Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

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 pathetic serover 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 *Enterobacteriacea* 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 Southast 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, 10^3 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.

Final

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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۱ – فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

تشخیص مولکولی سروار بیماری‌زای *سالمونلا انتریتیدیس* به روش LAMP با استفاده از مارکر اختصاصی غربال‌شده به‌وسیله روش‌های ژنومیک مقایسه‌ای

هادی روان، مژده امانادی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

پذیرش:۱۳۹۵/۱۰/۰۸

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۱۲/۲۶

موضوع:

میکروب شناسی مولکولی

IJMM 1396; 11(1): 18-29

نویسنده مسئول:

دکتر هادی روان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تلفن: ۰۹۸۳۴۳۳۲۵۷۴۳۲

پست الکترونیک:

Ravan@uk.ac.ir :

چکیده

زمینه و اهداف: *سالمونلا انتریتیدیس* یکی از شایع‌ترین علل گاستروانتریت می‌باشد که در موارد حاد می‌تواند منجر به سپتی‌سمی و یا حتی مرگ شود. در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های ژنومیک مقایسه‌ای مارکرهای ژنی این سروار غربال گردید و اختصاصی‌ترین مارکر با استفاده از روش LAMP برای شناسایی این پاتوژن مورد هدف قرار گرفت.

مواد و روش کار: این مطالعه در سال ۱۳۹٤ صورت گرفت. بمنظور یافتن مارکرهای ژنی *سالمونلا انتریتیدیس* ، ۵۰ ژنوم کامل از سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* و سایر جنس‌های خانواده *انتروباکتریاسه* با استفاده از روش‌های ژنومیک مقایسه‌ای موردبررسی قرار گرفتند. مارکر اختصاصی غربال‌شده با طراحی ٦ پرایمر اختصاصی و با استفاده از روش LAMP به‌منظور شناسایی سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* هدف قرار گرفت (سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه از بیمارستان‌های جنوب شرق کشور جمع‌آوری گردید). کارایی روش LAMP برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه‌های گوشت مرغ که بصورت مصنوعی به این باکتری آلوده شده بودند، نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ژن *lygC* به‌عنوان اختصاصی‌ترین مارکر برای شناسایی سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* انتخاب شد. نتایج حاصل از روش LAMP اختصاصیت این مارکر را برای شناسایی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* نشان داد. حساسیت این روش برای کشت خالص باکتری ۱۰ CFU/reaction و برای نمونه‌های گوشت مرغ آلوده $۱۰^{۳}$ CFU/mL در آغاز انکوباسیون و ۱۰ CFU/mL بعد از ٤ ساعت انکوباسیون ارزیابی گردید.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر اثبات می‌کند که روش ژنومیک مقایسه‌ای روشی کارآمد برای شناسایی مارکرهای ژنی اختصاصی می‌باشد. همچنین روش LAMP حاضر می‌تواند یک ابزار قدرتمند، دقیق و ارزان جهت شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* در آزمایشگاه‌های کنترل کیفی مواد غذایی و تشخیص طبی باشد.

کلمات کلیدی: *سالمونلا انتریتیدیس* ، مارکر اختصاصی، ژنومیک مقایسه‌ای، روش LAMP

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اعضای زیر جنس *سالمونلا انتریکا* دسته‌ای از پاتوژن‌های مهم غذایی در سرتاسر جهان و از عوامل ایجاد گاستروانتریت و عفونت خون می‌باشند که در مواردی حتی ممکن است منجر به مرگ شوند (۱،۲). گاستروانتریت شایع‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان می‌باشد که یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده آن سروار *سالمونلا انتریتیدیس* می‌باشد. منبع اصلی این سروار گوشت دام و طیور و تخم مرغ نپخته آلوده می‌باشد که منبع و ناقل مهمی جهت عفونت‌های انسانی محسوب می‌گردد (۳). در سال‌های اخیر الگوی آلودگی به سالمونلا از سروار *سالمونلا تیفی موریوم* به سروار *سالمونلا انتریتیدیس* تغییر پیداکرده است و در بسیاری از کشورها تست‌های تشخیصی برای شناسایی این باکتری جزء تست‌های مهم در صنایع غذایی و مراکز کنترل بیماری‌ها به شمار می‌روند (۴،۵). شیوع *سالمونلا انتریتیدیس* در طی سال‌های اخیر در سرتاسر جهان رو به افزایش بوده است، به‌طوری‌که چندین مورد آلودگی گاستروانتریت در ایران نیز گزارش‌شده است (۶). در مطالعه‌ای بر روی ۴۸۰ مزرعه مرغ

