



Molecular detection of pathogenic serovar *Salmonella enteritidis* by LAMP method using a specific marker screened by comparative genomic methods

Hadi Ravan, Mojdeh Amandadi

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/07/31

Accepted: 2016/12/28

Available online: 2017/03/16

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2017; 11(1): 18-29

Corresponding author at:

Dr. Hadi Ravan

Department of Biology,
Faculty of Science, Shahid
Bahonar University of
Kerman, Kerman, Iran

Tel: 0983433257432

Email:

Ravan@uk.ac.ir

Abstract

Background and Aim: *Salmonella enteritidis* is one of the most common causes of gastroenteritis, and in acute cases may lead to septicemia and even death. In this study, genetic markers of serovar were screened by comparative genomic methods, and the most specific marker was targeted to identify this pathogenic serovar by LAMP method.

Materials and Methods: This study was done in 2016. To find genetic markers of *S. enteritidis*, 50 complete genomes of *S. enteritidis* and other genera belonging to *Enterobacteriaceae* family were compared by different comparative genomic methods. The specific marker was selected and targeted by the LAMP method using six special primers to demonstrate the feasibility of comparative genomic methods for screening specific genetic markers (The bacterial strains used in this study were collected from hospitals in the Southeast of Iran). The efficiency of LAMP assay for the identification of this bacterium was also evaluated in artificially contaminated chicken meat samples.

Results: *lygC* gene was selected as the most specific marker for detecting *S. enteritidis* strains. LAMP assay results showed that the selected gene is specific for detecting *S. enteritidis* isolates. The assay sensitivity was determined to be 10 CFU/reaction for pure bacterial culture, 10³ CFU/mL for contaminated chicken meat samples without pre-enrichment, and 10 CFU/mL after a 4-h pre-enrichment.

Conclusions: The present study demonstrates that comparative genomic methods are efficient tools for the identification of specific genetic markers. Also, the present LAMP method could be used as a powerful, accurate and inexpensive tool for detecting *S. enteritidis* in food quality and clinical laboratories.

KeyWords: *Salmonella enteritidis*, Specific Marker, Comparative genomic, LAMP assay

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ravan H, Amandadi M. Molecular detection of pathogenic serovar *Salmonella enteritidis* by LAMP method using a specific marker screened by comparative genomic methods. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 18-29



Farname Inc.

تشخیص مولکولی سرووار بیماری زای سالمونلا انتریتیدیس به روش LAMP با استفاده از مارکر اختصاصی غربال شده به وسیله روش های ژنومیک مقایسه ای

هادی روان، مژده اماندادی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سالمونلا انتریتیدیس یکی از شایع ترین علل گاستروانتریت می باشد که در موارد حاد می تواند منجر به سپتی سمی و یا حتی مرگ شود. در مطالعه حاضر با استفاده از روش های ژنومیک مقایسه ای مارکرهای ژنی این سرووار غربال گردید و اختصاصی ترین مارکر با استفاده از روش LAMP برای شناسایی این پاتوژن مورد هدف قرار گرفت.

مواد و روش کار: این مطالعه در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. بمنظور یافتن مارکرهای ژنی سالمونلا انتریتیدیس، ۵۰ ژنوم کامل از سویه های سالمونلا انتریتیدیس و سایر جنس های خانواده انتروباکتریاسه با استفاده از روش های ژنومیک مقایسه ای مورد بررسی قرار گرفتند. مارکر اختصاصی غربال شده با طراحی ۶ پرایمر اختصاصی و با استفاده از روش LAMP بمنظور شناسایی سویه های سالمونلا انتریتیدیس هدف قرار گرفت (سویه های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه از بیمارستان های جنوب شرق کشور جمع آوری گردید). کارایی روش LAMP برای شناسایی سالمونلا انتریتیدیس در نمونه های گوشت مرغ که بصورت مصنوعی به این باکتری آلوده شده بودند، نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: ژن *lygC* به عنوان اختصاصی ترین مارکر برای شناسایی سویه های سالمونلا انتریتیدیس انتخاب شد. نتایج حاصل از روش LAMP اختصاصیت این مارکر را برای شناسایی ایزوله های سالمونلا انتریتیدیس نشان داد. حساسیت این روش برای کشت خالص باکتری ۱۰ CFU/reaction و برای نمونه های گوشت مرغ آلوده 10^3 CFU/mL در آغاز انکوباسیون و ۱۰ CFU/mL بعد از ۴ ساعت انکوباسیون ارزیابی گردید.

نتیجه گیری: پژوهش حاضر اثبات می کند که روش ژنومیک مقایسه ای روشی کارآمد برای شناسایی مارکرهای ژنی اختصاصی می باشد. همچنین روش LAMP حاضر می تواند یک ابزار قدرتمند، دقیق و ارزان جهت شناسایی سالمونلا انتریتیدیس در آزمایشگاه های کنترل کیفی مواد غذایی و تشخیص طبی باشد.

کلمات کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، مارکر اختصاصی، ژنومیک مقایسه ای، روش LAMP

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۱۲/۲۶

موضوع:

میکروبی شناسی مولکولی

IJMM 1396; 11(1): 18-29

نویسنده مسئول:

دکتر هادی روان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان،
ایران

تلفن: ۰۹۸۳۴۳۲۲۵۷۴۳۲

پست الکترونیک:

Ravan@uk.ac.ir

مقدمه

اخیر الگوی آلودگی به سالمونلا از سرووار سالمونلا تیفی موریوم به سرووار سالمونلا انتریتیدیس تغییر پیدا کرده است و در بسیاری از کشورها تست های تشخیصی برای شناسایی این باکتری جزء تست های مهم در صنایع غذایی و مراکز کنترل بیماری ها به شمار می روند (۴،۵). شیوع سالمونلا انتریتیدیس در طی سال های اخیر در سرتاسر جهان رو به افزایش بوده است، به طوری که چندین مورد آلودگی گاستروانتریت در ایران نیز گزارش شده است (۶). در مطالعه ای بر روی ۴۸۰ مزرعه مرغ

اعضای زیر جنس سالمونلا انتریکا دسته ای از پاتوژن های مهم غذایی در سرتاسر جهان و از عوامل ایجاد گاستروانتریت و عفونت خون می باشند که در مواردی حتی ممکن است منجر به مرگ شوند (۱،۲). گاستروانتریت شایع ترین عفونت سالمونلایی در انسان می باشد که یکی از مهم ترین عوامل ایجادکننده آن سرووار سالمونلا انتریتیدیس می باشد. منبع اصلی این سرووار گوشت دام و طیور و تخم مرغ نپخته آلوده می باشد که منبع و ناقل مهمی جهت عفونت های انسانی محسوب می گردد (۳). در سال های

