مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۲، شماره ۴، زمستان ۹۱، صفحات ۲۷۳ تا ۲۷۸

Original Article

تشخیص سالمونلا انتریکا سرو تیپ تایفی موریوم در گوجه فرنگی به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *hilA*

محمد رضا شفاعتی[۱]، مریم شفاعتی[۲]، مرتضی خدادوست[۳]

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
[۲] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۳] پژوهشگر علوم سلولی و ملکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

چکیده

سابقه و هدف: *سالمونلا به عنوان عامل شایع بیماری‌های گوارشی که از طریق مواد غذایی و محصولات آلوده منتقل می‌شود، سالیانه موارد بسیار زیادی از بیماری و مرگ و میر را موجب می‌شود. تشخیص مولکولی سالمونلا به روش PCR برای بسیاری از محصولات حیوانی مورد استفاده قرار گرفته، ولی در موارد کمی برای ردیابی آن در محصولات کشاورزی ساده از این روش بهره گیری شده است. گوجه فرنگی به عنوان یکی از محصولات کشاورزی که به شکل خام هم مصرف می شود یکی از منابع عفونت سالمونلایی شناخته شده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، از PCR بر اساس پرایمرهای اختصاصی برای ژن hil A سالمونلا برای ردیابی آن در سطح و درون گوجه فرنگی‌های تلقیح شده به روش مصنوعی به صورت مستقیم و پس از غنی سازی، استفاده شد. پرایمرها براساس نتایج به دست آمده برای سالمونلا اختصاصی می‌باشند.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل حاکی از قدرت تشخیص سالمونلا در سطح و درون گوجه‌های تلقیح شده به ترتیب به مقدار 10^1 و 10^2 باکتری در هر گرم گوجه پس از ۶ ساعت غنی سازی در محیط مایع BHI بود.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که PCR با پرایمرهای اختصاصی برای hil A روشی حساس و قابل قبول برای ردیابی سالمونلا است.*

واژگان کلیدی: *سالمونلا، ژن hilA، گوجه فرنگی.*

مقدمه

سالمونلا یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای موجود در مواد غذایی است و هر ساله موارد زیادی از مرگ و میر را به خود اختصاص می‌دهد (۱). بیماری‌های سالمونلایی بیشتر در ارتباط با مصرف مواد غذایی آلوده حیوانی مثل مرغ، تخم مرغ، گوشت و محصولات لبنی هستند. تصور می‌شود تغییر در روش‌های کشاورزی و عادات غذایی و نیز افزایش واردات محصولات کشاورزی تازه موجب افزایش تعداد همه‌گیری‌های مرتبط با میوه‌ها و سبزیجات در سال‌های اخیر شده است (۲). همه‌گیری‌های سالمونلایی بیشتر در رابطه با گوجه فرنگی، هندوانه، آب پرتقال و آب سیب است (۶-۳).

در سال ۱۹۹۰، ۱۷۶ مورد عفونت سالمونلایی در میشیگان و در ارتباط با مصرف گوجه تازه روی داد. در سال ۱۹۹۳، گوجه فرنگی به عنوان منبع همه‌گیری سالمونلا اینتریکا در چندین ایالت آمریکا شناخته شد (۷). Zhuang و همکارانش شرایطی که موجب زنده ماندن و رشد سالمونلا اینتریکا بر روی سطح گوجه فرنگی‌ها می‌شود را توضیح دادند (۸). رشد سریع سالمونلا در گوجه فرنگی آب‌دار برش داده شده (۱/۴±۰/۱

آدرس نویسنده مسئول: دامغان، بلوار چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان گروه میکروب شناسی، **محمد رضا شفاعتی** (**email**: Shafaati.mohammadreza@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۷/۱۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۲/۴

Archive of SID
www.SID.ir

pH:) در دمای مناسب صورت می‌گیرد. گزارش شده که سالمونلا اینتریکا سروتیپ اینتریتیدیس، سالمونلا اینتریکا سروتیپ اینفانتیس و سالمونلا اینتریکا سروتیپ تایفی موریوم در گوجه‌های برش خورده تازه (pH: ۳/۹۹±۴/۳۷) در دمای ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند (۹). آلوده شدن محصولات تازه با سالمونلا می‌تواند در هر مرحله‌ای از فرایند تولید درکشاورزی تا استفاده صورت گیرد. سالمونلا احتمالا به مقدار کم و همراه با فلور طبیعی متنوع وجود خواهد داشت. بنابراین استفاده از روش‌های تشخیص سریع جهت سالمونلا و به تبع آن اطمینان از سالم بودن تولیدات امری لازم و ضروری می‌باشد. یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای تشخیص سالمونلا در مواد غذایی، PCR می‌باشد که حساسیت و ویژگی قابل قبولی داشته و به سادگی انجام می‌شود.