گوشتی در اطراف تهران، ۶۷٪ مورد آلودگی به *سالمونلا انتریتیدیس* گزارش‌شده است (۷). همچنین در مطالعه دیگری نرخ آلودگی به این باکتری در ۱۷۱ مزرعه مرغداری اطراف کشور ۴۵٪ گزارش‌شده است (۳). با توجه به شیوع رو به رشد این سروار بیماری‌زا و چرخه زندگی پیچیده آن، بسیاری از محققان ارائه یک روش تشخیصی سریع و کارآمد را برای کنترل این پاتوژن به‌منظور 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 تائیدی تست‌های مثبت پس از ۱۵ روز به دست می‌آید (۱۰). علاوه بر زمان‌بر بودن، این روش‌ها پرزحمت 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 ارائه‌شده است که ژن‌های ازجمله *sefA*، *invA*، *spvC*، *lygD* و *SEN1392* را هدف قرار داده‌اند (۱۴-۱۲،۳). باوجود سرعت و دقت روش‌های مبتنی بر PCR بسیاری از روش‌های ارائه‌شده برای شناسایی این پاتوژن به دلیل عدم اختصاصیت لازم برای شناسایی این پاتوژن دچار چالش جدی شده‌اند. درواقع انتخاب اهداف یا مارکرهای مناسب جهت تشخیص اختصاصی پاتوژن‌ها یکی از اصلی‌ترین چالش‌های روش‌های تشخیصی می‌باشد. امروزه با افزایش تعداد ژنوم‌های توالی یابی شده از انواع سروارهای *سالمونلا* و سایر جنس‌های مربوط به خانواده *انتروباکتریاسه*، امکان شناسایی مارکرهای ژنی اختصاصی مربوط به هر سروار با استفاده از روش‌های *in silico* ازجمله روش ژنومیک مقایسه‌ای فراهم‌شده 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 سروار باکتریایی می‌باشد (۱۶،۱۵). ازاین‌رو 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 ازجمله نیازمندی به تجهیزات پیشرفته و گران‌قیمت آزمایشگاهی، نیاز به استفاده از روش‌های وقت‌گیر و هزینه‌بر به‌منظور 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 به‌واسطه حلقه (Loop mediated isothermal amplification) (LAMP) می‌باشد (۲۰-۱۸). در این روش، اسید نوکئیک هدف با اختصاصیت، کارایی و سرعت‌بالا به‌وسیله آنزیم DNA پلیمراز *Bst* و با به‌کارگیری ۶ پرایمر اختصاصی در دمای ثابت و مدت‌زمان 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 سروار *سالمونلا انتریتیدیس* می‌تواند یک ابزار قدرتمند، دقیق و ارزان جهت شناسایی این سروار 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. ازاین‌رو در مطالعه حاضر به‌منظور تائید نهایی مارکر اختصاصی غربال‌شده و همچنین به‌منظور ارائه یک روش کارآمد برای شناسایی سروار بیماری‌زای *سالمونلا انتریتیدیس* ، اختصاصی‌ترین مارکر غربال‌شده از روش ژنومیک مقایسه‌ای با استفاده از روش LAMP مورد هدف قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

غربال مارکرهای ژنی اختصاصی سروار *سالمونلا انتریتیدیس*

ژنوم کامل مربوط به ۵۰ سویه متعلق به سروارهای 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. به‌منظور شناسایی اهداف تشخیصی سروار *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

Final Proof

BLASTN در مقابل ۱۰ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* هم‌طراز گردید و قطعاتی که مقدار E-value کمتر از 10^{-200} 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 سروارهای *سالمونلا* و غیر*سالمونلا* هم‌طراز گردیدند. روش ژنومیک مقایسه‌ای مورداستفاده در اینجا توسط *Chen* و همکاران و *Liu* و همکاران ارائه‌شده است (۲۲،۲۳). به‌منظور ارزیابی بیشتر و اطمینان از نتایج به‌دست‌آمده، 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*، *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Shigella* و سروارهای 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 Nucleotide Collection (nr) و Whole Genome 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). درنهایت 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 مورداستفاده در واکنش LAMP