گوشتی در اطراف تهران، ۶۷٪ مورد آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس گزارش شده است (۷). همچنین در مطالعه دیگری نرخ آلودگی به این باکتری در ۱۷۱ مزرعه مرغداری اطراف کشور ۴۵٪ گزارش شده است (۳). با توجه به شیوع رو به رشد این سرووار بیماری‌زا و چرخه زندگی پیچیده آن، بسیاری از محققان ارائه یک روش تشخیصی سریع و کارآمد را برای کنترل این پاتوژن به منظور ایمنی مواد غذایی و تشخیص‌های بالینی ضروری می‌دانند. روش‌های مرسوم برای شناسایی این باکتری شامل غنی‌سازی نمونه‌ها، کشت بر روی محیط انتخابی و تست‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی می‌باشند (۸،۹). در این روش‌ها نتایج منفی پس از ۴ روز و نتایج تأییدی تست‌های مثبت پس از ۱۵ روز به دست می‌آید (۱۰). علاوه بر زمان بر بودن، این روش‌ها پرهزمت و پرهزینه می‌باشند و به دلیل تغییرات مورفولوژیکی و تغییر در پروفایل بیوشیمیایی کلنی‌ها از کارایی و درصد اطمینان بالایی برخوردار نمی‌باشند (۱۱). امروزه روش‌های مولکولی به دلیل سادگی، سرعت و دقت بالا جایگزین قدرتمندی در تشخیص میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. تاکنون روش‌های بسیاری مبتنی بر PCR برای شناسایی این پاتوژن ارائه شده است که ژن‌های از جمله *sefA*، *invA*، *spvC*، *lygD* و *SEN1392* را هدف قرار داده‌اند (۱۴-۱۲،۳). با وجود سرعت و دقت روش‌های مبتنی بر PCR بسیاری از روش‌های ارائه شده برای شناسایی این پاتوژن به دلیل عدم اختصاصیت لازم برای شناسایی این پاتوژن دچار چالش جدی شده‌اند. در واقع انتخاب اهداف یا مارکرهای مناسب جهت تشخیص اختصاصی پاتوژن‌ها یکی از اصلی‌ترین چالش‌های روش‌های تشخیصی می‌باشد. امروزه با افزایش تعداد ژنوم‌های توالی‌یابی شده از انواع سرووارهای سالمونلا و سایر جنس‌های مربوط به خانواده انتروباکتریاسه، امکان شناسایی مارکرهای ژنی اختصاصی مربوط به هر سرووار با استفاده از روش‌های *in silico* از جمله روش ژنومیک مقایسه‌ای فراهم شده است. مطالعات بسیاری نشان داده است که ژنومیک مقایسه‌ای روشی کارآمد برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی بین باکتری‌های نزدیک به هم و بنابراین شناسایی مارکرهای ژنی اختصاصی برای هر سرووار باکتریایی می‌باشد (۱۵،۱۶). از این رو در پژوهش حاضر، مارکرهای اختصاصی سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از مقایسه توالی‌های ژنومی در دسترس از سویه‌های مختلف سالمونلا و غیر سالمونلا مورد شناسایی قرار گرفت. علاوه بر استفاده از یک مارکر ژنی اختصاصی، انتخاب یک روش تشخیصی سریع، ساده، ارزان و با حساسیت بالا در تشخیص پاتوژن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار

می‌باشد. با توجه به محدودیت‌های روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR از جمله نیازمندی به تجهیزات پیشرفته و گران‌قیمت آزمایشگاهی، نیاز به استفاده از روش‌های وقت‌گیر و هزینه‌بر به منظور آشکارسازی و تشخیص محصولات و حساسیت پایین‌تر این روش‌ها نسبت به برخی روش‌های موجود (۱۷)، در سال‌های اخیر روش‌های تشخیصی مبتنی بر تکثیر هم‌دمای اسیدهای نوکلئیک توجه محققان بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. یکی از کارآمدترین این روش‌ها روش تکثیر هم‌دمای به واسطه حلقه (Loop mediated isothermal amplification) (LAMP) می‌باشد (۲۰-۱۸). در این روش، اسید نوکلئیک هدف با اختصاصیت، کارایی و سرعت بالا به وسیله آنزیم DNA پلیمرز *Bst* و با به‌کارگیری ۶ پرایمر اختصاصی در دمای ثابت و مدت زمان کوتاه تکثیر می‌شود (۲۱). با توجه به مزایای ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که به‌کارگیری این روش به همراه استفاده از یک مارکر ژنی بسیار اختصاصی برای سرووار سالمونلا انتریتیدیس می‌تواند یک ابزار قدرتمند، دقیق و ارزان جهت شناسایی این سرووار بیماری‌زا در آزمایشگاه‌های کنترل کیفی مواد غذایی، تشخیص‌های کلینیکی و پایش بیماری‌های عفونی در آزمایشگاه‌های تشخیصی؛ به خصوص آزمایشگاه‌های با تجهیزات اندک و همچنین آزمایشگاه‌های سیار باشد. از این رو در مطالعه حاضر به منظور تأیید نهایی مارکر اختصاصی غربال شده و همچنین به منظور تأیید نهایی مارکر اختصاصی غربال شده و بیماری‌زای سالمونلا انتریتیدیس، اختصاصی‌ترین مارکر غربال شده از روش ژنومیک مقایسه‌ای با استفاده از روش LAMP مورد هدف قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

غربال مارکرهای ژنی اختصاصی سرووار سالمونلا

انتریتیدیس

ژنوم کامل مربوط به ۵۰ سویه متعلق به سرووارهای مختلف سالمونلا انتریکا و سایر سویه‌های مربوط به خانواده انتروباکتریاسه از پایگاه داده‌های NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) و موسسه سانجر (<http://www.sanger.ac.uk/>) دانلود شدند. به منظور شناسایی اهداف تشخیصی سرووار سالمونلا انتریتیدیس سویه P125109 با شماره دسترسی AM933172 به‌عنوان ژنوم مرجع انتخاب و توالی ژنومی آن به‌صورت *in silico* به قطعات ۵۰۰ جفت بازی تقسیم گردید. هر قطعه ۵۰۰ جفت بازی با استفاده از برنامه

سویه‌های باکتریایی و آماده‌سازی DNA

در مطالعه حاضر از ۱۲ ایزوله باکتریایی؛ شامل ۳ ایزوله از سرووار *سالمونلا انتریتیدیس*، ۷ ایزوله از سایر سرووارهای *سالمونلا* شامل *Blegdom*، *Kuilsrivier*، *ParatyphiA*، *Nigeria Rostock*، *Typhimurium* و *Typhi* و ۲ ایزوله از جنس‌هایی غیر از *سالمونلا*؛ شامل *E. coli* و *Shigella* (با سروتایپ‌های نامشخص) استفاده گردید. سویه‌های باکتریایی مذکور از گروه دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سیستان و بلوچستان و آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان جمع‌آوری گردید. یک تک کلون از هر باکتری در محیط کشت Tryptic Soy Broth, TSB (Liofilcham, Italy) کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. به‌منظور شمارش کلنی‌ها از روش استاندارد رقیق‌سازی متوالی استفاده گردید. استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

طراحی پرایمرهای LAMP

ژن *lygC* از ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* سویه P125109 به‌عنوان هدف برای طراحی پرایمرهای LAMP مورد استفاده قرار گرفت. مجموعه‌ای از ۶ پرایمر؛ شامل دو پرایمر درونی (FIP و BIP)، دو پرایمر بیرونی (F3 و B3) و دو پرایمر لوب (FLP و BLP) با استفاده از نرم‌افزار PRIMER EXPLORER (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)V4 طراحی گردید (جدول ۱). اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه NCBI مورد تأیید قرار گرفت.

