تشخیص سریع مولکولی جنس سالمونلا بر پایه شناسایی ژن عامل تهاجم باکتری

رضا رنجبر*[۱]، سید مجتبی مرتضوی[۲]، علی مهرابی توانا[۳]، علی نجفی[۴]، فاطمه پورعلی[۵]، داود افشار[۶]، زهرا سفیری[۷]

۱. متخصص باکتری شناسی، دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۲. کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۳. متخصص باکتری شناسی، مرکز تحقیقات سلامت دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۴. دانشجوی دکترای بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۵. کارشناس مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۶. دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۷. کارشناس ارشد مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران خیابان ملا صدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی، تلفن: ۸۸۰۳۹۸۸۳ ، ranjbarre@gmail.com

دریافت مقاله: شهریور نود پذیرش برای چاپ: آبان نود

چکیده

سابقه وهدف: *باکتری های سالمونلاها یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت غذایی و اسهال محسوب می گردند. شناسایی این گروه از باکتریها معمولا از طرق سنتی اعم از کشت میکروبی انجام می شود اما این روش ها زمان بر بوده و دقت کافی ندارند. در این مطالعه، استفاده از روش Uniplex PCR با پرایمرهای جدید به عنوان یک روش سریع و دقیق برای تشخیص سریع جنس سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت.*

روش کار: *ابتدا پرایمرهای اختصاصی توالی ژنهای invA مربوط به جنس سالمونلا واقع در کروموزوم باکتری طراحی گردید. DNA ژنومی از ایزوله های بالینی که با روشهای بیوشیمیایی و سرولوژی تعیین هویت شده بود، استخراج گردیده و به کمک پرایمرهای فوق، واکنش PCR انجام شد. جهت بررسی اختصاصی بودن این پرایمرها، از سایر باکترهای خانواده انتروباکتریاسه وکوکسی های گرم مثبت استفاده گردید. محصول PCR بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردیده و باندهای حاصله مورد نظر از طریق مقایسه با مارکر مولکولی بررسی گردیدند.*

یافته ها: *نتایج الکتروفورز محصول واکنش PCR، نشان داد که پرایمرها کاملا اختصاصی بوده و محصولات با اندازه باند مورد نظر ایجاد می نمایند. پرایمرهای طراحی شده با هیچ یک از باکتری های خانواده انتروباکتریاسه و کوکسی های گرم مثبت مورد استفاده، محصولی را ایجاد نکرد که حکایت از انجام واکنش اختصاصی داشت.*

نتیجه گیری: *این روش نشان داد که Uniplex PCR میتواند در کمتر از ۳ ساعت، شناسایی جنس سالمونلا را با قدرت تشخیصی حداقل ۵۰ واحد تشکیل کلنی باکتری و بطور اختصاصی به انجام برساند لذا می تواند بعنوان یک روش جایگزین یا تاییدی روشهای سنتی مورد نظر باشد.*

واژگان کلیدی: سالمونلا ، تشخیص ملکولی، PCR

مقدمه

بیماری های اسهالی بعنوان یکی از معظلات بهداشتی همچنان بصورت یک مشکل در تمام نقاط دنیا به ویژه در کشورهای در حال توسعه مطرح می باشند. در این کشورها بیماریهای اسهالی سالانه ۵ میلیون مرگ و میر به همراه دارند که اسهال و تب های روده ای ناشی از سالمونلا در این خصوص سهم بسزائی دارند. گونه های سالمونلا به عنوان یک عامل بیماری زا بالقوه در اسهال های التهابی ومسمومیت غذایی مطرح می باشند(۱). بیماری های ناشی از آنها در کودکان و افراد بالغ و مسن شایع است و سالانه میلیونها مورد بیماری در دنیا رخ می دهد. سالمونلوز در ایران یک بیماری مطرح می باشد و گزارشاتی هرچند محدود در مورد شیوع برخی گونه های آن در کشور به ثبت رسیده است(۳و۲). اکثر سروتایپ های سالمونلا پاتوژن های بالقوه ای برای انسان و بسیاری از حیوانات می باشند. این باکتری ها در دستگاه گوارش مهره داران اعم از پستانداران، پرندگان و ماهیان استقرار یافته و بسته به سروتایپ، شرایط و عوامل متعدد میزبان، بیماری هایی با نشانه ها و عوارض متفاوت ایجاد می کنند(۴).