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

سویه‌های باکتریایی و آماده‌سازی DNA

در مطالعه حاضر از ۱۲ ایزوله باکتریایی؛ شامل ۳ ایزوله از سروار *سالمونلا انتریتیدیس* ، ۷ ایزوله از سایر سروارهای *سالمونلا* شامل *Bledgom*، *Kuilsrivier*، *ParatyphiA*، *Rostock*، *Nigeria*، *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 مورداستفاده قرار گرفت. مجموعه‌ای از ۶ پرایمر؛ شامل دو پرایمر درونی (FIP و BIP)، دو پرایمر بیرونی (F3 و B3) و دو پرایمر لوپ (FLP و BLP) با استفاده از نرم‌افزار PRIMER EXPLORER V4 (http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html) طراحی گردید (جدول ۱). اختصاصیت پرایمرهای طراحی‌شده با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه NCBI مورد تائید قرار گرفت.

Final Proof

واکنش LAMP

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، ۸ 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. به‌منظور 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 به‌صورت چشمی با مشاهده کدورت ناشی از رسوب منیزیم پیروفسفات در محیط واکنش انجام شد. علاوه بر این، به‌منظور ارزیابی دقیق واکنش LAMP و تائید 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

به‌منظور ارزیابی روش LAMP برای شناسایی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه‌هایی که به‌صورت مصنوعی به این باکتری آلوده‌شده‌اند، ۱ گرم گوشت مرغ عاری از باکتری با ۹ میلی‌لیتر TSB هموژنه گردید. نمونه‌های هموژنه شده به چند قسمت تقسیم شدند و هر قسمت با ۰ تا 10^4 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). هرکدام از این هموژنه‌های 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 به‌صورت مصنوعی آلوده‌شده بودند) به زمان با استفاده از پارامتر آماری کای مربع موردبررسی قرار گرفت (P-value < 0.05 معنی‌دار در نظر گرفته شد).

یافته‌ها

مارکرهای ژنی اختصاصی سروار *سالمونلا انتریتیدیس*

به‌منظور شناسایی مارکرهای ژنتیکی اختصاصی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ، از روش ژنومیک مقایسه‌ای ارائه‌شده توسط *Chen* و همکاران و *Liu* و همکاران استفاده گردید. علاوه بر این، به‌منظور 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 ازاین‌روش‌ها 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 سروار به‌عنوان مارکر اختصاصی در نظر گرفته شوند (شکل ۱). علاوه بر این، آنالیز سایر ژن‌ها در پایگاه WGS نشان داد که ژن‌های (*safA*)*SEN0281* با نواحی متناظر از ژنوم‌های *S. Nachanga* (با شماره دسترسی APAD01000005) و ژن‌های (*lygB*) *SEN1380* و (*kil*) *SEN1381* با نواحی ژنی از ژنوم‌های *S. Bareilly* (با شماره دسترسی JRLS01000052) و *S. Bovismorbificans* (با شماره دسترسی CQPN01000008) دارای درصد شباهت بالایی می‌باشند. ژن (*lygD*) *SEN183* 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 (*lygF*) *SEN1384* 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 غربال‌شده از مرحله اول تنها ژن‌های (*SEN1379*) *lygA*، (*SEN1382*) *lygC*، *SEN1388*، *SEN1389* و *SEN1391* و ناحیه بین ژنی *sdf I* (ناحیه بین ژن‌های *lygC* و *lygD*) برای سروار *سالمونلا انتریتیدیس* اختصاصی می‌باشند. ازآنجایی‌که ژن‌های