BLASTN در مقابل ۱۰ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* هم‌طراز گردید و قطعاتی که مقدار E-value کمتر از 10^{-20} داشتند به‌عنوان توالی‌های محافظت‌شده در *سالمونلا انتریتیدیس* در نظر گرفته شدند. سپس هر یک از این قطعات با استفاده از برنامه BLASTN در مقابل توالی‌های ژنومی ۴۰ سویه مربوط به سایر سرووارهای *سالمونلا* و غیر *سالمونلا* هم‌طراز گردیدند. روش ژنومیک مقایسه‌ای مورد استفاده در اینجا توسط *Chen* و همکاران و *Liu* و همکاران ارائه شده است (۲۲، ۲۳). به‌منظور ارزیابی بیشتر و اطمینان از نتایج به‌دست آمده، آنالیز بیوانفورماتیکی مارکرهای ژنی *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از نرم‌افزار Mauve (university of technology, Sydney) نیز انجام شد (۲۴). در این روش ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* سویه P125109 در مقابل ۵۰ ژنوم باکتریایی متعلق به جنس‌های *E. coli*، *Citrobacter*، *Shigella*، *Klebsiella*، *Enterobacter* و سرووارهای مختلف *Salmonella* موجود در پایگاه داده‌های NCBI هم‌طراز و نواحی اختصاصی مربوط به *سالمونلا انتریتیدیس* غربال گردید. پس از غربال نواحی اختصاصی ژنوم سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس*، به‌منظور آنالیزهای بیشتر، توالی‌های DNA انتخابی با استفاده از نرم‌افزار Nucleotide BLAST (USA) در مقابل دو پایگاه داده‌ها شامل Whole Genome و Nucleotide Collection (nr) و Shotgun reads (WGS) هم‌طراز شدند. غربال‌گری نهایی به‌وسیله جستجوی هومولوژی توالی‌ها با استفاده از برنامه BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) با مقدار E.value برابر 10^{-30} انجام گرفت و توالی‌هایی که با این مقدار E.value در تمامی ژنوم‌های *سالمونلا انتریتیدیس* مطابق و مشابه بودند به‌عنوان مارکرهای اختصاصی انتخاب شدند (۲۵). در نهایت به‌منظور تعیین بهترین کاندید از بین توالی‌های به‌دست‌آمده از غربال دوم، آنالیز دقیق نواحی مختلف هر یک از این ژن‌ها در پایگاه داده‌های مختلف انجام شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش LAMP

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمرها (5'-3')	موقعیت توالی هدف در ژنوم <i>سالمونلا انتریتیدیس</i> سویه P125109
F3	CCGTCGGACAATTTATGC	۱۴۷۱۴۳۲-۱۴۷۱۴۴۹
B3	CGTCGATACACGAACCAG	۱۴۷۱۷۹۵-۱۴۷۱۸۱۲
FIP	GCACTATAAGGTAAGCCACAGCTACGGAGCTTATTGAGGC	(۱۴۷۱۵۵۷-۱۴۷۱۵۷۸)-(۱۴۷۱۴۹۹-۱۴۷۱۵۱۶)
BIP	ACTCATTCTCCACTTTCGCGAACGATACCTGCCTTA	(۱۴۷۱۷۱۶-۱۴۷۱۷۳۵)-(۱۴۷۱۷۷۲-۱۴۷۱۷۸۹)
FLP	CGGCATATGGTAAATCGC	۱۴۷۱۵۲۲-۱۴۷۱۵۳۹
BLP	TGATGCAGATGCTCTGGT	۱۴۷۱۷۵۴-۱۴۷۱۷۷۱

واکنش LAMP

یافته‌ها

مارکرهای ژنی اختصاصی سرووار سالمونلا

انتریتیدیس

به منظور شناسایی مارکرهای ژنتیکی اختصاصی باکتری سالمونلا انتریتیدیس، از روش ژنومیک مقایسه‌ای ارائه شده توسط Chen و همکاران و Liu و همکاران استفاده گردید. علاوه بر این، به منظور ارزیابی بیشتر و اطمینان از نتایج به دست آمده، آنالیز بیوانفورماتیکی مارکرهای ژنی سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از نرم‌افزار Mauvi نیز انجام شد. نتایج به دست آمده از هر دو روش مورد استفاده مشابه بود. نتایج حاصل از این روش‌ها وجود دو لوکوس ژنی اختصاصی (SEN1935A-SEN1946 و SEN1379-SEN1391) و ۳ ژن اختصاصی مجزا (SEN0281، SEN1959 و SEN1964) را در ژنوم این باکتری نشان داد (جدول ۲). آنالیزهای بیشتر و دقیق‌تر ما بر روی این توالی‌ها در پایگاه داده‌های nr نشان داد که لوکوس ژنی SEN1935A-SEN1946 و ژن‌های SEN1959 و SEN1964 علی‌رغم اختصاصیتی که در غربال اول نشان دادند به دلیل آنکه در تعداد زیادی از ژنوم‌های سالمونلا انتریتیدیس وجود ندارند نمی‌توانند برای این سرووار به‌عنوان مارکر اختصاصی در نظر گرفته شوند (شکل ۱). علاوه بر این، آنالیز سایر ژن‌ها در پایگاه WGS نشان داد که ژن‌های SEN0281 (safA) با نواحی متناظر از ژنوم‌های *S. Nachanga* (با شماره دسترسی APAD01000005) و ژن‌های SEN1380 (*lygB*) و SEN1381 (*kil*) با نواحی ژنی از ژنوم‌های *S. Bareilly* (با شماره دسترسی JRLS01000052) و *S. Bovismorbificans* (با شماره دسترسی CQPN01000008) دارای درصد شباهت بالایی می‌باشند. ژن SEN183 (*lygD*) با نواحی ژنی از ژنوم *S. Give* (با شماره دسترسی JOKK01000020) شباهت تقریباً ۱۰۰٪ را نشان می‌دهد و ژن‌های SEN1385-SEN1387 و ژن SEN1390 علاوه بر این ژنوم، با نواحی ژنومی از ژنوم *S. Bareilly* نیز هم‌پوشانی دارند. ژن SEN1384 (*lygF*) نیز با نواحی متناظر از یکی از سویه‌های *E. coli* (با شماره دسترسی CP013662) شباهت بالایی را نشان می‌دهد. با توجه به این داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که از بین ۲۷ ژن غربال شده از مرحله اول تنها ژن‌های SEN1379 (*lygA*)، SEN1382 (*lygC*)، SEN1388، SEN1389 و SEN1391 و ناحیه بین ژنی *sdf1* (ناحیه بین ژن‌های *lygD* و *lygC*) برای سرووار سالمونلا انتریتیدیس اختصاصی می‌باشند. از آنجایی که ژن‌های

واکنش LAMP برای حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر تیوب واکنش شامل ۱/۶ میکرومولار از هر یک از پرایمرهای درونی، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از پرایمرهای بیرونی، ۰/۸ میکرومولار از هر یک از پرایمرهای لوب (جدول ۱)، ۱/۴ میلی مولار از هر یک از dATP، dGTP، dCTP و dTTP، ۰/۸ مولار بتائین (Sigma B0300, St. Louis, USA)، غلظت ۶ میلی مولار منیزیم سولفات، ۱ میکرولیتر از بافر LAMP 10X، واحد از قطعه بزرگ آنزیم *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, M0275S, Beverly, USA) و ۱۰ میکرولیتر از DNA هدف بود. مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۴ درجه سلسیوس در درون ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) انکوبه گردید. به منظور ارزیابی امکان‌پذیر بودن واکنش بدون نیاز به دستگاه ترموسایکلر، واکنش LAMP همچنین در حمام آب گرم با تنظیمات دمایی مشابه انجام شد. آشکارسازی و شناسایی محصولات حاصل از واکنش به صورت چشمی با مشاهده کدورت ناشی از رسوب منیزیم پیروفسفات در محیط واکنش انجام شد. علاوه بر این، به منظور ارزیابی دقیق واکنش LAMP و تأیید نتایج حاصل از روش کدورت سنجی، محصولات حاصل از واکنش با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۲/۵ درصد مورد آنالیز قرار گرفتند.

