

<원 저>

Salmonella enterica serovars Enteritidis의 온도감수성 변이주 및 폴리인산키나아제 변이주의 제작과 방어효과

김기주¹ · 박소연¹ · 조영재¹ ·곽정연¹ · 강정무¹ · 김은희² · 최환원² · 원호근² · 노윤희² · 한태욱^{1,*}

¹강원대학교 수의과대학 및 동물의학종합연구소, ²중앙백신연구소

(접수: 2013년 7월 2일, 게재승인: 2013년 9월 24일)

Development and evaluation of protective capacity of *Salmonella* Enteritidis polyphosphate kinase-deleted and temperature-sensitive mutant

Kiju Kim¹, Soyeon Park¹, Youngjae Cho¹, Jeong-Yeon Kwak¹, Zheng-Wu Kang¹, Eun-Hee Kim², Hwan-Won Choi², Ho-Keun Won², Yun-Hee Noh², Tae-Wook Hahn^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²ChoongAng Vaccine Lab., DaeJeon 305-348, Korea

(Received: July 2, 2013; Accepted: September 24, 2013)

Abstract : This study was focusing on evaluating the protection of polyphosphate kinase (*ppk*) deleted and/or temperature-sensitive (*ts*) *Salmonella* Enteritidis (SE) as an attenuated vaccine in chickens. We constructed SE*ppk*, SE*ts* and SE*ppk::ts* mutants and screened those mutants by growth capability *in vitro*, protection study in mice model and antibody response in chickens. Among the mutants, SE*ppk::ts*-3 was selected because it showed higher growth capability, good protection against highly virulent SE in mice model, and good antibody response in chickens. SE*ppk::ts*-3 also showed good protection against highly virulent SE isolate because it decreased colonization of virulent SE challenge strain in spleen, liver and cecum compared with the non-vaccinated control. The SE*ppk::ts*-3 mutant showed cross-protection against *S. Gallinarum* (SG) challenge although the its cross-protection rate was a little lower than that of SG9R, a commercial vaccine against SG infection. To use for live attenuated vaccine in chickens, it should further be characterized.

Keywords : cross protection, polyphosphate kinase deleted mutant, *Salmonella* Enteritidis, temperature-sensitive mutant

서 론

국민 1인당 계란의 소비는 미국의 경우 연간 258개로 매년 증가하는 추세이며 [15], 국내의 경우도 농림축산식품부에서 발표한 2012년도 농림축산식품 주요통계에 의하면 2011년 1인당 계란 소비량은 2001년보다 15% 증가한 232개이며, 계육 소비량은 56% 증가한 11.4 kg이었다. 이에 따라 계란 또는 계육을 통한 식중독은 해마다 증가되고 있으며, 그 중 살모넬라에 의한 식중독이 해마다 괄목할 정도로 증가하고 있다 [21].

사람을 비롯하여 동물에서 일반적으로 분리되는 살모넬라 혈청형은 다양하며, 이 중 *Salmonella*(*S.*) *enterica* serovars Enteritidis(SE)와 *S.* Typhimurium(ST)이 주된 혈청형으로 숙주의 장관 내 집락을 형성하여 살모넬라증(salmonellosis)

을 일으킨다 [4]. 특히 SE는 오염된 계란과 계육을 통해 사람에게 식중독을 가장 빈번하게 일으키는 원인균이며, 이와 같은 식품매개질병으로 인한 경제적 손실이 상당하다 [24, 26]. 반면에 *S. Gallinarum*(SG)은 조류에게만 감염되는 제한적인 숙주 범위를 가지고 있으며, 닭에서 가금티푸스(fowl typhoid)를 일으켜 높은 폐사율을 초래한다 [6].