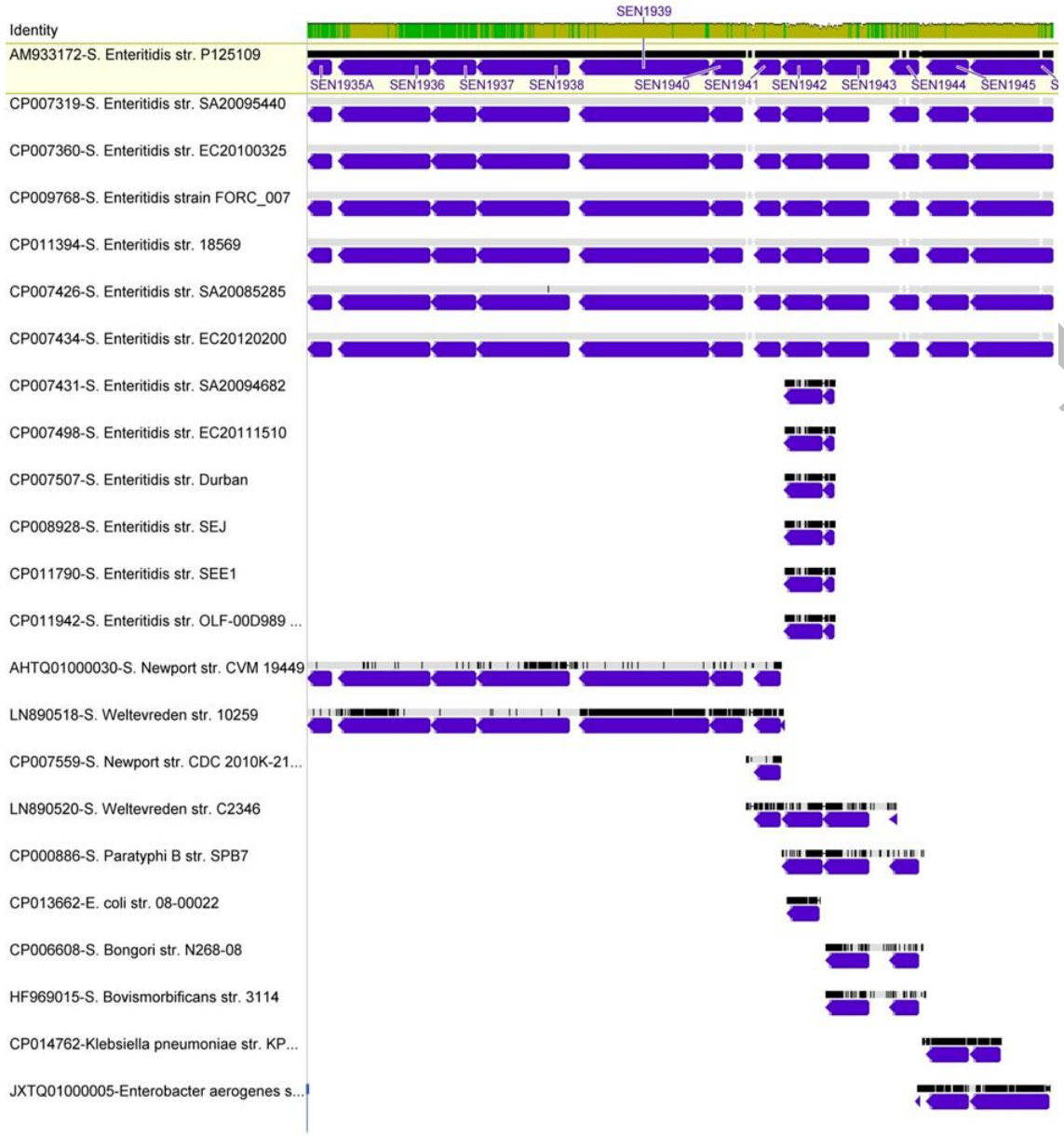
Final Proof

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

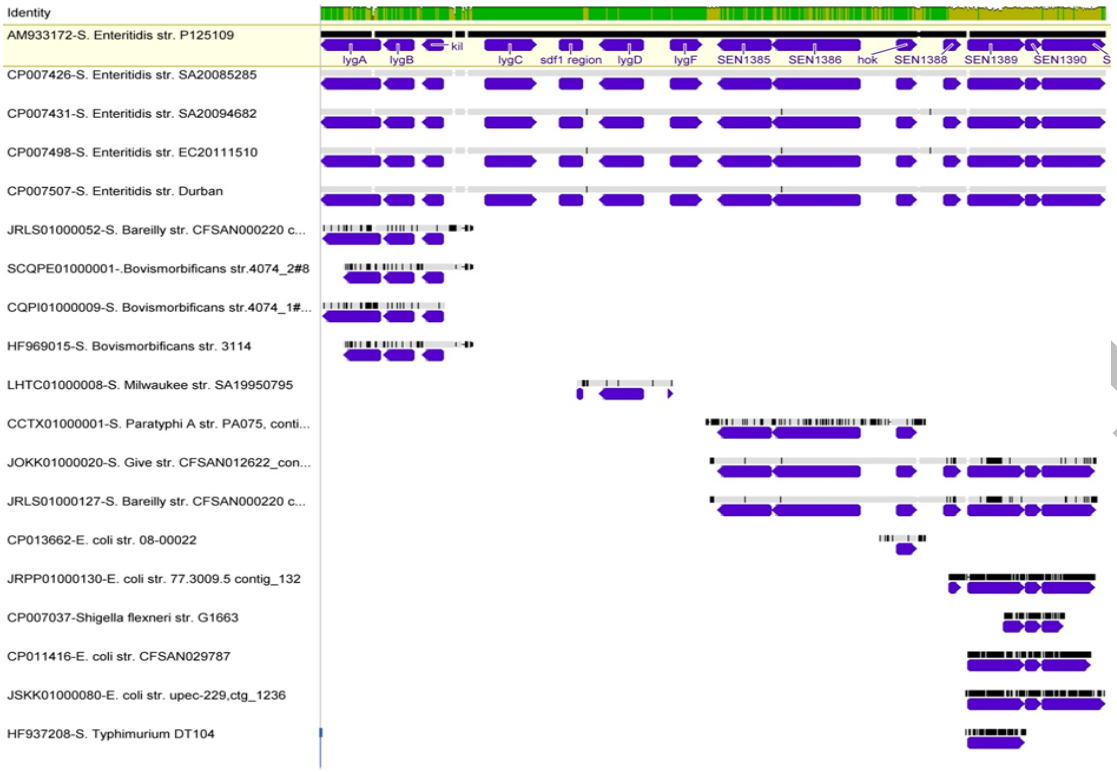
جدول ۲: ژن‌های غربال‌شده حاصل از غربال اولیه با استفاده از روش‌های ژنومیک مقایسه‌ای

ناحیه نوکلئوتیدی در ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* سویه P125109	نام رایج ژن‌ها	ژن‌های به‌دست‌آمده از غربال اولیه
۳۲۱۷۴۷-۳۲۲۲۵۶	*safA*	*SEN0281*
۱۴۶۹۶۸۰-۱۴۷۰۳۰۳	*lygA*	*SEN1379*
۱۴۷۰۳۲۵-۱۴۷۰۶۴۲	*lygB*	*SEN1380*
۱۴۷۰۷۲۷-۱۴۷۰۹۴۸	*Kil*	*SEN1381*
۱۴۷۱۳۷۱-۱۴۷۱۹۰۷	*lygC*	*SEN1382*
۱۴۷۲۵۵۵-۱۴۷۳۰۲۲	*lygD*	*SEN1383*
۱۴۷۳۲۹۵-۱۴۷۳۶۲۴	*lygF*	*SEN1384*