جنس سالمونلا از خانواده انتروباکتریاسه متشکل از ۲۲۰۰ سروتایپ و بر اساس سیستم طبقه بندی جدید به هشت زیر گونه ۱،۲،۳A،۳B ،۷،۶،۵،۴ طبقه بندی گردیده است که زیرگونه ۵ به نام سالمونلا بونگوری و بقیه در خانواده انتریکا قرار می گیرند. .بیش از ۹۰ درصد سروتایپ های بیماری زا در انسان متعلق به زیر گروه ۱ می باشد که شامل سالمونلا تایفی، سالمونلا تایفی موریوم، سالمونلا اینتریتیدیس، سالمونلا اینفانتیس و غیره هستند(۵،۶). این باکتری ها به صورت باسیل های گرم منفی با فلاژل های پری تریش دیده می شوند(۷). روشهای معمول مثل کشت به خاطر تاخیر در ارائه نتیجه به پزشک ارزش چندانی در کمک در درمان فوری ندارند بنابراین تشخیص سریع بیماری های حاصل از این جنس باکتری اهمیت فوق العاده بالایی دارد لذا واضح است ارائه تکنیکی که در تایید تشخیص پزشک در عرض چند ساعت اولیه بیماری به کار آید، ارزش بالایی دارد(۸،۹). تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز یکی از روش هایی است که به دلیل دارا بودن حساسیت بالا، توانایی شناسایی تعداد کم باکتری و ژنوم آن ارزش زیادی دارد. در این مطالعه، استفاده از روش Uniplex PCR، با طراحی پرایمرهای جدید به عنوان یک روش سریع و دقیق برای تشخیص سریع جنس سالمونلا بررسی شد.

روش کار

باکتریهای مورد استفاده مربوط به نمونه های بالینی بودند که از چند بیمارستان شهر تهران جمع آوری گردیده بودند به این ترتیب که نمونه های مدفوع پس از انتقال از طریق محیط های ترانسپورت، به محیط کشت سلنیت F منتقل گردیدند. محیط های کشت به مدت ۱۲-۱۰ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند. سپس از محیط سلنیت F به محیطهای کشت اختصاصی و افتراقی مانند Salmonella-Shigella agar(SS)، Xylose-Lysine Deoxychola agar(XLD) و MacConky agar انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. بعد از یک روز گرمخانه گذاری کلنی های مشکوک به سالمونلا جدا سازی شدند. سپس توسط تست های بیو شیمیایی استاندارد نظیر انتقال بر روی محیط TSI، سیترات، لیزین آگار، اوره و MR-VP مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از انجام آزمون های افتراقی مذکورآزمون سروتایپینگ با آنتی سرم های اختصاصی انجام شد.

استخراج DNA با استفاده از روش Boiling صورت گرفت. در این روش کلنی تک از محیط XLD به 5ml محیط آبگوشت LB تلقیح و ۲۴ ساعت درانکوباتور شیکر دار ۳۷°C با 150 rpm قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکویاسیون، 3ml از محیط فوق را برداشته و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه، سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول STET اضافه گردید و ۴ دقیقه در آب جوش جوشانده شد. سپس ۳ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ کرده، مایع رویی به یک میکروتیوب استریل منتقل شد و به آن پروپرانول ۷۰ درصد (هم حجم آن) اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰°C- قرار داده شد. میکروتیوب را از یخچال خارج و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از آن مایع رویی دور ریخته شده و هم حجم رسوب، به آن اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در C ° ۳۷ قرار داده شد تا به طور کامل خشک گردد. بعد از خشک شدن، در نهایت مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول TE به آن اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در C ° ۳۷ قرار گرفت(۱۵-۱۰). مقدار غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر در دستگاه نانودراپ اندازه گیری گردید.

