونلا تیفی و انواع نمونه‌های استاندارد و کلینیکال سالمونلا همراه با نمونه‌هایی از خانواده انتروباکتریاسه شامل اشرشیا کولی، کلبسیلا، پروتئوس، انتروباکتر و باکتری‌های گرم مثبت با این سه جفت پرایمر به روش مولتی پلکس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی‌ها مشخص نمود که پرایمرهای انتخاب شده بطور اختصاصی قادر به تشخیص عامل سالمونلا تیفی از انواع انتروباکتریاسه‌ها و کوکسی‌های گرم مثبت و همچنین از بین انواع هم خانواده سالمونلا بوده و هیچگونه پاسخی با هم خانواده و باکتریهای دیگری که ممکن است در نمونه‌های کلینیکی وجود داشته باشد را ایجاد نکرد.

یافته مهم دیگر این بود که پرایمرهای S3-S4 قادر به تفکیک بین سالمونلا انفانتیس و هاوانا می‌باشند بنابراین سه جفت پرایمر انتخاب شده علاوه بر توانایی تشحیص سالمونلاها از انتروباکتریاسه‌های دیگر، تفکیک بین سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفی امکان تفکیک سالمونلا هاوانا از سالمونا انفنتیس را نیز امکان پذیر می‌سازد و در آینده می‌توان از این پرایمرها جهت تفکیک گونه‌های سالمونلا تیفی، پارا تیفی، انفنتیس و هاوانا در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده نمود.

بررسی حساسیت مشخص نمود که این روش قادر است حدود ۱۰-۱ واحد کلنی و یا ۱ تا ۱۰ کپی از ژنوم باکتری را در نمونه را

با دقت تشخیص دهد. با بهینه سازی‌های انجام شده در مراحل و برنامه PCR و چرخه‌های حرارتی در دستگاههای متداول در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و پزشکی موفق شدیم زمان نهایی تشخیص را کوتاه تر نماییم. جهت انجام این کار زمانهای واسرشتی دو رشته DNA، زمان اتصال پرایمرها و زمان گسترش زنجیره از ۱ دقیقه در آزمایشات متداول به ۷ ثانیه کاهش یافت. در عین حال تعداد چرخه‌های PCR از ۳۵ چرخه به ۲۰ چرخه کاهش یافت. تلاش‌های بسیاری جهت کوتاه نمودن زمان تشخیص باکتری‌های بیماریزا از جمله سالمونلا با استفاده از دستگاههای متداول PCR صورت گرفته است. (۲۳) با توجه به سرعت محدود دستگاههای متداول چرخه حرارتی PCR که از فناوری peltier جهت افزایش و کاهش حرارت در مراحل مختلف PCR استفاده می‌کنند، بطور متداول زمان یک چرخه کامل در دستگاههای عادی PCR که بستگی به سرعت افزایش یا کاهش دمای دستگاه (ramping time) دارد بین ۳ تا ۵ دقیقه طول می‌کشد. (۲۴-۲۸) با توجه به مشخصات فنی دستگاه استفاده شده در این تحقیق که سرعت چرخه حرارتی آن معادل ۳ درجه سانتی گراد در ثانیه برای افزایش دما (heating) °C/s ۳و ۲ درجه سانتی گراد در ثانیه برای کاهش دما (cooling) °C/s ۲ می باشد انجام ۳۰ تا ۳۵ چرخه با برنامه متداول حدود ۲/۵ تا ۳ ساعت زمان لازم دارد. جهت کوتاه نمودن زمان ضرورت بهینه سازی تمام فاکتورهای موثر در واکنش مانند غلظت DNA، پرایمرها، dNTP، املاح و نوع و مقدار انزیم و همچنین تغییر برنامه زمانی ضرورت دارد. در عین حال کوتاه کردن زمان برنامه در هنگام استفاده از چند پرایمر (مولتی پلکس) در مقایسه با سیستم یونی پلکس دارای دشواری‌های بیشتری است. (۲۹) اندازه قطعات پرایمرهای انتخاب شده به نحوی است که امکان تفکیک سه قطعه با اندازه‌های ۶۱۵ ، ۲۵۹ و ۳۷۳ جفت باز به سهولت با سیستم عادی اگاروز ژل الکتروفورز با غلظت ۱ تا ۱/۵ درصد وجود دارد. با استفاده از این روش امکان تشخیص سریع عامل سالمونلا تیفی به روش مولتی پلکس PCR با احتساب زمان استخراج سریع ژنوم (کمتر از ۵ دقیه)، تهیه مخلوط واکنش، انجام چرخه‌های PCR سریع، الکتروفورز (حاوی ماده اتیدیوم بروماید) و بررسی نتیجه در دستگاه UV، در کمتر از ۹۰ دقیقه وجود دارد (این اطلاعات بعداً منتشر خواهد شد). در عین حال با توجه به اینکه تا کنون در کشور ما این بخش‌های ژنوم باکتری سالمونلا تیفی تعیین ردیف نگردیده است بنابراین سکانس‌های حاصل از این سه ژن می‌تواند از نظر میزان شباهت سکانس‌ها با سکانس‌های مشابه در بانک ژن و شناسایی هر نوع موتاسیون ارزشمند را جهت مطالعات تشخیصی و همه‌گیرشناسی ملکولی مورد استفاده محققین کشور قرار گیرد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، روش مولتی پلکس PCRواحدی جهت تشخیص سریع و تفکیک سالمونلاتیفی از سایر انتروباکتریاسه‌ها و همچنین تفکیک از سایر باکتری‌های خانواده سالمونلاها حاصل گردید که می‌تواند جهت تشخیص سریع این عامل در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. سکانس های محصولات PCR با شماره های AY771363, AY771362, AY771364در بانک ژن جهانی ثبت گردیده است.