تا به حال چندین آزمون PCR بر اساس هدف قرار دادن ژن-های مختلفی از سالمونلا مثل ژن *inv A*، 16S rRNA، *agf A* و *via B* و پلاسمیدهای مرتبط با بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶-۱۰). این آزمون‌های PCR بیشتر برای تشخیص سالمونلا در نمونه‌های گوشت، مرغ و تخم مرغ و شیر مورد استفاده قرار گرفته است (۲۰-۱۷). در موارد کمی، از روش‌های PCR برای تشخیص این عامل بیماری‌زا در محصولات کشاورزی تازه استفاده شده است.

تهاجم عاملی اساسی در قدرت بیماری‌زایی سویه‌های سالمونلا است. فنوتیپ تهاجمی تحت کنترل گروه‌های بزرگی از ژن‌ها که در جزیره پاتوژنیسیته ۱ سالمونلا (SPI1) قرار دارند می‌باشد که در تمام سویه‌های مهاجم سالمونلا وجود دارد (۲۱). یکی از ژن‌های بیماری‌زایی در جزیره پاتوژنیسیته ۱ ژن hil A می‌باشد که تنظیم کننده مثبت رونویسی از چندین ژن تهاجمی است (۲۲).

در این مطالعه، تشخیص سویه‌های سالمونلا در نمونه‌های گوجه فرنگی که به صورت مصنوعی آلوده شده بودند به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده یک قطعه ۴۹۷ جفت بازی از ژن *hil A* را شناسایی و تکثیر می‌کردند.

مواد و روشها

سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد

سویه سالونلا اینتریکا سروتیپ تایفی موریوم (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی) به عنوان سویه استاندارد و ۱۸ سویه کلینیکی سالمونلا مورد استفاده قرار گرفت. رشد سویه باکتریایی در محیط مایع BHI (QUELAB) و دمای ۳۷ درجه برای مدت ۱۸ ساعت انجام گرفت.

نگهداری باکتری در محیط جامد BHI و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در طول مدت انجام پروژه صورت گرفت.

سویه‌های باکتریایی غیر سالمونلا به شرح زیر برای اطمینان از اختصاصیت روش مورد استفاده قرار گرفتند که شرایط رشد و نگهداری آنها همانند سویه استاندارد سالمونلا می‌باشد.

۱. *Aeromonas sobria* (1)
۲. *Escherichia coli* ATCC 10789 (1)
۳. *Escherichia coli* O157:H7 (2)
۴. *Enterobacter aerogenes* (1)
۵. *Klebsiella pneumoniae* (1)
۶. *Serratia marcescens* (1)
۷. *Shigella dysenteriae* non-type I (1)
۸. *Shigella sonnei* (3)
۹. *Staphylococcus aureu s*(2)
۱۰. *Proteus vulgaris* (1)
۱۱. *Pseudomonas fluorescens* (1)
۱۲. *Yersinia enterocolitica* (7)

استخراج DNA از نمونه‌ها و سویه‌های باکتریایی

در این مطالعه، برای استخراج و تخلیص DNA از سویه‌های باکتریایی و نمونه‌های آلوده شده مصنوعی گوجه فرنگی از کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrep®; Bioneer Co.) و طبق دستورالعمل اختصاصی آن بهره‌گیری شد. نمونه‌های DNA استخراج شده با روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ حاوی ۰/۰۵ $\mu g\ ml^{-1}$ و نیز اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ nm بررسی شده و میزان خلوص آنها از نسبت A_{260}/A_{280} مورد ارزیابی قرار گرفت.

