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

شناسایی سالمونلا تیفی بر اساس توالی ViaB با استفاده از PCR

مجتبی سعادتی[۱]، نسیبه قربانی[۲]، بابک براتی[۳]، شهرام نظریان [۳]، مهدی شیرازی [۴]، محمدباقر صالحی[۵]، هادی شیرزاد[۶]، روح الله نخعی سیستانی[۷]

[۱] دانشیار مرکز تحقیقات علوم پایه دانشگاه امام حسین(ع) و محقق مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

[۲] کارشناس شرکت آب و فاضلاب روستایی استان تهران

[۳] مربی مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه امام حسین(ع)

[۴] مربی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم سبزوار

[۵] مربی مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه امام حسین(ع)

[۶] مربی مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه امام حسین(ع)

[۷] دانشجوی دکترای ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه امام حسین (ع)، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دکتر مجتبی سعادتی
E-mail: Saadati_m@yahoo.com

وصول:۸۸/۶/۱۵، اصلاح:۸۸/۸/۲۰، پذیرش:۸۸/۹/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: تب تیفوئید توسط سالمونلا تیفی ایجاد می‌شود و هنوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در سرتا سر دنیا می‌باشد. روش‌های متعددی از جمله روش‌های بیوشیمیایی و الایزا برای شناسایی این باکتری استفاده شده است که علاوه بر زمان‌بر بودن و هزینه فراوان، بعضاً با پاسخ کاذب همراه می‌باشد. لذا هدف از این تحقیق شناسایی باکتری سالمونلا تیفی از طریق روش PCR می‌باشد که روشی سریع، ارزان و اختصاصی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی که به‌روش تشخیص انجام شد از polymerase chain reaction (PCR) جهت شناسایی سالمونلا تیفی استفاده شد. این سویه قبلاً توسط روش‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت. جهت شناسایی به‌وسیله PCR، نسبت به طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی ژن ViaB اقدام گردید. سپس نسبت به انجام واکنش PCR اقدام و محصول آن در معرض هضم با آنزیم محدودکننده‌ی Taq1 قرار گرفت. برای ارزیابی اختصاصیت این روش از ٦ سویه مختلف باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده شد. جهت بررسی حساسیت واکنش PCR از سریال رقت استفاده شد.

یافته‌ها: محصول PCR سالمونلا تیفی ۵۳۰ جفت باز بود که با هضم آنزیمی صحت محصول PCR تأئید شد. برای ارزیابی اختصاصیت این روش از باکتری سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا فلکسنری، اشریشیا کلای، کلستریدیوم بوتولینیوم، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتیلیس به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج PCR آن با پرایمر طراحی شده منفی بود. حساسیت این روش در حدود ۵۰ CFU/ml ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شناسایی ژن viaB با روش PCR برای تشخیص سالمونلا تیفی در نمونه‌های کلینیکی می‌تواند به عنوان روشی سریع، ارزان، اختصاصی و با حساسیت بالا مورد استفاده قرار گیرد. *(مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره۱۶/شماره۴ / صص۲۲۷-۲۲۱).*

واژه‌های کلیدی: *سالمونلا تیفی؛ توالی ViaB – PCR.*

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

مقدمه

تب تیفوئید به‌وسیله باکتری سالمونلا تیفی ایجاد می‌شود و هنوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مطرح در دنیا می‌باشد. بر اساس تخمین‌های موجود، سالانه ۱۶ میلیون نفر به این بیماری مبتلا شده و بیش از ۶۰۰ هزار نفر به‌خاطر این بیماری می‌میرند (۱). در حال حاضر، شناسایی این باکتری از طریق جداسازی آن از خون، مغز استخوان، مدفوع، ادرار و سایر مایعات بدن امکان‌پذیر می‌باشد. کشت خون مبتلایان به تب تیفوئید به تنهایی ممکن است بین ۴۵ تا ۷۰ درصد مثبت گردد. این در حالی است که حداقل بین ۲۰ تا ۳۰ میلی‌لیتر خون لازم است تا بتوان از آن جهت شناسایی استفاده نمود.

