

サルモネラ（4：i：-）の同定法マニュアル

平成29年10月16日

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門
細菌・寄生虫研究領域 腸管病原菌ユニット

目次

要約	1
1. はじめに	2
2. サルモネラ症の病性鑑定	2
3. サルモネラの鞭毛相変異機構	3
4. <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) の単相化の原因	3
5. 非定型 ST 同定法の概略	4
6. 関連する PCR 法のプロトコール	5
①プライマーリスト	5
②共通のプロトコール	6
③ST 同定用マルチプレックス PCR	6
④ST 同定用 IS200 PCR	7
⑤変異同用 PCR	8
⑥ <i>fljA</i> 増幅用 PCR	9
⑦ <i>hin</i> 増幅用 PCR	9
参考：農研機構動物衛生研究部門が配布した標準菌株の性状	10
7. 相誘導法	11
①ガラス管法	11
②ろ紙法	11
③トラブルシューティング	12
8. 本マニュアル使用上の注意事項	13
参考文献	14

要約

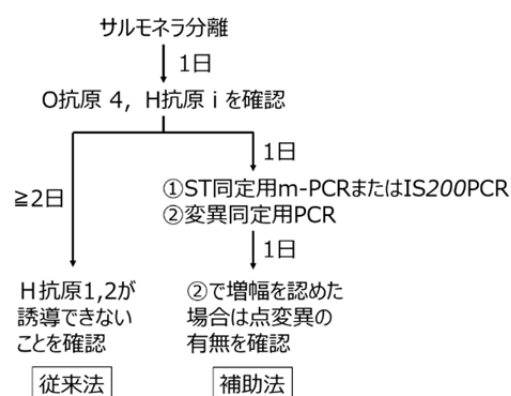
Salmonella 血清型 Typhimurium (ST) は家畜のサルモネラ症の原因血清型として重要視されており、家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されている。近年、ST の 2 相鞭毛抗原が発現しない変異株である血清型 4:i:- (非定型 ST) の分離頻度が上昇して問題となっている。非定型 ST の病原性は ST と差がないことから、農林水産省は本血清型を届出伝染病と同等に扱うことを決定した。非定型 ST に遭遇した場合、従来の血清型別法では 2 相 H 抗原の同定に手間取ることになり、結論を出すまでに時間を要することが懸念されている。そこで、本マニュアルでは病性鑑定において 04 群サルモネラのうち、1 相 H 抗原が i と同定される株に遭遇した場合の検査法をまとめた。

本法では従来法としての 2 相 H 抗原の誘導と平行して、補助法としての ST 同定用 PCR と変異同定用 PCR を行う (右図)。現在、非定型 ST と呼ばれているサルモネラは、ST 以外の血清型に由来する可能性も完全には否定できないことから、原則として ST 同定用 PCR を行う必要がある。また、変異同定用 PCR により、2 相 H 抗原を規定する遺伝子領域の欠失が検出できれば、その時点で 2 相 H 抗原の誘導作業が不要と判断できる。

なお、O 抗原が 4、H 抗原が i であることが確認された時点で、原則として ST 同定用の PCR を行う必要があるが、臨床所見や疫学的に ST (非定型を含む) と考えられる場合は、その時点で ST として届出ることができるものとする。

本マニュアル使用上の注意事項は以下の通りである。

- ・ 04 群サルモネラで H 抗原 i が検出された場合、直ちに PCR による補助法を行ってよいが、可能な限り従来法による 2 相 H 抗原の同定を併用すること。
- ・ 従来法または補助法で 2 相 H 抗原が検出できなかった場合、4:i:- が ST 以外の血清型に由来する可能性を否定するため、原則として ST 同定用 PCR は実施すること (特に家畜保健衛生所等の公的機関においては確実に実施する必要がある)。
- ・ ただし、非定型 ST の病原性が ST と同等であること、及び我が国における非定型 ST の分離状況を踏まえ、疫学的、臨床的に非定型 ST によるサルモネラ症と判断することが妥当と考えられる場合は、O 抗原が 4、H 抗原が i であることが確認された時点で、ST によるサルモネラ症として届け出ること。
- ・ 病性鑑定担当者は ST と非定型 ST を区別して記録を保存すること。
- ・ 家畜保健衛生所は、ST 以外の血清型に由来する 4:i:- を確認した場合、速やかに農林水産省動物衛生課及び国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構) 動物衛生研究部門に報告すること。



