تشخیص سریع مولکولی سالمونلا تیفی به روش PCR با استفاده از ژن invA در نمونه های مواد غذائی

علی احمدی[۱]، مهدی قربانعلی زادگان[۱]، علی نجفی[۱]، حمید رضا توکلی[۲]، رضا میرنژاد[*۱]

۱) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

۲) مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۵

چکیده

مقدمه: به دلیل این که سالمونلا تیفی یک پاتوژن روده ای مهم و آلوده کننده آب و غذا می باشد، تشخیص سریع و دقیق آن در آب و مواد غذائی بسیار حائز اهمیت است. امروزه تشخیص سریع باکتری های بیماری زا با تکنیک های نوین در مواد غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از انجام این مطالعه جداسازی سالمونلا تیفی در مواد غذایی آلوده با روش PCR با استفاده از ژن invA بوده است.

مواد و روش ها: بعد از استخراج DNA با دو روش استاندارد، ابتدا روش مولکولی PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژن **invA** بر روی هر یک از سوش های باکتریایی استاندارد تنظیم گردید. سپس با استفاده از روش PCR، باکتری مورد نظر در نمونه های غذایی آلوده جداسازی گردید.

یافته های پژوهش: نتایج این مطالعه نشان داد که ژن invA مناسب ترین توالی برای جداسازی سالمونلا تیفی در مواد غذائی آلوده می‌باشد. هم چنین روش PCR طراحی شده در این مطالعه برای جداسازی سریع باکتری بیماری زای سالمونلا تیفی در نمونه های غذایی آلوده، دارای حساسیت(با کپی نامبر قابل جداسازی ۱۰۸×۱/۸۹) و اختصاصیت بالا می باشد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش مولکولی PCR بهینه شده در این مطالعه روشی مناسب جهت تشخیص سریع باکتری بیماری زای سالمونلا تیفی در نمونه های غذایی آلوده بوده و می تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای روش های رایج و مرسوم فعلی به کار گرفته شود.

واژه های کلیدی: سالمونلا تیفی، تشخیص مولکولی، PCR، مواد غذائی

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

Email: rmirnejadreza@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

مقدمه

بیماری های ناشی از مصرف غذا(Food-borne diseases) طیف وسیعی از بیماری ها در نقاط مختلف جهان را در بر می گیرند. به عنوان مثال، در ایالات متحده آمریکا، پس از بیماری های تنفسی و ریوی در درجه دوم اهمیت قرار دارند. طبق گزارش مرکز کنترل بیماری ها(CDC) عوامل باکتریال عامل ایجاد ۷۰ درصد عفونت ها و مسمومیت های غذایی هستند. گزارش های متعددی از بروز اپیدمی مسمومیت های غذایی توسط سالمونلا در نقاط مختلف جهان وجود دارد. به عنوان نمونه می توان به بزرگ ترین اپیدمی سالمونلوز ناشی از سالمونلا تیفی موریوم در سال ۱۹۸۵ در ایالات متحده اشاره نمود که به دلیل آلوده شدن شیر پاستوریزه شده در کارخانه رخ داد و طی آن ۱۷۰۰۰۰ نفر دچار مسمومیت گردیدند،(۱). در سال ۱۹۹۴ نیز به دلیل آلودگی بستنی پاستوریزه به سالمونلا انتریتیدیس ۲۲۴۰۰۰ نفر در ۴۱ ایالت آمریکا دچار عفونت غذایی گردیدند.(۲)