تست کمکی این روش که می‌تواند در تشخیص کمک‌کننده باشد، تست ویدال است. این روش نیز به دلیل آن‌که به‌صورت غیر اختصاصی عمل می‌کند، کاملاً قابل اعتماد نمی‌باشد. روش‌های دیگر به دلایلی از جمله گرانی و زمان بر بودن کمتر مورد توجه می‌باشند (۲). یکی از روش‌های شناسایی عوامل بیماری‌زا استفاده از تکنیک PCR می‌باشد که از سرعت و حساسیت بسیار بالایی برخوردار است. ردیف‌های خاصی از اسید نوکلئیک جهت شناسایی باکتری سالمونلا تیفی استفاده شده است. در مطالعه‌ای که توسط سلطانی در سال ۲۰۰۵ انجام گردید با استفاده از ۳ جفت پرایمر نسبت به شناسایی این باکتری اقدام نموده و نشان داده شدکه روش multiplex PCR مورد استفاده می‌تواند تا ۲۵۰ سلول مورد شناسایی قرار گیرد (۳). محققین با استفاده از روش PCR توانسته‌اند تا ۴۰ باکتری سالمونلا تیفی را در مواد غذایی شناسایی نماید (۴). تمام سویه‌های سالمونلا تیفی که از خون جدا شده است دارای آنتی‌ژن Vi (که به ناحیه ViaB نامیده شده) می‌باشد که این آنتی‌ژن به عنوان یک عامل حدت‌زا مطرح می‌باشد. این آنتی ژن در تعدادی از سویه‌های دیگر از جمله سالمونلا پاراتیفی C، تعدادی از سویه‌های سالمونلا دوبلین گزارش شده است (۵). در تحقیق حاضر با هدف شناسایی باکتری سالمونلا تیفی نسبت به طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی بر اساس ترادف ژن ViaB اقدام گردید تا بتوان با سرعت و اختصاصیت نسبت به شناسایی این باکتری اقدام شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی بوده و به‌روش تشخیصی انجام گردید. جامعه آماری در این تحقیق، ۵۰ سویه جدا شده از بیمارانی بود که به بیمارستان بقیه‌ا... اعظم (عج) مراجعه کرده و مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. باکتری‌های مورد آزمایش شامل ATCC ۱۴۰۲۸ Salmonella typhimorium، نمونه‌های کلینیکی Salmonella typhi، Shigella flexneri، Staphylococcus aureus ATCC=25923، Escherichia coli، Bacillus subtilis، Clostridium botulinium و Salmonella typhi P ATCC =1185 بود. در این تحقیق دو سوشی که قبلاً از طریق روش‌های معمول آزمایشگاهی به‌عنوان Salmonella Dublin و Salmonella paratyphi C شناسایی شده بودند نیز مورد بررسی قرار گرفت.

انتخاب قطعات ژنی و تهیه پرایمرهای مناسب: یک جفت پرایمر از ژن (جدول ۱) viaB در باکتری سالمونلا تیفی طراحی و سپس به‌وسیله نرم‌افزارهای مولکولی BLAST و Oligo وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی و تأئید خصوصیات، جهت ساخت پرایمرها به شرکت سیناژن سفارش داده شد.

شناسایی باکتری سالمونلا تیفی به روش مولکولی PCR

تخلیص ژنوم: برای استخراج و تخلیص DNA ژنومیک از روش CTAB استفاده شد. برای این منظور، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت باکتری‌های مورد مطالعه به مدت ۵-۲ دقیقه در ۶۰۰۰-۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و رسوب (Pellet) حاصل در ۵۶۷ میکرولیتر بافر (10

