Archive of SID

تنوع توالی های تکرار شونده در ایزوله‌های سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس جداشده از نمونه های بالینی

میترا احمدی[۱]، رضا رنجبر[۲]*

۱-کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
۲- استاد باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران

***نشانی برای مکاتبه:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، تلفن: ۸۸۰۳۹۸۸۳-۰۲۱،
ranjbarre@gmail.com
دریافت مقاله: خرداد نود و چهار **پذیرش برای چاپ**: شهریور نود و چهار

چکیده

سابقه و هدف: *باکتری سالمونلا، یک پاتوژن روده ای و عامل شایع مسمومیت‌های غذایی در دنیای امروز است. در طی سال‌های اخیر، عفونت های ناشی از سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس به سرعت رو به افزایش است. توالی های تکرار شونده پُشتِ سرِ هَم ، الگوهایی از DNA هستند که در تمامی پروکاریوت‌ها وجود دارند. این توالی ها ممکن است از نظر تعداد واحدهای تکراری، در بین سویه‌های مختلف یک گونه، متفاوت باشند. بنابراین، اهداف مناسبی جهت تمایز ایزوله‌های مختلف یک گونه هستند. هدف از این مطالعه، تعیین تنوع دو توالی های تکرار شونده در ایزوله های سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس جدا شده از نمونه های بالینی در شهر تهران بود.*

روش کار: *در این مطالعه، تعداد ۲۰ ایزوله سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس جدا شده از بیماران، که با استفاده از تست های بیوشیمیایی معمول تأیید شدند، از نظر توالی های تکرار شونده بررسی شدند. با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، توالی های تکرار شونده تکثیر داده شد و پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، تعداد تکرارهای هر لوکوس ، تعیین شد.*

یافته ها: *نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در مورد توالی های تکرار شونده در باکتری سالمونلا اینفانتیس نشان داد که لوکوس SENTR3 دارای بیش ترین تنوع اللی و لوکوس SE4 دارای کم ترین تنوع اللی بود.*

نتیجه گیری: *با توجه به تنوع نسبتاً بالای لوکوس‌های مورد مطالعه، می‌توان از این لوکوس‌ها جهت ژنوتایپینگ و بررسی قرابت ژنتیکی ایزوله‌های مختلف سالمونلا اینفانتیس در مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: سالمونلا اینفانتیس، توالی های تکرار شونده، الل، واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه

باکتری *سالمونلا*، گروه بزرگی از باسیل های گرم منفی و یکی از اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه هستند. این باکتری، یک پاتوژن روده ای با توزیع گسترده در سراسر جهان است که در انسان و دام، بیماری زا است. سالمونلا، یکی از مهم ترین عوامل ایجاد مسمومیت‌های غذایی در انسان است(۱و۲). به لحاظ تنوع زیاد سرولوژی و بیوشیمیایی طبقه بندی سالمونلاها بسیار پیچیده است(۳و۴). بیش ترین سروتایپ های بیماری زای روده ای در انسان مربوط به سروتایپ های *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا اینفانتیس* و *سالمونلا اینتریتیدیس* است. در واقع، یکی از شایع‌ترین سروتایپ های سالمونلا های غیر تیفوئیدی، زیر گونه ی انتریکا سروار اینفانتیس است که معمولاً *سالمونلا اینفانتیس* نامیده می شود. این باکتری عمدتاً از طریق تماس مستقیم و غیر مستقیم با منابع آلودگی به انسان منتقل می شود(۵). بیماری های ناشی از *سالمونلا* شامل تب روده ای، سپتی سمی و گاستروانتریت است که هر یک می تواند باعث بروز نشانه های متعددی از مانند تب، سردرد، تورم طحال و کبد و اسهال و استفراغ در انسان گردد. با توجه به افزایش عفونت های ناشی از *سالمونلا* بویژه *سالمونلا اینفانتیس*، تشخیص به موقع و درست این باکتری در مواد غذایی به ویژه فرآورده های حیوانی و نیز افراد مشکوک به آلودگی ضروری می باشد(۸-۶).

