

Kanatlı *Salmonella* Aşılarına Farklı Perspektiften Bakış

Elçin GÜNAYDIN¹

¹ Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara, Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara

Özet: *Salmonella* infeksiyonlarından korunmada aşılama oldukça güçlü bir araçtır. Daha etkili ve daha güvenli *Salmonella* aşılarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. *Salmonella* virulensinin genetiği hakkında elde edilen bilgiler ve modern rekombinant DNA teknolojisi; çoklu, belirlenmiş, attenüe ve irreversible mutasyonların bakteri genomu içerisine dahil edilmesi gerekliliği üzerinde durmaktadır. Bu genler bakteriyel yapısal komponentlerin (Lipopolisakarit; LPS, dış membran proteini; outer membran proteini, OMP) veya temel metabolitlerin (aromatik aminoasit, purin, primidinhistidin) biyosentezinden sorumlu olan 'house-keeping genes' olarak adlandırılan genlerdir. *Salmonella*'nın konak içinde hayatta kalabilmesini sağlayan çok sayıda gen identifiye edilmiştir. Bu genlerde meydana getirilen mutasyonlarla yeni aşı suşları denenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Salmonella*, mutasyon, aşı suşu.

View at Poultry *Salmonella* Vaccines with Different Perspective

Abstract: Vaccination is a powerful tool for the protection of *Salmonella* infections. There is a need to develop more effective and more reliable *Salmonella* vaccines. The knowledge achieved about the genetics of *Salmonella* virulence and modern recombinant DNA technology dwell upon a subject of the necessity of inserting multiple, specified, attenuated and irreversible mutations into the bacterial genome. These genes, responsible for biosynthesis of bacterial basic structural components (Lipopolisaccharide; LPS, outer membran protein; OMP) or basic metabolites (aromatic aminoasit, purin, primidinhistidin) are termed as house-keeping genes. Many genes, eliciting survival of *Salmonella* into the host were identified. New vaccine strains were experienced by the mutations achieved in the genes.

Key words: *Salmonella*, mutation, vaccine strain.

Giriş

Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonlarına neden olan *Salmonella* serovarları konakçı-bağımlı ve konakçı-bağımsız serovarlar olmak üzere 2 başlık altında değerlendirilir. Kanatlılarda, *Salmonella* infeksiyonlarına karşı etkili koruyucu önlemlerin alınması öncelikle *Salmonella* salgınlarının izlerini sürmekle başarılıdır. İngiltere ve Kuzey Amerika'da *Salmonella* insidensinin rapor edildiği dökümanlar 1930'lu yıllarda başlamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1935 yılında *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum (*Salmonella* Pullorum) infeksiyon düzeyini azaltmak için oluşturulan 'Ulusal Kanatlı Koruma Programı' boyalı antijenle aglutinasyon ve tam kan testi kanatlı sürülerinde isteğe bağımlı olarak geniş kapsamlı olarak kullanılmıştır (BÄUMLER ve ark., 2000). Eş zamanlı olarak, kimi Avrupa ülkelerinde de benzer koruma kontrol programları uygulanmıştır. 'Ulusal Kanatlı koruma Programı 1954 yılında Kanatlı Tifosu etkeni olan *Salmonella* Gallinarum'u da içine alacak şekilde değiştirilmiştir. Bu iki *Salmonella* biyotipi (Pullorum ve Gallinarum) aynı

serovara ait oldukları için *Salmonella* Pullorum pozitif hayvanların imhası tifo insidensini de etkin bir biçimde düşürmüştür. Böylelikle 1960-1970'li yıllarda *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum İngiltere ve ABD'de ticari kanatlı sürülerinden elimine edilmiştir. 1900'lerin başında, insan *Salmonella* Enteritidis infeksiyonları kanatlılarla ilişkilendirilmemiş, bu patojenin tek bilinen hayvan rezervuarının rodentler olduğu düşünülmüştür (BÄUMLER ve ark., 2000; WOLFGANG ve ark., 2000). 1930'larda monitoring çalışmaları başladığında etkenin ortaya konulamaması ve kanatlıların 1960'lı yıllara dek bu mikroorganizma ile infekte olmaması, bu hipotezin çok geçmeden çürütülmesine neden olmuştur. Epidemiyolojik araştırmaların retrospektif analizlerinden ortaya çıkan sonuçlar *Salmonella* Enteritidis'in neden olduğu insan salmonellosis epidemilerinin, avian *Salmonella* Pullorum ve *Salmonella* Gallinarum'un boşalttığı ekolojik boşluğu *Salmonella* Enteritidis'in doldurması sonucu şekillendiğini göstermiştir (BÄUMLER ve ark., 2000; WOLFGANG ve ark., 2000). Retrospektif analizler *Salmonella*