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

TE(mM Tris HCl, 10 mM EDTA، ۳۰ میکرولیتر بافر SDS ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر آنزیم Proteinase K (20 mg/ml) حل و به‌مدت ۳-۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به مخلوط حاصل، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl 5M و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (Cetyltrimethylammonium bromide) (۴/۱ گرم NaCl، ۱۰ گرم CTAB و ۸۰ میلی لیتر DDW) اضافه و به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. سپس به مخلوط حاصل ۷۸۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ کلروفرم و ۱ ایزوآمیل الکل) اضافه و پس از تکان دادن به‌مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در rpm ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد. محلول روئی به تیوب دیگری منتقل شده و هم حجم آن مخلوط فنل – کلروفرم – ایزوآمیل الکل (۱/۲۴/۲۵) اضافه شد و پس از سانتریفوژ ۲۵-۲۰ دقیقه‌ای در rpm ۲۵۰۰، عمل ترسیب DNA به‌وسیله ایزوپروپانول و اتانول (۷۰ درصد) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و در نهایت DNAحاصل در ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر بافر TE (pH=8) و ۵-۳ میکرولیتر آنزیم Rnase A حل شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای انجام فرآیند PCR، ۲ میکرولیتر از DNA تخلیص شده (با غلظت ۲۰۰µl/ng) از باکتری سالمونلا تیفی با ۲۳ میکرولیتر از دیگر اجزا واکنش PCR مخلوط شد. این اجزا عبارتند از یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت pmol/ ۲۰µl (در مجموع ۲ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP با غلظت mM ۲/۵، ۱/۲۵ میکرولیتر MgCl2 با غلظت mM ۵۰، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer X۱۰، ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل (DDW) و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5 unit/µl). برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر DNA (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه) و یک مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش، ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول رنگ‌زا (Loading buffer) توسط ژل آگارز ۲ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. سپس محصولات PCR به‌وسیله دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

تأیید محصولات واکنش: برای این منظور از هضم آنزیمی محصولات واکنش توسط آنزیم‌های محدودکننده استفاده شد. پس از بررسی توالی مورد انتظار توسط نرم افزار DNASIS، آنزیم Taq1 برای هضم قطعه مورد نظر انتخاب گردید. پس از تکثیر هر یک از قطعات به‌صورت مجزا، ۸ میکرولیتر از آن‌ها توسط ۲ میکرولیتر از آنزیم مربوطه به‌مدت ۴ ساعت در ۶۵ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت و محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: برای این منظور، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از ۸ باکتری انجام شد و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

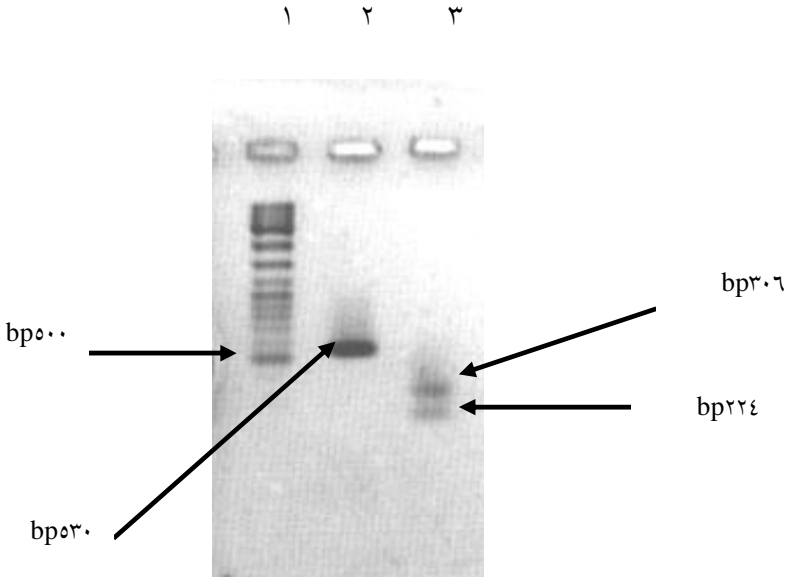
تعیین میزان حساسیت واکنش PCR: برای محاسبه حساسیت واکنش بر اساس تعداد باکتری، پس از کشت باکتری در محیط BHI و اندازه گیری OD محیط کشت، ابتدا از محیط مورد نظر تا ۸-۱۰ رقت تهیه کرده و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شد و جهت محاسبه تعداد باکتری در هر رقت فرآیند شمارش باکتری انجام گردید.