جداسازی و تشخیص میکروارگانیسم های بیماری زا در آب و مواد غذایی یکی از موضوعات بسیار مهم در بهداشت مواد غذایی محسوب می گردد. در حال حاضر، تشخیص وجود باکتری ها در مواد غذایی با دو روش کلی سنتی و مدرن انجام می‌گیرد،(۳). روش های سنتی در مقایسه با روش های نوین، به دلیل نیاز به انجام آزمایشات افتراقی و تکمیلی، روش هایی وقت گیر و علی رغم کم هزینه بودن گاهی مشکل ساز می باشند. این خلاء به ویژه در مواقعی که اعلام سریع نتایج از نظر پزشکی و اقتصادی حائز اهمیت است بیشتر احساس می گردد،(۴،۳). اساس این روش ها عموماً کشت باکتری در محیط های مختلف و تولید کلنی های قابل رویت در یک محیط جامد انتخابی و انجام آزمایشات بیوشیمیایی در محیط های مایع است. در مورد برخی باکتری ها مانند سالمونلاها حتی مجبور هستیم از مراحل پیش غنی سازی، غنی سازی و کشت در محیط جامد انتخابی استفاده نمائیم،(۵،۶،۷). خوشبختانه، با کشف روش های سریع تشخیص مولکولی این مشکلات تا حد زیادی مرتفع گردیده است، زیرا این روش ها دارای سرعت و دقت بسیار بالا بوده و با کمک آن ها در زمان بسیار کمتری میکروارگانیسم مورد نظر شناسایی می گردد. به طوری که امروزه در مراکز تحقیقاتی و آزمایشگاه های بالینی در داخل و خارج کشور از روش مولکولی PCR جهت شناسائی سالمونلاها و سایر پاتوژن ها در نمونه های بالینی استفاده فراوانی می شود،(۸،۹). در خصوص تشخیص عوامل آلوده کننده مواد غذائی به خصوص سالمونلاها با روش مولکولی در ایران مطالعاتی انجام شده است،(۱۰). ولی در زمینه تشخیص سالمونلا تیفی با استفاده از ژن های اختصاصی، مطالعه ای صورت نگرفته، به همین دلیل در این مطالعه تشخیص سریع سالمونلا تیفی در مواد غذایی آلوده با روش PCR با استفاده از ژن invA طراحی گردید.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی و تجربی(Experimental) است. سوش های استاندارد باکتری سالمونلا تیفی PTCC : 1609، لیستریا مونوسیتوژنز PTCC : 1163 و اشرشیاکلی ATCC : 35218، از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی ایران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و محیطای کشت LB agar و LB broth از شرکت Merck تهیه گردید. بعد از کشت باکتری های فوق بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید مقدار DNA تعیین گردید. با توجه به این که توانایی روش الکتروفورز در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در تعیین DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم می‌باشد، نمونه خالص شده از محیط کشت به صورت رقت سریالی ۱/۲ تا ۱/۸۰ رقیق گردید و ضعیف ترین باند انتخاب شد.(۹)

پرایمر: پس از بررسی منابع تشخیص سالمونلا تیفی با استفاده از PCR، تمام ژن‌ها و پرایمرهایی که تاکنون استفاده شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای مربوط به ژن invA انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آن ها با نرم افزار ملکولی BLAST پرایمر مطلوبی که مشخصات آن در جدول شماره ۱ ذکر شده است، برای تشخیص سالمونلا تیفی انتخاب گردید. بررسی نرم افزار مولکولی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

این ژن و پرایمرهای ارایه شده نشان داد که سکانس انتخاب شده از ژن invA مناسب ترین توالی برای شناسایی سالمونلا تیفی در مواد غذائی آلوده می‌باشد.

استخراج ژنوم: برای استخراج ژنوم از روش فنل و کلروفرم استفاده شد. به این ترتیب که برای set up نمودن آزمایش PCR ابتدا چند کلنی از باکتری‌های استاندارد به ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی وارد و سپس سانتریفیوژ گردید(۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه)، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر Salt Tris EDTA افزوده و پس از ۱۰ دقیقه مخلوط نمودن، ۱۸۰ میکرولیتر SDS دو درصد به آن اضافه گردید. پس از آن، ۳۷۵ میکرولیتر استات سدیم به آن افزوده و ۱۰ بار تکان شدید داده شد. سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و به محلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال منهای ۲۰ درجه نگهداری و پس از آن سانتریفیوژ گردید(۱۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). به رسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانول ۷۰ افزوده و به خوبی مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر TE اضافه کرده و جهت انجام PCR استفاده گردید.

