مقاله پژوهشی

تایپینگ سالمونلاهای تیفوئیدی با روش تخلیص پروتئینهای محلول در آب و بکارگیری تکنیک SDS-PAGE

دکتر رسول یوسفی مشعوف* ، دکتر محمدتقی گودرزی** ، سعید آزادی***

دریافت : ۸۳/۱۲/۲۶ ، پذیرش : ۸۴/۷/۱۱

چکیده:

مقدمه و هدف: سالمونلا ها از مهمترین باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه هستند کـه موجـب عفونتهـای سیسـتمیک در انسـان و حیوانات میشوند.هدف از این مطالعه جداسازی و تایپینگ سالمونلاهای تیفوئیدی بـا روش پلـی اکریـل آمیـد ژل الکتروفـروزیس SDS-PAGE و مقایسه آن با روش سروتایپینگ میباشد.

روش کار : در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی تعداد یکصد مورد سالمونلا که از آزمایشگاه های مراکز درمانی شـهر همـدان جمـع آوری شده بود به همراه ٤ سویه رفرانس سالمونلا و ۵ سویه رفـرانس دیگـر از خـانواده انتروباکتریاسـه مـورد آزمـایش قـرار گرفتند. سروتایپینگ نمونه ها با آنتی سرمهای منووالان بیومریو و دیفکو انجام گرفت و الکتروفورز پروتئین های ساختمانی آنهـا نیز در ژل ۱۰٪ پلی آکریل آماید انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی ژل ها بـا آبـی کوماسـی ، اوزان مولکـولی بانـدهای حاصـل از الکتروفورز سویه های مورد مطالعه با استفاده از منحنی مربوط به باندهای حاصل از پروتئین های استاندارد مشـخص گردیـد و توسط دستگاه دنسیتومتر مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج : از یکصد مورد سالمونلای جداشده از بیماران ٤۳مورد (٤۳٪) مربوط به سـالمونلا تیفـی، ۲۰ مـورد (۲۰٪) سـالمونلا تیفـی موریوم، ۱۲مورد(۱۲٪) سالمونلا پارا تیفی B، ۱۰ مورد (۱۰٪) سالمونلا پاراتیفی Cو یک مورد سالمونلا پارا تیفی A و بقیه نیز غیـر تیفوئیدی بودنـد. در روش الکتروفـورز بانـدهای پروتئینـی زیـادی از مولکولهـای بـزرگ بـیش از ۲۲۰ کیلـو دالتـون (KDa) تـا مولکولهای کوچک کمتر از ۱۸/۵کیلو دالتون بدست آمد که به خوبی باعث تمایز سویه هـا از یکـدیگر گردیـد و بـر ایـن اسـاس سالمونلا تیفی به ۵ زیرگروه و سالمونلا پارا تیفی B و C هرکدام به ۳ زیرگروه تقسیم شدند. همچنین الگوی پروتئینی سویه هـای رفرانس سالمونلا اختلاف عمده ای با الگوی پروتئینی سویه های رفرانس انتروباکتریاسه از خود نشان دادند، بـا اینحـال یـک بانـد پروتئینی مشترک در ناحیه ٤۳ کیلو دالتون در مقایسه با الگوی پروتئینی سویه های رفرانس انتروباکتریاسه مشاهده گردید.

نتیجه نهائی : نتایج این مطالعه نشان داد که تخلیص پروتئینهای محلول در آب سالمونلاها با بکارگیری تکنیک SDS-PAGE میتوانـد بعنوان یک روش مطمئن تر از روش سروتاپینگ در طبقه بندی و تایپینگ این ارگانیسـمها مـورد اسـتفاده قـرار گیـرد. بـا اینحـال تحقیقات بیشتری مورد نیاز است تا این روش بتواند جایگزین روشهای سروتایپینگ گردد.