살모넬라와 같이 세포 내 기생하는 병원체의 경우 불활화 백신도 초기 감염단계인 장기 내의 집락을 감소시킬 수 있지만, 방어효과가 다소 떨어진다는 단점이 있다 [7]. 이에 반해 약독화 생균백신은 세포매개성 면역반응을 유도하여 불활화 백신보다 더 효율적으로 면역반응을 유도하기 때문에 전 세계적으로 많은 연구가 활발히 이루어지고 있으며 [3, 25], 현재 대표적인 생균백신으로는 SE Δ aroA [8], TAD *Salmonella* vac E [12], Megan Vac 1 [10] 등이 있다. 또

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-244-2367

E-mail: twahn@kangwon.ac.kr

한 닭에서 가금티푸스를 일으키는 SG의 예방을 위해 국내에서는 Nobilis SG 9R 생균백신을 많이 사용하고 있지만 [11], 숙주의 간과 비장에서 약독화 균주의 지속성에 의한 전신성 감염증이 여전히 문제가 되기 때문에 대체 백신의 개발이 필요하다 [27].

살모넬라 생균백신 후보주로는 온도감수성(temperature-sensitive; ts), polyphosphate kinase(*ppk*), aromatic amino acid(*aroA*), DNA adenine methylase(*dam*) 변이주 등이 있다 [9, 14, 20]. 이 중 polyphosphate kinase(*ppk*) 유전자는 세포의 ATP 생성과정에서 polyphosphate(polyP)의 합성에 관여하는 것으로 알려져 있으며 [22], ST *ppk* 변이주가 야생주에 비해 쥐 및 닭에서 병원성이 매우 감소되는 것은 이미 보고된 바 있다 [20]. 또한 온도감수성 변이주는 숙주의 체내에서 증식하지 못하기 때문에 생균백신 후보주로 적합할 것으로 사료된다. 게다가 최근 살모넬라 생균백신이 다른 혈청형에 대해 교차방어할 수 있다는 연구결과가 보고되고 있으며, 특히 동일한 혈청형 D군에 속한 SE와 SG 또는 SE와 혈청형 B군에 속한 ST에 대한 교차방어능에 관련된 연구가 보고되고 있다 [5, 19]. 국내의 경우 양계농장에서 SE와 SG가 동시에 발생되고 있는 점을 고려할 때 두 혈청형 모두 예방할 수 있는 백신 기술이 필요하다고 판단된다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 유행하는 SE 야생주를 대상으로 *ppk* 유전자 결손과 온도감수성 변이주를 제작하였고, 아울러 이 두 가지 특성을 동시에 갖추고 있는 이중변이주를 제작하여 쥐에서의 방어율 및 닭에서의 면역원성을 시험하였으며, SE와 SG에 대한 교차 방어효과 또한 관찰하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험의 균주는 닭에서 분리된 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) type A6에 속한 고병원성의 SE B01277을 선택하여 사용하였다 [16, 17]. SE *ppk* 결손 변이주는 phage P22HT를 이용하여 제작하였으며 [23], 이 변이주를 대상으로 온도 감수성 변이주를 제작하여 실험에 사용하였다(Table 1).

온도감수성(ts) 변이주의 제조

본 연구에 사용된 온도감수성 변이주는 이전에 보고된 방법을 이용하여 제작하였다 [13]. 선택된 균주를 tryptic soy broth(TSB; Difco, USA)에 접종하고 37°C에서 진탕 배양하였다. 증식한 균을 새로운 TSB에 넣어 37°C에서 배양한 후 1 mg/mL의 *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(NTG)을 첨가하여 37°C에서 반응시켰다. 균을 2회 세척한 다음 TSB로 희석하여 28°C에서 진탕 배양하였다. 여기에 50,000 U/mL의 penicillin을 첨가한 후 37°C에서 3시간 진탕 배양하고 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 뒤, TSB로 부유한 후 28°C에서 배양하였다. 10 mM D-cycloserine을 첨가하여 37°C에서 진탕 배양한 뒤 600 × g에서 원심분리하고 침전물

Table 1. *Salmonella* strains used in this study

Strains	Genotype	Remarks
<i>S. Enteritidis</i>		
SE B01277	Wild-type	Isolated from chicken
Vaccine strains		
SE <i>ppk</i>	<i>Δppk</i>	Isogenic mutant of SE B01277
SE277ts-1	Ts	Isogenic mutant of SE B01277
SE <i>ppk</i> ::ts-3	<i>Δppk</i> , ts	Isogenic mutant of SE B01341
Challenge strain		
SE B01271	Wild-type	Isolated from chicken

ppk: polyphosphate kinase, ts: temperature-sensitive.