توالی سکانس ژن مورد نظر (invA (3062251-3062654) از طریق سایت NCBI استخراج و سپس پرایمر آن ازطریق نرم افزارآنلاین Primer3 طراحی شد. BLAST پرایمرهای طراحی شده اختصاصیت آن را به گونه های سالمونلا نشان داد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه را نشان می دهد

پرایمر	توالی
FS1	5'- GTATTGTTGATTAATGACATCCG -3'
RS1	5'- ATATTACGCACGGAAACACGTT -3'

برای انجام فرایند PCR، ۲ میکرولیتر از DNA تخلیص شده (با غلظت ۲۰۰ µl/ng) از باکتری با ۲۳ میکرولیتر از دیگر اجزا واکنش PCR مخلوط شد. این اجزا عبارتند از ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها باغلظت ۲۰ پیکومول(در مجموع ۲ میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP باغلظت 1/5mM ، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ باغلظت ۵۰mM، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X ، ۱۵ میکرولیتر آب مقطراستریل(DDW) و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم(Taq DNA polymerase 5 unit/µl) بود. برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشت در C ° ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰چرخه تکثیر DNA (°C۹۴ به مدت ۱ دقیقه، °C ۵۷ به مدت ۱دقیقه، C ° ۷۲ به مدت ۱ دقیقه) و یک مرحله نهایی در C ° ۷۲ به مدت ۷ دقیقه بود. پس از انجام واکنش، ۵ میکرو لیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول رنگ زا (Loading buffer) توسط ژل آگارز ۱/۵ دزصد به مدت ۲۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. سپس محصولات PCR بوسیله دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

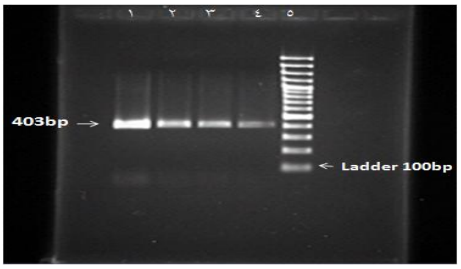
برای تعیین حساسیت ابتدا یک کلنی تک به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LB تلقیح و ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار ۳۷°C قرار داده شد.

۲۴ ساعت بعد ۳ لوله حاوی ۹۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. به لوله اول ۱۰۰ میکرولیتر از کشت اضافه شد(رقت ۱/۱۰) پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از این لوله به لوله دوم و به همین طریق تا لوله سوم ادامه یافت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از رقت هر لوله به پلیتهای حاوی محیط کشت جامد اضافه شده و کاملا در سطح محیط پخش گردید. پلیتها ۲۴ ساعت در C ° ۳۷ گرمخانه گذاری شد. سپس پلیتهای واجد ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی شمارش و محاسبه شد(۱۶). غلظت ژنوم استخراج شده با نانو دراپ اندازه گیری شد. سپس با رقتهای مختلف از ژنوم واکنش PCR انجام شد.

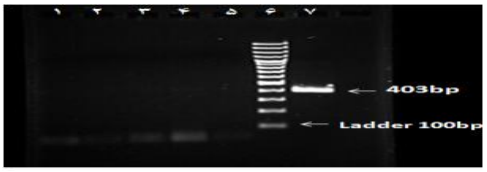
یافته ها

Uniplex PCR ابتدا با دستگاه Master Cycler اپندورف واکنش زنجیره ای پلیمراز با گرادیانتهای دمایی C ° ۵۸، ۵۷، ۵۶، ۵۵ برای دمای آنیلینگ پرایمر جنس سالمونلا در نظر گرفته شد، که بهترین دما C °۵۷ محصول مورد نظر را تولید کرد. همچنین پس از انتخاب دمای آنیلینگ ۵۷ درجه، برای واکنش زنجیره ای پلیمراز جنس سالمونلا غلظت های متفاوت $MgCl_2$(۱.۵، ۱، ۰.۷ ، ۰.۵) در نظر گرفته شد که بهترین غلظت ۱ میکرولیتر انتخاب گردید(شکل شماره ۱).