بهینه سازی مواد لازم برای واکنش PCR: برای رسیدن به این هدف، چند بار فرآیند PCR با ژنوم سویه های استاندارد انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت های مواد اولیه(پرایمرها، MgCl2، dNTP و آنزیم Taq پلی مراز) استفاده گردید و در نهـایت مناسب ترین مقادیر مواد لازم برای انجام PCR انتخاب شد. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم گردد. جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها(Annealing) از درجه حرارت‌های ۵۶، ۵۷، ۵۸ و ۵۹ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

جهت تائید محصولات PCR پس از انجام واکنش PCR محصول به همراه پرایمر اختصاصی جهت تعیین سکانس به شرکت Bioneer کره ارسال گردید. پس از دریافت نتیجه از شرکت مذکور، سکانس های ارسالی ابتدا توسط نرم افزار Chromas خوانده شد و سپس توسط نرم افزار Contig manager سکانس های کامل آن استخراج گردید.

تعیین میزان اختصاصی بودن PCR: جهت تعیین میزان اختصاصیت هر یک از واکنش های PCR و پرایمرهای استفاده شده، ابتدا توسط نرم افزار Blast موجود در سایت NCBI پرایمرهای استفاده شده آنالیز شده و از نظر اختصاصی بودن مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین برای اطمینان بیشتر، در عمل نیز جهت سویه های باکتریایی نزدیک همانند باکتری های E.coli، Proteus، Shigella، Enterobacter واکنش PCR با همان شرایط قبلی و پرایمرهای استفاده شده انجام گردید.

تعیین میزان حساسیت PCR بر حسب غلظت DNA ژنومیک: برای این منظور، ابتدا غلظت DNA ژنومیک استخراج شده از هر یک از باکتری ها به روشی که قبلا ذکر گـــردید انـــدازه گیری شد. سپس از این DNA های استخراج شده، برای هر یک از باکتـــری ها رقت تهیه گردید و در نهایت از این رقت های تهیه شده واکنش PCR انجام شد تا حساسیت کار اندازه گیری شود.

یافته های پژوهش

تائید محصولات PCR: با بررسی و مقایسه سکانس ها با سکانس های استخراج شده مربوط به هر یک از عوامل باکتریایی مشخص گردید که توالی های به دست آمده دقیقا مربوط به باکتری های مورد نظر می باشند.

تعیین میزان اختصاصی بودن PCR: برای تعیین میزان اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده، هر یک از جفت پرایمرها با ژنوم گونه های باکتریایی نزدیک که در بخش دوم ذکر شده اند مورد آزمایش قرار گرفت و نتیجه این که هیچ گونه باندی در این واکنش ها حاصل نشد. در نتیجه، مشخص گردید که پرایمرهای مورد استفاده کاملا اختصـــاصی عمـــل می کنند.

تعیین میزان حساسیت PCR: پس از انجام واکنش PCR طبق شرایط بهینه شده بخش دوم و الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد نتیجه مورد بررسی قرار گرفت. واکنش تا رقت ۱/۱۰۰ از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

DNA ژنومیک انجام شده است. با توجه به این که غلظت DNA ژنومیک در نمونه اولیه برای باکتری سالمونلا ۹۵۵ ng/µl بوده است، برای محاسبه حساسیت واکنش چندین رقت تهیه گردید و سپس از این رقت های PCR گذاشته شد. نتیجه این که تا رقت ۱/۱۰۰ ژنوم اولیه باند حاصل می گردد. از ایـــن رو می توان طبق جدول ۲ حساسیت PCR را تعیین نمود. بر این اساس، متوسط حساسیت PCR طراحی شده برای تشخیص این باکتری می توان تعداد کپی نامبر باکتری که با این تکنیک قابل تشخیص است را از فرمولی که توسط Andrew Staroscik در سال ۲۰۰۴ در سایت URI Genomics & Sequencing Center ارائه شده است استفاده نمود.

number of copies =
(amount*6.022×1023)/(length*1×109*650)
number=
(ng * number/mole)/(bp* ng/g * g/ mole of bp)