에 신선한 TSB를 넣고 세척한 뒤 10 mL TSB로 희석하여 28°C에서 배양하였다. 단일 집락을 선택하여 두 개의 tryptic soy agar(TSA; Difco)에 접종한 후 각각 28°C, 37°C에서 배양하였으며, 28°C에서만 증식하는 집락을 선택하여 온도감수성 변이주를 선별하였다.

SE 변이주의 균 증식성 조사

본 실험에서 제작된 3가지 SE 변이주(SE*ppk*, SE277ts-1, SE*ppk*::ts-3)를 대상으로 균 증식성을 조사하기 위해 TSA에 접종하여 28°C와 37°C에서 각각 배양한 후 집락수(colony-forming unit; cfu)를 측정하였다.

쥐에서 생균백신 후보주에 대한 방어율 시험

실험동물은 7주령의 BALB/c 암컷쥐를 사용하였고, IVC Rack(MVCS; Threeshine, Korea)에서 사육하였다. 실험동물의 윤리적 사용을 위해 3R 원칙을 준수하였으며, 강원대학교의 동물실험윤리위원회 규정하에서 동물실험을 실시하였다(허가번호 KW-130328-1). SE 변이주에 대한 쥐에서 방어효과를 측정하기 위해 각각의 변이주를 복강으로 접종(1×10^9 cfu/0.1 mL)하였으며, 대조군은 phosphate-buffered saline (PBS)만을 투여하였다. 접종 3주 후 고병원성 야생주 SE B01271(6.8×10^8 cfu/mL, 100 LD₅₀)을 쥐 복강으로 공격접종한 뒤 21일간 쥐의 폐사 유무를 관찰하였다.

닭에서 생균백신 후보주에 대한 항체가 조사

생균백신으로 선발된 균주(SE*ppk*::ts-3, SE277ts-1)에 대하여 각 균별로 2주령의 specific pathogen-free(SPF) 닭 10수에 대하여 경구를 통해 3주 간격으로 2회 백신접종(1×10^9 cfu/dose/0.5 mL)을 실시하였으며, 대조군은 PBS만을 투여하였다. 2차 백신접종 2주 후, 모든 닭에서 혈액을 채취한 뒤 고병원성 야생주 SE B01271을 사용하여 경구로 공격접종(1×10^8 cfu/dose/0.5 mL)을 실시하였다. 공격접종 2주 후, 모든 닭에서 혈액을 채취하여 항체 역가의 변화를 확인하기 위해 아래의 방법으로 microplate agglutination test(MAT)를 실시하였다. MAT용 항원은 SE B01277를 tryptose phosphate broth(TPB; Difco)에 접종하여 37°C에서 진탕 배양한 후