1. はじめに

Salmonella 血清型 Typhimurium (ST) は家畜のサルモネラ症の原因血清型として重要視されており、家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されている。近年、ST の 2 相鞭毛抗原が発現しない変異株である血清型 4:i:- (非定型 ST) の分離頻度が上昇して問題となっている。47 都道府県において 1998 年以降に発生した家畜サルモネラ症、計 2,410 事例の情報を収集したアンケート調査¹⁾では、牛と豚のサルモネラ症が、それぞれ全体の 54.1%及び 41.3%を占めた。牛のサルモネラ症の原因血清型としては ST が最も優勢で約半数を占め、その変異株である非定型 ST の分離頻度も 10%程度と高かった。豚のサルモネラ症の原因血清型としては ST と Choleraesuis が、それぞれ全体の 44.7%及び 36.9%を占めた。非定型 ST の分離頻度は 4.4%と全ての分離された血清型の中で 3 番目に高かった。牛でも豚でも非定型 ST の分離頻度は 2012 年以降に上昇したことが明らかとなり、一定の低い頻度で出現する変異株を検出したのではなく、何らかの疫学的背景の存在が疑われた。

我々は国内において分離された ST と非定型 ST の全ゲノム系統解析を行い、これら菌株の遺伝学的背景を反映した新しい遺伝子型別法を開発した²⁾。本法では ST と非定型 ST を 1~9 の 9 つの遺伝子型に型別できる。非定型 ST はこのうち 4、8、9 の 3 つの遺伝子型に集約された。本法を用いて 1972~2017 年の間に牛と豚から分離された 980 株の遺伝子型別を実施したところ、欧州に起源を有すると考えられる 9 型菌が牛では 2012 年以降に優勢となっている事実が明らかとなった。豚でも近年、9 型菌の分離頻度が上昇していた。これらの事実は、近年の 4:i:-によるサルモネラ症の顕在化が欧州に起源を有する 9 型菌の世界流行の一部である可能性を強く示唆している。以上の疫学的状況から、非定型 ST は今後、ST と同様に届出の対象とすることが農林水産省により決定された。本マニュアルの目的は非定型 ST の同定法を解説することで、家畜保健衛生所、動物検疫所、農林水産消費安全技術センター等における本菌の検査業務の円滑化に資することである。

2. サルモネラ症の病性鑑定

病性鑑定マニュアル³⁾の記載に従って実施する。疫学調査と臨床検査からサルモネラ症が疑われる場合は剖検や細菌検査を行う。細菌検査では血液、主要臓器、腸内容物、流産胎児、下痢便等の材料をノボビオシン (20 mg/L) 加 DHL 寒天培地に塗布し、分離培養を行う。必要に応じてその他のサルモネラ用培地を併用する。通常、糞便をサンプルとしてハーナテトラチオン酸塩培地で増菌後、ノボビオシン (20 mg/L) 加 DHL 寒天培地を用いて分離培養を行う。他の増菌用培地、選択分離培地、免疫磁気ビーズ等の併用により、検出率は向上する。分離培地上に中心黒色の円形集落が観察されたら、それを釣菌し、TSI 寒天培地や LIM 寒天培地に画線または穿刺して糖の利用性、硫化水素産生性、リジン脱炭酸酵素の有無等を確認する。サルモネラの可能性が考えられた場合は市販のサルモネラ免疫血清を用いてスライド凝集反応により菌体 (O) 抗原を同定する。鞭毛抗原については市販のサルモネラ免疫血清を用いて試験管凝集反応により H 抗原を同定する。多くのサルモネラは 2 種類の鞭毛抗原を発現することが知られている。一方の H 抗原に対する抗血清を含む培地でガラス管を通過させること等により、反対側の相の H 抗原を誘導することができる (P. 11)。サルモネラの血清型は 0 抗原、1 相 H 抗原、及び 2 相 H 抗原の組み合わせにより決定される⁴⁾。