کلید واژه ها : تایپینگ / سالمونلا / تخلیص پروتئین

مقدمه :

سالمونلا ها از باکتریهای مهم خانواده انتروباکتریاسـه هستند که در طبیعت انتشار وسیعی دارند و اکثرآنها برای انسان و سایر حیوانات بیماریزا میباشند (۱). سالمونلا های تیفی و پارا تیفـی عامـل تیفوئیـد (حصـبه) و پاراتیفوئیـد (شبه حصبه) هسـتند، امـا سـالمونلا هـای غیرتیفوئیـدی

* دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (yousefimash@yahoo.com)

** دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*** کارشناس ارشد بخش بیوتکنولوژی شرکت داروسازی داروپخش تهران

(مانند سالمونلاهای آگونا ـ تیفی موریوم ـ ویرشو ـ هاوانا ـ دربی ـ انتریتیدیس) عامل عفونتهای غیرتیفوئیدی مانند گاستروآنتریت، سپتی سمی و آبسه های احشایی هستند(۲). تاکنون بیش از ۲۴۰۰ سروتایپ سالمونلای غیر تیفوئیدی (NTS) شناسایی شده است که اکثر آنها از نمونه های کلینیکی با منشاء حیوانی ایزوله شده است (۸-۳). بر اساس طبقه بندی کوفمن-وایت این سروتایپ ها از گروه A تا گروه Z تقسیم میشوند (۹). با توجه به گزارشات مرکز بهداشتی و تحقیقاتی دنیا نظیر سازمان بهداشت جهانی شیوع سالمونلا ی غیر تیفوئیدی در جوامع انسانی نیز افزایش یافته است و علت آن پیدایش بسیاری از سروتایپهای جدید سالمونلایی است که در گذشته شیوع چندانی نداشته است (۱).

در حال حاضر روش معمول تایپینگ سالمونلاها روش سرولوژیک می باشد، اما این روش بعلت وجود واکنشهای متقاطع(Cross-reaction) در حین سروتایپینگ، مشکلاتی را در تایپینگ سالمونلا ها ایجاد کرده است (۹،۱۰). اخیراً روشهای مولکولی از جمله تخلیص پروتئینهای ساختمانی میکروارگانیسم ها و آنالیز آن با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفروزیس SDS-PAGE جهت اهداف تایپینگ باکتری ها بکار گرفته شده است (۱۱،۱۲). در خصوص تایپینگ سالمونلا ها با این روش در ایران اطلاعات جامع و کاملی در دسترس نمی باشد، از طرف دیگر سایر مطالعات مولکولی مانند PCR و هیبریداسیون DNA-DNA در چند سال اخیر موجب تغییرات عمده ای در طبقه بندی سالمونلا ها شده است که جنس سالمونلا شامل دو گونه می باشد : سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری. سالمونلا انتریکا خود شامل شش زیرگونه است (I, II, IIIa, IIIb, IV, VI) که سالمونلاهای انسانی در زیرگونه (I) قرار می گیرد در حالیکه سایر زیرگونه ها و سالمونلا بونگوری معمولاً از حیوانات خونسرد و عوامل محیطی جدا میگردد (۱،۹).

هدف مطالعه حاضرسروتایپینگ سالمونلا ها و تعیین سروتایپ غالب در محل پژوهش، تخلیص پروتئینهای ساختمانی سالمونلا های تیفوئیدی جدا شده از بیماران با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفروزیس SDS-PAGE و مقایسه با الگوی پروتئینی برخی از سویه های مهم خانواده انتروباکتریاسه می باشد. استخراج و شناسایی پروتئینهای ساختمانی محلول در آب باکتریها میتواند در تایپینگ و طبقه بندی آنها مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار:

این پژوهش از نوع توصیفی ـمقطعی و آینده نگر بوده و جامعه آماری آن را نمونه های بدست آمده از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر همدان تشکیل می دادند. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ مورد سالمونلا از نمونه های خون، مدفوع، مایع نخاع، ادرار و مایع پلور بیماران با بیماری حصبه و گاستروآنتریت جداسازی شده و پس از سروتایپینگ، پروتئینهای ساختمانی محلول در آب (Whole-Cell Proteins) آنها تخلیص شده و مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه همچنین۴ سویه رفرانس یا استاندارد سالمونلا بدست آمده از کلکسیون PTCC (شامل سالمونلا تیفی PTCC=1609 ، سالمونلا پاراتیفی PTCC=1230 A ،سالمونلا پاراتیفی PTCC =1231 B و سالمونلا پاراتیفی PTCC=1222 C) و ۵ سویه رفرانس دیگر از خانواده انتروباکتریاسه (شامل اشریشیا کلی PTCC=1222، انتروباکتر آئروژینوزا PTCC=1221، سیتروباکتر فروندی PTCC=1600، کلبسیلا پنومونیه PTCC=1953 و سراشیا مارسه سنس PTCC=1111) بکار برده شد. نمونه ها بر روی محیط های کشت انتخابی SS آگار و مکانکی آگار کشت داده شده و پس از انجام آزمایشات بیو شیمیایی (۱۳) تشخیص اولیه آنها صورت گرفت.

