

## 【研究紹介】

## サルモネラの選択分離とH抗原決定法の検討

藤原 正俊<sup>1)†</sup> 田淵 博之<sup>2)†</sup> 上垣 華穂<sup>3)†</sup> 玉村 雪乃<sup>4)</sup>

1) 北海道農政部畜産振興課家畜衛生グループ (〒060-8588 札幌市中央区北3条西6丁目)

2) 北海道根室家畜保健衛生所 (〒086-0214 野付郡別海町別海緑町69)

3) 北海道網走家畜保健衛生所 (〒090-0008 北見市大正323-5)

4) 農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 (〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5)

†: 前所属: 檜山家畜保健衛生所

## はじめに

サルモネラ症防疫対策では公衆衛生ならびに家畜衛生の観点から保菌動物を摘発する必要があり、迅速かつ的確に糞便材料中の微量のサルモネラを分離することが求められる。また、サルモネラは慣例的に血清型で分類されており、その一部は監視伝染病に指定されていることから、血清型の決定(血清型別)は非常に重要であるが、免疫血清によるO抗原と2種類のH抗原(べん毛抗原)を検出する必要がある。

サルモネラの検出・分離感度の向上には選択増菌培養が必須であり、北海道の家畜保健衛生所では、選択増菌培地に液体培地であるハーナ・テトラチオン酸塩培地(HTTB: 栄研化学、東京)およびラパポート培地(RB: 栄研化学)が広く使われている。一方で、半流動の選択増菌培地がサルモネラ分離に有効であるという報告があり<sup>[1,2]</sup>、筆者らは平板の変法半流動ラパポート寒天培地(MSRA)を自作した。平板のMSRAは、培地の選択性に加え、サルモネラの運動性を利用して選択増菌する培地である。

また血清型を決定する2種類のH抗原は通常、ある割合で混在しているとされ、定法では多く発現している相を決定後、相誘導により発現が少ない相の菌を増やしてから相の決定をすることが必要である。このため、相誘導を行わなくても微量のべん毛抗原を検出できる検査法を確立すると、2つの相を同時に決定できるはずである。この考え方から、筆者らは半流動平板培地を用いるH抗

原決定法であるDisc Immuno-immobilization (DII)法<sup>[3]</sup>を応用して、新たな相誘導法を開発したことから、サルモネラの分離から血清型別までを簡便に行える手法を紹介する。

## MSRAによるサルモネラ分離の検討

半流動の選択増菌培地として市販されている変法半流動ラパポート・バシリアデイス基礎培地(SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)の組成を参考に、選択物質であるマラカイトグリーンと塩化マグネシウムを50%濃度のRBで代用し、0.3%の寒天、栄養として0.5%のカザミノ酸を加え、平板のMSRAを自作した。供試菌株として2004~2013年に檜山、網走、十勝および根室家畜保健衛生所にてサルモネラ症の家畜から分離された20血清型25菌株ならびにサルモネラと近縁な*Enterobacter cloacae*、*Citrobacter freundii*を用いて、MSRA、選択増菌培地の比較対照としてHTTBおよびRBのサルモネラ分離能を検証した。

まず、各菌株をMSRAには平板培地中央に約3,000 CFU、HTTBおよびRBには約3,000 CFU/mlを接種して増殖動態を調べた。培養温度は、*E. cloacae*が37℃でMSRA上を遊走したことから、選択性を高めるためにMSRAのみ40℃とし、HTTBとRBは37℃とした。結果は表1に示したように、*S. Abortusequi*と*S. Dublin*については全ての選択増菌培地で、*S. Choleraesuis*はHTTBで、*S. Uganda*はMSRAとRBで、それぞれ増殖を認めなかった。また、*S. Derby*はMSRA上でコロニー

連絡担当者: 藤原 正俊 農政部畜産振興課家畜衛生グループ

〒060-8588 札幌市中央区北3条西6丁目

TEL: 011-204-5441 FAX: 011-232-1064 E-mail: fujihara.masatoshi@pref.hokkaido.lg.jp