3. サルモネラの鞭毛相変異機構⁴⁾

サルモネラは2種類の鞭毛抗原を発現する能力を有するが、1つの細胞は通常、1種類の鞭毛抗原しか発現しない。鞭毛相変異には染色体上の2つの遺伝子領域が関与する(図1)。*fliC*及び*fljB*遺伝子はそれぞれ1相及び2相のフラジェリン蛋白(H抗原)をコードする。図1の上段は1相H抗原が発現している状態である。このとき、*fliC*遺伝子と離れた位置に存在する*fljA*、*fljB*、及び*hin*という縦列した3つの遺伝子のうち、インベルターゼ(逆位酵素)をコードする*hin*遺伝子は*fljA*及び*fljB*とは反対の方向を向いている。FljA及びFljB蛋白質を発現するためのスイッチである*fljB*プロモーターは、*hin*遺伝子の直下に存在して*hin*遺伝子と同じ方向を向いている。したがってFljA及びFljB蛋白質は発現せず、FljC蛋白質がH抗原を規定することになる。一方、図1の下段のように*hin*遺伝子に逆位が起こるとプロモーターが*fljA*及び*fljB*と同じ方向を向くので、これらの遺伝子が発現する。FljA蛋白質は*fliC*遺伝子のメッセンジャーRNAに結合し、翻訳の抑制または分解を促進すると考えられている。これにより、同時に発現したFljB蛋白質がH抗原を規定することになり、2相H抗原が発現する。

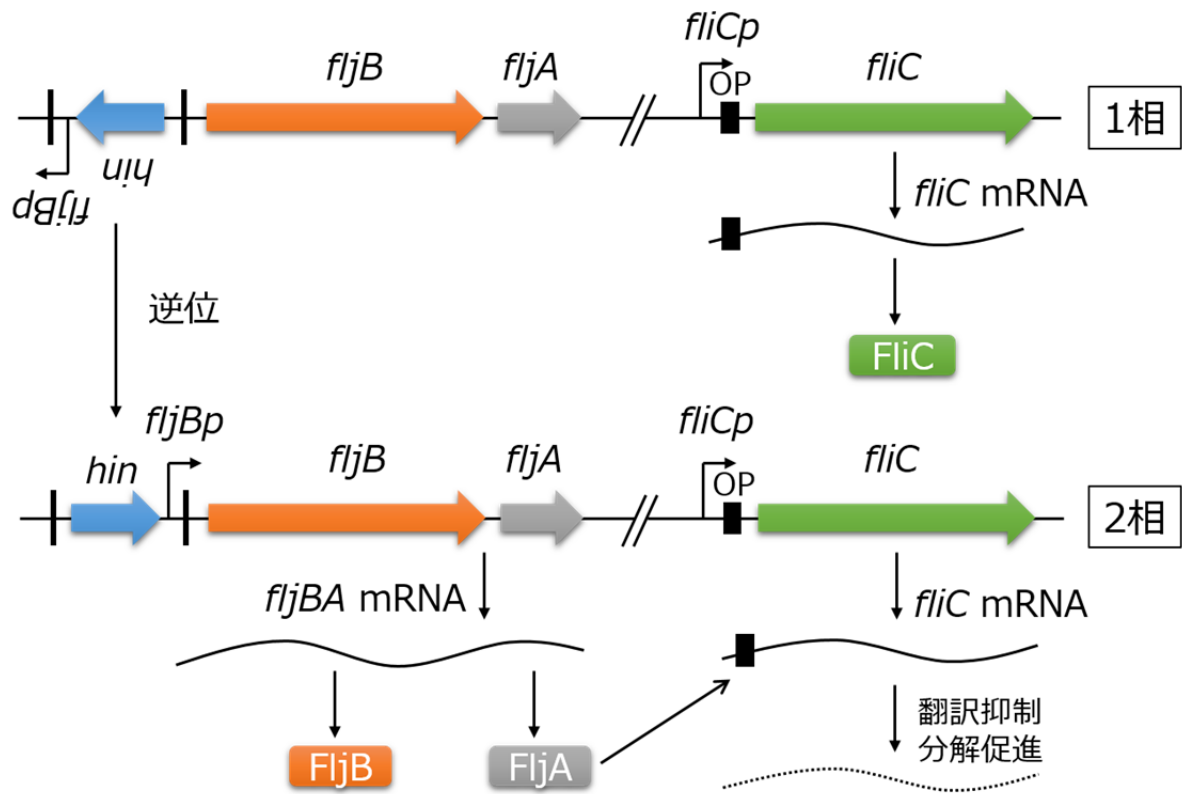


図1 サルモネラ鞭毛相変異機構モデル

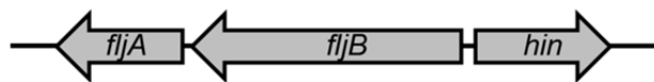
fljBp, *fljB*プロモーター; *fliCp*, *fliC*プロモーター; OP, オペレーター領域; *fliC* mRNA, *fliC*メッセンジャーRNA; *fljBA* mRNA, *fljBA*メッセンジャーRNA

