

## تنوع توالی های تکرار شونده در ایزوله های سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس جدا شده از نمونه های بالینی

مینرا احمدی<sup>۱</sup>، رضا رنجبر<sup>۲\*</sup>

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: ۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳،  
ranjbarre@gmail.com

پذیرش برای چاپ: شهریور نود و چهار

دریافت مقاله: خرداد نود و چهار

### چکیده

**سابقه و هدف:** باکتری سالمونلا، یک پاتوژن روده ای و عامل شایع مسمومیت های غذایی در دنیای امروز است. در طی سال های اخیر، عفونت های ناشی از سالمونلا انتریکا سروار اینفانتیس به سرعت رو به افزایش است. توالی های تکرار شونده پشت سر هم، الگوهایی از DNA هستند که در تمامی پروکاریوت ها وجود دارند. این توالی ها ممکن است از نظر تعداد واحدهای تکراری، در بین سویه های مختلف یک گونه، متفاوت باشند. بنابراین، اهداف مناسبی جهت تمایز ایزوله های 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 پلیمرز (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 لوکوس های مورد مطالعه، می توان از این لوکوس ها جهت ژنوتایپینگ و بررسی قرابت ژنتیکی ایزوله های مختلف سالمونلا اینفانتیس در مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** سالمونلا اینفانتیس، توالی های تکرار شونده، ال، واکنش زنجیره ای پلیمرز

### مقدمه

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).

باکتری سالمونلا، گروه بزرگی از باسیل های گرم منفی و یکی از اعضای خانواده ی 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 مسمومیت های غذایی در انسان است (۱ و ۲). به لحاظ تنوع زیاد سرولوژی و بیوشیمیایی طبقه بندی سالمونلاها بسیار پیچیده است (۳ و ۴). 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 شایع ترین سروتایپ های

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(۱۹ و ۲۰). واکنش زنجیره پلیمرز 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).

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 می گویند(۹ و ۱۰). 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(۱۱ و ۱۲).

در ایران مطالعات بسیاری در زمینه بررسی عوامل آلوده کننده مواد غذایی به خصوص گونه های سالمونلا با روش های 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 الیهای غالب آن، بررسی شد تا اولاً درک صحیحی از میزان تنوع جمعیتی ایزوله های سالمونلا اینفانتیس داشته باشیم و ثانیاً بتوانیم در آینده، از این لوکوس ها جهت تمایز و بررسی قرابت ژنتیکی این ایزوله ها 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

جدول ۱: نام لوکوس، و پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر هر لوکوس VNTR.

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

جدول ۲: مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش های PCR برای تکثیر لوکوس های VNTR.

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

| واسرشت اولیه                     | ۳۵ دور                                 |  |  | گسترش<br>انتهایی                       |
|----------------------------------|--|--|--|--|
|                                  | واسر<br>شت                             | اتصال                                  | گستر<br>ش                              |  |
| ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه | ۹۳                                     | ۵۸                                     | ۷۲                                     | ۷۲ درجه<br>سانتیگراد به<br>مدت ۷ دقیقه |
|                                  | درجه<br>سانتیگراد<br>به مدت<br>۱ دقیقه | درجه<br>سانتیگراد<br>به مدت<br>۱ دقیقه | درجه<br>سانتیگراد<br>به مدت<br>۱ دقیقه |  |

جدول ۳: برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر لوکوس های VNTR

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 می گردد. به علاوه، برای محاسبه دقیق اندازه محصولات PCR بهتر است حداقل از دو یا سه ستون سایز مارکر استفاده شود (۲۲).