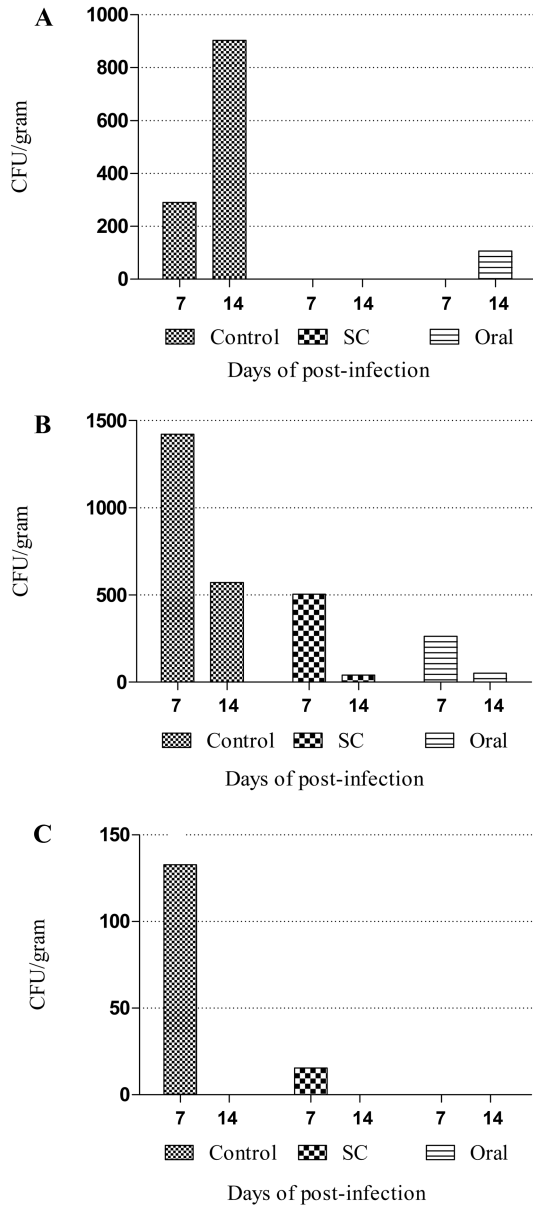


Fig. 2. Recovery of SE mutant *ppk::ts-3* from three organs of vaccinated chickens. Results are shown as mean CFU per gram of cecal contents (A), spleen (B) and liver (C). Control; unvaccination, SC; subcutaneous injection, Oral; Oral injection.

3 변이주 접종군은 양성항체가 나타났으며, 평균 4.0으로 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 나타냈다($p < 0.001$). 70 dpi에는 모든 군에서 양성항체를 확인할 수 있었다. 그 중 SE*ppk::ts-3* 변이주를 접종한 군이 6수 중 1수가 음성(16%), 나머지 5수는 양성(84%) 항체를 나타내며 가장 높은 값의 항체가(5.6 ± 3.6)를 보였으며, 다음으로 무접종 대조군(5.1 ± 2.3), SE277*ts-1*(3.2 ± 3.5) 순으로 높은 항체를 나타냈다.

SE 공격접종에 대한 방어능 조사

최종 선별된 SE*ppk::ts-3* 변이주를 대상으로 공격접종 군주 SE B01271에 대한 닭에서의 방어능을 조사하였다(Fig. 2).

Table 4. Effect of cross-protection against *S. Gallinarum*

Vaccine	Route	Survivor rate (%)
SE <i>ppk::ts-3</i>	SC	6/9 (67)
SE killed vaccine	IM	6/9 (67)
SG 9R	SC	4/5 (80)
Unvaccination	-	0/5 (0)

SC; subcutaneous injection, IM; intramuscular injection.

접종경로별 방어효과를 보기 위해 경구접종(1×10^9 cfu/dose/0.5 mL)군과 피하접종(1×10^9 cfu/dose/0.5 mL)군으로 나누었으며, 백신접종 후 2주 뒤 경구로 공격접종(1×10^8 cfu/dose/0.5 mL)을 실시하였다. 공격접종 7일과 14일 후 장기별 집락수(cfu/g)를 조사한 결과 무접종 대조군이 맹장 내용물에서 각각 2.9×10^2 과 9.0×10^2 cfu를, 비장에서는 1.4×10^3 과 5.7×10^2 cfu를, 그리고 간에서는 1.3×10^2 과 0 cfu를 나타냈다. 반면에 변이주를 접종한 군은 접종경로에 상관없이 공격접종 7일과 14일에 모두 무접종 대조군에 비해 매우 낮은 수준의 장기별 집락수를 나타냈으며, 특히 간과 맹장에서는 공격접종군의 검출이 거의 일어나지 않았다. 또한 공격접종 14일에는 7일과 비교하여 공격접종 군주의 장기별 집락수가 감소하는 경향을 보였다. 한편, 접종경로별 차이는 경구접종군에서 검출되는 집락수가 피하접종군보다는 다소 낮은 것으로 나타났다.