4. STの単相化の原因

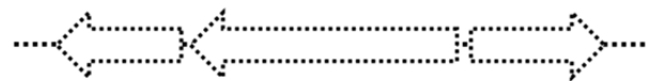
我々は国内で2000~2010年に分離された非定型STの単相化の原因を調べた⁵⁾。前項で述べたとおり、サルモネラの鞭毛相変異には染色体上に縦列して存在する3つの遺伝子*fljA*、*fljB*、*hin*

が関与する。この構造が正常な状態で存在するか否かを調べたところ、非定型 ST のこの部位には 3 種の変異 (A、B、C) が存在することが明らかとなった (図 2)。すなわち、変異型 A では *fljA*、*fljB*、*hin* の全領域が欠失、変異型 B では *fljA*、*fljB*、*hin* の大部分が欠失、変異型 C では *fljA* 及び *hin* 遺伝子に、それぞれ A46T 及び R140L という非同義置換 (アミノ酸の変化を伴う点変異) が認められた。変異型 A 及び B では 2 相 H 抗原を規定する *fljB* 遺伝子が存在しないので、2 相 H 抗原は発現できない。一方、変異型 C で認められた点変異を ST に導入すると相変異率の低下が認められ、これらの菌株では 2 相 H 抗原が検出できなかった。

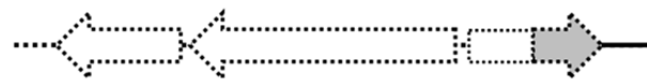
正常型 (Typhimurium)



変異型 A (4:i:-) : 欠失



変異型 B (4:i:-) : 欠失



変異型 C (4:i:-) : 点変異



図 2 非定型 ST の *fljA*、*fljB*、*hin* 領域に認められた変異

5. 非定型 ST 同定法の概略

非定型 ST に遭遇した場合、従来の血清型別法では 2 相 H 抗原の同定に手間取ることになり、結論を出すまでに時間を要することが懸念されている。そこで、本項及び次項では病性鑑定において 04 群サルモネラのうち、1 相 H 抗原が i と同定される株に遭遇した場合の検査法を示す。従来法の一部としての相誘導法については項目 7 で説明する。

図 3 に示すように、本法では従来法としての 2 相 H 抗原の誘導と平行して、補助法としての ST 同定用マルチプレックス PCR (P. 6) または ST 同定用 IS200PCR (P. 7) 及び変異同定用 PCR (P. 8) を行う。従来法で H 抗原 1, 2 が誘導されない株のうち、ST 同定用 PCR で陽性、変異同定用 PCR で陰性の結果が得られた場合、A 型または B 型非定型 ST と同定できる。ともに陽性の結果が得られた場合は *fljA* 増幅用 PCR (P. 9) 及び *hin* 増幅用 PCR (P. 9) の増幅産物の塩基配列を解析し、アミノ酸置換を伴う点変異が確認できれば C 型非定型 ST と同定できる (図 3)。変異パターン同定は任意であるが、変異同定用 PCR により 2 相 H 抗原の発現を規定する遺伝子領域の欠失が確認

できれば、その時点で2相H抗原の誘導作業が不要と判断できる。

なお、O抗原が4、H抗原がiであることが確認された時点で、原則としてST同定用のPCRを行う必要があるが、臨床所見や疫学的にST（非定型を含む）と考えられる場合は、その時点でSTとして届出ることができるものとする。