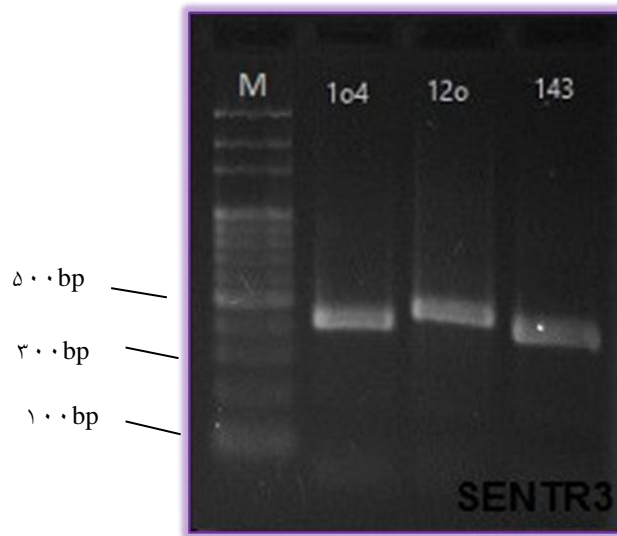
#### یافته ها

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

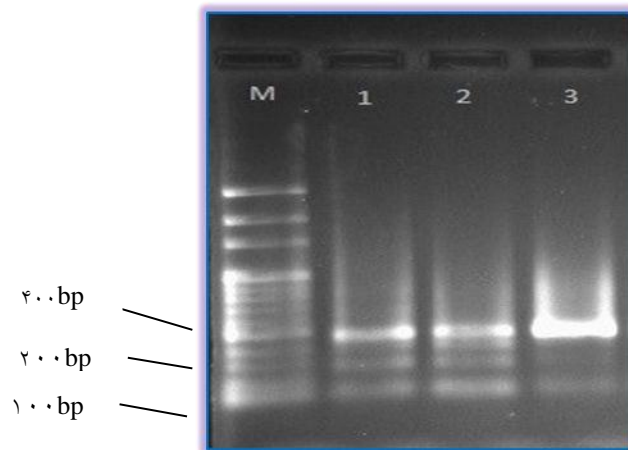
برای بررسی و مشاهده باندهای حاصل از محصولات PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام شد. مولکول های DNA به دلیل داشتن بار منفی هنگامی که در میدان الکتریکی قرار می گیرند، به سمت قطب مثبت حرکت می نمایند. همچنین برای تشخیص سریع و آسان تر اندازه محصولات PCR، در چاهک اول، مارکر اختصاصی 100 bp Ladder را اضافه می کنیم. 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 ۱۵ دقیقه 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 می توان 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



شکل ۱: در این ژل، تنوع محصولات مختلف VNTR مربوط به لوکوس SENTER3 می باشد. اعداد بالای محصولات لوکوس های VNTR، بیانگر شماره ایزوله سالمونلا اینفانتیس می باشد. در ستون M، از مارکر 100 bp Ladder 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 100 bp Ladder استفاده شده است.

## بحث

باکتری سالمونلا یک پاتوژن روده ای و یکی از مهم ترین عوامل باکتریایی منتقله از راه مواد غذایی محسوب می گردد که اخیراً منجر به نگرانی هایی در سطح بهداشت عمومی شده است. سالمونلاهای غیر تیفوئیدی زیرگونه ای انتریکا سروار اینفانتیس اخیراً به عنوان یکی از شایع ترین عوامل ایجاد عفونت بویژه مسمومیت های غذایی در انسان مطرح شده است (۱،۵). شناسایی و تمایز پاتوژن ها در مواد غذایی، در اپیدمیولوژی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. استفاده از توالی های VNTR جهت تمایز و افتراق سویه های مختلف یک گونه ای باکتریایی، یکی از روش های نوین مولکولی در علم میکروبی شناسی 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 لوکوس های VNTR جهت تمایز و افتراق ایزوله های سالمونلا انتریکا سروار تیفی موریوم استفاده کردند (۲۳).

Van Cu و همکاران، در سال ۲۰۱۰ در کامبوج ، در مطالعه ای 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 جدایه ای سالمونلا انتریتیدیس را از نظر لوکوس های SE3، SE4، SENTR5، SENTR6 و SENTR7 مورد ارزیابی قرار دادند. آن ها تنوع نسبتاً بالایی را در لوکوس های مزبور مشاهده نمودند (۲۰).

قادری و همکاران در سال ۲۰۱۳، ساختار ژنتیک جمعیتی سویه های ایرانی سالمونلا انتریتیدیس را با استفاده از لوکوس های VNTR، تعیین کردند. هدف آن ها، افزایش اطلاعات در زمینه ای 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 جدایه ای سالمونلا تیفی موریوم 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 جوجه های دانمارکی به انسان رخ نمی دهد (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 تیفی موریوم که باعث شیوع بیماری می شوند، به کار بردند. در این مطالعه، چهار فاژتایپ در دسرساز در نیوزلند، تعیین خصوصیت شدند (۲۶).

گزارش های محققین چه در ایران و چه در جهان که بر روی عفونت های 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 SE4 و SENTR3 که بر اساس مطالعات حاضر انتخاب شده بودند، استفاده گردید.

با توجه به نتایج حاضر در این مطالعه، لوکوس SENTR3 با داشتن ۳ ال متفاوت، بیشترین تعداد ال و لوکوس SE4 با داشتن ۲ ال متفاوت، کم ترین تعداد ال 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 می دهد که ایزوله های جدا شده از شهر تهران، از چند کلون (منشأ اجدادی) مختلف، نشأت گرفته اند. با این حال، برای ارزیابی صحیح تر و بهتر جمعیت ایزوله های سالمونلا اینفانتیس نیاز به بررسی لوکوس های VNTR بیشتری می باشد.

## نتیجه گیری

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در ارتباط با تنوع لوکوس های VNTR در ایزوله های سالمونلا اینفانتیس در کشورمان انجام نگرفته است، در این پژوهش، سعی بر آن شد که تنوع لوکوس های فوق در جمعیت ایزوله های بومی، مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان می دهد که از لوکوس های VNTR استفاده شده، به خوبی می توان جهت تمایز و افتراق ایزوله های سالمونلا اینفانتیس در نمونه های بالینی و بررسی های اپیدمیولوژیکی استفاده کرد.

## تقدیر و تشکر

همچنین جناب دکتر مجتبی معماریانی که در تحقق این پژوهش یاری نموده اند کمال تشکر را داشته و سپاسگزاری می نمایم.

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

## 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: A battle of David against Goliath? *Food Res Int*. 2011;8(9):4-8.
4. Hendriksen SW, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van Duinkerken 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  $\beta$  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.Geocities.Com/avinash\\_abhyankar](http://bacteriology.Htrn.www.Geocities.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 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  $\beta$  lactamase-producing non typhoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(1):91-5.

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 Health*, 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.