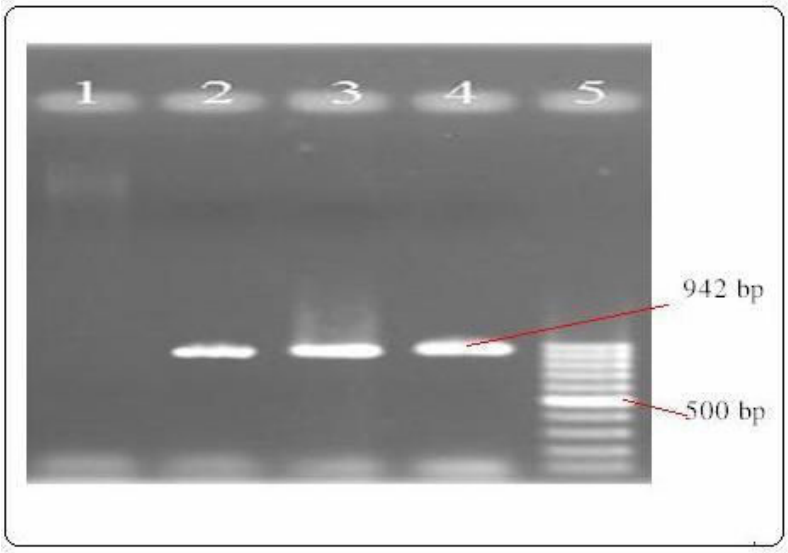
ژن invA مربوط به باکتری سالمونلا: با توجه به شرایط بهینه شده از نظر مواد مصرفی در واکنش و سیکل حرارتی مناسب، واکنش PCR برای ژن invA با پرایمرهای اختصاصی آن انجام شد و نهایتا باند ۹۴۲ جفت بازی حاصل گردید که نتیجه آن در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱. سکانس پرایمر انتخاب شده به منظور تشخیص سالونلا تیفی

Primers	Sequences
Forward	5-acc acg ctc ttt cgt ctg g-3
Reverse	5-gaa ctg act acg tag acg ctc-3

جدول شماره ۲. میزان حساسیت تشخیصی روش مولکولی PCR برای هر یک از عوامل

باکتری	غلظت ژنوم اولیه(ng/µl)	رقت ۱/۱۰۰(ng/µl)	طول ژنوم باکتری	کپی نامبر قابل تشخیص
Salmonella	955	9.55	4,685,848 pb	1.89×108



تصویر شماره ۱. تصویر ژل الکترفورز سالمونلا تیفی. ردیف ۱ کنترل منفی، ردیف ۲ و ۳ از نظر ژن invA سالمونلا تیفی در مواد غذائی آلوده مثبت می بـــاشند. ردیف ٤ کنتـــــرل مثبت سالمونلا تیـــــفی(PTCC :1609)، ردیـــــف ٥ مارکر(100bp DNA ladder, SM#333).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

بحث و نتیجه گیری

امروزه کنترل بهداشت مواد غذایی در جوامع بشری از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد که همواره شیوع بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده یکی از مشکلات مهم به ویژه در جوامع دارای سطح بهداشت پایین تر تلقی می گردد. عوامل مختلف باکتریائی و انگلی آب و مواد غذائی را آلوده می کنند و انسان ها با خوردن این مواد به بیماری های مختلف از جمله مسمومیت غذائی مبتلا می گردند. یکی از این عوامل مهم بیماری زا سالمونلاها می باشند. سالمونلاها باسیل های گرم منفی هستند که از طریق آب و مواد غذائی به انسان منتقل و باعث بروز مسمومیت های غذائی، سپتی سمی و تب روده ای(حصبه یا تیفوئید) می گردند.(۱،۲،۳،۱۱)