بعد از اینکه دمای بهینه آنیلینگ وغلظت بهینه MgCl2 انتخاب شد، Uniplex PCRبا پرایمرهای مربوط به جنس سالمونلا با بقیه باکتری های خانواده انتروباکتریاسه (اشریشیا کلی، شیگلا، پروتئوس، کلبسیلا) و استافیلوکوکوس آرئوس انجام شد. همانطور که در شکل مربوطه مشاهده می شود جفت پرایمر جنس سالمونلا(S1) کاملا اختصاصی بوده و فقط با باکتری سالمونلا باند مورد نظر را ایجاد کرد. همچنین همان طور که دیده می شود Uniplex PCR با جفت پرایمرجنس در چهار گونه اصلی بیماریزای سالمونلا تایفی، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا اینفانتیس و سالمونلا اینتریتیدیس محصول مورد نظر را ایجاد کرد(شکل ۱ و۲).



شکل ۱. تعیین دمای بهینه واکنش زنجیره ای پلیمراز برای گونه های سالمونلا: ۱،سالمونلا تیفی ۲.سالمونلا تیفی موریوم ۳. سالمونلا اینفانتیس ۴. سالمونلا اینتریتیدیس ۵.مارکر 100bp



شکل۲- شکل ۲. بررسی اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، ۱. اشریشیا کلی ۲. پروتئوس ولگاریس ۳. شیگلا سونئی ۴. کلبسیکلا پنومونیه ۵. استافیلوکوکوس آرئوس ۶.مارکر 100bp ۷.کنترل مثبت با سالمونلا تایفی

پس از تهیه رقت سریال نسبت به میزان حساسیت واکنش اقدام گردید. تکثیر قطعه مورد نظر توسط واکنش Uniplex PCR تا رقت 10^{-3} از محیط کشت باکتری انجام شده است که در این رقت تعداد باکتری برابر 50 CFU می‌باشد، که نشان دهنده حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری است.

بحث

سالمونلا ها یکی از عوامل مهم مسمومیت غذایی واسهال در جهان هستند. مهمترین سروتایپ های عامل گاستروانتریت جدا شده از انسان شامل گونه های اینتریتیدیس، تیفی موریوم و اینفانتیس می باشند(۱۷). تشخیص سریع و دقیق این عوامل در مواد غذایی و بیماری های اسهالی می تواند یکی از راههای پیشگیری از همه گیری های وسیع باشد. در این راستا روشهای جداسازی و تشخیص باکتریها به ویژه باکتری های بیماری زا در مواد غذایی که به دو روش کلی سنتی و مدرن انجام می گیرد، حائز اهمیت فراوانی است.

روش های سنتی روش هایی هستند که غالباً وقت گیر بوده و به رغم کم هزینه بودن همواره برای میکروب شناسان مشکل ساز هستند و خصوصاً هنگامی که اعلام سریع نتایج از نظر اقتصادی و پزشکی واجد اهمیت است، این مشکل بیشتر احساس می گردد. جداسازی باکتری نیاز به صرف چندین روز وقت دارد(۱۹و۱۸).

خوشبختانه در روشهای جدید و سریع که امروزه برای تشخیص و جداسازی باکتریها مورد استفاده قرار می گیرند، این مشکلات مرتفع گردیده و با تکنیکهای مبتنی بر روشهای فیزیکی، شیمیایی، ایمونولوژیکی و در راس آنها روش های مولکولی می توان در اسرع وقت نتایج را اعلام نمود. یکی از روش های تشخیصی سریع و مورد اطمینان جهت تشخیص مولکولی، زمانیکه بخواهیم یک لوکوس ژنی مجزا را تکثیر و سپس تشخیص دهیم، استفاده از روش Uniplex PCR می باشد(۲۰).