جفت پرایمر مورد استفاده و شرایط انجام PCR

از یک جفت پرایمر که در آزمایشگاه ما طراحی گردید و توسط شرکت سیناژن سنتز شد، استفاده شد. این جفت پرایمر قطعه‌ای ۴۹۷ جفت بازی از ژن *hil A* را شناسایی و تکثیر می‌نماید که توالی آنها به این صورت می‌باشد:

FORWARD: 5'-**CTG CCG CAG TGT TAA GGA TA**-3'
REVERSE: 5'-**CTG TCG CCT TAA TCG CAT GT**-3'

هر ۲۵ µl واکنش PCR انجام شده در این مطالعه حاوی انواع dNTP (Fermentase) با غلظت نهایی ۰/۰۵ mM، پرایمرها هر کدام با غلظت ۲۵۰ µM، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ mM و آنزیم *Taq* DNA Polymerase (Fermentase) با غلظت ۰/۷۵ U

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد. برای هر واکنش PCR، µl ۲ از DNA استخراج شده به عنوان الگو استفاده شد. سیکل‌های حرارتی PCR در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- سیکل‌های حرارتی PCR

Primary denaturation: 94°C / 5min	
Denaturation: 90 °C / 45sec	35
Annealing: 62 °C / 1min	Cycles
Extension: 72 °C / 1min	
Final extension: 72 °C / 10min	

پس از انجام PCR، مقدار µl ۱۰ از هر محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی $\mu g\ ml^{-1}$ ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج توسط دستگاه BioDoc Analyze (Biometra) به صورت فایل دیجیتالی ثبت شد.

بررسی ویژگی آزمون PCR

PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور بر روی سویه سالمونلا اینتریکا سروتیپ تایفی موریوم به عنوان کنترل مثبت، سویه‌های بالینی سالمونلا و سویه‌های غیر سالمونلایی انجام شد (۱۲-۱۰، ۱۶-۱۴، ۲۳).

بررسی حد نهایی تشخیص آزمون PCR

رقت‌های سریالی از سوسپانسیون باکتری سالمونلا انتریکا سروتیپ تایفی موریوم حاوی 10^9 الی 10^0 باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه و استخراج DNA ژنومی و به دنبال آن PCR انجام شد (۲۴).

برای بررسی تأثیر غنی‌سازی نمونه‌ها بر نتیجه PCR، از رقت‌های 10^0 تا 10^8، µl ۱۰۰ برداشته و به ml ۹۰۰ محیط مایع BHI انتقال داده شد. پس از ۳، ۶ و ۹ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌های هر محیط جمع‌آوری شده و استخراج DNA و PCR بر روی آنها انجام گرفت.

آلوده کردن سطح و داخل گوجه فرنگی به روش مصنوعی

گوجه فرنگی‌های خام و رسیده تازه با وزن حدود ۷۵ گرم خریداری شده و به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه به صورت سطحی و یک گروه به صورت داخلی با باکتری تلقیح شدند. سویه سالمونلا اینتریکا سروتیپ تایفی موریوم در محیط BHI و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد و زمانی که کدورت محیط کشت ۶۰۰ نانومتر به ۱ رسید، رقت‌های سریالی در آب پپتونه ۰/۱٪ ازمحیط کشت حاوی باکتری تهیه شد.

برای آلوده کردن سطحی گوجه فرنگی، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی 10^5 تا 10^0 باکتری و آب پپتونه استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به شکل یک قطره بر روی گوجه فرنگی قرار گرفته و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد خشک شد . هر گوجه فرنگی در یک کیسه پلاستیکی حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱٪ قرار داده و برای ۲ دقیقه با دست ماساژ داده شد. نمونه‌های آب شستشو دهنده به لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب هر لوله در ۵ میلی‌لیتر آب پپتونه استریل ۰/۱٪ سوسپانسیون شده و با ۵ میلی‌لیتر محیط BHI مخلوط و ۶ ساعت جهت غنی سازی انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از این محیط جهت استخراج DNA استفاده گردید. سپس آزمون PCR بر روی DNA استخراج شده انجام گرفت. کشت بر روی محیط BHI برای تخمین تعداد باکتری در هر نمونه انجام گرفت.

جهت تلقیح در داخل گوجه فرنگی، سالمونلا اینتریکا سروتیپ تایفی موریوم به مقدار ۲۰ میکرولیتر تزریق شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر با استفاده از سر سپر به ناحیه شیاف محل رعشه تزریق شد. مقادیر تلقیح از 10^0 تا 10^5 باکتری در هر میلی‌لیتر بود. هر گوجه فرنگی پس از تلقیح در یک هاون چینی حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱٪ استریل کاملا هموژن شد. بخش مایع به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و در ۳۰۰۰g برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک فالکون دیگر منتقل شده و ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله همانند روش بالا برای PCR استفاده شد (۲۵، ۲۶).