شناسایی سالمونلا انتریتیدیس در نمونه‌های آلوده

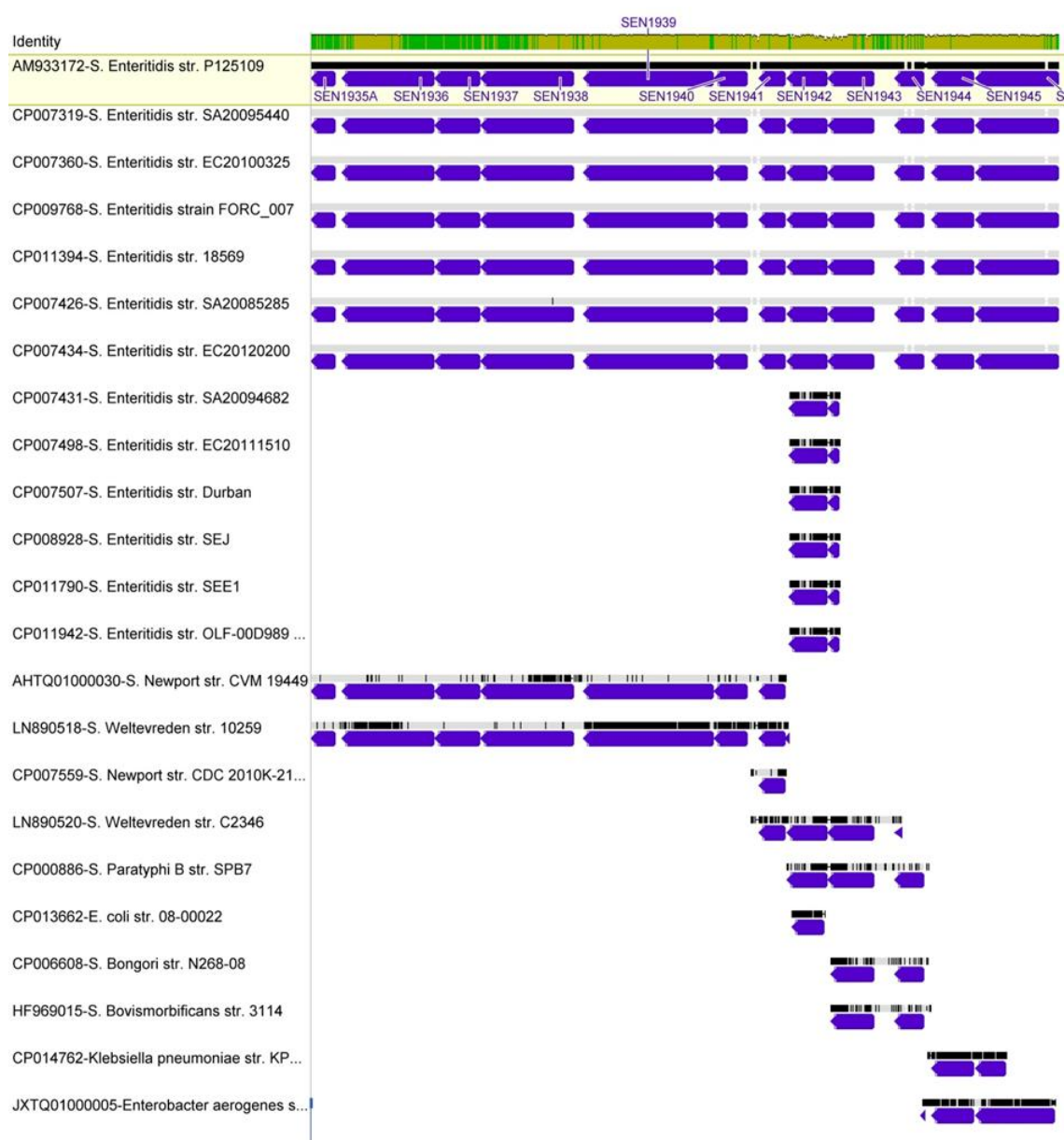
به منظور ارزیابی روش LAMP برای شناسایی ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس در نمونه‌هایی که به صورت مصنوعی به این باکتری آلوده شده‌اند، ۱ گرم گوشت مرغ عاری از باکتری با ۹ میلی‌لیتر TSB هموزنه گردید. نمونه‌های هموزنه شده به چند قسمت تقسیم شدند و هر قسمت با ۰ تا ۱۰^۴ واحد تشکیل‌دهنده کلنی از باکتری سالمونلا انتریتیدیس آلوده گردید (از 0 CFU/mL به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید و تعداد تکرار برای هر نمونه ۱۰ عدد بود). هر کدام از این هموزنه‌های گوشتی آلوده به چند قسمت تقسیم و در زمان‌های ۴، ۶ و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. میزان وابستگی واکنش LAMP (برای نمونه‌هایی که به صورت مصنوعی آلوده شده بودند) به زمان با استفاده از پارامتر آماری کای مربع مورد بررسی قرار گرفت (P-value < 0.05 معنی‌دار در نظر گرفته شد).

سالمونلا انتریتیدیس وجود ندارد و تنها منحصر به این سرووار می‌شود می‌توان ژن *lygC* را به‌عنوان اختصاصی‌ترین مارکر برای شناسایی سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس معرفی نمود (شکل ۲).