در این بررسی ازآنجا که ژن invA مسئول تهاجم باکتری به سلولهای اپیتلیال است و در همه سالمونلا ها مشترک و اختصاصی آنها است(۲۱)، پرایمری برای آن طراحی شد که کاملا اختصاصی جنس سالمونلا بوده و به عنوان پرایمر شناسایی کننده جنس انتخاب شد. نمونه ژنوم از نمونه های بالینی حاوی باکتری های خانواده انتروباکتریاسه شامل چهار گونه اصلی سالمونلا ، شیگلا، اشریشیا کلی، کلبسیلا ، پروتئوس و استافیلوکوکوس آرئوس که همگی با روشهای بیوشیمیایی وسرولوژی تعیین هویت شده بودند، استخراج شد. نتایج این بررسی نشان داد که پرایمر های انتخاب شده به طور اختصاصی قادر است جنس سالمونلا را از بقیه باکتری های خانواده انترو باکتریاسه و استافیلوکوکوس آرئوس افتراق دهد .در سال ۱۹۹۸ میلادی ترکووو همکارانش از ژن ۱۶S rRNA(۲۳) و نیز در سال ۲۰۰۳ میلادی پاتماناتان و همکارانش از ژن hilA جهت شناسایی جنس سالمونلا استفاده نمودند(۲۴) در این دو بررسی گونه های سالمونلا قابل شناسایی نبود. همچنین مطالعات نشان می دهد که دقت و حساسیت روش PCR بیشتر از روش کشت میکروبی است و زمان کمتری (حدود ۲۴ ساعت) در مقابل ۳ الی ۵ روز برای کشت میکروبی لازم است .این نتایج برگرفته از مطالعات قبلی دیگران است(۱۷،۱۹،۲۶،۲۷).

نتیجه گیری

نتایج بررسی این روش نشان داد که بکمک Uniplex PCR می توان در کمتر از ۱۲ ساعت نسبت به شناسایی جنس سالمونلا با شناسایی حداقل ۵۰ واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) باکتری اقدام کرد، در حالی که مدت زمان مورد نیاز در روش معمول کشت میکروبی ۳ الی ۵ روز بوده و حساسیت آن کمتر است.

REFERENCES

1. Kumar, S., K. Balakrishna, and H. V. Batra. 2006. Detection of Salmonella enterica serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of invA, viaB, fliC-d and prt genes by polymerase chain reaction in mutiplex format. Lett. Appl. Microbiol. 42: 149-154.

2. Iranshahi N, Ranjbar R et al. 2008. Evaluation of nalidixic acid susceptibility testing for screening of clinical strains of Salmonella with decreased susceptibility to ciprofloxacin. Iranian journal of medical microbiology; 2(3,4):39-45.

3. Bej, A. K., M. H. Mahbubani, M. J. Boyce, and R. M. Atlas. 1994. Detection of Salmonella spp. in oysters by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60: 368-373.

4. Baumler, A. J., R. M. Tsolis, T. A. Ficht, and L. G. Adams. 1998. Evolution of host adaptation in Salmonella enterica. Infect. Immun. 66: 4579-4587.

5. Tindall BJ ,Grimont PDA,Garrity GM and Euzeby JP. 2005. Nomenclature and taxonomy of the Genus salmonella Int.J Syst Evol Microbiol,55:521-524

6. Judidcal Commonision of International Committee on Systematics of Prokaryotes. 2005. The type species of the genus Salmonella Lignieres 1900 is Salmonella enteric Int.J Syst Evol Microbiol:55:519-520.

7. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melinick & Adelberg's. 2004.Medical Microbiology23th ed. The United States of America; McGraw-Hill.;256-261.

8. Kim, S., J. G. Frye, J. Hu, P. J. Fedorka-Cray, R. Gautom, and D. S. Boyle. 2006. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of Salmonella enterica subsp. enterica. J. Clin. Microbiol. 44: 3608-3615.