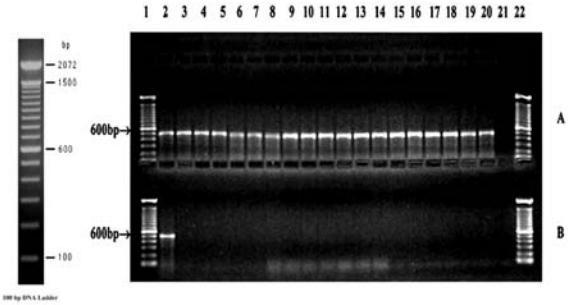
یافته‌ها

اختصاصیت PCR

نتیجه تست اختصاصیت PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور که در شکل ۱ نمایش داده شده، برای سالمونلا اینتریکا سروتیپ تایفی موریوم مثبت بود، در حالی که هیچ کدام از سویه‌های غیر سالمونلایی توسط این روش PCR تشخیص داده نشد (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

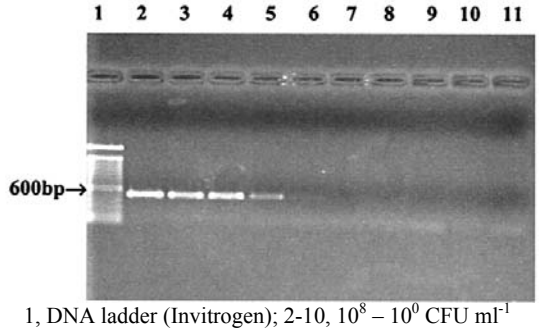


A: 1 & 22, DNA ladders (Invitrogen); 2, *S.enterica* serotype Typhimurium; 3-20, *S.enterica* clinical isolates; 21 negative control.
B: 1 & 22, DNA ladders (Invitrogen); 2, *S.enterica* serotype Typhimurium; 3, *Aeromonas sobria*; 4, *Escherichia coli* ATCC 10789; 5 & 6, *Escherichia coli* O157:H7; 7, *Enterobacter aerogenes*; 8, *Klebsiella pneumoniae*; 9, *Serratia marcescens* ; 10, *Shigella dysenteriae* non-type I; 11-13, *Shigella sonnei*; 14 & 15, *Staphylococcus aureus*; 16, *Proteus vulgaris*; 17, *Pseudomonas fluorescens*; 18-20, *Yersinia enterocolitica*; 21, negative control

شکل ۱- نتیجه آزمون بررسی ویژگی PCR

حد نهایی تشخیص PCR

نتایج حساسیت سنجی PCR نسبت به تعداد باکتری قابل تشخیص در روش بدون غنی‌سازی 10^4 باکتری در هر میلی‌لیتر نمونه بود، در صورتی که با غنی‌سازی به مدت ۶ و ۹ ساعت به ترتیب به 10^1 و 10^0 باکتری در هر میلی‌لیتر رسید (شکل‌های ۲ و ۳).

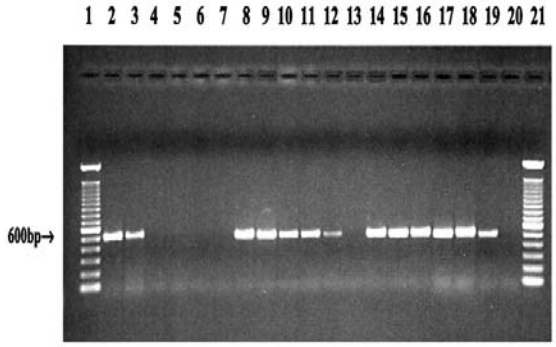


1, DNA ladder (Invitrogen); 2-10, $10^8 – 10^0$ CFU ml^{-1}

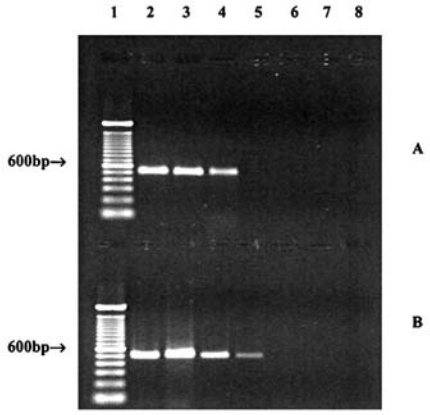
شکل ۲- حساسیت PCR نسبت به تعداد باکتری موجود در هر میلی‌لیتر نمونه بدون غنی‌سازی