SG 공격접종에 대한 생균백신의 교차 방어효과

3~4주령의 갈색 산란계 28수에 대하여 SE*ppk::ts-3* 변이주, SE 불활화백신 [17], SG 생균백신(9R) 그리고 무접종 대조군을 대상으로 SG에 대한 교차 방어효과를 보기 위해 폐사율을 조사하였다(Table 4). 백신접종 후 3주 뒤 고병원성의 SG 야생주를 이용하여 공격접종(1.07×10^8 cfu/dose/mL)을 실시하고 2주간 관찰한 결과 무접종 대조군은 5수 모두 폐사한 것에 반해 SG 생균백신(9R) 접종군은 5수 중 4수가 생존하여 80%의 생존율을 보였으며, SE*ppk::ts-3* 변이주 접종군과 SE 불활화백신 접종군은 각각 9수 중 6수가 생존하여 67%의 생존율을 나타냈다. 비록 SG 9R에 비해 방어력은 다소 떨어지나 SE*ppk::ts-3* 변이주가 SG 9R 생균백신을 기준으로 84%의 높은 방어율을 나타내 고병원성의 SG 야생주에 대한 교차방어가 있는 것을 확인하였다.

고찰

살모넬라에 대한 백신은 불활화 백신과 특정성분(OMP, LPS 등)을 추출하여 제조한 서브유닛 백신이 있으며, 자연적으로 변이된 비병원성균 또는 인위적으로 병원성과 관련된 특정 유전자 부분을 제거하거나 다른 유전자로 대체 및 삽입하여 병원성을 상실한 균주로 만든 생균백신이 있다 [9]. 생균백신은 불활화백신 접종 시 다소 충분히 유도하지 못하는 세포성 면역반응을 유도할 수 있어 통성 세포 내 기생세

균인 살모넬라의 예방에는 더 없이 좋은 장점을 확보하고 있다 [2, 18]. 살모넬라를 대상으로 제작한 온도감수성 변이주는 공격접종에 대해 효과적인 방어능을 나타냈으며 [13], ppk 변이주는 운동성이 저하되어 전신성 감염을 일으킬 수 없기 때문에 백신후보주로 적합하다 [22]. 따라서 본 연구에서는 온도감수성과 ppk 결손을 모두 가지는 SE 이중변이주를 제작하여 쥐에서 방어능 조사와 닭에서의 면역원성을 조사하였다.

쥐에서 공격접종 균주에 대해 가장 우수한 방어효과를 나타낸 SE277ts-1, SEppk::ts-3 변이주를 선발하였으며, 이 균주를 대상으로 닭에서의 면역원성을 시험하였다. 그 결과 모든 구간에서 SEppk::ts-3 변이주를 접종한 군이 가장 높은 항체가를 나타냈으며, 특히 2차 접종 2주 후에는 무접종 대조군에 비해 유의성 있는 높은 항체가를 나타냈다($p < 0.001$). 일반적으로 생균백신의 경우 양성항체가를 나타내야 백신접종의 효과를 간접적으로 측정할 수 있다. 하지만 공격접종 균주에 의해 형성된 항체가인지, 변이주에 의한 항체가인지는 본 실험에서는 구별할 수 없었다. 아울러 단순한 온도감수성 변이주의 경우 병원성 복귀가능성도 있기 때문에 최종적으로 SEppk::ts-3 변이주를 백신 후보주로 선발하였다.