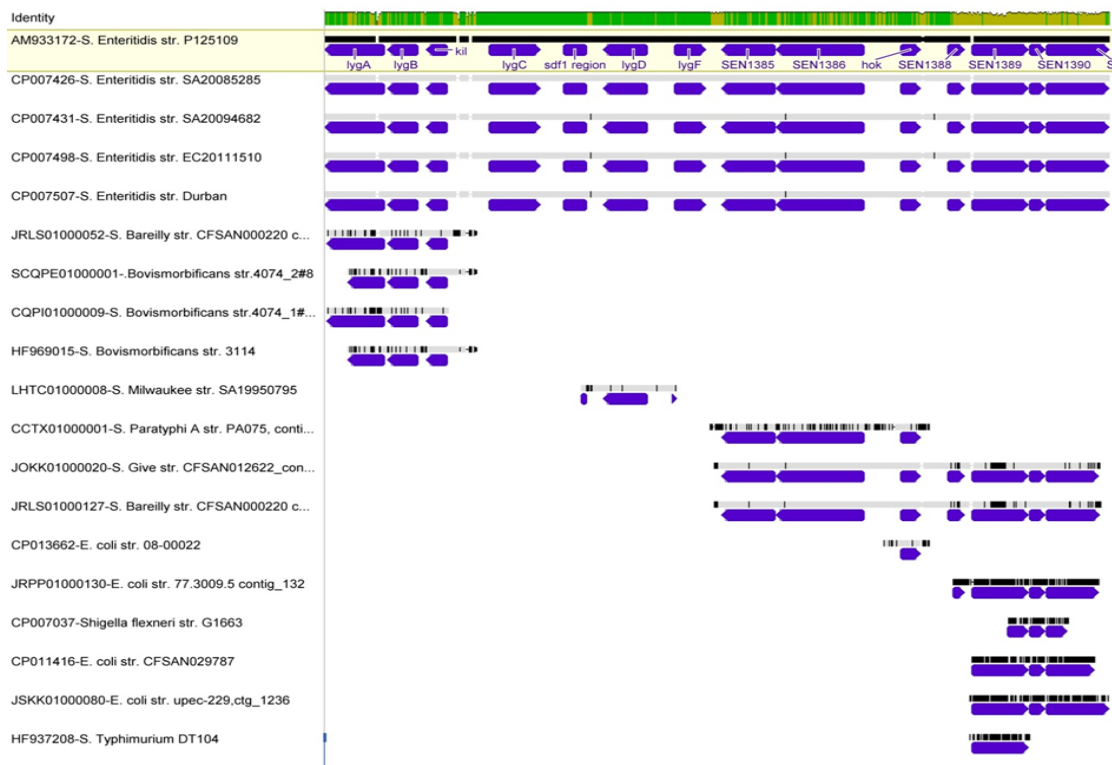
اختصاصی *lygA* و *SEN1388*، *SEN1389* و *SEN1391* و ناحیه *sdf I* نسبت به سایر سویه‌های غیر انتریتیدیس دارای پلی‌مورفیسم می‌باشند، اما ژن *lygC* در هیچ سویه دیگری غیر از

جدول ۲: ژن‌های غربال شده حاصل از غربال اولیه با استفاده از روش‌های ژنومیک مقایسه‌ای

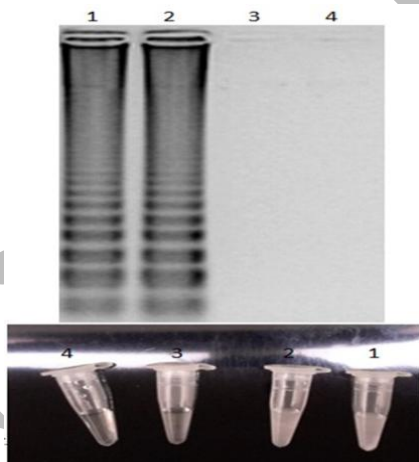
ژن‌های به‌دست‌آمده از غربال اولیه	نام رایج ژن‌ها	ناحیه نوکلئوتیدی در ژنوم سالمونلا انتریتیدیس سویه P125109
<i>SEN0281</i>	<i>safA</i>	۳۲۱۷۴۷-۳۲۲۲۵۶
<i>SEN1379</i>	<i>lygA</i>	۱۴۶۹۶۸-۱۴۷۰۳۰۳
<i>SEN1380</i>	<i>lygB</i>	۱۴۷۰۳۲۵-۱۴۷۰۶۴۲
<i>SEN1381</i>	<i>Kil</i>	۱۴۷۰۷۲۷-۱۴۷۰۹۴۸
<i>SEN1382</i>	<i>lygC</i>	۱۴۷۱۳۷۱-۱۴۷۱۹۰۷
<i>SEN1383</i>	<i>lygD</i>	۱۴۷۲۵۵۵-۱۴۷۳۰۲۲
<i>SEN1384</i>	<i>lygF</i>	۱۴۷۳۲۹۵-۱۴۷۳۶۲۴
<i>SEN1385</i>	-	۱۴۷۳۷۸۶-۱۴۷۴۳۴۰
<i>SEN1386</i>	-	۱۴۷۴۳۳۷-۱۴۷۵۲۶۹
<i>SEN1387</i>	<i>hok</i>	۱۴۷۵۶۳۹-۱۴۷۵۸۵۱
<i>SEN1388</i>	-	۱۴۷۶۱۲۷-۱۴۷۶۳۱۲
<i>SEN1389</i>	-	۱۴۷۶۳۷۵-۱۴۷۶۹۷۴
<i>SEN1390</i>	-	۱۴۷۶۹۷۴-۱۴۷۷۲۶۴
<i>SEN1391</i>	-	۱۴۷۷۱۴۱-۱۴۷۷۷۹۷
<i>SEN1935A</i>	-	۲۰۳۳۴۶۱-۲۰۳۳۷۸۴
<i>SEN1936</i>	-	۲۰۳۳۸۶۴-۲۰۳۵۰۹۳
<i>SEN1937</i>	-	۲۰۳۵۱۰۳-۲۰۳۵۷۰۵
<i>SEN1938</i>	-	۲۰۳۵۶۹۸-۲۰۳۶۹۴۸
<i>SEN1939</i>	-	۲۰۳۷۰۶۴-۲۰۳۸۷۹۴
<i>SEN1940</i>	-	۲۰۳۸۷۹۴-۲۰۳۹۲۳۴
<i>SEN1941</i>	-	۲۰۳۹۳۷۸-۲۰۳۹۷۲۸
<i>SEN1942</i>	-	۲۰۳۹۷۵۲-۲۰۴۰۲۹۱
<i>SEN1943</i>	-	۲۰۴۰۲۸۸-۲۰۴۰۹۰۵
<i>SEN1944</i>	-	۲۰۴۱۱۷۳-۲۰۴۱۵۶۲
<i>SEN1945</i>	-	۲۰۴۱۶۵۱-۲۰۴۲۲۲۳
<i>SEN1946</i>	-	۲۰۴۲۲۳۶-۲۰۴۳۳۲۷
<i>SEN1959</i>	-	۲۰۵۲۹۷۹-۲۰۵۳۸۹۶
<i>SEN1964</i>	-	۲۰۵۶۲۶۱-۲۰۵۷۱۲۴



شکل ۱: همطرازی توالی نوکلئوتیدی لوکوس ژنی *SEN1935A-SEN1946* از ژنوم سالمونلا انتریتیدیس در مقابل نواحی متناظر از سایر انواع ژنوم‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه. هر پیکان نشان‌دهنده یک ژن می‌باشد. شماره‌های مشخص شده بر روی پیکان‌ها نشان‌دهنده نام این ژن‌ها در ژنوم مرجع می‌باشد. نواحی مشابه ژن‌ها در ژنوم‌های مختلف بارنگ خاکستری نشان داده شده است. خطوط سیاه عمودی در این نواحی نشان‌دهنده نواحی دارای پلی مورفیسم می‌باشند. نام سویه‌های باکتریایی در ستون سمت چپ شکل نشان داده شده است. به دلیل عدم وجود فضای کافی تنها همطرازی تعدادی از سویه‌ها نشان داده شده است.