www.SID.ir

Archive of SID

توالی های تکرار شونده (tandem repeats)، الگوی‌هایی از DNA هستند که به صورت تکرارهای پشت سرهم در ژنوم باکتری‌ها قرار دارند. آن‌ها ممکن است از نظر اندازه تکرار یا طول تکرار، متفاوت باشند. بنابراین، به آن‌ها اصطلاحاً VNTR (variable number of tandem repeats) نیز می‌گویند(۹و۱۰). هر گونه یا جنس باکتریایی، توالی های VNTR (تکرار شده) مخصوص به خود را دارند که متفاوت از سایر گونه ها یا جنس ها است. با توجه به این ویژگی و با تعیین تعداد تکرارهای موجود در نواحی VNTR خاص در ژنوم، می توان از آن جهت انگشت نگاری DNA در باکتری های پاتوژن استفاده کرد(۱۱و۱۲).

در ایران مطالعات بسیاری در زمینه بررسی عوامل آلوده کننده موادغذایی به خصوص گونه های *سالمونلا* با روش‌های مولکولی انجام گرفته است(۱۵-۱۳). اما تاکنون در مورد بررسی تنوع توالی های تکرار شونده در *سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس*، گزارشی در این راستا مشاهده نشده است. لذا در این پژوهش سویه های سالمونلا اینفانتیس را از نظر تنوع توالی های تکرار شونده و الل‌های غالب آن، بررسی شد تا اولاً درک صحیحی از میزان تنوع جمعیتی ایزوله‌های سالمونلا اینفانتیس داشته باشیم و ثانیاً بتوانیم در آینده، از این لوکوس‌ها جهت تمایز و بررسی قرابت ژنتیکی این ایزوله‌ها در منابع و مواد غذایی آلوده استفاده نماییم.

روش کار

طی یک مطالعه توصیفی – مقطعی افراد مبتلا به عفونت روده ای که مشکوک به عفونت با سالمونلا *انتریکا سروار اینفانتیس بودند* و به آزمایشگاه بقیه الله مراجعه کرده بودند انتخاب شدند بطوریکه تعداد ۲۰ ایزوله *سالمونلا اینفانتیس* از این بیماران جدا گردید. هر یک از این ایزوله ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی استاندارد تایید شدند.

طبق روش استاندارد، نمونه های مدفوع بیماران پس از نمونه گیری به محیط کشت سلینت F منتقل گردید و در نهایت به محیط های انتخابی مانند Salmonella-Shigella(SS) agar و XLD agar انتقال یافته و در مرحله بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس، کلنی های مشکوک به *سالمونلا* جداسازی و از نظر واکنش های بیوشیمیایی استاندارد مانند محیط TSI، محیط MRVP، اوره و غیره کشت داده شده و بررسی شدند(۱۸-۱۶).

پس از جداسازی ایزوله های باکتریایی با استفاده از روش جوشاندن، DNA باکتریایی استخراج گردید. به این صورت که مقداری کلونی از باکتری در آب دیونیزه بن ماری وارد شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد در دستگاه بن ماری جوشانده شد. و در نهایت پس از سانتیریفوژ، محلول رویی با استفاده از سمپلر جمع آوری شد و در یک میکروتیوب جدید جمع آوری گردید. در ضمن با استفاده از سمپلر در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، به ترتیب میزان جذب DNA، پروتئین ها، و تعیین میزان خلوص DNA انجام پذیرفت و ژنوم های استخراج شده تا فرارسیدن زمان مصرف، در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

طبق بررسی به عمل آمده و مرور مطالعات انجام شده قبلی توسط محققین هاپکینز و همکاران، جفت پرایمر مناسب طبق جدول ۱، انتخاب و جهت تهیه به شرکت پیشگام(Pishgam co.,Iran) سفارش داده شد(۱۹و۲۰). واکنش زنجیره پلیمراز برای هر جایگاه VNTR، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر توسط دستگاه ترموسایکلر صورت گرفت. ترکیبات و مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش در جدول ۲، و برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر جایگاه های (لوکوس های) VNTR در جدول ۳ ارائه شده است (۲۱) .

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱: نام لوکوس، و پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر هر لوکوس VNTR.