表 1. 3,000 CFU/ml のサルモネラを接種後の MSRA 上の移動距離と HTTB および RB の菌数

菌種	株名	由来	移動距離 (直径・mm)		log CFU/ml (平均±標準誤差)		
			MSRA 24時間後	HTTB 8時間後	RB 8時間後	HTTB 24時間後	RB 24時間後
<i>C. freundii</i>	Ab-cf	豚	NG*	3.20 ± 0.14	3.21 ± 0.24	< 3	< 3
<i>E. cloacae</i>	Hi-ec	鶏	NM**	4.45 ± 0.88	3.57 ± 0.82	7.26 ± 0.25	4.04 ± 0.28
<i>S. Abony</i>	To-ab	牛	43.3 ± 7.69	3.57 ± 0.03	4.58 ± 0.48	8.39 ± 0.09	6.80 ± 0.26
<i>S. Abortusequi</i>	Ne-ae	馬	NG	< 3	< 3	3.16 ± 0.09	< 3
<i>S. Abortusequi</i>	Ab-ae	馬	NG	< 3	< 3	3.53 ± 0.31	< 3
<i>S. Choleraesuis</i>	Ab-ch	豚	48.3 ± 6.44	3.48 ± 0.11	4.98 ± 0.51	3.52 ± 0.10	7.48 ± 0.04
<i>S. Derby</i>	To-de	豚	NM	4.49 ± 0.44	4.07 ± 0.23	8.35 ± 0.06	7.54 ± 0.03
<i>S. Dublin</i>	Ab-du	牛	NG	3.15 ± 0.19	< 3	3.37 ± 0.19	< 3
<i>S. Dublin</i>	To-du	牛	NG	< 3	< 3	3.58 ± 0.26	< 3
<i>S. Enteritidis</i>	Ab-en	牛	60.3 ± 2.33	3.70 ± 0.10	3.76 ± 0.16	8.46 ± 0.09	6.92 ± 0.19
<i>S. Enteritidis</i>	To-en	牛	22.7 ± 0.33	5.90 ± 0.18	4.38 ± 0.4	8.42 ± 0.06	7.50 ± 0.07
<i>S. Isangi</i>	To-is	鶏	54.7 ± 6.06	4.68 ± 0.29	5.06 ± 0.09	8.52 ± 0.11	7.61 ± 0.03
<i>S. Kedougou</i>	Ne-ke	牛	66.7 ± 6.69	4.88 ± 0.36	4.08 ± 0.25	8.17 ± 0.14	7.21 ± 0.15
<i>S. Livingstone</i>	Ab-li	豚	78.3 ± 2.73	5.95 ± 0.39	5.79 ± 0.26	8.51 ± 0.03	7.53 ± 0.05
<i>S. Mbandaka</i>	Ne-mb	牛	65.0 ± 2.65	4.71 ± 0.42	5.40 ± 0.03	8.52 ± 0.11	7.58 ± 0.08
<i>S. Montevideo</i>	To-mo	牛	52.7 ± 4.48	5.24 ± 0.20	5.60 ± 0.29	8.33 ± 0.03	7.5 ± 0.06
<i>S. Newport</i>	To-ne	鶏	48.0 ± 1.15	4.21 ± 0.60	4.50 ± 0.59	8.20 ± 0.18	7.03 ± 0.06
<i>S. Paratyphi B</i>	Ne-pb	牛	26.3 ± 3.18	5.42 ± 0.67	4.95 ± 0.11	8.41 ± 0.09	7.45 ± 0.06
<i>S. Ruiru</i>	Ne-ru	牛	62.0 ± 1.00	3.56 ± 0.02	5.31 ± 0.16	8.36 ± 0.08	7.48 ± 0.07
<i>S. Saintpaul</i>	Ne-sa	牛	41.0 ± 3.00	4.37 ± 0.29	4.05 ± 0.31	8.43 ± 0.07	7.10 ± 0.30
<i>S. Schwarzengrund</i>	Ne-sc	牛	>90	4.83 ± 0.47	5.14 ± 0.14	8.58 ± 0.09	7.56 ± 0.06
<i>S. Senftenberg</i>	Ne-se	牛	84.3 ± 3.18	4.71 ± 0.67	5.61 ± 0.20	8.51 ± 0.05	7.39 ± 0.20
<i>S. Typhimurium</i>	Ab-ty	豚	57.3 ± 2.33	3.80 ± 0.20	3.62 ± 0.03	8.40 ± 0.18	7.30 ± 0.08
<i>S. Typhimurium</i>	Hi-ty	鳩	35.7 ± 0.67	3.96 ± 0.23	3.52 ± 0.06	8.01 ± 0.37	7.28 ± 0.09
<i>S. Uganda</i>	To-ug	牛	NG	3.65 ± 0.33	3.23 ± 0.58	7.26 ± 0.29	< 3
<i>S. 4:i:-</i>	Ab-4i	鶏	54.0 ± 2.65	4.95 ± 0.55	4.74 ± 0.20	8.15 ± 0.31	7.44 ± 0.03
<i>S. 4:i:-</i>	Hi-4i	牛	69.0 ± 2.08	4.22 ± 0.22	5.10 ± 0.15	7.70 ± 0.18	6.91 ± 0.20