یافته‌ها

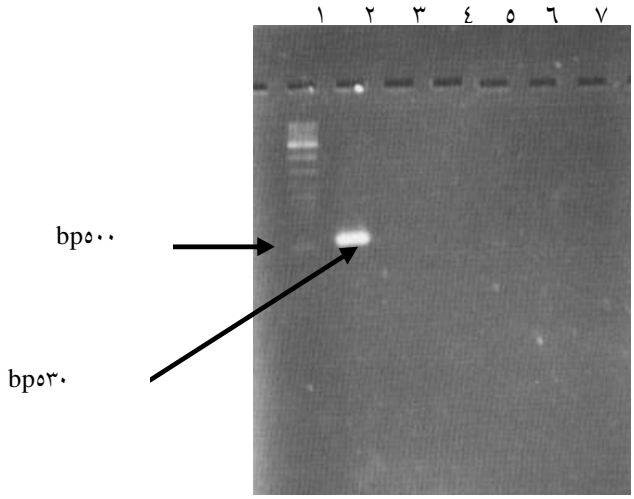
سویه‌های مورد استفاده به‌وسیله روش‌های استاندارد آزمایشگاهی شناسایی شدند. پرایمرها و قطعات انتخاب شده جهت PCR توسط نرم‌افزارهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند و یک جفت پرایمر جهت تکثیر قطعه مورد نظر طراحی شده و کیفیت آن‌ها در الکتروفورز

جدول ۱: خصوصیات پرایمر طراحی شده

نام پرایمر	توالی پرایمر	باز تعداد	اندازه محصول
VF	5' TGA CTC TAA TGC AAA CAT CTA GCG 3'	24	bp ۵۳۰
VR	5' GAA GTC TCC TTA TGC TGA AAT AAC C 3'	25	



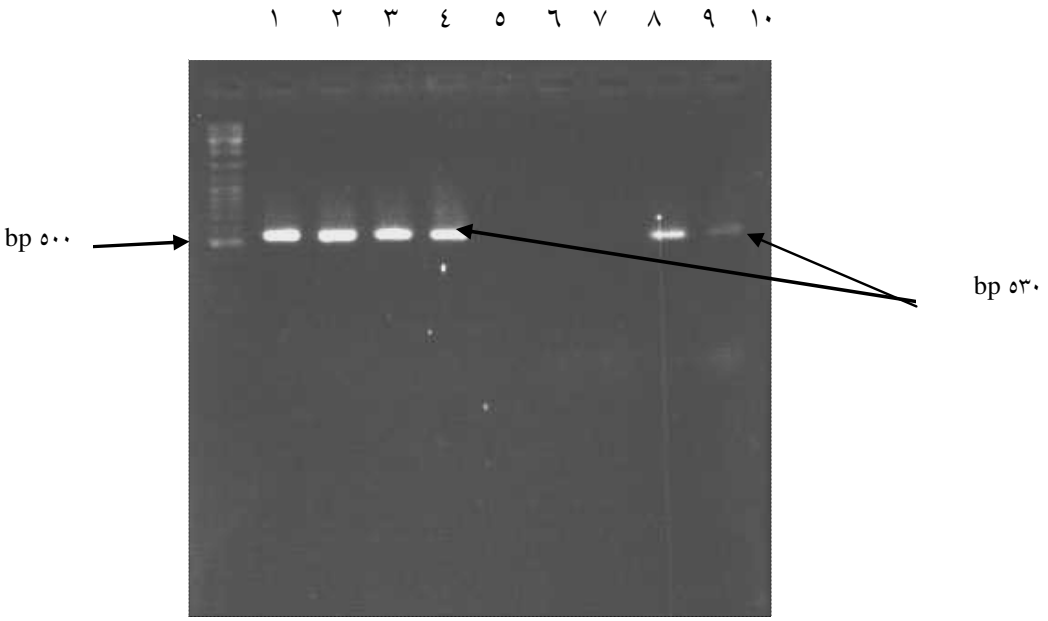
تصویر ۱: برش آنزیمی محصول PCR: ستون ۱: مارکر (DNA Ladder Mix SM0333)
ستون ۲: محصول PCR، ستون ۳: قطعات حاصل از برش آنزیمی



