استفاده از ژن های خانه دار جهت غربالگری مولکولی سالمونلا انتریکا سروتیپ انتریتیدیس

فائقه صرفی[۱]، رضا رنجبر[۲]* ، ناصر هرزندی[۳]

۱-کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲-دانشیار باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهران
۳-استاد یار، گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

* **نشانی برای مکاتبه:** مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تهران، تلفن: ۸۸۰۳۹۸۸۳، ranjbarre@gmail.com
دریافت مقاله: اردیبهشت نود و سه پذیرش برای چاپ: تیر نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *سالمونلوزیس به عنوان مشکل سلامت عمومی در جهان مطرح است. سالمونلا انتریکا سروار انتریتیدیس رایج ترین سروتیپ سالمونلای عفونی کننده در جهان است. هدف از این مطالعه استفاده از ژن های خانه دار به منظور غربال گری و تشخیص مولکولی سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس بود.*

روش کار: *در این مطالعه ۶۸ ایزوله سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس جدا شده از بیماران بررسی شد. شناسایی سویه های سالمونلا با استفاده از روش های استاندارد میکروبیولوژی و اسلاید آگلوتیناسیون با آنتی سرم های مونو و پلی والان انجام شد. سپس با انجام روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از ژن های thrA، sucA جهت تشخیص سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس استفاده گردید. سویه های باکتریایی کنترل شامل باکتری های اشریشیا کلی و شیگلا بود.*

یافته ها: *ژن های خانه دار با اندازه محصول ۸۹۴ جفت باز برای ژن thrA و ۶۴۳ جفت باز برای ژن sucA در تمام نمونه های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس وجود دارند. با توجه به نبود واکنش مثبت این ژن ها با باکتری های کنترل، کارآمدی تشخیصی این ژن ها اثبات گردید.*

نتیجه گیری: *ژن های خانه دار مورد استفاده در این مطالعه به منظور غربال گری و تشخیص سویه های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس مناسب و سودمند هستند.*

واژگان کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، ژن های خانه دار، thrA و sucA

مقدمه

گونه های *سالمونلا* از مهم ترین آلوده کننده ها ی مواد غذایی در انسان محسوب می شوند(۳-۱). سالانه شاهد ۱۶ میلیون مورد تب تیفوئید، ۱/۳ بیلیون گاستروانتریت و ۳ میلیون مرگ در جهان به دلیل عفونت با سالمونلا هستیم. سالمونلا باکتری میله ای گرم منفی بی هوازی اختیاری است که تقریباً ۲-۳ و ۰/۴-۰/۶ میکرو متر اندازه دارد(۴و۵). نود و پنج درصد سالمونلوزیس انسانی در ارتباط با مصرف محصولات آلوده ای مانند گوشت، ماکیان، تخم مرغ، شیر و غذاهای دریایی می باشد(۶). در جنس سالمونلا بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ وجود دارد که بسیاری از این سروتایپ ها پاتوژن های مهمی برای انسان ها و حیوانات محسوب می شوند(۷). *سالمونلا انتریکا* سروار انتریتیدیس رایج ترین سروتایپ سالمونلای آلوده کننده انسان در جهان است(۸). سالمونلوزیس ناشی از *سالمونلا انتریتیدیس* در انسان با اسهال، تب، سردرد، دردهای شکمی، تهوع و استفراغ مشخص می گردد(۹). برای نظارت اپیدمیولوژیک و کنترل شیوع بیماری های منتقله از طریق غذا و تعیین منابع آلودگی نیازمند روش های سریع تشخیص و شناسایی هستیم(۱۰).

در حال حاضر به منظور جستجو و تشخیص باکتری ها از دو روش سنتی و مدرن استفاده می کنند. روش های سنتی به تست های افتراقی و تکمیلی نیازمندند و به همین دلیل زمان بر هستند و به رغم اینکه هزینه کمی را در بر می گیرند ولی در مقایسه با روش های مدرن دارای معایب و محدودیت هایی هستند. اساس روش های سنتی کشت باکتری در محیط های مختلف و تولید کلنی ها و رویت آن ها در محیط جامد انتخابی و پس از آن انجام تست های بیوشیمیایی در محیط های مایع است. اخیراً با توسعه روش های مولکولی، شناسایی میکروارگانیسم ها با سرعت و دقت زیادی انجام می شود. میزان بسیار اندک باکتری ها، جستجوی باکتری را با مشکل مواجه می نماید. تکنیک هایی که اخیراً برای تکثیر توالی های DNA در آزمایشگاه توسعه یافته اند، از جمله PCR، اجازه جستجوی DNA هدف در مقادیر بسیار پایین در نمونه های مختلف را می دهد. بنابراین شناسایی عوامل عفونی توسط روش PCR روشی سریع و کارآمد

است(۱۱و۱۲). ژن های خانه دار ژن های ضروری برای حفظ و بقاء سلول می باشند و ژن های thrA (aspartokinase+homoserine dehydrogenase) dehydrogenase) sucA(alpha ketoglutarate مسئول سنتز پروتئین های اساسی در سالمونلا می باشند(۱۳).