선발된 SEppk::ts-3 변이주를 접종한 닭에서의 공격접종에 대한 방어능을 조사한 결과 간, 비장 및 맹장에서 대조군에 비해 효과적인 방어효과를 나타냈다. 특히 비장을 제외한 간과 맹장에서는 공격접종 균주의 검출이 거의 일어나지 않았다. 이는 온도감수성과 dam 결손의 특성을 모두 가진 SE 이중변이주를 접종한 쥐에서 공격접종 균주에 대해 높은 방어효과를 나타낸 이전의 보고와 유사한 결과이다 [14]. 또한 닭을 대상으로 SEppk::ts-3 변이주 접종에 대한 SG 교차방어 조사 결과 SG 9R 생균백신에 비해 비교적 우수한 방어효과를 나타냈다. 한편, SE와 함께 사람에게 식중독을 일으키는 ST에 대한 교차방어 효과 또한 시험해 볼 필요가 있다. 이처럼 최종 선발된 SEppk::ts-3 변이주는 기존에 보고되지 않은 새로운 변이주로서 생균백신으로 사용하기 위해 추가적으로 안전성 시험과 야외 실증시험 등이 필요할 것으로 판단된다.

본 연구는 국내에서 계란 또는 계육 등의 축산식품을 통해 일어나는 식중독의 주요 원인균인 SE의 예방기술 개발과 더불어 가금티푸스의 원인균인 SG를 동시에 예방할 수 있는 생균백신을 개발하고자 하였다. 그 결과 쥐와 닭을 대상으로 SE야생주에 대해 가장 우수한 방어효과를 보이며, SE와 SG를 교차방어 할 수 있는 SEppk::ts-3 변이주를 국내에서 유행하고 있는 SE의 감염에 대해 효과적으로 방어할 수 있는 예방 백신균주로 사용할 수 있으리라 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업과 강원대학교 동물의학종합연구소의 기술지원으로 이루어진 것입니다.

References

1. **Almogren A, Shakoor Z, Adam MH, Gadelrab MO, Musa HA.** Modifications influencing Widal test reactivity in a novel microplate assay. *Pol J Microbiol* 2012, **61**, 137-142.
2. **Ashraf S, Kong W, Wang S, Yang J, Curtiss R 3rd.** Protective cellular responses elicited by vaccination with influenza nucleoprotein delivered by a live recombinant attenuated *Salmonella* vaccine. *Vaccine* 2011, **29**, 3990-4002.
3. **Babu U, Dalloul RA, Okamura M, Lillehoj HS, Xie H, Raybourne RB, Gaines D, Heckert RA.** *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 2004, **101**, 251-257.
4. **Blondel CJ, Yang HJ, Castro B, Chiang S, Toro CS, Zaldívar M, Contreras I, Andrews-Polymenis HL, Santiviago CA.** Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum and Enteritidis. *PLoS One* 2010, **5**, e11724.
5. **Chacana PA, Terzolo HR.** Protection conferred by a live *Salmonella* Enteritidis vaccine against fowl typhoid in laying hens. *Avian Dis* 2006, **50**, 280-283.
6. **Chaudhari AA, Jawale CV, Kim SW, Lee JH.** Construction of a *Salmonella* Gallinarum ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens. *Vet Res* 2012, **43**, 44.
7. **Cho YJ, Kang ZW, Kang KS, Jeong SH, Yoon HJ, Suh SW, Hahn TW.** Efficacy and clinical trials of Salenvac-T, bivalent killed vaccine containing *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. *Korean J Vet Res* 2013, **53**, 43-48.
8. **Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE.** Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis aroA* live oral vaccine candidate. *Infect Immun* 1994, **62**, 4747-4754.
9. **Desin TS, Köster W, Potter AA.** *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 2013, **12**, 87-96.
10. **Dórea FC, Cole DJ, Hofacre C, Zamperini K, Mathis D, Doyle MP, Lee MD, Maurer JJ.** Effect of *Salmonella* vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**, 7820-7825.
11. **Feberwee A, Hartman EG, de Wit JJ, de Vries TS.** The spread of *Salmonella* gallinarum 9R vaccine strain under field conditions. *Avian Dis* 2001, **45**, 1024-1029.
12. **Gantois I, Ducatelle R, Timbermont L, Boyen F, Bohez L, Haesebrouck F, Pasmans F, van Immerseel F.** Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac[®] E and TAD *Salmonella* vac[®] T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 2006, **24**, 6250-6255.
13. **Gherardi MM, Gómez MI, García VE, Sordelli DO, Cerquetti MC.** *Salmonella enteritidis* temperature-sensitive mutants protect mice against challenge with virulent *Salmonella* strains of different serotypes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000, **29**, 81-88.
14. **Giacomodonato MN, Sarnacki SH, Caccuri RL, Sordelli DO, Cerquetti MC.** Host response to a dam mutant of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a temperature-