لوکوس VNTR	پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال
SENTR 3	Forward	5’-CTA AAC AAG CCG CTC ATC CG	۵۸
	Reverse	5’-ACA ACC TGC TGC TGT GCT G	
SE-4	Forward	5’-ACT TTA GAA AAT GCG TTG AC	۵۸
	Reverse	5’-AAG TCA ACT GCT CTA CCA AC	

جدول۲: مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش‌های PCR برای تکثیر لوکوس های VNTR.

اجزای واکنش	غلظت	حجم(میکرو لیتر)
DNA Templete	-	۳
مستر میکس Ampliqon واجد Taq DNA polymerase به همراه بافر، dNTP وکلرید منیزیم	1X	۱۰
Primer (msF)	۲۰ pmol	۱
Primer (msR)		۱
آب مقطر دوبار تقطیر	-	۵
مجموع	-	۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

گسترش انتهایی	۳۵ دور			واسرشت اولیه
	گسترش	اتصال	واسرشت	
۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه	۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه	۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه	۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه

جدول۳: برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر لوکوس‌های VNTR

برای بررسی و مشاهده باندهای حاصل از محصولات PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام شد. مولکول‌های DNA به دلیل داشتن بار منفی هنگامی که در میدان الکتریکی قرار می‌گیرند، به سمت قطب مثبت حرکت می‌نمایند. همچنین برای تشخیص سریع و آسان تر اندازه محصولات PCR، در چاهک اول، مارکر اختصاصی 100 bp Ladder را اضافه می‌کنیم. سپس الکتروفورز با اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت در مدت یک ساعت با دستگاه الکتروفورز شرکت Bio Rad انجام گرفت.

پس از اتمام الکتروفورز، ژل را از تانک خارج کرده و برای رنگ آمیزی، ژل را در محلول اتیدیوم برماید به مدت ۱۵دقیقه قرار داده و سپس ژل را به مدت ۱۵ دقیقه در آب مقطر قرار دادیم و در نهایت، با استفاده از دستگاه Gel documentation، عمل عکس برداری از ژل و سپس ذخیره اطلاعات در فایل و دیسکت مورد نظر انجام گرفت.

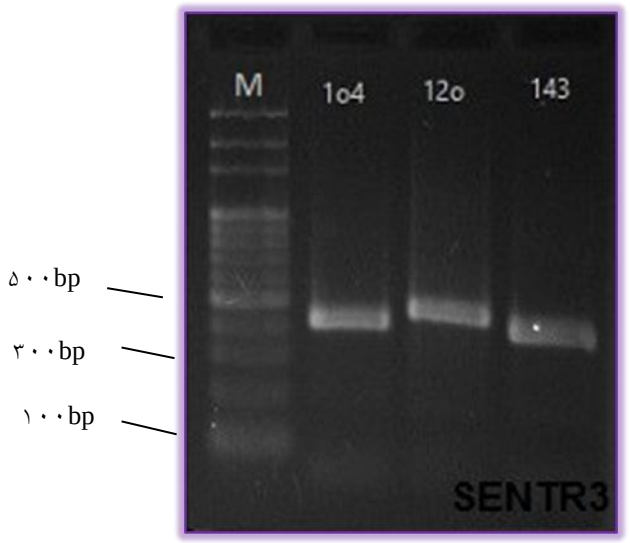
تعداد تکرار در هر لوکوس VNTR را می‌توان به راحتی پس از انجام PCR و تفکیک محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز، به دست آورد. اگر اندازه محصول PCR را از مجموع مناطق دربرگیرنده چپ و راست کم نماییم و عدد حاصل را بر اندازه تکرار (که از قبل، توسط مقاله یا پروتوکل استاندارد در اختیار ما قرار داده شده است) تقسیم کنیم، تعداد تکرار در هر لوکوس تعیین می‌گردد. به علاوه، برای محاسبه دقیق اندازه محصولات PCR بهتر است حداقل از دو یا سه ستون سایز مارکر استفاده شود(۲۲) .