شکل ۲: هم‌طرازی توالی نوکلئوتیدی لوکوس ژنی *SEN1379-SEN1391* از ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* در مقابل نواحی متناظر از سایر انواع ژنوم‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه. هر پیکان نشان‌دهنده یک ژن می‌باشد. شماره‌های مشخص‌شده بر روی پیکان‌ها نشان‌دهنده نام این ژن‌ها در ژنوم مرجع می‌باشد. نواحی مشابه ژن‌ها در ژنوم‌های مختلف بارنگ خاکستری نشان داده شده است. خطوط سیاه عمودی در این نواحی نشان‌دهنده نواحی دارای پلی مورفیسم می‌باشند. نام سویه‌های باکتریایی در ستون سمت چپ شکل نشان داده شده است. به دلیل عدم وجود فضای کافی تنها هم‌طرازی تعدادی از سویه‌ها نشان داده شده است.



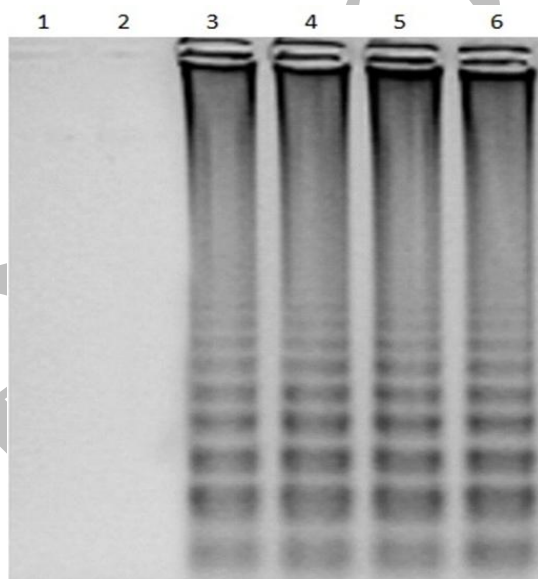
شکل ۳: نتایج حاصل از آنالیز محصولات واکنش LAMP با استفاده از روش ژل الکتروفورز و کدورت سنجی برای سروارهای مختلف *سالمونلا*. ۱: کنترل منفی، ۲: ایزوله *سالمونلا تیپیفی* موربوم، ۳ و ۴: ایزوله‌های مختلف *سالمونلا انتریتیدیس*. کدورت ایجاد شده در تیوب‌ها نشان‌دهنده تکثیر ژن هدف طی واکنش LAMP می‌باشد (تنها نتایج تعدادی از ایزوله‌ها نشان داده شده است).

اختصاصیت واکنش LAMP

واکنش LAMP بر روی ایزوله‌های مختلف *سالمونلا* و غیر *سالمونلا* انجام شد. کدورت ایجاد شده ناشی از محصولات واکنش LAMP در تیوب‌های تست حاوی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* تکثیر موفق ژن هدف را در این ایزوله‌ها نشان داد. علاوه بر این، به‌منظور تأیید نتایج حاصل از روش کدورت سنجی، محصولات واکنش با استفاده از روش ژل-الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند. الگوی نردبانی حاصل از محصولات LAMP در ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* بر روی ژل نشانگر تکثیر موفق و اختصاصی ژن *lygC* به‌وسیله پرایمرهای طراحی شده بود. این در حالی بود که ایزوله‌های غیر از *سالمونلا انتریتیدیس* هیچ‌گونه کدورت و یا هیچ‌گونه بانندی را بر روی ژل الکتروفورز با شرایط آزمایشی مشابه نشان ندادند (شکل ۳).

حساسیت واکنش LAMP

حد تشخیص واکنش LAMP با استفاده از رقت‌های سریالی از تعداد مشخصی از ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس مورد ارزیابی قرار گرفت. پیش از انجام واکنش LAMP، ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش در ژل آگاروز ۲/۵ درصد الکتروفورز گردید. نتایج این ارزیابی نشان داد که در تست کشت خالص، روش LAMP قادر به تشخیص ۱۰ کلنی باکتری در هر تیوب واکنش می‌باشد (شکل ۴). این نتایج با استفاده از هر دو روش کدورت سنجی و الکتروفورز در ژل مورد تأیید قرار گرفت.



شکل ۴- حساسیت واکنش LAMP در رقت‌های مختلف (cfu/reaction) از باکتری سالمونلا انتریتیدیس. ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب مربوط به رقت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۰^۲، ۱۰^۳ و ۱۰^۴ کلنی در هر تیوب واکنش می‌باشد.

شناسایی سالمونلا انتریتیدیس در نمونه‌های آلوده

به منظور ارزیابی کارایی روش LAMP برای شناسایی ایزوله‌های سالمونلا انتریتیدیس در نمونه‌های گوشتی که به صورت مصنوعی به این باکتری آلوده شده‌اند، نمونه‌های هموژنه شده با TSB با رقت‌های سریالی از باکتری سالمونلا انتریتیدیس آلوده گردیدند. هموژنه گوشتی آلوده به این باکتری در زمان‌های ۴، ۶ و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. نتایج ما برای ۱۰ تکرار از نمونه‌های آلوده نشان داد که در سطوح پایین آلودگی، روش LAMP حاضر قادر به تشخیص ۱۰ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بعد از ۴ ساعت انکوباسیون می‌باشد. علاوه بر

این، نمونه‌هایی با $\geq 10^3$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در آغاز انکوباسیون (فاقد مرحله غنی‌سازی) نیز دارای نتایج مثبت بودند.

بحث

سرروار بیماری‌زای سالمونلا انتریتیدیس یکی از شایع‌ترین علل گاستروانتریت می‌باشد که در موارد حاد می‌تواند منجر به سپتی‌سمی و یا حتی مرگ شود (۱،۲). با توجه به گزارش‌های حاکی از شیوع بالای این پاتوژن در مزارع مرغ در کشور و با توجه به این موضوع که گوشت مرغ آلوده می‌تواند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع انتقال عفونت‌های سالمونلایی به انسان باشد، به نظر می‌رسد که ارائه یک روش تشخیصی سریع، ساده، ارزان و با حساسیت بالا برای شناسایی این پاتوژن حیاتی است (۸-۳،۶). از این رو در پژوهش حاضر ما به ارائه روشی کارآمد برای شناسایی این پاتوژن پرداخته‌ایم. از آنجایی که یکی از مهم‌ترین چالش‌های روش‌های تشخیصی در شناسایی پاتوژن‌ها استفاده از مارکرهای ژنی غیراختصاصی می‌باشد، در مطالعه حاضر ابتدا به حل این چالش پرداخته شد. برای این منظور، با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌های *in silico* از جمله ظهور روش‌های قدرتمند مقایسه‌های ژنومی، ظهور روش‌ها و نرم‌افزارهای قدرتمند به منظور آنالیز دقیق توالی‌های ژنومیک، ایجاد پایگاه داده‌های ژنتیکی جامع و از همه مهم‌تر افزایش روز افزون تعداد ژنوم‌های توالی‌یابی شده در این پایگاه‌ها (۱۵)، ما توالی‌های ژنومیک سویه‌های مربوط به سرروار سالمونلا انتریتیدیس را با سایر ژنوم‌های سالمونلا و ژنوم‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه مورد مقایسه قرار داده و از این طریق مارکرهای اختصاصی مربوط به این سرروار بیماری‌زا را شناسایی نمودیم. نتایج ما نشان داد که ژن‌های *SEN1388 dygC dygA*، *SEN1389* و *SEN1391* ناحیه بین ژنی *sdf1* نواحی اختصاصی مربوط به این سرروار می‌باشند. این نواحی نوکلئوتیدی در لوکوس Φ SE14 (فاژ SE14) از ژنوم سالمونلا انتریتیدیس سویه P125109 قرار دارند. این لوکوس در واقع یک پروفاز ناقص می‌باشد و کدکننده پروتئین‌های مربوط به فاژ SE14 می‌باشد (۲۶). هم‌راستا و موافق با نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی ما، *Agtron* و همکاران با استفاده از روش subtractive hybridization نشان دادند که نواحی *lygA* تا *lygF* از ژنوم سالمونلا انتریتیدیس برای این سرروار اختصاصی می‌باشند (۲۷). علاوه بر این *Carlos* و همکاران نیز با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی نشان دادند که بخشی از ژنوم پروفاز SE14 در