هدف از این مطالعه استفاده از ژن های خانه دار به تشخیص مولکولی سروتایپ *سالمونلا انتریتیدیس* می باشد.

روش کار

در این مطالعه از ۶۸ سویه *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از نمونه های بالینی شامل: خون، مدفوع و ادرار بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا و با علائم گوارشی، از مرکز طبی کودکان، بیمارستان بقیه الله و برخی آزمایشگاه های سطح تهران، استفاده گردید. نمونه های مدفوع، بعدازنمونه گیری بلافاصله به محیط کشت سلنیت F منتقل گردید و ۶ ساعت درآن نگه داری شد و پس از ۱۲-۸ ساعت در محیط های کشت انتخابی XLD و SSagar کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری شد. نمونه های خون در محیط های دی فازیک کشت و پس از آن به محیط های انتخابی منتقل گردید. ۲۴ ساعت بعد، کلنی های مشکوک به *سالمونلا* جدا و با استفاده از تست ها ی بیوشیمیایی و محیط های افتراقی مانند TSI، MRVP، اوره، لیزین آیرون آگار و سیمون سبترات تأیید شد. آزمون سروتایپینگ به منظور تعیین آنتی ژن Vi، H، O با آنتی سرم مربوطه انجام گردید. در صورت مشاهده آگلوتیناسیون پس از ۱ تا ۲ دقیقه واکنش مثبت گزارش می شد.

بعد از جداسازی و تعیین هویت ایزوله های باکتریایی، سویه های مربوط به سروتایپ انتریتیدیس در محیط های BHI، LB براث کشت داده شدند و با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج DNA ژنومیک طبق استاندارد انجام شد. سلول های باکتریایی در معرض EDTA و SDS ۵ درصد و آنزیم پروتئیناز K قرار داده شد و عمل استخراج با استفاده از فنل- کلروفرم و ایزو آمیل الکل انجام شد و DNA توسط سدیم استات و اتانل رسوب داده شد. سپس DNA با اتانل ۷۰ درصد شستشو و در دمای اتاق خشک شده و در نهایت DNA در بافر TE حل گردید(۱۴). بر روی این سویه ها واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن های خانه دار thr A و suc A بر مبنای نتایج آنالیز آنها توسط نرم افزار BLAST در پایگاه ژنی NCBI، استفاده گردید که در جدول ۱ خصوصیات ترادف هر یک از پرایمرها ذکر گردیده است. به منظور بهینه سازی مواد مورد نیاز واکنشPCR توسط دستگاه ترموسایکلر و سیکل های حرارتی تعیین شده و شرایط مناسب انجام شد.

PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر حاوی ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز، بافر PCR(X)۱و ۰/۱ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse و ۲۰۰ میکرولیتر dNTPs انجام شد. برنامهPCR در ۳۰ سیکل شامل مراحل واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی به مدت ۲ دقیقه در ۷۵ درجه انجام شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR، با ۱ میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط شد و در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز انجام شد و رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

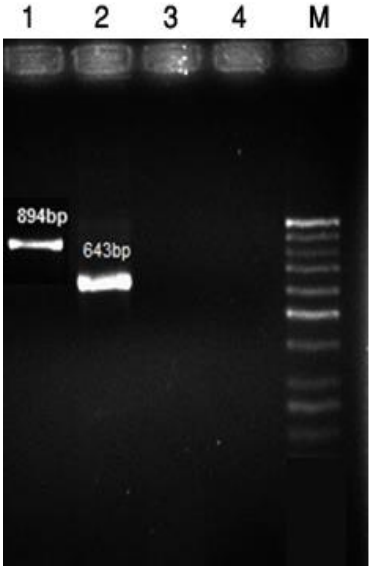
جدول۱: توالی پرایمرهای ژنهای مورد استفاده در این مطالعه

محصول PCR	توالی پرایمرها	نام پرایمر
۸۲۵ جفت باز	5’-ATC CCG GCC GAT CAC ATG AT-3’	Thr: sF
	5’-CTC CAG CAG CCC CTC TTT CAG-3’	Thr: sR
۶۴۳ جفت باز	5’-AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3’	Suc:sF
	5’-GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3’	Suc: sR