تصویر ۲: تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR.
ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت باز، ستون ۲: سالمونلا تیفی PTCC=1185
ستون ۳:شیگلا فلکسنری، ستون ٤: اشریشیاکلی ، ستون ۵: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC= 25923
ستون ٦: باسیلوس ساب تیلیس، ستون ۷: کلستریدیوم بوتولینوم

با ژل پلی‌اکریل‌آمید بررسی و تأیید گردید. برای جستجوی سالمونلا تیفی واکنش PCR با یک جفت پرایمر ویژه ژن viaB انجام شد که مشاهده قطعه ۵۳۰ جفت باز مربوط به بخشی از ژن viaB نشان‌دهنده وجود این ژن در باکتری سالمونلا تیفی بود (شکل ۱ ستون ۱).

تأیید محصولات PCR: پس از بررسی قطعات



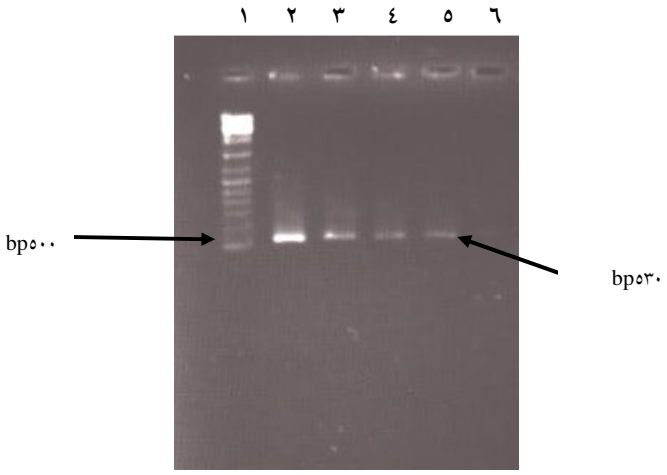
تصویر۳: تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR با دیگر سویه های سالمونلا

ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت باز، ستون ۲، ۳، ٤، ٥: نمونه های کلینیکی سالمونلا تیفی ،

ستون ٦: سالمونلا تیفی موریوم ATCC=14028 ، ستون ۷: نمونه کلینیکی سالمونلا تیفی موریوم

ستون ۸: نمونه کلینیکی سالمونلا تیفی موریوم ، ستون ۹: نمونه کلینیکی مشکوک به سالمونلا دوبلین

ستون ۱۰: نمونه کلینیکی مشکوک به سالمونلا پاراتیفی C



تصویر ٤: تعیین حساسیت بر حسب تعداد باکتری: پس از تهیه غلظت $۱۰^{-۸}$ باکتری، رقت های زیر از باکتری جهت بررسی حساسیت واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت

ستون شماره ۱: مارکر، ستون شماره ۲: ٥۰۰۰۰ باکتری ، ستون شماره ۳: ٥۰۰۰ باکتری ،

ستون شماره ٤: ٥۰۰ باکتری، ستون شماره ٥: ٥۰ باکتری ، ستون شماره ٦: ٥ باکتری

تکثیر شده توسط نرم‌افزار DNASIS،Taq1 برای هضم این قطعات در نظر گرفته شد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، آنزیم Taq1 قطعه viaB را در جایگاه ۳۰٦ مورد برش قرار داده بود که در نتیجه این فرآیند، دو قطعه ۲۲٤ و ۳۰٦ جفت باز ایجاد گردید (شکل ۱، ستون ۲).

میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: پس از انجام

واکنش PCR با ٦ باکتری و الکتروفورز محصولات PCR، نتیجه حاصل از آن مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، قطعه مورد نظر تنها در سالمونلا تیفی تکثیر یافته بود، (شکل ۲ ستون ۲) و در مورد ۵ باکتری دیگر، این قطعه تکثیر نشده بود (شکل ۲ ستون ۳ تا ۷). در این تحقیق، دو نمونه کلینیکی که توسط روش‌های معمول در آزمایشگاه به عنوان سالمونلا دوبلین و سالمونلا پاراتیفی C معرفی شده بودند، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳ ستون ۹ و ستون ۱۰) و مشخص گردید که قطعه ۵۳۰ جفت باز در این دو باکتری وجود دارد. از آن‌جایی که در بررسی جفت پرایمر مورد نظر به‌وسیله نرم‌افزارهای مولکولی، هیچ باکتری به غیر از سالمونلا تیفی شناسایی نگردید، نسبت به برش محصول واکنش PCR با ژنوم دو باکتری توسط آنزیم محدود کننده TaqI اقدام شد و در نتیجه این فرآیند دو قطعه ۲۲٤ و ۳۰٦ جفت باز ایجاد گردید که نشان‌دهنده تشخیص اشتباه در آزمایشگاه بود و هر دو سویه سالمونلا تیفی می باشد. با انجام تست‌های بیوشیمیایی مجدد، نتیجه به‌دست آمده توسط روش PCR مورد تأیید قرار گرفت.

میزان حساسیت واکنش PCR: پس از تهیه سریال رقت، نسبت به میزان حساسیت واکنش اقدام گردید. تکثیر قطعه مورد نظر توسط واکنش PCR تا رقت ٤-۱۰ از محیط کشت باکتری انجام شده است که در این رقت تعداد باکتری برابر ۵۰µl/cfu می‌باشد که نشان دهنده حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری است (شکل ٤).

بحث

روش‌های متعددی جهت شناسایی سریع و قطعی باکتری عامل حصبه از جمله تست ویدال و کشت خون وجود دارد که به دلایلی از جمله اشتباه در تشخیص و هزینه بالا کمتر مورد استفاده قرار می گیرند (٦). این در حالی است که روش‌های متداول تشخیص سالمونلا تیفی نیازمند زمان طولانی بوده و فاقد کارآیی لازم جهت تشخیص سریع و دقیق این باکتری می باشند. اخیراً روش PCR جهت تشخیص عامل حصبه و تفکیک آن از سایر باکتری‌ها مورد توجه قرار گرفته شده است.

در سال ۱۹۹۳ میلادی سونگ و همکارانش توانستند سالمونلا تیفی را توسط ژن flagellin شناسایی نمایند (۷). در سال ۱۹۹۸، ترکوو و همکارانش از ژن 16S rRNA و در سال ۲۰۰۳، پاتماناتان و همکارانش از ژن hilA جهت شناسایی جنس سالمونلا استفاده نمودند (۸,۹). در این دو روش، گونه سالمونلا قابل شناسایی نبود و با توجه به آن‌که همه جنس‌های سالمونلا برای انسان خطرناک نمی‌باشند، روش‌های فوق کارآیی لازم برای استفاده در آزمایشگاه‌های کلینیکی را ندارند.

محققین جهت تشخیص مولکولی سالمونلا تیفی پرایمرهای مختلفی را بر اساس ردیف ژن‌های شناخته شده flic-d, prt, tyv و flic-a طراحی و بررسی نموده اند (۱۰). در تحقیق دیگری در سال ۲۰۰۵، از ژن‌های prt, tyv, invA جهت تشخیص مولکولی سالمونلا تیفی استفاده گردید که تعداد پرایمرهای مورد استفاده در آن‌ها زیاد بوده است (۱۱).

در مطالعه حاضر، نمونه ژنوم باکتری‌های استاندارد و کلینیکی سالمونلا تیفی، سالمونلا تیفی موریوم همراه با گونه‌های دیگر شامل: شیگلا، اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس ساب تیلیس و کلستریدیوم بوتولینوم با یک جفت پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی‌ها مشخص نمود که پرایمر انتخاب شده به‌طور اختصاصی قادر به تشخیص عامل سالمونلا تیفی می‌باشد.