سروتایپینگ نمونه ها نیز با آنتی سرمهای منووالان ساخت بیومریو فرانسه (Diagnostic Pasteur, 72200, Lyon France) انجام گرفت (۱۴). الکتروفورز پروتئینهای ساختمانی سویه ها به روش تیلور (Taylor) با اندکی اصلاح صورت گرفت (۱۱).

در این روش۴ تا۵ کلنی از محیط کشت برداشته شد و پس از سه بار سانتریفوژ با نرمال سالین، رسوب (Pellet) را در ۱۰۰ میکرولیتر لایزیس بافر (Lysis-buffer) حل نموده، سپس سوسپانسیون را به آرامی مخلوط نموده و مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰درجه سانتیگراد بن ماری قرار داده و پس از سانتریفوژ مجدداً مقدار ۱۵۰ میکرولیتر لایزیس بافر حاوی SDS 3% به محلول اضافه نموده و پس از ده بار مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سوسپانسیون برای مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ سرد شده و سپس با ورتکس بخوبی مخلوط نموده و سوسپانسیون به مدت ده دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شده و مایع رویی که حاوی

پروتئین های ساختمانی محلول در آب بود، جـدا نمـوده و قبل از مصرف در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

مایع حاوی پروتئین در هنگام استفاده در حرارت C ۳۷° گرم شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن به هـر چـاه ژل پلـی آکریل آمید ۱۰٪ تزریق نموده و پس از رنگ آمیزی ژلها بـا آبی کوماسی، اوزان مولکولی باندهای حاصل از الکتروفـورز سویه های مورد مطالعه با اسـتفاده از منحنـی مربـوط بـه بانـدهای حاصـل از پـروتئین هـای اسـتاندارد مشـخص گردید.

چگالی باندهای پروتئینی و تعداد آنها برای هر یک از سویه های استاندارد و نمونه های جداشـده از بیمـاران بـا دستگاه دنسیتومتر مشـخص گردیـد. بـرای تخمـین اوزان مولکولی باندهای پروتئینی، با هر ژل یک مـارکر اسـتاندار ساخت شرکت سیگما از 29-205,KDa نیز استفاده گردید. الگوی الکتروفورزی پروتئینی (Protein-profiles) هریک از نمونه های سالمونلا جدا شده از بیماران و هچنین الگـوی پروتئینی سالمونلاهای استاندارد(رفرانس) با استفاده از روش دنسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفت و تعداد باندهای ماژور (بزرگ)ومینـور(کوچـک)هـر سـروتایپ سـالمونلا شـمارش گردید.

برای تایپینگ سویه ها معمولاً از تعداد باندهای ماژور و وزن مولکولی تقریبی هر یک از باندهای پروتئینـی آنهـا استفاده میگـردد. در ایـن مطالعـه نیـز بـرای تعیـین زیـر گروهای گونه های سالمونلاهای جدا شده از بیماران از این روش استفاده گردید.

اطلاعـات مـورد نیـاز بـر اسـاس اهـداف تحقیـق در پرسشـنامه درج و بـا نـرم افـزار EPI6 مـورد آنـالیز قـرار گرفت.

نتایج :

بیشترین نمونه های سروتایپ شده (۵۴/۷٪) از کشت خـون و سـپس از کشـت مـدفوع (۴۰٪) بدسـت آمـد و همچنین کمترین آنها از کشت های مایع نخاع و مایع پلور هر کدام ۰/۶٪ جدا گردید. در این مطالعه از یکصـد مـورد سالمونلا تیفوئیدی و غیرتیفوئیدی جداشده از بیمـاران در مجموع ۷۱٪ سالمونلای تیفوئیدی و ۲۹٪ نیز سـالمونلای غیرتیفوئیدی بدست آمد.