۱۴۷۳۷۸۶-۱۴۷۴۳۴۰	_	*SEN1385*
۱۴۷۴۳۳۷-۱۴۷۵۲۶۹	_	*SEN1386*
۱۴۷۵۶۳۹-۱۴۷۵۸۵۱	*hok*	*SEN1387*
۱۴۷۶۱۲۷-۱۴۷۶۳۱۲	_	*SEN1388*
۱۴۷۶۳۷۵-۱۴۷۶۹۷۴	_	*SEN1389*
۱۴۷۶۹۷۴-۱۴۷۷۲۶۴	_	*SEN1390*
۱۴۷۷۱۴۱-۱۴۷۷۷۹۷	_	*SEN1391*
۲۰۳۳۴۶۱-۲۰۳۳۷۸۴	_	*SEN1935A*
۲۰۳۳۸۶۴-۲۰۳۵۰۹۳	_	*SEN1936*
۲۰۳۵۱۰۳-۲۰۳۵۷۰۵	_	*SEN1937*
۲۰۳۵۶۹۸-۲۰۳۶۹۴۸	_	*SEN1938*
۲۰۳۷۰۶۴-۲۰۳۸۷۹۴	_	*SEN1939*
۲۰۳۸۷۹۴-۲۰۳۹۲۳۴	_	*SEN1940*
۲۰۳۹۳۷۸-۲۰۳۹۷۲۸	_	*SEN1941*
۲۰۳۹۷۵۲-۲۰۴۰۲۹۱	_	*SEN1942*
۲۰۴۰۲۸۸-۲۰۴۰۹۰۵	_	*SEN1943*
۲۰۴۱۱۷۳-۲۰۴۱۵۶۲	_	*SEN1944*
۲۰۴۱۶۵۱-۲۰۴۲۲۲۳	_	*SEN1945*
۲۰۴۲۲۳۶-۲۰۴۳۳۲۷	_	*SEN1946*
۲۰۵۲۹۷۹-۲۰۵۳۸۹۶	_	*SEN1959*
۲۰۵۶۲۶۱-۲۰۵۷۱۲۴	_	*SEN1964*