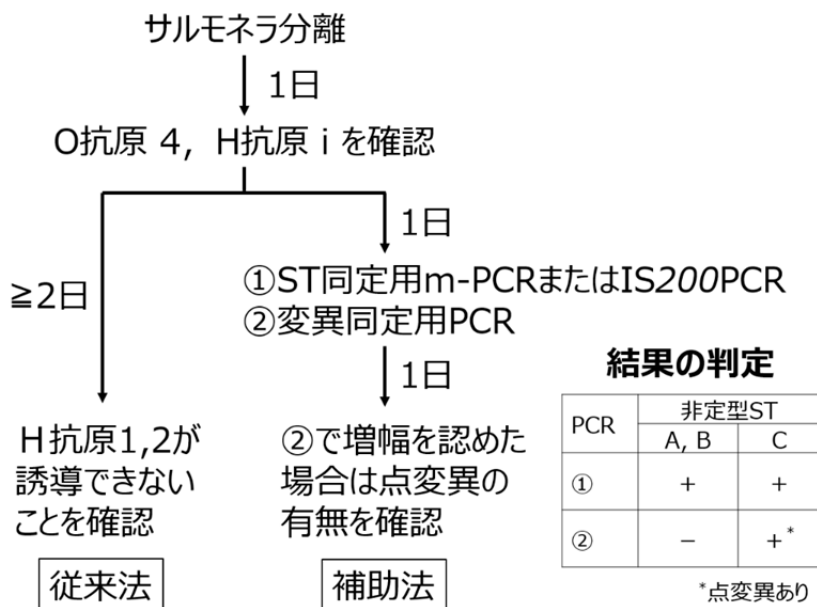


図3 04群サルモネラ同定法の概略

m-PCR, マルチプレックスPCR

6. 関連するPCR法のプロトコール

①プライマーリスト（希釈標準溶液 10 μM）

目的	プライマー	塩基配列 (5'→3') ^a	位置	増幅産物 (bp)	
ST特異的PCR	m-PCR ⁶⁾	invAF	AAACCTAAAACCGCAAAGG	STM2896 (<i>invA</i>)	605
		invAR	TGTACCGTGGCATGTCTGAG	STM2897 (<i>invA</i>)	
		TSR1F	ATGCGGGTATGACAAACCCCT	STM0292	94
		TSR1R	TTAGCCCCATTTGGACCTTT	STM0292	
		TSR2F	CAGACCAGGTAAGTTTCTGG	STM2235	196
		TSR2R	CGCATATTTGGTGCAAAAT	STM2235	
		TSR3F	TTTACCTCAATGGCGGAACC	STM4493	303
		TSR3R	CCCAAAGCTGGGTTAGCAA	STM4493	
	PCR ⁷⁾	FFLIB	CTGGCGACGATCTGTCGATG	<i>fliB</i>	1000 (ST)または250 (非ST)
RFLIA		GCGGTATACAGTGAATTCAC	<i>fliA</i>		
<i>fljA</i> , <i>fljB</i> , <i>hin</i> 領域 PCRマッピング ⁵⁾	<i>fljA</i> F	TCCTGGACTGTTCCGGTATC	IS3- <i>fljA</i> 遺伝子間領域	464	
	<i>fljA</i> R	CGGCTGACGGATTTAATCTT	<i>fljA</i>		
	<i>fljA</i> BF	CTTCGCAATGTAGCCTGTGA	<i>fljA</i>	452	
	<i>fljA</i> BR	CTCTGATCTGGGTGCGGTA	<i>fljB</i>		
	<i>fljB</i> HF	GCAATGGAGATACCGTCGTT	<i>fljB</i>	547	
	<i>fljB</i> HR	TTAACGCCACCAGGTTTTTC	<i>hin</i>		
	<i>hin</i> F	GGCGATCAACAAACATGAAC	<i>hin</i>	473	
	<i>hin</i> R	ATGCCAGGCTTACCTGTGTC	<i>hin-iroB</i> 遺伝子間領域		

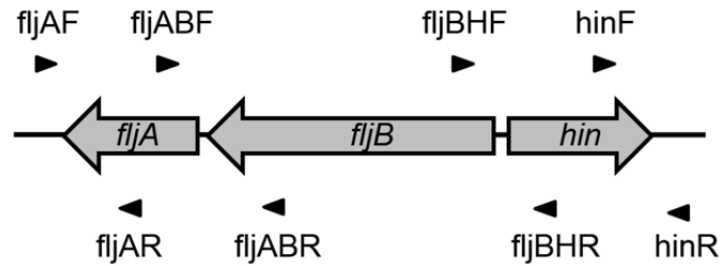


図4 *fljA*、*fljB*、*hin* 遺伝子領域の PCR マッピング用プライマーの位置⁵⁾

非定型 ST の同定には参考文献中の PCR マッピングは不要である。この中から選択したプライマーを使用する。組み合わせについては以下に示すプロトコールを参照。

②共通のプロトコール

テンプレート DNA の調製 (アルカリボイル法)