تشخیص سالمونلا انتریکا به روش PCR در گوجه‌هایی که به طور مصنوعی آلوده شدند

سالمونلاها از گوجه‌هایی که به شکل سطحی و درونی آلوده شده بودند جداسازی شدند. شمارش باکتری‌ها روی محیط BHI عددی معادل مقدار تلقیح را به دست داد. بدون غنی‌سازی، حد تشخیص برای گوجه‌هایی که به شکل سطحی آلوده شده بودند، 10^5 باکتری در هر گوجه فرنگی بود. پس از ۶ ساعت غنی‌سازی، حد تشخیص برای گوجه‌هایی که به شکل سطحی و داخلی تلقیح شده بودند به ترتیب 10^2 و 10^3 باکتری در هر گوجه فرنگی بود (شکل ۴). از آنجایی که میانگین وزن گوجه‌ها ۷۵ گرم بود، حد تشخیص با PCR برای گوجه‌هایی که به شکل سطحی و داخلی تلقیح شدند به ترتیب 10^1 و 10^2 باکتری در هر گرم از گوجه فرنگی بود.



شکل ۳- حساسیت PCR پس از ۳، ۶ و ۹ ساعت غنی سازی
1 & 21; 2-7, 105-100 CFU/ml-1 (3h enrichment); 8-13, 105-100 CFU/ml-1 (6h enrichment); 14-19, 105-100 CFU/ml-1 (9h enrichment); 20, negative control



شکل ۴- نتیجه PCR پس از ۶ ساعت غنی‌سازی برای گوجه‌هایی که به شکل مصنوعی تلقیح شدند.
A: Internal inoculation
B: surface inoculation
1, DNA ladder (Invitrogen); 2-7, 105 – 100 CFU/tomato; 8, negative control

بحث

برای تشخیص سالمونلا انواع مختلفی از PCR مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲-۱۰، ۱۶-۱۴، ۲۳). در مطالعه‌ای که

Archive of SID
www.SID.ir

تعدادی از پرایمرهای سالمونلاها و سویه‌های غیرسالمونلایی برای تشخیص سالمونلا مورد ارزیابی مقایسه‌ای قرار گرفتند، پرایمر های مورد استفاده اختصاصیت و حساسیت قابل ملاحظه‌ای داشتند (۲۴).

گوجه فرنگی های مورد استفاده میکرو فلور طبیعی دارند که منعکس کننده محیط و فرایند کشاورزی و تولید است. این فلور می‌تواند شامل باکتری‌های لاکتیک اسید، سیتروباکتر، انتروباکتر، سدوموناس و فلاووباکتریوم باشند که اکثر مواقع با محصولات کشاورزی همراه هستند (۲۵). بر اساس گزارش Ogunjimi و همکارانش، پلی‌فنل‌هایی که در بیشتر محصولات کشاورزی وجود دارد با تشخیص سروتیپ O157:H7 اختلال ایجاد می‌کند (۲۶). علاوه بر این، گوجه‌های بریده شده pH حدود ۴/۰ تا ۴/۴ دارند. این عوامل می‌توانند در تشخیص سالمونلا به روش PCR، در گوجه فرنگی‌های آلوده اختلال ایجاد کنند. نتیجه این تحقیق نشان داد که پس از تلقیح سالمونلا به گوجه، قابل بازیابی و تشخیص تا حد 10^1 و 10^2 باکتری در هر گرم گوجه پس از ۶ ساعت غنی سازی می‌باشد. باکتری‌هایی که در درون گوجه فرنگی تلقیح شده بودند، بیش از 10^2 باکتری قابل ردیابی نبودند که به دلیل اختلالات فیزیکی در اثر جسم گوجه می‌باشد و بالا بردن حد تشخیص وابسته به ابداع روش‌های جدیدتری است.

بر اساس نتایج این مطالعه، روش PCR برای سالمونلا بسیار اختصاصی و حساس است و می‌تواند در تشخیص این باکتری در سایر محصولات تازه نیز به کار گرفته شود.