یافته ها

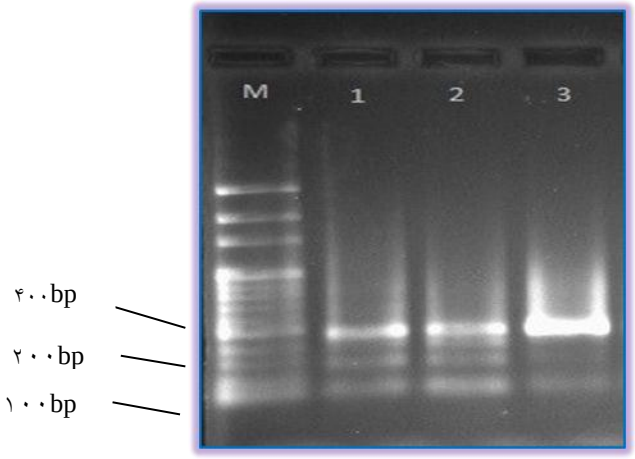
نتایج حاصل از انجام الکتروفورز در ۲ لوکوس SENTR3 و SE4 نشان داد که در لوکوس SENTR3، ۳ نوع الل، آن هم به صورت تکرارهایی به ارقام ۴، ۵ و ۶ در ایزوله‌های سالمونلا اینفانتیس وجود دارد. لوکوس SE4 نیز دارای ۲ نوع الل به صورت تعداد تکرارهایی به ارقام برابر با ۳ و ۳/۵ موجود می باشد . در شکل‌های ۱ و ۲، محصولات مختلف VNTR حاصل از PCR، مربوط به لوکوس‌های SENTR3 و SE4 نشان داده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ : در این ژل، تنوع محصولات مختلف VNTR مربوط به لوکوسSENTR3 می باشد. اعداد بالای محصولات لوکوس های VNTR، بیانگر شماره ایزوله *سالمونلا اینفانتیس* می باشد. در ستون M، از مارکر bp Ladder ۱۰۰ استفاده شده است.



شکل ۲ : در این ژل، تنوع محصولات مختلف VNTR مربوط به لوکوس SE4 می باشد. اعداد بالای محصولات لوکوس های VNTR، بیانگر شماره ایزوله *سالمونلا اینفانتیس* می باشد. در ستون M، از مارکر bp Ladder ۱۰۰ استفاده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

باکتری *سالمونلا* یک پاتوژن روده‌ای و یکی از مهم‌ترین عوامل باکتریایی منتقله از راه مواد غذایی محسوب می‌گردد که اخیراً منجر به نگرانی‌هایی در سطح بهداشت عمومی شده است. سالمونلاهای غیر تیفوئیدی زیرگونه‌ی انتریکا سروار اینفانتیس اخیراً به عنوان یکی از شایع ترین عوامل ایجاد عفونت بویژه مسمومیت‌های غذایی در انسان مطرح شده است(۱،۵). شناسایی و تمایز پاتوژن‌ها در مواد غذایی، در اپیدمیولوژی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. استفاده از توالی‌های VNTR جهت تمایز و افتراق سویه‌های مختلف یک گونه‌ی باکتریایی، یکی از روش‌های نوین مولکولی در علم میکروب‌شناسی است. در همین رابطه، مطالعات گوناگونی در ارتباط با تنوع الل های VNTR در سویه های مختلف *سالمونلا* انجام گرفته است که در ادامه به چند مطالعه اشاره می شود.

Karolina Dimovski و همکاران در سال ۲۰۱۴، از لوکوس‌های VNTR جهت تمایز و افتراق ایزوله‌های *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی‌موریوم استفاده کردند(۲۳) .

Van Cu و همکاران، در سال ۲۰۱۰ در کامبوج ، در مطالعه‌ی خود به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در بین ۲۰۶ گونه *سالمونلا انتریکا*، از تکرارهای VNTR به عنوان نشانگر انتخابی استفاده نمودند(۲۴). Katle Hopkins و همکاران در سال ۲۰۱۱ در انگلستان، ۲۹۸ جدایه‌ی *سالمونلا انتریتیدیس* را از نظر لوکوس‌های SE3، SENTR4، SENTR5، SENTR6 و SENTR7 مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها تنوع نسبتاً بالایی را در لوکوس‌های مزبور مشاهده نمودند(۲۰).