- 大きさ 1 mm 程度の菌体コロニーを 50 μ l の 25 mM NaOH 水溶液に懸濁。
- 95°C で 5 分間加熱。
- 4 μ l の 1 M Tris-HCl (pH 7.0~8.0) を加えて中和。
- 12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清 1 μ l をテンプレートとする。

電気泳動

2%アガロース、100 bp DNA Ladder マーカーを使用。

③ST 同定用マルチプレックス PCR⁶⁾

プライマー

invAF、invAR、TSR1F、TSR1R、TSR2F、TSR2R、TSR3F、TSR3R

通常のゲル濾過精製グレードではなく、精製度の高いカートリッジカラム精製グレードを使用。

DNA ポリメラーゼ

KOD FX (東洋紡 1 U/ μ l)

PCR ミックス (50 μ l)

DW	1 μ l
2X Buffer	25 μ l
各 2 mM dNTP	10 μ l
プライマー	1.5 μ l \times 8 (計 12 μ l)
テンプレート	1 μ l
KOD FX	1 μ l

サイクル条件

ホットスタート

94°C 2分

↓

98°C 10秒	} 35 サイクル
60°C 30秒	
68°C 30秒	

増幅産物のサイズ

プライマーリスト (P.5) 参照

結果の判定と注意点

実施の際は必ず陽性対照（標的血清型）及び陰性対照（DW）をおくこと。陰性対照でバンドが検出される場合はプライマー溶液か超純水の汚染（マイクロピペットの汚染等に起因するゲノムDNAの混入）が疑われる。全てのバンドで陽性対照と同程度の増幅が見られるときは結果判定ができないので、使用中のプライマー溶液や超純水を全て新しくする必要がある。陰性対照で有意な増幅を認めないことを確認した上で、全てのバンドが陽性対照と同程度に増幅される場合、被検菌は標的血清型と判定できる。非標的血清型では *invA* のみ、あるいは *invA* に加えて1つ、または2つの血清型特異的遺伝子で増幅が認められる。非サルモネラでは *invA* の増幅が認められない。エキストラバンドの出現が問題となる場合は、サイクル数を減らす。テンプレートに問題がなければ25程度まで減らしても十分な増幅が認められる。

④ST 同定用 IS200 PCR⁷⁾

プライマー

FFLIB、RFLIA

DNA ポリメラーゼ

Ex Taq HS version (タカラ 5 U/μl)

PCR ミックス (20 μl)

DW	13.3 μl
10X Ex Taq Buffer	2 μl
各 2.5 mM dNTP	1.6 μl
プライマー	1 μl × 2 (計 2 μl)
テンプレート	1 μl
Ex Taq HS version	0.1 μl

サイクル条件

ホットスタート

94°C 2分

↓

98°C 10秒

60°C 30秒

72°C 60秒

} 30 サイクル

増幅産物のサイズ

ST で 1,000 bp、その他の血清型では 250 bp

⑤変異同定用 PCR

プライマー

f1jABF、f1jABR

DNA ポリメラーゼ

Ex Taq HS version (タカラ 5 U/μl)

PCR ミックス (20 μl)

DW	13.3 μl
10X Ex Taq Buffer	2 μl
各 2.5 mM dNTP	1.6 μl
プライマー	1 μl × 2 (計 2 μl)
テンプレート	1 μl
Ex Taq HS version	0.1 μl

サイクル条件

ホットスタート

94°C 2分

↓

98°C 10秒

60°C 30秒

72°C 30秒

} 30 サイクル

増幅産物のサイズ

452 bp

⑥ *fljA* 増幅用 PCR

プライマー

f1jAF、f1jABR

DNA ポリメラーゼ

Ex Taq HS version (タカラ 5 U/ μ l)

PCR ミックス (20 μ l)

DW	13.3 μ l
10X Ex Taq Buffer	2 μ l
各 2.5 mM dNTP	1.6 μ l
プライマー	1 μ l \times 2 (計 2 μ l)
テンプレート	1 μ l
Ex Taq HS version	0.1 μ l

サイクル条件

ホットスタート

94°C 2分

↓

98°C 10秒	} 30 サイクル
60°C 30秒	
72°C 60秒	

増幅産物のサイズ

1,049 bp

⑦ *hin* 増幅用 PCR

プライマー

f1jBHF、hinR

DNA ポリメラーゼ

Ex Taq HS version (タカラ 5 U/ μ l)

PCR ミックス (20 μ l)