Enteritidis'in kanatlı sürülerine girişinin 1960'larda olduğunu ve bunun evcil kanatlılarda konakçı-bağımlı *Salmonella* patojenlerinin eradikasyonu ile çakıştığını ortaya koymaktadır. Her üç patojen ortak immunodominant yüzey antijenini paylaştığı ve dolayısıyla aynı serogrupta yer aldıkları için iki konakçı-bağımlı *Salmonella* serovarına karşı oluşan sürü immunitesi, geçtiğimiz yüzyılın ikinci yarısında *Salmonella* Enteritidis'in kanatlı sürülerindeki sirkülasyonunu engellemiştir. Bu nedendir ki; serogrup B'de yer alan *Salmonella* Typhimurium uygulanan koruma ve kontrol programlarından etkilanmemiş ve stabil bir insidensle seyretmiştir (BÄUMLER ve ark., 2000; WOLFGANG ve ark., 2000).

Salmonella infeksiyonlarının kontrolünde, etkili ve güvenilir *Salmonella* aşılarının kullanımı yönünde duyulan ihtiyaç, araştırmacıları farklı aşı suşları üzerinde çalışmaya yöneltmektedir. Virulens genlerinde oluşturulan mutasyonlarla geliştirilen aşı suşlarıyla ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (MASTROENI ve ark., 2000). Burada halihazırda kullanılan ve halen araştırmaları devam eden mutasyona uğratılmış bazı aşı suşları hakkında bilgi verilecektir.

9 R Suşu: Belirlenmemiş mutant suş *Salmonella* Gallinarum 9R'nın tavukları virulent *Salmonella* Gallinarum ve *Salmonella* Enteritidis'e karşı koruyabildiği bilinmektedir (SMITH 1956; BARROW 1991). Fakat aşı bazı tavuk ırklarında dalakta lezyonlara ve hepatitise yol açmakta ve *Salmonella* Typhimurium'a karşı koruma sağlamamaktadır (SILVA ve ark., 1981). *Salmonella* Gallinarum 9R suşu 1950'lerden beri tavuklarda canlı aşı olarak kullanılmaktadır. 9R kanatlı tifo aşısı, besinsel kalitesi düşük bir besiyerinde pasajlar yapılarak üretilmiş ve ergin tavuklarda sistemik infeksiyona karşı güçlü bir koruma sağlamıştır. 9R suşu rough bir suş olup, direkt lipopolisakkarite karşı antikor üretimini stimüle etmemektedir. Aşı suşunun bu özelliği oldukça değerlidir. Çünkü *Salmonella* enfeksiyonunun tespitinde kullanılan serotip-spesifik serum IgG varlığına dayalı serolojik testlerle interfere olmamaktadır (ZHANG-BARBER ve ark., 1999).

Dış membran proteini (Outer membran protein; Omp): OmpR regülatör sistemin bir komponentidir. OmpR temel outer membran proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu regüle

eder. Bu operon, serbest yaşam alanlarında ve hayvan barsağında *Salmonella*'nın farklı çevresel koşullara adaptasyonunu sağlar (MASTROENI ve ark., 2000). *Salmonella* Enteritidis'in infeksiyon oluşturabilmesi intestinal epiteliyal hücrelere tutunma, kolonizasyon ve invazyon yeteneğine bağlıdır. Tutunma patogenesisin birinci basamağıdır. Bakterinin tutunması kollektif olarak adhesin olarak bilinen proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu safhanın blokajı bakteriyel infeksiyonu engellemenin en etkili stratejisidir (KHAN ve ark., 2003). *Salmonella* Enteritidis'in outer membran proteinleri adjuvant ile aşı olarak kullanıldıklarında, virulent *Salmonella* suşlarına maruz bırakılan tavuklardan alınan kloakal svaplardan yapılan ölçümlerde dışkı ile saçılımın engellendiği ve yüksek antikor cevabının şekillendiği ortaya konmuştur (MEENAKSHI ve ark., 1999).