این روش شناسایی بر اساس توالی نوکلئوتیدی می‌باشد که در ناحیه viaB قرار داشته و بستگی به حضور یا عدم حضور آنتی ژن Vi ندارد. در حقیقت، سوش‌های سالمونلا تیفی Vi منفی نیز دارای این ناحیه بوده و توسط این جفت پرایمر قابل شناسایی می‌باشند (۱۱,۱۲). موشیموتو و همکارانش نیز با استفاده از ترادف ژن ViaB

نسبت به شناسایی باکتری سالمونلا تیفی اقدام نمودند که ترادف انتخاب شده با سالمونلا پاراتیفی C واکنش داده و نتیجه PCR آن مثبت بوده است (۵).

در تحقیق حاضر، ترادفی انتخاب شد که پس از جستجو در بانک‌های ژنی مشاهده گردید که هیچ واکنشی با سویه‌های دیگر سالمونلا ندارد. به‌طور کلی، با بررسی حساسیت این روش مشخص گردید که در حدود c.f.u ۵۰ از باکتری در نمونه قابل تشخیص می‌باشد. در بررسی‌هایی نیز که توسط سونگ و پاتماناتان انجام شد، میزان حساسیت به ترتیب ۱ تا ۱۰ و c.f.u ۱۲۰۰ از باکتری گزارش شد (۷،۹). با توجه به آن‌که دوز عفونی باکتری سالمونلا تیفی در انسان ۱۰۰ هزار باکتری می‌باشد، در نتیجه می‌توان از این روش قبل از ایجاد بیماری نسبت به شناسایی این باکتری اقدام نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش مصوب شورای پژوهشی دانشگاه امام حسین (ع) می‌باشد که بدینوسیله از مسؤولین محترم و نیز از آقای دکتر میرزا خلیل بهمنی به‌خاطر مشاوره در انجام پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Ivanoff B, Levine MM, Lambert PH. Vaccination against typhoid fever: present status. Bull World Health Organ. 1994;72(6): 957-71.
2. Haque A, Ahmed J, Qureshi A. Early detection of typhoid by polymerase chain reaction. Ann Saudi Med. 1999; 19(4): 337-40.
3. Soltani Banavandi MJ. Shahhosseiny MH. Shahbazzadeh D. Karimi V. Mirzahoseini H. Mahboudi M. et al. Selective amplification of prt, tyv and invA genes by multiplex PCR for rapid detection of Salmonella typh. Iranian Biomedical Journal. 2005; 9(3): 135-8.
4. Zhu Q. Lim CK. Chan YN. Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol. 1996; 80(3):244-51.
5. Hashimoto Y, Itho Y, Fujinaga Y, Khan AQ, Sultana F, Miyake M. et al. Development of nested PCR based on the Via B sequence to detect Salmonella typhi. J Clinical Microbiology. 1995; 33: 775–7.
6. Abdul H, Janbaz A, Javed A. Early detection of typhoid by polymerase chain reaction. Ann Saudi Med. 1999; 19(4):337-340.
7. Song JH, Cho H, Park MY, Na DS, Moon HB, Pai CH.. Detection of Salmonella typhi in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993; 31(6): 1439-43.
8. Trkov M, Avgustin G. Specific detection of salmonella spp. with molecular biological techniques. Animal Microbiol. 1998; 29.
9. Pathmanathan SG. Cardona-Castro N. Sánchez-Jiménez MM. Correa-Ochoa MM, Puthucheary SD, Thong KL. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene. J Med Microbiol. 2003; 52(Pt 9): 773-6.
10. Riyaz-hassan S, Verma V, Qazi GN. Rapid detection of salmonella by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 2004; 18: 333-9.
11. Looney RJ, Steigbigel RT. Role of the Vi antigen of Salmonella typhi in resistance to host defense in vitro. J Lab Clin Med. 1986; 108: 506-16.
12. French GL, King SD, Louis P. Salmonella serotypes, Salmonella typhi phage types, and anti-microbial resistance at the University Hospital of the West Indies, Jamaica. J Hyg Camb. 1977; 79: 5–16.