Final Proof



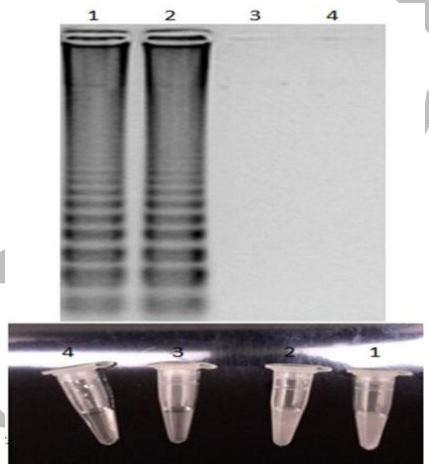
شکل ۱: هم‌طرازی توالی نوکلئوتیدی لوکوس ژنی *SEN1935A-SEN1946* از ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* در مقابل نواحی متناظر از سایر انواع ژنوم‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه. هر پیکان نشان‌دهنده یک ژن می‌باشد. شماره‌های مشخص شده بر روی پیکان‌ها نشان‌دهنده نام این ژن‌ها در ژنوم مرجع می‌باشد. نواحی مشابه ژن‌ها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

اختصاصیت واکنش LAMP

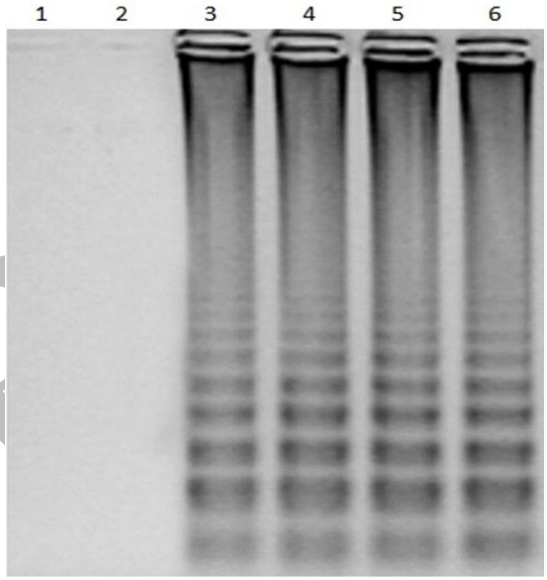
واکنش LAMP بر روی ایزوله‌های مختلف *سالمونلا* و غیر *سالمونلا* انجام شد. کدورت ایجادشده ناشی از محصولات واکنش LAMP در تیوب‌های تست حاوی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* تکثیر موفق ژن هدف را در این ایزوله‌ها نشان داد. علاوه بر این، به‌منظور تائید نتایج حاصل از روش کدورت سنجی، محصولات واکنش با استفاده 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 طراحی‌شده بود. این در حالی بود که ایزوله‌های غیر از *سالمونلا انتریتیدیس* هیچ‌گونه کدورت و یا هیچ‌گونه باندی را بر روی ژل الکتروفورز با شرایط آزمایشی مشابه نشان ندادند (شکل ۳).



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 تیفی موریوم، ۳ و ۴: ایزوله‌های مختلف سالمونلا انتریتیدیس . کدورت ایجادشده در تیوب‌ها نشان‌دهنده تکثیر ژن هدف طی واکنش LAMP می‌باشد (تنها نتایج تعدادی از ایزوله‌ها نشان داده‌شده است).

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 تائید 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، 10^2، 10^3 و 10^4 کلنی در هر تیوب واکنش می‌باشد.

شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه‌های آلوده

به‌منظور ارزیابی کارایی روش LAMP برای شناسایی ایزوله‌های *سالمونلا انتریتیدیس* در نمونه‌های گوشتی که به‌صورت 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

سروار 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 (۳،۶-۸). از این رو در پژوهش حاضر ما به ارائه روشی کارآمد برای شناسایی این پاتوژن پرداخته‌ایم. از آنجایی‌که 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 به‌منظور 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 سروار *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 سروار بیماری‌زا را شناسایی نمودیم. نتایج ما نشان داد که ژن‌های *lygA*، *lygC*، *SEN1388*، *SEN1389* و *SEN1391* و ناحیه بین ژنی *sdf I* نواحی اختصاصی مربوط به این سروار می‌باشند. این نواحی نوکلئوتیدی در لوکوس ΦSE14 (فاژ SE14) از ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* سویه P125109 قرار دارند. این لوکوس درواقع یک پروفاژ ناقص می‌باشد و کد کننده پروتئین‌های مربوط به فاژ SE14 می‌باشد (۲۶). هم‌راستا و موافق با نتایج حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی ما، *Agron* و همکاران با استفاده از روش subtractive hybridization نشان دادند که نواحی *lygA* تا *lygF* از ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* برای این سروار اختصاصی می‌باشند (۲۷). علاوه بر این *Carlos* و همکاران نیز با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی نشان دادند که بخشی از ژنوم پروفاژ SE14 در

Final Pdf

ژنوم *سالمونلا انتریتیدیس* ، که ژن‌های *SEN1378-SEN1398* را شامل می‌شود، حفاظت‌شده می‌باشد (۲۸). بااین‌وجود، نتایج حاصل از آنالیزهای مانشان داد که تنها توالی ژن *lygC* به‌صورت ۱۰۰ درصد منحصر به سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* می‌باشد. از این رو در پژوهش حاضر با استفاده از روش LAMP این مارکر ژنی اختصاصی برای شناسایی سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* برای اولین بار در دنیا مورد هدف قرار گرفت. تاکنون روش‌های متعددی مبتنی بر واکنش LAMP برای شناسایی این پاتوژن ارائه شده است. به‌عنوان مثال، *Chen* و همکاران ژن *lygD* را با استفاده از این روش هدف قرار دادند که حساسیت روش آن‌ها حدود ۲۰ CFU/mL اعلام شده است (۱۲). همان‌طور که در نتایج به دست آمده مشاهده می‌شود، ژن *lygD* علاوه بر سروار *انتریتیدیس* در سایر سروارهای غیر از *انتریتیدیس* موجود می‌باشد. علاوه بر عدم اختصاصیت کافی ژن مورد استفاده، حساسیت این روش نسبت به روش LAMP حاضر (۱۰ CFU/reaction) نیز پایین‌تر می‌باشد. علاوه بر این، *Gong* و همکاران و *Techathuvanan* و همکاران به ترتیب ژن‌های *sefA* و *invA* را با استفاده از روش LAMP هدف قرار دادند (۱۴،۲۹). متأسفانه این روش‌ها نیز از اختصاصیت کافی برخوردار نمی‌باشند. مطالعات نشان داده است که ژن *sefA* علاوه بر *انتریتیدیس* در سایر سروارهای *سالمونلا* ازجمله *Dublin* و *Gallinarum* نیز وجود دارد (۳۰). علاوه بر این، ژن *invA* یک مارکر ژنی عمومی برای شناسایی جنس *سالمونلا* انتریکا می‌باشد و تنها منحصر به سروار *انتریتیدیس* نمی‌باشد (۳۱). اخیراً *Liu* و همکاران با استفاده از روش PCR ژن *SEN1392* را برای شناسایی سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* هدف قراردادند (۱۳). مطالعات بیوانفورماتیکی ما بر روی این ژن نشان داد که توالی این ژن با نواحی ژنی از سروارهای دیگر *سالمونلا* ازجمله *S. Bovismorbificans* سویه ۳۱۱۴ (با شماره دسترسی HF969015) شباهت ۱۰۰٪ ی دارد و بنابراین این ژن نمی‌تواند به‌عنوان یک مارکر اختصاصی برای سویه‌های *سالمونلا انتریتیدیس* در نظر گرفته شود. حساسیت روش مذکور نیز ۲۳ CFU/reaction به‌دست‌آمده است که نسبت به روش LAMP حاضر از حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد. علاوه بر این، مطالعات بسیاری حساسیت بالاتر روش LAMP را نسبت به PCR نشان داده‌اند (۳۴-۳۲).