حاضر ما کارایی روش LAMP را در گوشت مرغ چرخ شده که به طور مصنوعی به باکتری *سالمونلا* انتریتیدیس آلوده شده است، مورد ارزیابی قرار دادیم. نتایج حاصل از واکنش LAMP نشان می دهد که این روش دارای حد تشخیص 10^3 CFU/mL برای نمونه های گوشتی آلوده پس از ۴ ساعت غنی سازی و 10^3 CFU/mL در آغاز غنی سازی (در زمان صفر) می باشد. حساسیت روش LAMP حاضر نسبت به روش هایی که تاکنون برای شناسایی *سالمونلا* انتریتیدیس در گوشت مرغ آلوده ارائه شده است، قابل مقایسه می باشد. به عنوان مثال *Yang* و همکاران روش LAMP ی را برای شناسایی این باکتری در گوشت مرغ آلوده ارائه کردند که قادر به تشخیص ۴ کپی از باکتری در هر میکرولیتر از نمونه گوشتی آلوده می باشد (۳۵). *Conceição* و همکاران نیز از روش ایمونوگنتیک برای شناسایی *سالمونلا* انتریتیدیس استفاده کردند که حد تشخیص این روش برای نمونه های کشت خالص باکتری 20 CFU/mL و برای نمونه های گوشت مرغ آلوده حدود 10^3 CFU/mL پس از ۱۸ ساعت غنی سازی اعلام گردیده است (۳۶). علاوه بر این، *Malorny* و همکاران نیز با استفاده از روش Real-time PCR این باکتری را در گوشت مرغ آلوده شناسایی کردند که حد تشخیص این روش 3 CFU/mL پس از ۲۰ ساعت غنی سازی می باشد (۳۷). با توجه به اینکه در این روش ها مرحله غنی سازی بسیار طولانی مدت می باشد، می توان گفت که حساسیت روش LAMP حاضر (10^3 CFU/mL پس از ۴ ساعت غنی سازی) با حساسیت روش های مذکور برابری می کند و حتی می تواند بالاتر از آن ها در نظر گرفته شود. علاوه بر این، روش های مبتنی بر Real-time PCR، همانند سایر روش های PCR برای تکثیر ماده ژنتیکی نیازمند سیکل های حرارتی زیاد، استفاده از دستگاه های گران قیمت ترموسایکلر، روش های پر زحمت آشکارسازی و نیروی انسانی متخصص می باشند (۱۷). این در صورتی است که روش مورد استفاده در مطالعه حاضر بر پایه روش های تکثیر هم DNA می باشد. این روش در مدت زمان یک ساعت و شرایط هم دما قادر به تشخیص اسید نوکلئیک هدف بطور اختصاصی، با کارایی و حساسیت بالا می باشد. شرایط تک دمایی واکنش باعث می شود که نیاز به استفاده از دستگاه های گران قیمت ترموسایکلر و سیکل های حرارتی متوالی مرتفع شود و واکنش با استفاده از یک حمام آب گرم یا یک بلوک حرارتی بسیار ساده و ارزان ساخت داخل کشور در یک دمای واحد قابل انجام باشد. به دلیل کدورت ایجاد شده حاصل از فرایند تکثیر ژن ها و رسوب منیزیم

ژنوم *سالمونلا* انتریتیدیس، که ژن های *SEN1378-SEN1398* را شامل می شود، حفاظت شده می باشد (۲۸). با این وجود، نتایج حاصل از آنالیزهای مانشان داد که تنها توالی ژن *lygC* به صورت ۱۰۰ درصد منحصر به سویه های *سالمونلا* انتریتیدیس می باشد. از این رو در پژوهش حاضر با استفاده از روش LAMP این مارکر ژنی اختصاصی برای شناسایی سویه های *سالمونلا* انتریتیدیس برای اولین بار در دنیا مورد هدف قرار گرفت. تاکنون روش های متعددی مبتنی بر واکنش LAMP برای شناسایی این پاتوژن ارائه شده است. به عنوان مثال، *Chen* و همکاران ژن *lygD* را با استفاده از این روش هدف قرار دادند که حساسیت روش آن ها حدود 20 CFU/mL اعلام شده است (۱۲). همان طور که در نتایج به دست آمده مشاهده می شود، ژن *lygD* علاوه بر سرووار انتریتیدیس در سایر سرووارهای غیر از انتریتیدیس موجود می باشد. علاوه بر عدم اختصاصیت کافی ژن مورد استفاده، حساسیت این روش نسبت به روش LAMP حاضر (10^3 CFU/reaction) نیز پایین تر می باشد. علاوه بر این، *Gong* و همکاران و *Techathuvanan* و همکاران به ترتیب ژن های *sefA* و *invA* را با استفاده از روش LAMP هدف قرار دادند (۱۴، ۲۹). متأسفانه این روش ها نیز از اختصاصیت کافی برخوردار نمی باشند. مطالعات نشان داده است که ژن *sefA* علاوه بر انتریتیدیس در سایر سرووارهای *سالمونلا* از جمله *Dublin* و *Gallinarum* نیز وجود دارد (۳۰). علاوه بر این، ژن *invA* یک مارکر ژنی عمومی برای شناسایی جنس *سالمونلا* انتریتیدیس می باشد و تنها منحصر به سرووار انتریتیدیس نمی باشد (۳۱). اخیراً *Liu* و همکاران با استفاده از روش PCR ژن *SEN1392* را برای شناسایی سویه های *سالمونلا* انتریتیدیس هدف قرار دادند (۱۳). مطالعات بیوانفورماتیکی ما بر روی این ژن نشان داد که توالی این ژن با نواحی ژنی از سرووارهای دیگر *سالمونلا* از جمله *S. Bovismorbificans* سویه ۳۱۱۴ (با شماره دسترسی HF969015) شباهت ۱۰۰٪ دارد و بنابراین این ژن نمی تواند به عنوان یک مارکر اختصاصی برای سویه های *سالمونلا* انتریتیدیس در نظر گرفته شود. حساسیت روش مذکور نیز 23 CFU/reaction به دست آمده است که نسبت به روش LAMP حاضر از حساسیت کمتری برخوردار می باشد. علاوه بر این، مطالعات بسیاری حساسیت بالاتر روش LAMP را نسبت به PCR نشان داده اند (۳۲-۳۴).