در ایالات متحده آمریکا، بین سال های ۱۹۷۷ تا ۱۹۸۱ تقریباً ۹۵۴ اپیدمی ثبت شده که همگی به علت مصرف غذای آلوده ایجاد شده‌اند. طبق این گزارشات، ۴۹ درصد موارد عفونت و مسمومیت غذایی در این کشور ناشی از سالمونلا بوده است و طبق گزارش Ryan و همکاران در سال ۱۹۸۷ و Hennessy و همکاران در سال ۲۰۰۱ آلودگی فرآورده های لبنی(شیر و بستنی) در دو نوبت منجر به بروز دو اپیدمی در ایالات متحده گردید که در خلال آن ها به ترتیب ۱۷۰۰۰۰ و ۲۲۴۰۰۰ نفر دچار مسمومیت گردیدند و عامل آن سالمونلا انتریتیدیس و تیفی موریوم معرفی گردید(۱،۲). متاسفانه، در کشورهای جهان سوم و حتی در بسیاری از کشورهای اروپایی آمار دقیقی از اپیدمی ها و به ویژه تعداد انواع مسمومیت ها و بیماری های ناشی از مصرف غذای آلوده در دسترس نیست،(۱۰،۱۲). در کشور ما ایران، حدود ۲۵ درصد از مواد غذائی به دلیل فساد از بین می روند و به دلایل دیگر مانند سهل انگاری و عدم رعایت موازین بهداشتی همه ساله شاهد بروز انواع اپیدمی های ناشی از مصرف مواد غذائی هستیم.(۱۰)

با توجه به اهمیتی که ذکر گردید تشخیص سریع و دقیق این عوامل در مواد غذایی می تواند یکی از راه های پیشگیری از همه گیری های وسیع باشد. در این راستا این مطالعه جهت تشخیص سالمونلا تیفی در مواد غذایی آلوده با روش PCR با استفاده از ژن invA انجام گردید.

همانند مطالعه Santos و Park و Jamshidi و همکارانش که نشان دادند روش PCR تکنیکی مناسب جهت شناسائی سالمونلاها در مواد غذائی به خصوص شیر و مرغ است، این مطالعه نیز نشان داد که تکنیک PCR روشی مناسب جهت شناسائی سالمونلاها به خصوص سالمونلا در نمونه های مواد غذائی در مقایسه با سایر روش های معمول می باشد.(۱۰،۱۳،۱۴)

در این مطالعه، شناسائی سالمونلا تیفی با استفاده از پرایمرهای ژن invA انجام شده و مشخص شد که این روش در تشخیص سریع و دقیق سالمونلا تیفی بسیار مناسب است که این مشابه مطالعات Chiu CH و Feder و Suo و همکارانش می باشد که اثبات نمودند روش مولکولی PCR با استفاده از ژن های ویرولانس مانند invA بسیار سریع تر و دقیق تر از سایر روش ها به ویژه کشت می باشد، زیرا روش های سنتی روش هایی هستند که غالباً وقت گیر بوده و علی 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. خوشبختانه در روش های جدید و سریع که امروزه برای تشخیص و جداسازی باکتری ها مورد استفاده قرار می گیرند، این مشکلات مرتفع گردیده و با تکنیک های مبتنی بر روش های فیزیکی، شیمیایی، ایمونولوژیکی و در راس آن ها روش های مولکولی می تواند در اسرع وقت نتایج را اعلام نمود.(۱۵،۱۶،۱۷)

به طورکلی، با توجه به تغییرات گوناگونی که امروزه در فنوتیپ باکتری های پاتوژن به صورت طبیعی و یا دستکاری های ژنتیکی و عمدی صورت می گیرد و باعث اختلال در تشخیص این باکتری ها به روش های سنتی می شود، از روش های مولکولی PCR که سریع تر و دقیق تر نیز می باشند به عنوان جایگزینی مناسب برای روش های رایج و مرسوم فعلی برای شناسائی باکتری ها در مواد غذائی آلوده می توان استفاده کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که روش مولکولی PCR بهینه شده ژن invA، روشی مناسب

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

جهت تشخیص سریع باکتری بیماری زای سالمونلا تیفی در نمونه های غذایی آلوده است و می توان آن را جایگزین روش های تشخیصی سنتی در آزمایشگاه های مواد غذائی نمود.