Galactose epimerase-less (galE) mutantları: Gal E mutantları, uridine diphosphate-galactose (UDP-Gal) epimerase (galE) enziminin eksikliğinden dolayı, uridine-diphosphate-glucose (UDP-Gul)'dan UDP-Gal'ı sentezleyemezler. Galaktoz, Lipopolisakkaritin ve bazı *Salmonella* serotiplerinde O-polisakkarit yan zincirinin bir komponentidir. Sonuç olarak, galE suşları galaktoz yokluğunda rough koloniler şeklinde ürerler. Eksojen olarak galaktoz sağlandığında; Salmonellalar, galactokinase ve galactose 1-P uridyl transferase enzimini kullanarak LPS molekülü içine şeker dahil ederek smooth LPS sentezleyebilirler ve bu sayede son ürün UDP-Gal oluştururlar. Fakat galE yokluğu, azalan virulensle sonuçlanan ve hücreler için toksik olan Gal-1-P ve UDP-Gal birikimine neden olmaktadır (MASTROENI ve ark., 2000). *Salmonella* Typhimurium'un canlı galE mutantları ile oral yolla aşılana ve 14 gün sonra oral yolla *Salmonella* Typhimurium'a maruz bırakılan 1 günlük civcivlerde fekal saçılımın azaldığı, kümeslerden ve kesimhanelerden alınan çevresel örneklerde *Salmonella* taşıyıcılık düzeyindeki düşüşün dikkate değer olduğu bildirilmiştir. Bu aşının, tavukların canlı ağırlık kazanımında da önemli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (WRAY ve ark., 1983).

Adenylate cyclase (Cya) ve cyclic AMP reseptör (crp) mutantları: Cya ve crp genleri; hücre yüzeyi OMP, flagella ve fimbriyanın ekspresyonunda, karbonhidrat ve aminoasitlerin transportunda ve kullanımında görev alan çok sayıda ve çe-

şitlilikteki genin ekspresyonunu regüle eder (MASTROENI ve ark., 2000). *Salmonella* Tyhimurium suşunun cya- crp mutantları ile oral immunizasyon, aşıtlı tavuklarda antikör yanıtını (IgA, IgG, IgM) ve hücrel immun yanıtı indüklemektedir (MASTROENI ve ark., 2000). Canlı attenüe cya-crp mutantları ile yapılan çalışmalarda, homolog ve heterelog suşlarla tavuklar karşı karşıya bırakıldığında tavukların gastrointestinal sisteminde visseral kolonizasyonun ve invazyonun azaldığını ortaya konmuştur. Ayrıca bu aşı yumurta üretimine herhangi bir etki yapmaksızın en az 11 ay kadar virulent homolog ve heterelog *Salmonella* suşlarının intestinal, visseral, reprodüktif ve yumurta kolonizasyonuna karşı koruma sağlamaktadır (HASSAN ve CURTIS 1994, 1997).

Aromatik bağımlı aşılarda: *Salmonella* aromatik (aro) biyosentetik yolun final ürününden para-amino-benzoic-acid (PABA) ve 2,3-dihydroxybenzoate (DHB) sentezler. Aro genlerinde mutasyon oluşturulan Salmonellalar, kültürleri yapılan makrofajlarda, memeli dokularında üreme kabiliyetlerini yitirmiştir ve birçok hayvan türü için etkili aşılardır (HOISETH ve STOCKER, 1981; FIELDS ve ark., 1986). Canlı attenüe *Salmonella* suşları, neonatal civcivlerin normal barsak mikroflorası olmadığı için, bu hayvanların alimantar bölgesine kolonize olabilmektedir. Bu durum, yaşamın ilk günleri içerisinde virulent *Salmonella* suşlarının kolonizasyonunu engellemektedir. Bu fenomene kolonizasyon-inhibisyon adı verilmektedir (BARROW ve ark., 1987; BERCHIERI ve BARROW 1990). Bu inhibitör fenomenin test edilen tüm *Salmonella* suşlarında gözlenmediği rapor edilmiştir. Bir diğer hipotez ise kullanılabilir karbon kaynakları ve elektron akseptörlerinin olmaması dolayısıyla ikinci suşun suprese olmasıdır (ZHANG-BARBER ve ark., 1997; VAN IMMERSSEL ve ark., 2002). *Salmonella* Enteritidis'in Aro mutantları kuluçkadan yeni çıkan civcivlerde ve ergin tavuklarda oldukça güvenlidir. Kuluçkadan yeni çıkan civcivlerin oral yolla aşılama sonucunda sekumda bakteri sayısında çok fazla artış olmasına rağmen, immunizasyondan bir gün sonra herhangi bir yan etkiye rastlanmadığı ve infeksiyona karşı direnç sağlandığı ortaya konmuştur (COOPER ve ark., 1992, 1994). Intramuskuler aşılama yapmadan, sadece oral aşılama sonrasında genç tavuklar virulent suşa oral ve intramuskuler olarak maruz bırakıldık-