قادری و همکاران در سال ۲۰۱۳، ساختار ژنتیک جمعیتی سویه‌های ایرانی *سالمونلا انتریتیدیس* را با استفاده از لوکوس‌های VNTR، تعیین کردند. هدف آن‌ها، افزایش اطلاعات در زمینه‌ی ساختار ژنتیکی جمعیت و توالی های تکراری *سالمونلا انتریتیدیس* بود(۱۵) .

Eva Litrup و همکاران در سال ۲۰۱۰ در دانمارک، از توالی های تکراری برای تایپینگ ۱۰۲ جدایه‌ی *سالمونلا تیفی‌موریوم* فاژتایپ DT41 جدا شده از جوجه به کار بردند و نتایج بیماران دانمارکی را با سویه های متفاوت بررسی شده در آلمان و انگلستان مقایسه کردند. به کمک دقت بالای این روش، توانستند ثابت کنند که انتقال از جوجه‌های دانمارکی به انسان رخ نمی‌دهد(۲۵) .

K. H. Dyet و همکاران در سال ۲۰۱۰ در نیوزلند، توالی های تکرار شده را برای تمایز قایل شدن بین انواع *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی‌موریوم که باعث شیوع بیماری می‌شوند، به کار بردند. در این مطالعه، چهار فاژتایپ دردسرساز در نیوزلند، تعیین خصوصیت شدند(۲۶) .

گزارش‌های محققین چه در ایران و چه در جهان که بر روی عفونت‌های انسانی ناشی از *سالمونلا* انجام گرفته است، نشان می دهد در دنیا بیشتر مطالعات بر روی سالمونلا انتریکا سروار انتریتیدیس صورت گرفته است و گزارشات اندکی از سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس در دسترس می باشد.

در این پژوهش، ۲۰ ایزوله *سالمونلا اینفانتیس* جدا شده از نمونه های بالینی در طی یک دوره ۱ ساله (از مهر ماه سال ۹۲ تا مهر ماه سال ۹۳) از نظر تنوع جایگاه های VNTR مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه از ۲ لوکوس VNTR به نام SENTR3 و SE4 که بر اساس مطالعات حاضر انتخاب شده بودند، استفاده گردید.

با توجه به نتایج حاضر در این مطالعه، لوکوس SENTR3 با داشتن ۳ الل متفاوت، بیشترین تعداد الل و لوکوس SE4 با داشتن ۲ الل متفاوت، کم ترین تعداد الل را به خود اختصاص داده است. نتیجه این مطالعه نشان داد که ایزوله های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله دارای تنوع نسبتاً بالایی از توالی های تکرار شونده هستند. این مسأله نشان می‌دهد که ایزوله‌های جدا شده از شهر تهران، از چند کلون (منشأ اجدادی) مختلف، نشأت گرفته‌اند. با این حال، برای ارزیابی صحیح‌تر و بهتر جمعیت ایزوله‌های *سالمونلا اینفانتیس* نیاز به بررسی لوکوس‌های VNTR بیشتری می‌باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تنوع لوکوس‌های VNTR در ایزوله‌های *سالمونلا اینفانتیس* در کشورمان انجام نگرفته است، در این پژوهش، سعی بر آن شد که تنوع لوکوس‌های فوق در جمعیت ایزوله‌های بومی، مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که از لوکوس‌های VNTR استفاده شده، به خوبی می‌توان جهت تمایز و افتراق ایزوله‌های *سالمونلا اینفانتیس* در نمونه‌های بالینی و بررسی های اپیدمیولوژیکی استفاده کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان می باشد. بدینوسیله از همکاری و مساعدت همکاران شاغل در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی و مولکولی بیمارستان بقیه الله (عج) و همچنین جناب دکتر مجتبی معماریانی که در تحقق این پژوهش یاری نموده اند کمال تشکر را داشته و سپاسگزاری می نماییم.