DW	13.3 μ l
10X Ex Taq Buffer	2 μ l
各 2.5 mM dNTP	1.6 μ l
プライマー	1.0 μ l \times 2 (計 2 μ l)

テンプレート 1 μ l
 Ex Taq HS version 0.1 μ l

サイクル条件

ホットスタート

94°C 2分

↓

98°C 10秒	}	30 サイクル
60°C 30秒		
72°C 60秒		

増幅産物のサイズ

1,213 bp

参考：農研機構動物衛生研究部門が配布した標準菌株の性状

株名	抗原構造	SNP遺伝子型 ²⁾	変異型	PCR増幅	
				ST同定用	変異同定用
L-4233	4:i:-	9	A	+	-
L-3575	4:i:-	8	B	+	-
L-3635	4:i:-	4	C	+	+

7. 相誘導法

①ガラス管法

半流動寒天培地を加熱溶解し、小試験管に 1.9 ml ずつ分注後、オートクレーブ。

↓

ウォーターバスで約 50°C に保温し、相誘導用血清 0.1 ml を加え、よく混和する。滅菌済みのガラス管を試験管内に立て、栓をして冷却、固化させる。

↓

被検菌をガラス管内の培地表面に接種し、37°C で 1~2 日間、培養。

↓

ガラス管から泳ぎ出て、ガラス管と試験管の間の表面に到達した菌を白金耳で取り、TSB 等の液体培地に接種し、37°C、一夜、振とう培養。

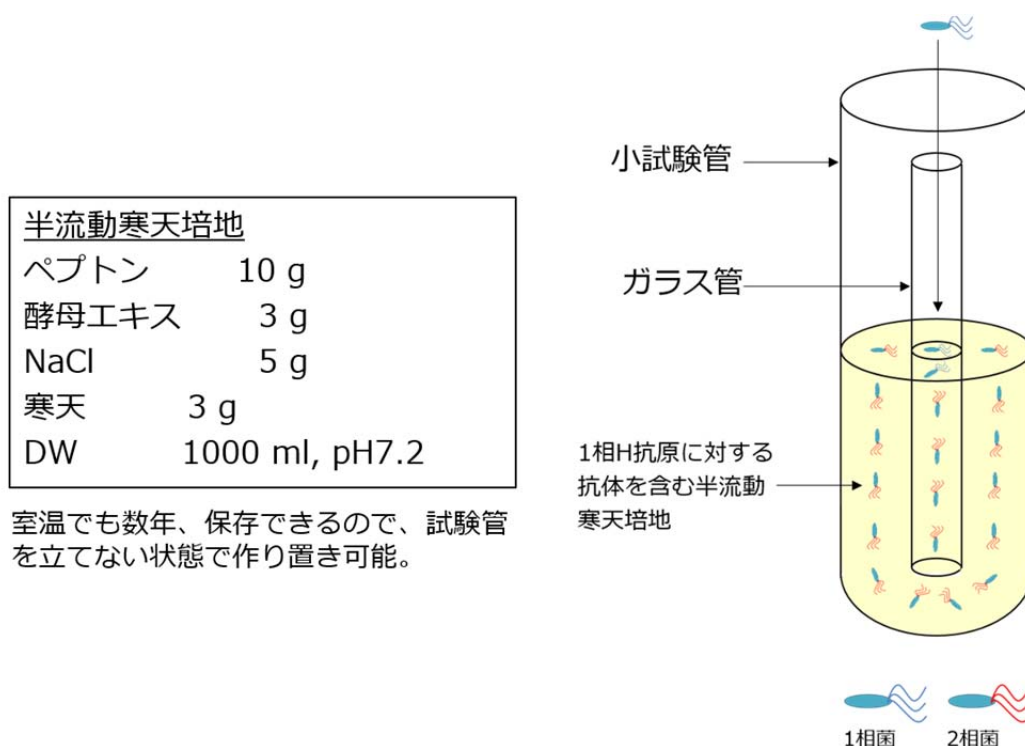


図5 ガラス管法によるサルモネラの相誘導

②ろ紙法

ろ紙片 (5 mm×30 mm[横長]と 5 mm×5 mm[方形]の 2 種類) をアルミホイルに包みオートクレーブ後、乾燥。

↓

TSA または普通寒天平板の中心部を 15 mm 幅に切り取って溝を作る。

↓

横長ろ紙片に相誘導血清 0.05 ml を吸収させ、この溝に橋をかけるように置く。培地成分が平衡化するまで数分放置。

↓

横長ろ紙片の片側の端に方形ろ紙を置き、反対側の端に被検菌を接種。

↓

ふたをしてそのままの状態（倒置しない）で37℃、一夜、静置培養。

↓

方形ろ紙片をTSB等の液体培地に入れ、37℃、一夜、振とう培養。

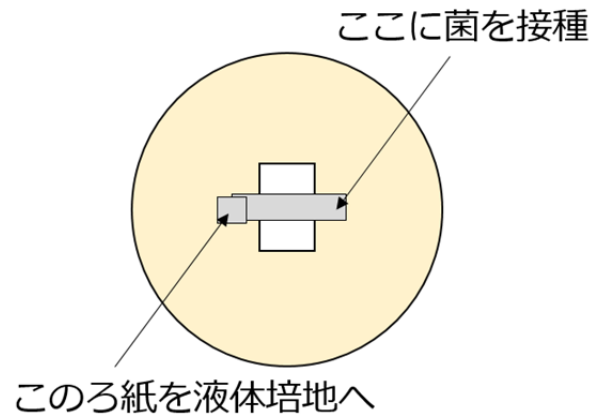


図6 ろ紙法によるサルモネラの相誘導

③トラブルシューティング

一夜以上、培養しても菌がガラス管の外に泳ぎ出ない場合

- 可能であれば陽性対照（被検菌と同じH抗原を発現しているサルモネラ保存株）をおいて、実験系に問題がないことを確認する。
- aで問題なければ抗血清の濃度を半分にして再度、実施する。
- 泳ぎ出ればH抗原を確認。1相と同じだった場合は単相と判定する。
- 泳ぎ出なければ単相と判定する。

一夜、培養してガラス管の外に泳ぎ出た菌のH抗原が1相と同じであった場合

- 可能であれば陽性対照（被検菌と同じH抗原を発現しているサルモネラ保存株）をおいて、系に問題がないことを確認する。
- aで問題なければ抗血清の濃度を2倍にして再度、実施する。
- 泳ぎ出ればH抗原を判定。1相と同じ抗原だった場合は単相と判定する。
- 泳ぎ出なければ単相と判定する。

8. 本マニュアル使用上の注意事項

- ・04群サルモネラでH抗原iが検出された場合、直ちにPCRによる補助法を行ってよいが、可能な限り従来法による2相H抗原の同定を併用すること。