از آنجایی‌که گوشت مرغ آلوده یکی از مهم‌ترین منابع انتقال عفونت‌های سالمونلایی به انسان می‌باشد، در پژوهش حاضر ما کارایی روش LAMP را در گوشت مرغ چرخ شده که به‌طور مصنوعی به باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* آلوده شده است، مورد ارزیابی قراردادیم. نتایج حاصل از واکنش LAMP نشان می‌دهد که این روش دارای حد تشخیص ۱۰ CFU/mL برای نمونه‌های گوشتی آلوده پس از ۴ ساعت غنی‌سازی و $\geq 10^{3}$ CFU/mL در آغاز غنی‌سازی (در زمان صفر) می‌باشد. حساسیت روش LAMP حاضر نسبت به روش‌هایی که تاکنون برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* در گوشت مرغ آلوده ارائه شده است، قابل مقایسه می‌باشد. 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 می‌باشد (۳۵). *Conceição* و همکاران نیز از روش ایمنومگنتیک برای شناسایی *سالمونلا انتریتیدیس* استفاده کردند که حد تشخیص این روش برای نمونه‌های کشت خالص باکتری ۲۰CFU/mL و برای نمونه‌های گوشت مرغ آلوده حدود ۱۰ CFU/mL پس از ۱۸ ساعت غنی‌سازی 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 ۳ CFU/mL پس از ۲۰ ساعت غنی‌سازی می‌باشد (۳۷). با توجه به اینکه در این روش‌ها مرحله غنی‌سازی بسیار طولانی‌مدت می‌باشد، می‌توان گفت که حساسیت روش LAMP حاضر (۱۰ CFU/mL پس از ۴ ساعت غنی‌سازی) با حساسیت روش‌های مذکور برابری می‌کند و حتی می‌تواند بالاتر از آن‌ها در نظر گرفته شود. علاوه بر این، روش‌های مبتنی بر Real-time PCR، همانند سایر روش‌های PCR برای تکثیر ماده ژنتیکی نیازمند سیکل‌های حرارتی زیاد، استفاده از دستگاه‌های گران‌قیمت ترموسایکلر، روش‌های پر زحمت آشکارسازی و نیروی انسانی متخصص می‌باشند (۱۷). این در صورتی است که روش مورداستفاده در مطالعه حاضر بر پایه روش‌های تکثیر هم دمای DNA می‌باشد. این روش در مدت‌زمان یک ساعت و شرایط هم دما قادر به تشخیص اسید نوکلئیک هدف بطور اختصاصی، با کارایی و حساسیت بالا می‌باشد. شرایط تک دمایی واکنش باعث می‌شود که نیاز به استفاده از دستگاه‌های گران قیمت ترموسایکلر و سیکل‌های 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 ایجادشده حاصل از فرایند تکثیر ژن‌ها و رسوب منیزیم

Final Proof

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 سروار *سالمونلا انتریتیدیس* است (*lygC*)، می‌تواند یک ابزار قدرتمند، دقیق و ارزان جهت شناسایی این سروار بیماری‌زا در 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 میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Spencer JF, de Spencer ALR. Food microbiology protocols. SpringerScience & Business Media; 2001.
5. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. Springer Science & Business Media; 2008.
6. Soltan DM FF, Eesraqi SS, Zahraei T, Ranjbar R, Akbari A,, Abdosamadi Z AhF, Nikmanesf B. The antimicrobialresistance pattern among *Salmonella Enteritidis* isolate from 1950 diiarhoic children in Iran. Tehran Univ Med Sci 2009; 67(12):35-48.
7. Bozorgmehri. An introduction of contamination rate *ofSalmonella Enteritidis* in broiler chicken from of Tehra. Int J FacVet Med Univ Tehran.47(1):70-6.
8. P Feng, S Weagant, K Jinneman, Diarrheagenic *Escherichia coli*, in: Bacteriological Analytical Manual, US Food Drug Administration 2002; 4(5): 20-24.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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 Welness 2015; 4(2):75-9.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Liu D. Molecular detection of foodborne pathogens. CRC Press; 2009.
18. 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.

Final Proof

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 adaptationpathways. 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 φSE14. 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 rapiddetection of *Salmonella* serovar *Enteritidis* under field conditions by loop-mediated isothermal amplification. J Appl Microbiol 2010; 109(5):1715-23.

36. Conceição RdCdS, Moreira ÂN, Ramos RJ, Goularte FL, Carvalhal 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]

Final Proof