در بخـش تعیـین سـروگروپ نیـز از ۱۰۰ مـورد سالمونلای سروتایپ شـده، بیشـترین فراوانـی بـه ترتیـب مربوط به گروه D_1 با ۴۶ سروگروپ (۴۶٪) و سپس گـروه B با ۳۲ سروگروپ (۳۲٪) و گروه C_1-C_2 با ۱۶ سـروگروپ ۱۶٪ بـود و همچنـین کمتـرین سـروگروپ ۱٪ مربـوط بـــه گروه E بود. توزیع فراوانی سـروتایپ هـای بدسـت آمده بـه ترتیـب زیـر بـود : ۴۳ مـورد (۴۳٪) مربـوط بـه سالمونلا تیفی، ۲۰ مورد (۲۰٪) سـالمونلا تیفـی موریـوم، ۱۲مـــورد (۱۲٪) ســـالمونلا پـــاراتیفی B، ۱۰مـــورد (۱۰٪) سـالمونلا پـارا تیفـی C، و همچنـین سـالمونلا انتریتیدیس ۳ مورد (۳٪)، سالمونلا کلرا سوئیس و آریزونـا هرکدام ۲ مورد(۲٪) و سالمونلا های سـالمونلا پـارا تیفـی A، اینفـانتیس، هاوانـا، لگزینتـون و ویرشـو هرکـدام یـک سروتایپ (۱٪) . ۳ مورد (۳٪) نیز با آنتی سرمهای موجـود پاسخ نداده و بعنوان سروتایپهای ناشناخته در نظر گرفتـه شد.

نتـایج سـروتایپینگ نمونـه هـای تیفوئیـدی بـا نتایج الکتروفورز پروتئین های ساختمانی سـویه هـا مـورد مقایسـه قـرار گرفـت. پـس از الکتروفـورز پروتئینهـای سـاختمانی محلـول در آب بانـدهای پروتئینـی زیـادی از مولکولهـای بـزرگ بـیش از ۲۲۰ کیلـو دالتـون(KDa) تا مولکولهای کوچک کمتـر از ۱۸/۵کیلـو دالتـون بدسـت آمـد کـه بـه خـوبی باعـث تمـایز سـویه هـا از یکـدیگر گردید.

هـر یـک از گونـه هـای سـالمونلای رفـرانس شـامل سـالمونلا تیفـی، سـالمونلا پـاراتیفی A, سـالمونلا پـاراتیفی B و سـالمونلا پـاراتیفی C، هـر یـک الگـوی پروتئینی اختصاصی و منحصر بـه فـرد (Protein-profile) نشـان دادنـد. پـس از آنـالیز الگـوی پروتئینـی هـر یـک از نمونه های الکتروفورز شده توسط دسـتگاه دنسـیتومتر، تعـداد بانـدهای مـاژور و مینـور هـر سـروتایپ سـالمونلا بـه ترتیـب زیـر مشـخص گردیـد: سـالمونلا تیفـی ۲۰ باند مجزا، سـالمونلا پـاراتیفی A ۲۲بانـد مجـزا، سـالمونلا پـاراتیفی B و سـالمونلا پـاراتیفی C هـر کـدام ۱۸ بانـد مجـزا. همچنـین سـالمونلا تیفـی اسـتاندارد (رفـرانس) ۱۱باند پروتئینی ماژور، سـالمونلا پـاراتیفی A اسـتاندارد ۱۲بانـــد پروتئینـــی مـــاژور، ســـالمونلا پـــاراتیفی B و سـالمونلا پـاراتیفی C هرکـدام ۱۴ بانـد پروتئینـی مـاژور نشـــان دادنـــد. تعـــداد بانـــدهای مـــاژور ســـالمونلا تیفـــی اســـتاندارد (رفـــرانس) و ســـالمونلا پـــاراتیفی B استاندارد و محدوده وزن مولکولی آنهـا در جـداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