REFERENCES

1. Ranjbar R, Torabi R, Mirzaie A. Molecular typing of Salmonella enteritidis strains isolated in several laboratory centers in Tehran by ERIC-PCR. Sci J Kurdistan Univ Med Sci. 2013;18(2): 77-85. [In Persian]
2. Tavakkoli HR. Food microbiology and health control of food supply and distribution centres. Tehran: Marze Danesh; 2008.[Persian]
3. Lopez FE, Mercedes Pescaretti ML, Morero R, Delgado MA. Salmonella typhimurium general virulence factors: Abattle of David against Goliath? Food Res Int. 2011;8(9):4-8.
4. Hendriksen SW, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van Duijkeren E. Animal-to-human transmission of Salmonella typhimurium DT104A variant. Emerg Infect Dis. 2004;10(12):2225-7.
5. Ranjbar R, Giammanco G, Aleo A, Plano M, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum β lactamase–producing non typhoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(1):91-5.
6. Abhyankar A. Salmonellosis and its laboratory diagnosis[online].(cited 2002). Available from: URL:http/ / bacteriology.Htrn. www.Geoities.Com/ avinash abhyankar
7. Watson PM, Paulin AP. Characterization of intestinal invasion by salmonella typhimurium and salmonella dublin and effect of a mutation in the invH gene. Infect Immun 1995; 63: 2743-54.
8. Bell c, Kyriakides A. Salmonella, a practical approach to the organism and its control in food. Blackwell Science. 2000.p.1-25.
9. Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol. 2008;46(8):2692–9.
10. Moller A, Brinkmann B. PCR-VNTRs (PCR-Variable Number of Tandem Repeats) in forensic science. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1995; 41(5):715-24.
11. Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Mol Biol Evol.1987; 4(3):203-21
12. Bruford, MW, Hanotte, O, Brookfield, JFY, Burke, T Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, AR eds. (1992) Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. IRL Press, Oxfordpp. 1
13. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron mediated resistance among clinical isolates of Salmonella enterica strains. Jpn J Infect Dis. 2010;63(6):417-21.
14. Ranjbar R, Giammanco G, Aleo A, Plano M, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum β lactamase–producing non typhoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(1):91-5.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Ghaderi R, Tadayon K, Avagyan S. 2013. The population structure of Salmonella enterica Enteritidis in Iran analyzed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. Trop Anim Heatlth, 45: 889-894.
16. Murray, P.R.et al; Manual of Clinical Microbiology, ASM, 8th edition, 2003
17. Connie, R.mahon; Textbook of Diagnostic Microbiology, 3th edition, 2007
18. Koneman, E.W.et al; Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott, 6th edition, 2006
19. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J, Bartkus. 2007. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype enteritidis. Journal of Clinical Microbiology, 45: 536-538.
20. Hopkins KL, Peters TM, Pinna E, Wain J. 2011. Standarisation of Multilocus variable- number tandem repeat analysis (MLVA) for subtyping of Salmonella enterica serovar enteritidis. Europe's Journal on Infectious Disease Epidemiology, Prevention and Control, 16: 1 – 11.
21. Hoorfar P, Radstro M. Automated nuclease PCR assay for identification of Salmonella enterica. J Cli Microbiology 2000: 3429–35.
22. Beranek A. 2009. International Journal of medical Microbiology, 299: 43 – 55.
23. Dimovski K, Cao H, Wijburg O, Strungell R, Mantena R, Whipp M, Hogg G, Holt K. 2014. Analysis of Salmonella enterica serovar typhimurium variable-number tandem-repeat data for public health sequence investigation based on measured mutation rates and whole-genome comparisons. Journal of Bacteriology, 196(16): 3036 – 3042.
24. Van Cuyck, H., Farbos-Granger, A., Leroy, P., Yith, V., Guillard, B., Sarthou,J.L.,Koeck, J.L., Kruy, S.L., 2011. MLVA polymorphism of Salmonella enterica subspecies isolated from humans, animals and food in Cambodia. BMC Research Notes 4, 306–404.
25. Litrup E, Christensen H, Nordentoft S, Nielsen E.M, Davies R.H, Helmuth R, Bisgaard M. 2010. Use of multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA) typing to characterize Salmonella Typhimurium DT41 broiler breeder infections. Journal of Applied Microbiology, 2032 – 2037.
26. Dyet K. H. Turbitt E, carter P.E. 2011. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for discriminating within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive types and investigation of outbreaks. Epidemiology and Infection, 139: 1050 – 1059.

www.SID.ir