- ・従来法または補助法で2相H抗原が検出できなかった場合、4:i:-がST以外の血清型に由来する可能性を否定するため、原則としてST同定用PCRは実施すること（特に家畜保健衛生所等の公的機関においては確実に実施する必要がある）。
- ・ただし、非定型STの病原性がSTと同等であること、及び我が国における非定型STの分離状況を踏まえ、疫学的、臨床的に非定型STによるサルモネラ症と判断することが妥当と考えられる場合は、O抗原が4、H抗原がiであることが確認された時点で、STによるサルモネラ症として届け出ること。
- ・病性鑑定担当者はSTと非定型STを区別して記録を保存すること。
- ・家畜保健衛生所は、ST以外の血清型に由来する4:i:-を確認した場合、速やかに農林水産省動物衛生課及び農研機構動物衛生研究部門に報告すること。

参考文献

1. 秋庭正人 (2017) 平成 28 年度戦略的監視・診断体制整備推進事業 (病原体 (サルモネラ (4:i:-)) の収集・解析委託事業) 調査報告書.
2. Arai N, Sekizuka T, Tamamura Y, Tanaka K, Barco L, Izumiya H, Kusumoto M, Hinenoya A, Yamasaki S, Iwata T, Watanabe A, Kuroda M, Uchida I, Akiba M. (2018) Phylogenetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant isolated from food animals in Japan revealed replacement of major epidemic clones in the last four decades. J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.01758-17.
3. 全国家畜衛生職員会 (2008) 病性鑑定マニュアル第 3 版.
4. Yamamoto S, Kutsukake K. (2006) FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol 188: 958-967.
5. Ido N, Lee K, Iwabuchi K, Izumiya H, Uchida I, Kusumoto M, Iwata T, Ohnishi M, Akiba M. (2014) Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium. PLoS One. 9(8):e104380.
6. Akiba M, Kusumoto M, Iwata T. (2011) Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. J Microbiol Methods. 85(1):9-15.
7. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. (2001) Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. J Clin Microbiol. 39(8):2981-3.