سپاس گزاری

نویسندگان این مقاله از مراکز تحقیقاتی بیولوژی مولکولی و بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) به خاطر پشتیبانی مالی و اجرای آن تقدیر و تشکر می نمایند.

References

1-Ryan CA, Nickels MK, Hargrett-Bean NT, Potter ME, Endo T, Mayer L, et al. Massive outbreak of antimicrobial resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. JAMA 1987;258:3269-74.

2-Hennessy TW, Hedberg CW, Slutsker L, White KE, Besser-Wiek JM, Moen ME, et al. A national outbreak of Salmonella enteritidis infections from ice cream. N Engl J Med 1996;334:1281-6.

3-Carrique-Mas JJ, Davies RH. Sampling and bacteriological detection of Salmonella in poultry and poultry premises: a review. Rev Sci Tech 2008;27:665-77.

4-Tavakoli H, Bayat M, Kousha A, Panahi P. The application of chromogenic culture media for rapid detection of food and water borne pathogen. American-Eurasian J Agric & Environ Sci 2008;4:693-8.

5-Dwivedi HP, Jaykus LA. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. Crit Rev Microbiol 2011;37:40-63.

6-Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiol 2010;27:710-30.

7-Wain J, Hosoglu S. The laboratory diagnosis of enteric fever. J Infect Dev Ctries 2008; 2:421-5.

8-Abubakar I, Irvine L, Aldus CF, Wyatt GM, Fordham R, Schelenz S, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. Health Technol Assess 2007;11:211-16.

9-Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetics methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. APMIS 2004;112:908-29.

10-Jamshidi A, Bassami MR, Afshari-Nic S. Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. Int J Vet Res 2009;1:43-8.

11-Aldridge P, Gnerer J, Karlinsey JE, Hughes KT. Transcriptional and translational control of the salmonella fliC gene. J Bacteriol 2006;188:4487-96.

12-Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. Epidemiol Infect 2002;129:1-8.

13-Santos LR, Nascimento VP, Oliveira SD, Flores ML, Pontes AP, Ribeiro R, et al. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Salmonella in inoculated chicken meat. Rev Inst Med Trop S Paulo 2001;43:247-50.

14-Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp., Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). J Microbiol 2006;44:92-7.

15-Feder I, Nietfeld JC, Galland J, Yeary T, Sargeant JM, Oberst R, et al. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of Salmonella in porcine fecal and water samples. J Clin Microbiol 2001;39: 2477-84.

16-Chiu CH, Ou JT. Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes, invA and spvC, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. J Clin Microbiol 1996;34:2619-22.

17-Suo B, He Y, Tu SI, Shi X. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Salmonella spp., Escherichia coli O157, and Listeria monocytogenes in meat products. Foodborne Pathog Dis 2010;7:619-28.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]

Molecular Detection of Salmonella typhi in Food Samples by PCR Using invA Gene

*Ahmadi A[1], Ghorbanali Zadegan M[1], Najafi A[1], Tavakoli H.R[2], Mirnejad R[*1]*

(Received: 7 Oct. 2011 Accepted: 5 Mar. 2012)

Abstract

Introduction: Salmonella typhi is an important enteric pathogen that can be transmited via food and water. So, careful and rapid identification of this organism is very important. Today, new techniques in rapid diagnosis of pathogenic bacteria in food are important. The purpose of this study was molecular detection of S. typhi in food samples by PCR using invA gene.

Materials & Methods: After extraction of genomic DNA by two standard methods, molecular method of PCR by specific primer of invA gene on any of the standard strains of bacteria was set. Then, using the PCR method, S. typhi was detected in samples of contaminated food.

Findings: The results showed that invA gene is the suitable sequence for detection of S. typhi in contaminated foods. Also, designed PCR method in this study is a method with high sensitive (detectable copy number is 1.89×108) and specificity for rapid detection of S. typhi in contaminated food.

Discussion & Conclusion: The results of this study shows that PCR method is safe, fast and sensitive for rapid detection and identification of bacteria in contaminated foods and can be an appropriate substitute method for the current and conventional methods.

Keywords: Salmonella typhi, molecular detection, PCR, food

1. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Military Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-10-19]