از آنجایی که گوشت مرغ آلوده یکی از مهم ترین منابع انتقال عفونت های سالمونلایی به انسان می باشد، در پژوهش

آزمایشگاه‌های کنترل کیفی مواد غذایی، آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و همچنین آزمایشگاه‌های سیار باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه انجام این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان تامین گردیده است.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

پیروفسفات در محیط واکنش، در این روش نیاز به استفاده از ژل-الکتروفورز جهت آشکارسازی و شناسایی محصولات واکنش نمی‌باشد و آشکارسازی محصولات به صورت بصری و بدون نیاز به هیچ ابزاری امکان‌پذیر است که این قابلیت در بین تمامی روش‌های مولکولی تکثیر DNA بی‌نظیر است (۳۸). با توجه به مزایای گفته شده می‌توان نتیجه گرفت که به‌کارگیری این روش با استفاده از یک ژن اختصاصی که تنها منحصر به سرووار سالمونلا انتریتیدیس است (*lygC*)، می‌تواند یک ابزار قدرتمند، دقیق و ارزان جهت شناسایی این سرووار بیماری‌زا در

References

- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4):1734-8.
- Tatavarthy A, Cannons A. Real-time PCR detection of *Salmonella* species using a novel target: the outer membrane porin F gene (*ompF*). *Lett Appl Microbiol* 2010; 50(6):645-52.
- Amini K, Salehi TZ, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella Enteritidis* isolated from human and animals in Iran. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4(21):2202-10.
- Spencer JF, de Spencer ALR. Food microbiology protocols. Springer Science & Business Media; 2001.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. Springer Science & Business Media; 2008.
- Soltan DM FF, Eesraqi SS, Zahraei T, Ranjbar R, Akbari A., Abdosamadi Z AhF, Nikmanesf B. The antimicrobial resistance pattern among *Salmonella Enteritidis* isolate from 1950 diarrhoeic children in Iran. *Tehran Univ Med Sci* 2009; 67(12):35-48.
- Bozorgmehri. An introduction of contamination rate of *Salmonella Enteritidis* in broiler chicken from of Tehra. *Int J Fac Vet Med Univ Tehran*. 47(1):70-6.
- P Feng, S Weagant, K Jinneman, Diarrheagenic *Escherichia coli*, in: Bacteriological Analytical Manual, US Food Drug Administration 2002; 4(5): 20-24.
- Foley SL, Zhao S, Walker RD. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis* 2007; 4(3):253-76.
- Blixt O, Hoffmann J, Svenson S, Norberg T. Pathogen specific carbohydrate antigen microarrays: achip for detection of *Salmonella* O-antigen specific antibodies. *Glycoconjugate J* 2008; 25(1):27-36.
- Fach P, Dilasser F, Grout J, Tache J. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-Based Test for Detecting *Salmonella* spp. in Food Samples: Probelia *Salmonella* spp. *J Food Prot* 1999; 62(12):1387-93.
- Chen Z, Zhang K, Yin H, Li Q, Wang L, Liu Z. Detection of *Salmonella* and several common *Salmonella* serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Sci Hum Wellness* 2015; 4(2):75-9.
- Liu B, Zhou X, Zhang L, Liu W, Dan X, Shi C, et al. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica Typhimurium* and *Enteritidis*. *Food Control* 2012; 27(1):87-93.
- Gong J, Zhuang L, Zhu C, Shi S, Zhang D, Zhang L, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification of the *sefA* Gene for Rapid Detection of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Gallinarum* in Chickens. *Foodborne Pathog Dis* 2016; 13(4):177-81.
- Ravan H, Amandadi M. Analysis of yeh Fimbrial Gene Cluster in *Escherichia coli* O157: H7 in Order to Find a Genetic Marker for this Serotype. *Curr Microbiol* 2015; 71(2):274-82.
- Ravan H, Amandadi M, Sanadgol N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Microb Pathog* 2016; 91:161-5.
- Liu D. Molecular detection of foodborne pathogens. CRC Press; 2009.
- Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 2006; 363(1):206-20.

19. Okamura M, Ohba Y, Kikuchi S, Suzuki A, Tachizaki H, Takehara K, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid, sensitive, and specific detection of the O9 group of *Salmonella* in chickens. *Vet Microbiol* 2008; 132(1):197-204.
20. Ravan H, Yazdanparast R. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* serogroup D. *Anal Chim Acta* 2012; 733:64-70.
21. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(12):e63.
22. Chen J, Zhang L, Paoli GC, Shi C, Tu S-I, Shi X. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella* enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *Int J Food Microbiol* 2010; 137(2):168-74.
23. Liu B, Zhang L, Zhu X, Shi C, Chen J, Liu W, et al. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. *Int J Food Microbiol* 2011; 144(3), 511-18.
24. Darling AE, Mau B, Perna NT. Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS one* 2010; 5(6):e11147.
25. Altschul S. The statistics of sequence similarity scores. World Wide Web electronic publication unknown. 2011.
26. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, et al. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res* 2008; 18(10):1624-37.
27. Agron PG, Walker RL, Kinde H, Sawyer SJ, Hayes DC, Wollard J, et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(11):4984-91.
28. Santiviago CA, Blondel CJ, Quezada CP, Silva CA, Tobar PM, Porwollik S, et al. Spontaneous excision of the *Salmonella* enterica serovar Enteritidis-specific defective prophage-like element ϕ SE14. *J Bacteriol* 2010; 192(8):2246-54.
29. Techathuvanan C, D'Souza DH. Reverse-Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification as a Rapid Screening/ Monitoring Tool for *Salmonella* Enterica Detection in Liquid Whole Eggs. *J food sci* 2012; 77(4):M20.
30. O'Regan E, McCabe E, Burgess C, McGuinness S, Barry T, Duffy G, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol* 2008; 8(1):1.
31. Shanmugasundaram M, Radhika M, Murali H, Batra H. Detection of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium by selective amplification of fliC, fljB, iroB, invA, rfbJ, STM2755, STM4497 genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25(8):1385-94.
32. Ravan H, Yazdanparast R. Development of a new loop-mediated isothermal amplification assay for prt (rfbS) gene to improve the identification of *Salmonella* serogroup D. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28(5):2101-6.
33. Feng P. Identification of *Escherichia coli* serotype O157: H7 by DNA probe specific for an allele of uid A gene. *Mol Cell Probes* 1993; 7(2):151-4.
34. Li X, Zhang S, Zhang H, Zhang L, Tao H, Yu J, et al. A loop-mediated isothermal amplification method targets the phoP gene for the detection of *Salmonella* in food samples. *Int J Food Microbiol* 2009; 133(3):252-8.
35. Yang JL, Ma G-P, Yang R, Yang SQ, Fu LZ, Cheng AC, et al. Simple and rapid detection of *Salmonella* serovar Enteritidis under field conditions by loop-mediated isothermal amplification. *J Appl Microbiol* 2010; 109(5):1715-23.
36. Conceição RdCdS, Moreira AN, Ramos RJ, Goularte FL, Carvalho JB, Aleixo JAG. Detection of *salmonella* sp in chicken cuts using immunomagnetic separation. *Braz J Microbiol* 2008; 39(1):173-7.
37. Malorny B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods* 2007; 70(2):245-51.
38. Karami A, Moradi A, Sorouri R, Ahmadi Z. Evaluation of LAMP (loop-mediated isothermal dna amplification) for molecular detection of *salmonella*. *J Ilam Univ Med Sci* 2009; 17(3):1-9. [in Persian]