9. Vu, D. T., O. Sethabutr, S. L. Von, V. T. Tran, G. C. Do, T. C. Bui, H. T. Le, H. Lee, H. S. Houng, T .L. Hale, J. D. Clemens, C. Mason, and D. T. Dang. 2004. Detection of Shigella by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. J. Clin. Microbiol. 42: 2031-2035.

10. Dutta, S., A. Chatterjee, P .Dutta, K. Rajendran, S. Roy, K. C. Pramanik, and S. K. Bhattacharya. 2001. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India. J. Med. Microbiol. 50: 667-674.

11. Wang, L., Y. Li, and A. Mustaphai. 2007. Rapid and simultaneous quantitation of Escherichia coli 0157:H7, Salmonella, and Shigella in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. J. Food Prot. 70: 1366-1372.

12. Mirmomeni, M. H., S. Kiani, and S. Sisakhtnezhad. 2008. Rapid detection of Salmonella dublin by PCR amplification of the SopE gene and its cloning. Pak. J. Biol. Sci. 11 :1497-1501.

13. Harada, K., M. Uchiyama, T. Hoshi, and T. Takahashi. 2009. Comparison of three DNA extraction methods for detection of Erysipelothrix rhusiopathiae in chicken blood by polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. 21: 354-358.

14. Qu, F. F., C. Cai, X. J. Zheng, and D. B. Zhang. 2006. Rapid identification of Riemerella anatipestifer on the basis of specific PCR amplifying 16S rDNA. Wei Sheng Wu Xue. Bao. 46: 13-17.

15. Sung, K., S. A. Khan, M. S. Nawaz, and A. A. Khan. 2003. A simple and efficient Triton X-100 boiling and chloroform extraction method of RNA isolation from Gram-positive and Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 229: 97-101.

16. Karami A., Ahmadi Z., and Safiri Z. 2006. Rapid detection of Salmonella typhi by Multiplex PCR of invA, tyv, prt genes and sequense comparison of Iranian isolates with Gene Bank. Kowsar. Med. J. 11:1-12 (Full Text in Persian).

17. Soumet, C., G. Ermel, V. Rose, N. Rose, P. Drouin, G. Salvat, and P. Colin .1999 .Identification by a multiplex PCR-based assay of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. Lett. Appl. Microbiol. 29: 1-6.

18. International Organisation for Standardization: ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods. Geneva, Switzerland. 2003.

19. Rijpens, N., L. Herman, F. Vereecken, G. Jannes, S. J. De ,and Z. L. De. 1999. Rapid detection of stressed Salmonella spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. Int. J. Food Microbiol. 46: 37-44.

20. Cohen, H. J., S. M. Mechanda, and W. Lin. 1996. PCR amplification of the fimA gene sequence of Salmonella typhimurium, a specific method for detection of Salmonella spp. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4303-4308.

21. Collazo CM and Galan GE. 1977. The invasion associated type III protein secretion system in 22 Salmonella.Gene;192:51-5.

22. Trkov M. Avgustin G.1998. Spesific detection of Salmonella spp with molecular biological techniques . Animal Microbiology, Domšale, Slovenia, 72:123-127.

23. Aabo S, Rasmussen OF, Sorensen LPD, Olsen E. 1993. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. Mol and Cell Probes; 7:171- 178.

24. Pathmanathan, S. G., N. Cardona-Castro, M. M. Sanchez-Jimenez, M. M. Correa-Ochoa, S. D. Puthucheary, and K. L. Thong. 2003. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene. J. Med. Microbiol. 52: 773-776.

25. Pan, T. M., and Y. J. Liu. 2002. Identification of Salmonella enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J. Microbiol. Immunol. Infect. 35: 147-151.

26. Trkov M, Majerikova I, Jerasek B, Stefanovicova A, Rijpens N, Kuchta T. Detection of Salmonella in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. Food Microbiol 1999; 16:393- 399.

27. Ward, M. P., C. A. Alinovi, L. L. Couetil, and C. C. Wu. 2005. Evaluation of a PCR to detect Salmonella in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. J. Vet. Diagn. Invest. 17: 118-123.