یافته ها

در مجموع پس از کشت اولیه ۶۵۰ نمونه مدفوع از بیماران اسهالی مراجعه کننده به چند بیمارستان در تهران، موفق به جداسازی ۶۸ سویه سالمونلا شدیم. از مجموع ۶۸ نمونه سالمونلا انتریتیدیس تایید شده، ۳۰ مورد(۴۴ درصد) مربوط به مردان ۲۴ مورد (۳۵ درصد) مربوط به زنان بود. بیش تر نمونه ها (۸۷ درصد) نمونه های مدفوعی و مابقی آن ها نمونه های خون و ادرار بود. ۶۸ مورد آن مربوط به سروتایپ انتریتیدیس بود. نتایج حاصل از تکثیر ژنوم ،نشان داد که ژن های خانه دار با اندازه محصول ۸۹۴ جفت باز برای ژن thrA و ۶۴۳ جفت باز برای ژن sucA در تمام نمونه های *سالمونلا انتریکا* سروتایپ انتریتیدیس وجود دارند که موجب شناسایی اختصاصی *سالمونلا انتریتیدیس* می گردند.

به منظور نشان دادن میزان اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، تمام پرایمرها با ژنوم دو جنس از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، شامل *اشریشیا کلی* و *شیگلا* آزمایش شد و هیچ گونه باندی مشاهده نشد و مشخص گردید که این پرایمرها اختصاصی هستند. شکل ۱ نتایج تکثیر PCR را با استفاده از ۲ ژن هدف در برخی نمونه های سالمونلا انتریتیدیس و کنترل نشان می دهد.



شکل۱: ردیف های ۱ تا ۴ به ترتیب نتایج PCR ژن thrA و sucA باکتری سالمونلا انتریتیدیس، ردیف ۳ باکتری اشریشیاکلی، ردیف ۴ باکتری شیگلا می باشد. ردیف M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی

بحث

سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سروار انتریتیدیس به عنوان یکی از سروتایپ های رایج که منجر به انتروکولیت می شود در جهان مطرح است(۱۵). سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس طی سه دهه اخیر ظهور یافت. به طور متداول دومین سروتایپ رایج در ایالات متحده آمریکا است. هم چنین سالمونلا انتریتیدیس رایج ترین سروتیپ در اروپا و دیگر نقاط جهان است.

در این مطالعه تمرکز اصلی مان بر روی ژن های خانه دار بوده که این انتخاب به دلایل زیادی بود از جمله این که، این ژن ها کلاسی از ژن ها را در بر می گیرند که دارای بیان بالا، بسیار محافظت شده و کد کننده پروتئین های اساسی هستند. این ژن ها بسیار آهسته تر از ژن های مخصوص کد کننده پروتئین ها تکامل می یابند اما نسبت به ژن های rRNA سریع تر دست خوش تغییر می شوند، بنابراین اغلب برای ساخت درخت های ژنی با تاکسون های بسیار نزدیک، از این ژن ها استفاده می کنند(۱۶).

بعنوان مثال ویلیام تورپین و هم کاران در سال ۲۰۰۷ از مجموع ۱۵۴نمونه از خانواده لاکتوباسیل مورد مطالعه و با استفاده از تکنیک PCR به شناسایی ۱۴ ژن Housekeeping پرداختند ونشان دادند که ژن های Housekeeping (ef-Tu, eno, gap, groEI, srtA)در تمام باکتری های اسید لاکتیک، ژن های (apf, cnb, fpbA, mapA, mub)در ۸۶٪ تا ۱۰۰٪ باکتری های اسید لاکتیک و ژن های (cbsA, gtf, msa, slpA)در ۰ تا ۸٪ آن ها وجود داشتند. پس نتیجه گرفتند ژن های housekeeping می توانند برای غربال گری و شناسایی خانواده لاکتوباسیل استفاده شوند(۱۷).

ورتز و هم کاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از توالی های DNA از ژنوم های ۳۸ سویه شامل E.coli MGI1655 وVibrio cholera بیوتیپ التور،از ۵ ژن خانه دار(gapA, groEL, gyrA, ompA, pgi) و ژن s rRNA۱۶ برای دریافتن درختان ژنی جداگانه و پیوسته برای پی بردن به یک فیلوژنی مولکولی مرکب برای گونه ها استفاده نمودند(۱۸).