larında bakteriyel saçılımın önemli ölçüde azaldığı ve dalak, karaciğer, ovaryum ve sekumda kolonizasyonun kaydadeğer bir şekilde gerilediği gözlenmiştir (COOPER ve ark., 1992, 1994). Oral ve intramuskuler aşı kombinasyonunun uygulaması sonrasında, genç tavuklar oral yolla *Salmonella* Enteritidis'e maruz bırakıldığında ovaryumlarda artan bir korumanın sağlandığı bildirilmiştir (BARROW ve ark., 1990). Aynı zamanda aro mutantları ile aşılama, aşıtlı tavuklara infekte tavuklardan wild-type salmonellaların geçişini engellemektedir (COOPER ve ark., 1993). *Salmonella* Gallinarum aro mutanı ile oral aşılama yapmadan sadece intramuskuler aşılama, tavukları virulent suşla oral maruz bırakılışa karşı korumaktadır. *Salmonella* Enteritidis rough aro mutantları ile immunizasyon, oral yolla virulent *Salmonella* Enteritidis'e maruz bırakılan tavuklarda zayıf koruma sağlar. Bunun sebebi henüz açıklığa kavuşmamakla birlikte rough aşı suşunun anti-O antikör oluşturmadaki yetersizliği olduğu düşünülmektedir (VAN IMMERSSEL ve ark., 2002).

DNA adenine methylase (Dam) mutantları: DNA metilasyonunun değiştirilmesine dayalı aşılarda, kanatlılarda ön *Salmonella* kontaminasyonunu azaltarak, insanlara gıda ile bulaşabilen bu patojenin potansiyel tehdit olmasını engelleyebilmektedir. DNA metilasyonu, Salmonellaları içine alan proteobakterlerin gamma alt grubundaki çok sayıda patojenin virulensinde rol alır. Virulente DNA metilasyonunun etkinliği ve koruyucu immun cevap oluşturmada, gen ekspresyonunda global regülatör olarak görev yapma kapasitesinin bir neticesidir (HEITHOFF ve ark., 1999; LOW ve ark., 2001; MAHAN ve LOW, 2001). DNA adenine methylase, *Escherichia coli* (VAN DER WOUDE ve ark., 1996) ve *Salmonella* spp.'de (NICHOLSON ve LOW, 2000) çok sayıda adhezinin üretimini ve *Salmonella* infeksiyonun şekillenmesi için gerekli olan birçok virulens geninin regülasyonunu üstlenmektedir. Bu tarz ektopik gen ekspresyonları, aşıtlı hayvanlarda görülen ve etkili immunitiyi şekillendiren çok sayıda ve çeşitlilikte antijenin üretimi ile sonuçlanabilmektedir (HEITHOFF ve ark., 1999, 2001). Bu nedenle dam aktivasyonunun denetim dışı bırakılmasının, birçok hayvanı infekte eden farklı patojenlere karşı koruyucu immun cevabı ortaya çıkarmanın bir yolu olduğu bildirilmektedir (LOW ve ark., 2001; MAHAN ve LOW, 2001). DUEGER ve

ark., (2001) 15'li gruplar halinde 30 adet kuluçkadan yeni çıkan civcivle yaptıkları çalışmada, Dam-*Salmonella* Typhimurium UK-1'e maruz bıraktıkları I. Grubun yaşadığını, II. Gruba ise Dam artı *Salmonella* Typhimurium UK-1 verdiklerinde 15 civcivden 8'inin öldüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda Dam'da oluşturulan mutasyonun *Salmonella* Typhimurium UK-1'i attenüe ettiği ortaya konmuştur. Aynı araştırmacılar Dam-*Salmonella* Typhimurium UK-1 ile aşıladıkları civcivleri *Salmonella* Typhimurium F98'e maruz bıraktıklarında, aşılı hayvanların dalak, karaciğer, bursa Fabricius, ileum, sekum ve dışkılarından yaptıkları incelemelerde *Salmonella* Typhimurium F98'e rastlamadıklarını, aşılınmayan hayvanlarda ise bu organlarda etkeni izole ettiklerini bildirirken, homolog suşa karşı koruma sağlandığını belgelemişlerdir (DUEGER ve ark., 2001).

Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase (nuoG) mutantları: Bu mutant suşla attenüasyonun mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamış olmasına rağmen; nuoG mutantlarının tek karbon kaynağı olan asetatta çok zayıf üredikleri bilinmektedir (ARCHER ve ark., 1996). NADH dehydrogenase I kompleksi, elektron transport zincirinin ilk komponentidir. Nuo mutantlarının fermente edilemeyen karbon kaynaklarından enerji ekstrete etmede wild-type suşlara göre daha az etkin olmaları attenüasyonun bir sebebi olarak gösterilmektedir. NADH dehydrogenase-I'de nuoG mutasyonu, sekumda kolonizasyonunun azalması, dalak ve karaciğerde bakteri üremesinin durmasıyla virulent *Salmonella* Gallinarum suşunu oldukça attenüe eder. Canlı nuoG mutantı ile tek doz oral immunizasyon sonrasında, virulent *Salmonella* Gallinarum'a maruz bırakılan 2 haftalık piliçlerde mortalitenin % 75'ten % 8'in altına düştüğü bildirilmiştir (ZHANG-BARBER ve ark., 1998).

Sıcaklık Duyarlı (Temperature sensitive -Ts) mutantlar: Fareler virulent *Salmonella* suşlarına oral veya intravenöz maruz bırakıldıklarında, Ts *Salmonella* suşları ile immunizasyonun, *Salmonella* antikorları ve antikor salgılayan hücrelerin sayılarında artışa yol açtığı bildirilmiştir. Ts mutantları farelerde subkutanöz olarak üreyebilmekte ve septik arthritise neden olabilmektedir. Bu bulgular; mutant suşun düşük ısının bulunduğu vücut alanlarında potansiyel üreme gösterebildiğinin delili niteliğindedir (MASTROENI ve ark., 2000). Cerquetti ve

Gherardi (2000), tavukları *Salmonella* Enteritidis E/1/3/ Ts mutantının multiple oral dozlarına maruz bıraktıkları çalışmalarında, herhangi bir hastalık tablosuna rastlamamakla birlikte sekal kolonizasyonda azalma olduğunu ve virulent *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Gallinarum'a karşı korunmanın sağlandığını ortaya koymuşlardır.

Sonuç olarak, çoklu, belirlenmiş, attenüe ve irreversible mutasyonların bakteri genomu içerisine dahil edilmesi sonucu geliştirilen aşı suşlarıyla kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonlarından korunmada anlamlı sonuçlar alınmakla beraber konuyla ilgili araştırmalar devam etmektedir.

Kaynak

1. Barrow P. (1991). *Serological analysis for antibodies to Salmonella enteritidis*. Vet Rec. 128(2), 43-4.
2. Barrow PA, Hassan JO, Lovell MA, Berchieri A, (1990). *Vaccination of chickens with aroA and other mutants of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis*. Res Microbiol. 141(7-8), 851-853.
3. Barrow PA, Tucker JF, Simpson JM, (1987). *Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with Salmonella Typhimurium gram-negative facultatively anaerobic bacteria*. Epidemiol Infect. 98, 311-22.
4. Bäuml AJ, Hargis BM and Tsoilis RM, (2000). *Tracing Origins of Salmonella outbreaks*. Science. 287, 50-52.
5. Berchieri JRA, Barrow PA. (1990). *Further studies on the inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with Salmonella Typhimurium by pre-colonization with an avirulent mutant*. Epidemiol Infect. 104 (3), 427-41.
6. Cooper GL, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE, (1992). *Vaccination of chickens with chicken-derived Salmonella enteritidis phage type 4 aroA live oral Salmonella vaccines*. Vaccine.10(4), 247-254.
7. Cooper GL, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE, (1993). *Further studies of the application of live Salmonella enteritidis aroA vaccines in chickens*. Vet Rec. 133(2), 31-36.
8. Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE, (1994). *Invasiveness and persistence of Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, and a genetically defined Salmonella enteritidis aroA strain in young chickens*. Infect Immun. 62(11), 4739-46.
9. Dueger EL, House JK, Heithoff DM, Mahan MJ, (2001). *Salmonella DNA Adenine methylase Mutants Elicit Protective Immune Responses to Homologous and Heterologous Serovars in Chickens*. Infection and Immunity 69(12), 7950-7954.
10. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F, (1986). *Mutants of Salmonella typhimurium that can not survive within the macrophage are avirulent*. Proc Natl Acad Sci. U S A. 83(14), 5189-93.