REFERENCES

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5:607-25.
2. Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne disease. Emerg Infect Dis 1997; 3:285–93.
3. Blostein J. An outbreak of *Salmonella javiana* associated with consumption of watermelon. J Environ Health 1991; 56:29–31.
4. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella oranienburg* gastroenteritis associated with consumption of precut watermelons, Illinois. Morb Mortal Wkly Rep 1979; 28:522–3.
5. Gayler GE, MacCready RA, Reardon JP, McKernan BF. An outbreak of *salmonellosis* traced to watermelon. Public Health Rep 1955; 70:311–3.
6. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella typhimurium* outbreak traced to a commercial apple cider—New Jersey. Morb Mortal Wkly Rep 1975; 24:87–8.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Multi-state outbreak of *Salmonella poona* infections—United States and Canada. Morb Mortal Wkly Rep 1991; 40:549–52.
8. Zhuang RY, Beuchat LR, Angulo FJ. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. Appl Environ Microbiol 1995; 61:2127–31.
9. Asplund K, Nurmi E. The growth of salmonellae in tomatoes. Int J Food Microbiol 1991; 13:177–82.
10. Doran JL, Collinson SK, Burian J, Sarlos G, Todd ECD, Munro CK, et al. DNA-based diagnostic test for *Salmonella* species targeting agfA, the structural gene for thin aggregative fimbriae. J Clin Microbiol 1993; 31:2263–73.
11. Hashimoto Y, Itho Y, Fujinaga Y, Khan AQ, Sultana F, Miyake M, et al. Development of nested PCR based on the ViaB sequence to detect *Salmonella typhi*. J Clin Microbiol 1995; 33:775–7.
12. Iida K, Abe A, Matsui H, Danbara H, Wakayama S, Kawahara K. Rapid and sensitive method for detection of *Salmonella* strains using a combination of polymerase chain reaction and reverse dot-blot hybridization. FEMS Microbiol Lett 1993; 114:167–72.
13. Mahon BE, Pönkä A, Hall W, Komatsu K, Beuchat L, Dietrich S, et al. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seed. J Infect Dis 1997; 175:876–82.
14. Rahn K, Grandis SAD, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C, et al. Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cell Probes 1992; 6:271–9.
15. Rexach L Dilasser F, Fach P. Polymerase chain reaction for Salmonella virulence-associated plasmid genes detection: a new tool in Salmonella epidemiology. Epidemiol Infect 1994; 112:33–43.
16. Wang H, Blais BW, Yamazaki H. Rapid confirmation of polymyxin-cloth enzyme immunoassay for group D salmonellae including *Salmonella enteritidis* in eggs by polymerase chain reaction. Food Control 1995; 6:205–9.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Bailey JS. Detection of *Salmonella* cells within 24–26 hrs in poultry samples with the PCR BAX system J Food Prot1998;61:792–5.

18. Bennett AR, Greenwood D, Tennant C, Banks JG, Betts RP. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. Appl Microbiol 1998; 26:437–41.

19. Chen S, Yee A, Griffiths M, Larkin C, Yamashiro CT, Behari R, et al. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. Int J Food Microbiol 1997; 35:239–50.

20. Kimura B, Kawasaki S, Fujii T, Kusunoki J, Itoh T, Flood S. Evaluation of TaqMan PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. J Food Prot 1999; 62:329–35.

21. Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the Escherichia coli K-12 chromosome. Mol Microbiol 1995; 15:749–59.

22. Bajaj V, Hwang C, Lee A. hilA is a novel ompR/toxR family member that activates expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. Microbiol 1995; 18:715–27.

23. Mahon J, Lax A. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of salmonellas carrying the spvR gene. Epidemiol Infect 1993; 111:455–64.

24. Gooding CM, Choudary PV. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 1999; 13:341–7.

25. Jay JM. Fresh and fermented fruit and vegetable products. Modern food microbiology. 5th ed. New York: N.Y: Chapman & Hall; 1996. p. 149–76.

26. Ogunjimi AA, Choudary PV. Adsorption of endogenous polyphenols relieves the inhibition by fruit juices and fresh produce of immuno-PCR detection of *Escherichia coli O157:H7*. FEMS Immuno Med Microbiol 1999; 23:213–20.

Archive of SID

www.SID.ir