در خصوص اهداف تشخیصی جهت سالمونلا مطالعات زیادی انجام شده است. رودولفو و هم کاران در سال ۲۰۱۲با بهره گیری از روش PCR در ۳۳۰ نفر از افراد مبتلا به اسهال حاد به تشخیص مولکولی سالمونلا پرداختند. در این مطالعه، از ژن های invA، sefA و fliC به ترتیب برای تشخیص جنس سالمونلا، سروتایپ های انتریتیدیس و اینفنتیس استفاده شد. نتایج به دست آمده بیان گر این بود که استفاده از تکنیک PCR در تشخیص گونه های سالمونلا از اختصاصیت بالایی برخوردار است(۱۹).

Chaudhry و هم کاران با بهره گیری از تکثیر ژن فلاژلین به تشخیص مولکولی یکی از سروتایپ های شایع سالمونلا و استاندارد سازی در تشخیص آن پرداختند(۲۰). Chiu و هم کاران با بهره گیری از تکثیر ژن های حدت SpvC و invA به تشخیص مولکولی سریع سروتایپ های سالمونلا اقدام نمودند(۲۱) و در سال ۲۰۰۳ نیز Pathmanathan ژن hilA را جهت تشخیص مولکولی سالمونلا هدف قراردادند(۲۲).

Hong و هم کاران در سال ۲۰۰۸ به آنالیز ژن های سازنده آنتی ژن O و ژن های نواحی متغیر فلاژلین H1 و H2 سالمونلا با روش Multiplex PCR پرداختند. نتایج آن ها نشان داد که روش Multiplex PCR به منظور شناسایی الل های ژنی آنتی ژن های O و H روشی کارآمد و سریعی است که می تواند جای گزین روش های سروتایپینگ جهت شناسایی سرووارهای سالمونلا انتریکا از جمله سالمونلا انتریتیدیس گردد(۲۳).

Tall و هم کاران در سال ۲۰۱۳ نشا ن داده شد که ترکیب روش q-PCRو سکانس دو ژن housekeeping شامل pyrH و toxR موجب شناسایی دو جمعیت غالب ویبریو بیماری زای ارگانیسم های دریایی یکی در ۳۷ درجه سانتی گراد و دیگری در ۲۲ درجه سانتی گراد گردید(۲۴).
از تکنیک های پیشرفته تر از جمله Real time-PCR نیز جهت تشخیص مولکولی سالمونلا بکرات استفاده شده است. بعنوان مثال، در بررسی که بر روی ۱۰۰ نمونه جدا شده از گوشت و تخم مرغ با استفاده از این تکنیک و روش های سنتی انجام گرفت انواع مختلفی از سروتایپ های سالمونلا ها از جمله سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا اینفنتیس، سالمونلا هادار، سالمونلا لیوینگستون و سالمونلا تیفی شناسایی شدند که نتایج بدست آمده بیان گر این بودکه استفاده از تکنیک PCR در تشخیص سروتایپ های سالمونلا با سرعت و دقت لازم بسیار امیدوار کننده است(۲۵).
همان طور که در بالا اشاره شد، مطالعات مختلفی با استفاده از ژن های ساختاری و یا ویرولانس با هدف تشخیصی صورت گرفته است اما در این مطالعه برای اولین بار از ژن های خانه دار سالمونلا انتریتیدیس برای تشخیص و شناسایی آن استفاده شده است.

نتایج حاکی از حضور ژن های خانه دار در تمامی ایزوله های سالمونلا انتریتیدیس بود که قادر به شناسایی اختصاصی آن هستند. در این مطالعه به منظور تعیین اختصاصیت ژن ها از باکتری های روده ای شامل شیگلا و اشریشیا کلی استفاده گردید و هیچ گونه واکنش مثبت و متقاطعی مشاهده نشد و باند هدف در این باکتری ها و نمونه کنترل منفی تکثیر نشد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که ژن های مورد استفاده در این مطالعه دارای توالی مناسبی به منظور شناسایی و تمایز سویه های سالمونلا انتریکا سروتایپ انتریتیدیس می باشند و در آینده با هدف غربال گری سروتایپ های سالمونلا می توان از این ژن ها در آزمایشگاه مولکولی بهره جست.

تشکر و قدر دانی
از هم کاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) به خصوص سرکار خانم پورعلی که در طول انجام این تحقیق حمایت و پشتیبانی فراوانی را مبذول داشتند کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

1.Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad S, Owlia P, Aleo A, Mammina C. Serotypes, antibiotic resistance, and class 1 integrons in Salmonella isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2011; 8(4):547-53.

2.Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, et al. High prevalence of integrin mediated resistance in clinical isolates of salmonella enterica. Jpn J Infect Dis 2010;63(6):417-21.