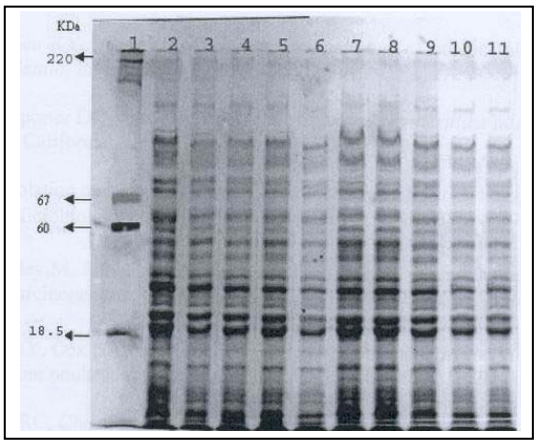
جدول ۱ : باندهای ماژور سالمونلا تیفی استاندارد و محدوده وزن مولکولی آنها

شماره باندهای ماژور	وزن مولکولی
۱	۱۵۰ Kda
۲	۸۰ Kda
۳	۶۷ Kda
۴	۶۰ Kda
۵	۵۵ Kda
۶	۴۹ Kda
۷	۴۵ Kda
۸	۴۳ Kda
۹	۳۳ Kda
۱۰	۱۸/۵ Kda
۱۱	۱۴ Kda

جدول ۲ : باندهای ماژور سالمونلا پاراتیفی B استاندارد و محدوده وزن مولکولی آنها

شماره باندهای ماژور	وزن مولکولی
۱	۹۴ Kda
۲	۸۰ Kda
۳	۷۰ Kda
۴	۶۰ Kda
۵	۵۵ Kda
۶	۴۹ Kda
۷	۴۵ Kda
۸	۴۳ Kda
۹	۳۳ Kda
۱۰	۲۸ Kda
۱۱	۲۴ Kda
۱۲	۱۸/۵ Kda
۱۳	۱۶ Kda
۱۴	۱۴ Kda

الگوی پروتئینی هریک از نمونه های سالمونلا جدا شده از بیماران با الگوی پروتئینی سالمونلا های استاندارد (رفرانس) مورد مقایسه قرار گرفت، و با استفاده از روش دنسیتومتری زیر گروهای هر گونه سالمونلا تعیین گردید و بر این اساس سالمونلا تیفی به ۵ زیرگروه، سالمونلا پارا تیفی B و C هرکدام به ۳ زیرگروه تقسیم شدند. الگوی الکتروفورزی پروتئینی هریک از نمونه های سالمونلا تیفی جدا شده از بیماران که با الگوی پروتئینی سالمونلا تیفی استاندارد مورد مقایسه قرار گرفته است، در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: مقایسه الگوی الکتروفورزی پروتئینی هریک از نمونه های سالمونلا تیفی جدا شده از بیماران با الگوی پروتئینی سالمونلا تیفی استاندارد. ستون۱ : استاندارد مارکر وزن مولکولی، ستون۲ : سالمونلا تیفی PTCC=1609 ، ستونهای ۱۱-۳ : نمونه های کلینیکی سالمونلا تیفی.

همچنین سویه های رفرانس سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی A, سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C اختلاف عمده ای با الگوی پروتئینی سویه های رفرانس انتروباکتریاسه از خود نشان دادند که موجب تمایز آنها از یکدیگر گردید، با اینحال یک باند پروتئینی مشترک در ناحیه ۴۳ کیلو دالتون بین الگوی پروتئینی سویه های رفرانس سالمونلا در مقایسه با الگوی پروتئینی سویه های رفرانس انتروباکتریاسه مشاهد گردید.

بحث:

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که توزیع فراوانی سالمونلاهای تیفوئیدی جداشده از بیماران شامل سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفیB و سالمونلا پاراتیفیC شایعتر از سالمونلاهای غیرتیفوئیدی مانند سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا آریزونا بود، در حالیکه در سایر مطالعات مشابه که در برخی کشورها صورت گرفته است، سالمونلاهای غیرتیفوئیدی شیوع بیشتری داشته است و شایعترین سروتایپ سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس بوده است (۲،۳،۴،۱۵).

در این مطالعه نشان داده شد که تخلیص پروتئینهای ساختمانی محلول در آب (Whole-Cell Proteins) میکروارگانیسم ها از جمله سالمونلاها با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفروزیس SDS-PAGE میتواند در تشخیص

و تایپینگ آنها کاربرد داشته باشد، همچنانکه این روش اختلاف و اشتراک ساختمان پروتئینی سویه های رفرانس سالمونلا با سویه های رفرانس انتروباکتریاسه را بخوبی مشخص نمود و موجب تعیین زیرگروه های سالمونلا گردید.