- sensitive phenotype. *Infect Immun* 2004, **72**, 5498-5501.
15. **Hennessy TW, Cheng LH, Kassenborg H, Ahuja SD, Mohle-Boetani J, Marcus R, Shiferaw B, Angulo FJ.** Egg consumption is the principal risk factor for sporadic *Salmonella* serotype Heidelberg infections: a case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 2004, **38** (Suppl 3), S237-243.
 16. **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 *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. *J Vet Med Sci* 2009, **71**, 1433-1438.
 17. **Kang ZW, Won HK, Kim EH, Noh YH, Choi HW, Hahn TW.** Protective effects and immunogenicity of *Salmonella* Enteritidis killed vaccine strains selected from virulent *Salmonella* Enteritidis isolates. *Korean J Vet Res* 2011, **51**, 21-28.
 18. **Li Y, Wang S, Xin W, Scarpellini G, Shi Z, Gunn B, Roland KL, Curtiss R 3rd.** A *sopB* deletion mutation enhances the immunogenicity and protective efficacy of a heterologous antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* vaccines. *Infect Immun* 2008, **76**, 5238-5246.
 19. **Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Babak V, Rychlik I.** SPII defective mutants of *Salmonella enterica* induce cross-protective immunity in chickens against challenge with serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine* 2013, **31**, 3156-3162.
 20. **McMeechan A, Lovell MA, Cogan TA, Marston KL, Humphrey TJ, Barrow PA.** Inactivation of *ppk* differentially affects virulence and disrupts ATP homeostasis in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Gallinarum. *Res Microbiol* 2007, **158**, 79-85.
 21. **Nyeleti C, Cogan TA, Humphrey TJ.** Effect of sunlight on the survival of *Salmonella* on surfaces. *J Appl Microbiol* 2004, **97**, 617-620.
 22. **Rashid MH, Rao NN, Kornberg A.** Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J Bacteriol* 2000, **182**, 225-227.
 23. **Schmieger H.** Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* 1972, **119**, 75-88.
 24. **Simon R, Tennant SM, Galen JE, Levine MM.** Mouse models to assess the efficacy of non-typhoidal *Salmonella* vaccines: revisiting the role of host innate susceptibility and routes of challenge. *Vaccine* 2011, **29**, 5094-5106.
 25. **Stepanova H, Volf J, Malcova M, Matiasovic J, Faldyna M, Rychlik I.** Association of attenuated mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with porcine peripheral blood leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 2011, **321**, 37-42.
 26. **Upadhyaya I, Upadhyay A, Kollanoor-Johny A, Darre MJ, Venkitanarayanan K.** Effect of plant derived antimicrobials on *Salmonella* Enteritidis adhesion to and invasion of primary chicken oviduct epithelial cells *in vitro* and virulence gene expression. *Int J Mol Sci* 2013, **14**, 10608-10625.
 27. **Wigley P, Hulme S, Powers C, Beal R, Smith A, Barrow P.** Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. *BMC Vet Res* 2005, **1**, 2.