3.Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Zaeimi Yazdi J, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. Pak J Biol Sci. 2007;10(7):1138-40.

4. Thorns CJ.Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, United Kingdom. Bacterial food-borne zoonoses.Rev Sci Tech. 2000 Apr;19(1):226-39.

5. Ranjbar R, Sarshar M, Sadeghifard N. Characterization of Genetic Diversity among Clinical Strains of Salmonella entericaSerovarInfantis by Ribotyping Method. J ZanjanUnive Med Sci; ; Oct 2012 ; 20(81): 75-84. [In Persian].

6. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci. 2008 Apr;86(14 Suppl):E173-87.

7. Ranjbar R, Mirzaee A. Determining of the variety of Genotypes in Salmonella Typhimurium by ERIC-PCR. J BabolUnive Med Sci; 15(1); Jan 2013; PP: 51-57.

8. De Lappe N, Doran G, O'Connor J, O'Hare C, Cormican M. Characterization of bacteriophages used in the Salmonella entericaserovarEnteritidisphage-typing scheme. J Med Microbiol. 2009 Jan;58(Pt 1):86-93.

9. Shah DH, Zhou X, Addwebi T, Davis MA, Orfe L, Call DR, Guard J, Besser TE. Cellinvasion of poultry-associatedSalmonellaentericaserovarEnteritidisisolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. Microbiology. 2011 May;157(Pt 5):1428-45.

10.Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Moleculartypingmethodologies for microbialsourcetracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens.Infect Genet Evol. 2009 Jul;9(4):430-40.

11. Naravaneni R, Jamil K. Rapid detection of food-bornepathogens by using molecular techniques.J Med Microbiol. 2005 Jan;54(Pt 1):51-4.

12. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M. Comparison of fiverepetitive-sequence-basedPCRtypingmethods for molecular discrimination of Salmonella enterica isolates. J ClinMicrobiol. 2005 Aug;43(8):3615-23.

13. Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G, Achtman M. Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. Infect Genet Evol. 2002 Oct;2(1):39-45.

14. Ranjbar R, Sarshar M, Morovvati S. Study of ribotype patterns of salmonella entrica serovar entritidis strains isolated in Tehran, Iran. J Isfahan Med Sch 2012; 30(180): 238-47. [In Persian]

15. KANG ZW, JUNG JH, KIM SH, LEE BK, LEE DY, KIM YJ, LEE JY, WON HK, KIM EH, HAHN TW. Genotypic and phenotypic diversity of Salmonellaenteritidis isolated from chickens and humans in Korea. J Vet Med Sci. 2009 Nov;71(11):1433-8.

16. Wertz JE, Goldstone C, Gordon DM, Riley MA. A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept.J Evol Biol. 2003 Nov;16(6):1236-48.

17. Turpin W, Humblot C, Noordine ML, Thomas M, Guyot JP. Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. PLoS One. 2012;7(5):e38034.

18.Wertz JE, Goldstone C, Gordon DM, Riley MA. A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept.J Evol Biol. 2003 Nov;16(6):1236-48.

19. Rodulfo H, De Donato M, Luiggi J, Michelli E, Millán A, Michelli M. Molecular characterization of Salmonella strains in individuals with acute diarrhea syndrome in the State of Sucre, Venezuela. Rev Soc Bras Med Trop. 2012 Jun;45(3):329-33.

20- Chaudhry R, Laxmi BV, Nisar N, Ray K, Kumar D. Standardisation ofpolymerase chain reaction for the detection of Salmonella typhi in typhoid fever. J Clin Pathol.. 1997;50 (5): 437-9.

21. Cohen HJ, Mechanda SM, Lin W. PCR amplification of the fimA gene sequence of Salmonella typhimurium, a specific method for detection of Salmonella spp. Appl Environ Microbiol. 1996 Dec;62(12):4303-8.

22. Pathmanathan SG, Cardona-Castro N, Sanchez- Jimenez MM, Correa-Ochoa MM, Puthucheary S D, Thong KL. Simple and rapid detection of Salmonella strains by direct PCR amplification of the hilA gene. J Med Microbiol. 2003; 52:773-776.

23. Hong Y1, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ. Rapid screening of Salmonella enterica serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. BMC Microbiol. 2008 Oct 9;8:178.
24. Tall A1, Hervio-Heath D, Teillon A, Boisset-Helbert C, Delesmont R, Bodilis J, Touron-Bodilis A. Diversity of Vibrio spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyrH sequencing. J Appl Microbiol. 2013 Jun;114(6):1713-24.