سالمونلاهای تیفوئیدی شامل سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی A, سالمونلا پاراتیفی B و سالمونلا پاراتیفی C ضمن اینکه الگوهای پروتئینی متفاوتی از یکدیگر نشان دادند، با اینحال دارای باندهای پروتئینی ماژور مشترکی در نواحی ۱۴، ۲۱، ۳۳، ۴۳، ۴۹ و ۵۵ کیلودالتون بودند.

نتیجه نهائی :

این روش در مقایسه با نتایج بدست آمده با روش سروتایپینگ، توانست گونه های سالمونلا را به زیر گونه نیز طبقه بندی نماید و اختلاف ساختمان پروتئینی آنها را با گونه های خانواده انتروباکتریاسه نشان دهد. اما با توجه به زمان و هزینه نسبتاً بالای تهیه پلی اکریل آمید ژل الکتروفروزیس SDS-PAGE به نظر نمی رسد از این روش بتوان در آزمایشهای روتین تشخیص طبی بهره برد، ضمن اینکه روش سروتایپینگ روشی ساده و سریع و کم هزینه است و در هر آزمایشگاهی با امکانات متوسط قابل انجام است. با این حال روش SDS-PAGE تکنیک قابل اطمینانی در تایپینگ و طبقه بندی میکروارگانیسم ها جدید و ناشناخته در مراکز تحقیقاتی بشمار میرود.

منابع :

1. Lesser C, Miller SI. Salmonellosis. In: Fauci F, Braunwald E, Isselbacher KJ, (eds). Harrisons principles of internal medicine.17th ed. Vol 2. New York: Mc Graw-Hill , 2001: 970-5.
2. Miller SI, Pegues DA. Salmonella species, including Salmonella typhi. In: Mandell GL, Bennet JE, Mandell RD, eds. Principles and practice of infectious disease. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 2000: 2344-62.
3. Wong SS, Yuen KY, Yam, WC. Changing epidemiology of human salmonellosis in Hong Kong. Epidemiol Infect. 1999; 113(3): 425-34
4. Passaro DJ, Reporter DJ, Mascola L. Epidemic Salmonella enteritidis infections in Los Angeless county, California. West J Med. 1996; 165(3): 126-30.
5. Bonnie ER. Isolation and identification of Salmonella from meat and egg products. In: Bennet JE, (ed). Microbiology laboratory guidebook. 3rd ed. USDA/FSIS, 1998: 122-49.
6. Singh H, Pandey M, Shukla VK. Salmonella carrier state, chronic bacterial infection and gallbladder carcinogenesis. Eur J Cancer Preven 1996; 5(2): 144-
7. Baily JS, Chiu JY, Cox NA, Johnston, RW. Improved selective procedure for detection of Salmonellae from poultry sausage products. J Food Prot 1998; 51: 391-6.
8. Lai CW, Chan RC, Cheng AF, Sung IY, Leung JM. Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis. Am J Gastroentrol. 1992; 87(9): 1198-9.
9. Holt JG , Krieg NR, Sneath PA , Staley JT , Williams ST. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 4th ed. New York: Williams & Wilkins, 1994;294-299.
10. Lantana CF, Taffur C, Benavenete L, Botuzzo E, Carrilio C. Detection of Salmonella typhi carriers in food handlers by Vi serology in Lima, Peru. Bull Pan Am Health-organ 1990; 24 (2): 177-82.
11. Taylor AJ, Costas M, Owen RJ. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of Bacteroides ureolyticus clinical isolates. J Clin Microbiol 1987; 25: 660-666.
12. Jackman PJH. Classification of Corynebacterium species from axillary skin by numerical analysis of electrophoresis protein patterns. J Med Microbiol. 1982. 15 : 485-488
13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Scchreckenberger PC, Winn-Jr WC. Color atlas and text book of diagnostic microbiology 5th ed. Philadelphia: Lippincott , 1997: 171-230.
14. Baron EJ , Peterson L.R, Finegold SM. Diagnostic microbiology. 9th ed. Baltimore: Mosby, 1994: 504-519.
15. Alonso JJ. Splenic Salmonella typhimurium abscess. Med Clin Bare 1993; 87(18) : 831-832