11. **Hassan JO, Curtiss III R**, (1994). *Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent Salmonella typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous Salmonella serotypes*. Infect Immun. 62(12), 5519-5527.
12. **Hassan JO and R. Curtiss III**, (1997). *Efficiency of a live avirulent Salmonella typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis*. Avian Dis. 41, 783-791.
13. **Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ**, (1999). *An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence*. Science. 284, 967-970.
14. **Heithoff DM, Enuioutina EY, Daynes RA, Sinsheimer DA, Low DA, Mahan MJ**, (2001). *Salmonella DNA adenine methylase mutants confer cross-protective immunity*. Infect. Immun. 69, 6725-6730.
15. **Hoiseth SK and Stocker BA**, (1981). *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines*. Nature. 291, 238-9.
16. **Khan MI, Fadl AA, Venkitanarayanan KS**, (2003). *Reducing colonization of Salmonella Enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins*. Journal of Applied Microbiology. 95, 142-145.
17. **Low DA, Weyand NJ, Mahan MJ**, (2001). *The roles of DNA methylation in the control of bacterial gene expression and virulence*. Infect. Immun. 69, 7197-7204.
18. **Mahan MJ, Low DA**, (2001). *DNA methylation regulates bacterial gene expression and virulence*. ASM News 67, 1-7.
19. **Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G**, (2000). *Salmonella: Immune responses and vaccines*. The Veterinary Journal. 161, 132-164.
20. **Meenakshi M, Bakshi CS, Butchaiah G, Bansal MP, Siddiqui MZ, Singh VP**, (1999). *Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with Salmonella enteritidis*. Vet Res Commun. 23(2), 81-90.
21. **Nicholson B, Low DA**, (2000). *DNA methylation-dependent regulation of pef expression in Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 35, 728-742.
22. **Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF**, (1981). *Studies on the use of 9R strain of Salmonella gallinarum as a vaccine in chickens*. Avian Dis. 25(1), 38-52.
23. **Smith H.W.** (1956). *The use of live vaccines in experimental Salmonella gallinarum infection in chickens with observations on their interference effect*. J Hyg (Lond). 54(3), 419-32.
24. **van Immerseel F, de Buck Jeroen, de Smet I, Mast J, Haesebrouck F, Du Catelle R**, (2002). *The effect of vaccination with a Salmonella Enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens*. Vaccine. 20, 3034-3041.
25. **van der Woude M, Braaten B, Low D**, (1996). *Epigenetic phase variation of thr pap operon in Escherichia coli*. Trends Microbiol. 4, 5-9.
26. **Wolfgang R, Hargis BM, Tsois RM, Kingsley RA, Hinz KH, Tschäpe H. and Bäumlner AJ**, (2000). *Competitive Exclusion of Salmonella Enteritidis by Salmonella Gallinarum in Poultry*. Emerg Infect Dis. 6, 444-449.
27. **Wray C, Sojka WJ, Pritchard DG, Morris JA**, (1983). *Immunization of animals with gal E mutants of "Salmonella typhimurium"*. Dev Biol Stand. 53, 41-6.
28. **Zhang-Barber L, Turner A.K, Barrow P.A.** (1999). *Vaccination for Control Salmonella in poultry*. Vaccine. 17, 2538-2545.
29. **Zhang-Barber L, Turner AK, Martin G, Frankel G, Dougan G, Barrow PA**, (1997). *Influence of genes encoding proton-translocating enzymes on suppression of Salmonella Typhimurium growth and colonization*. J. Bacteriol. 179(22), 7186-7190.