تقدیــر و تشکر . با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...«عج» و همکاران محترم در مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی و پژوهشکده طب رزمی که بدون همکاری و مساعدتهای بی‌شائبه آنان انجام این تحقیق امکان پذیر نبود. این مقاله بخشی از نتایج طرح پژوهشی اجرا شده در دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا.... «عج» است که اعتبار آن از محل بودجه پژوهشی این دانشگاه تامین گردیده است.

References

1. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Org 2004; 82: 346-53.

2. Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM and Euzeby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. Int. J Syst Evol Microbiol 2005; 55: 521-524.

3. Judicial Commision of the International

Committee on Systematics of Prokaryotes. The type species of the genus Salmonella Lignieres 1900 is Salmonella enterica. Int. J Syst Evol Microbiol 2005; 55: 519-520.

4. Purver R. Chemical and biological terrorism. The threat according to the open literature 1995. www.csis-scrs.gc.ca/eng/miscdocs/purv_e.html.

5. Ivanhoff B. Typhoid fever global situation and WHO recommendations. Southeast Asian J. Trop Med Public Health 1995; 26 (Suppl. 2) 1-6.

6. Reeves M W, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD and Farmer JJ. Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb nov. J Clin Microbiol 1989; 27: 313-230 .

7. Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18 . Nature 2001; 413: 848 – 852.

8. Deng W, Liou SR, Plunkett III G, Mayhew GF, Rose DJ, Burland V, et al. Comparative Genomics of Salmonella enterica Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18 J Bacteriol 2003; 185: 2330-37.

9. Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler C S, Dougan G and Falkow S. Genomic Comparison of Salmonella enterica Serovars and Salmonella bongori by use of an S. enterica serovar Typhimurium DNA microarray. J of Bacteriology 2003; 185: 553-563.

10. Van Kessel JS, Karns JS, Perdue, ML. Using portable real-time PCR (Rt-Pcr) Assays to detect salmonella In raw milk. J of Food Protection 2003; 1762-67.

11. Schneider A, Grönewald G, Fandke M, Kurth B. Real-time Detection of the Genus Salmonella with the LightCycler System. Biochemica 2002; 4: 19-21.

12. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997; 25: 3389-3402.

13. Joseph Sambrook and David W. Russell,. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2000.

14. Woo PC, Fung AM, Wong SS, Tsoi HW and Yuen KY. Isolation and characterization of a Salmonella enterica serotype Typhi variant and its clinical and public health implications. J Clin Microbiol 2001; 39: 1190-94.

15. Aabo S, Rasmussen O F, Roseen L, Sørensen, PD Olsen JE (1993). Salmonella identification by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes; 7: 171–178.

16. Hirose K, Itoh K I , Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, et al.. Selective Amplification of tyv (rfbE), prt (rfbS), viaB, and fliC Genes by Multiplex PCR for Identification of Salmonella enterica Serovars Typhi and Paratyphi A J of Clin Microbiol 2002; 40: 633-636.

17. Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar I, and Echeita MA. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of Salmonella spp. J of Clin Microbio 2004; 42: 2581-86.

18. Riyaz-Ul- Hassan S, Verma V, Qazi GN. Rapid

detection of Salmonella by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 2004; 18: 333-9.

19. Pathmanathan SN, Cardona-Castro N, Sánchez-Jiménez MM, Correa-Ochoa MM, Puthucheary SD and Thong KL Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene. Med Microbiol 2003; 52: 773-776.

20. Doran JL, Collinson SK, Burian J, Sarlos G, Todd EC, Munro CK et al DNA-based diagnostic tests for Salmonella species targeting agfA, the structural gene for thin, aggregative fimbiae, J Clin Microbiol 1993; 31:2263-73.

21. Van Kessel JS, Karns JS, Perdue ML. Using a portable real-time PCR assay to detect Salmonella in raw milk. J Food Prot 2003; 66:1762-7.

22. Collazo CM and Galán GE. The invasion associated type III protein secretion system in Salmonella. Gene1997; 192:51-59.

23. Massi MN, Shirakawa T, Gotoh A, Bishnu A, Hatta M, Kawabata M. Rapid diagnosis of typhoid fever by PCR assay using one pair of primers from flagellin gene of Salmonella typhi. J Infect Chemother 2003; 9:233-7.

24. Gannon VPJ, D'souka S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic Escherichia coli strains. J Clin Microbiol 1997; 35: 656-662.

25. Ferretti R, Mannazzu I, Cocolin L, Comi G, Clementi F. Twelve hour PCR based method for detection of Salmonella Spp in food. App Envi Microb 2001; 67: 977-978.

26. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time for DNA Amplification by Efficient Heat Transfer to Small Samples, Anal. Biochem 1990; 186: 328-33.

27. Meldrum D. Automation for Genomics, Part one: Preparation for Sequencing. Genome Res 2000; 10: 1081-1092.

28. Khandurina J, McKnight TE, Jacobson SC, Waters LC, Foote RS, Ramsey JM. Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices. Anal Chem 2000; 72 :2995-3000.

29. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH and Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step by step protocol. BioTechniques 1997; 23: 504-511.