\*NG: 増殖せず

\*\*NM: 遊走せず

を形成したものの、遊走を認めなかった。この *S. Derby* 株は SIM 培地においても運動を認めなかったことから、べん毛を発現しているが運動能を欠失している株と考えられた。

次に牛、豚、鶏の糞便に添加した菌の各培地における分離能を調べた。接種後 8 時間で増殖を開始している誘導期が短い株 (*S. Livingstone*)、誘導期が長い株 (*S. Typhimurium* Ab-ty) および静止期の菌数が少ない株 (*S.*

4:i:-Hi-ty) を一定菌量添加した糞便 0.1 g を、4 分画シャーレに作成した平板の MSRA の各分画と、5 ml の HTTB および RB に接種して上記温度で培養した。24 時間後、サルモネラ の分離状況について、選択分離培地の ES サルモネラ 寒天培地 II (栄研化学) で確認した。結果は表 2 に示すとおりで、静止期の菌数が最も少ない 4:i:- で分離率が低かった。選択増菌培地別に見ると、MSRA が最も高感度にサルモネラを分離できた。

表2. 各種選択増菌培地における牛、豚および鶏糞に添加したサルモネラの分離状況

サルモネラ株と 添加量	3 試験中サルモネラが分離された試験数 (うち、選択分離培地でサルモネラが優勢であった試験数)								
	牛			豚			鶏		
	MSRA	HTTB	RB	MSRA	HTTB	RB	MSRA	HTTB	RB
<b>S. Livingstone</b>									
Ab-li									
8	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (2)	2 (2)	3 (1)	3 (3)
78	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (2)	3 (3)
780	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3)
7,800	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
78,000	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
<b>S. Typhimurium</b>									
Ab-ty									
8	3 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	2 (0)	3 (3)	3 (2)	1 (1)
82	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (1)	3 (3)	3 (3)	3 (2)
820	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (1)	3 (3)	3 (3)	3 (2)
8,200	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
82,000	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
<b>S. 4:i:-Hi-4i</b>									
7	3 (3)	3 (3)	3 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	2 (2)	1 (0)	0
73	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2 (0)	3 (3)	3 (2)	3 (1)
730	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	3 (1)
7,300	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	3 (1)
73,000	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	3 (2)
サルモネラ 無添加	0	0	0	0	0	0	0	0	0

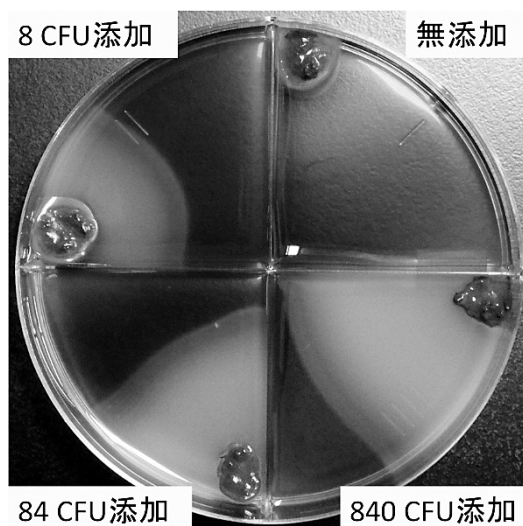


図1. S. Livingstoneを添加した牛糞便の4分画シャーレ平板MSRAでの培養結果  
サルモネラ添加牛糞便では菌の遊走が確認される。

MSRAではサルモネラを疑う菌を遊走で判断するため、菌の増殖は目視で明らかであることから、サルモネラ分離陰性の判断には選択分離培地への継代が不要であった(図1)。さらに、HTTBおよびRBでは継代した選択分離培地上で糞便中の他の細菌と混在していたのに対し、MSRAでは全て純粋培養状にサルモネラが増殖したので、MSRAから釣菌したものを血清型別検査に供することが可能であった。

以上の結果をまとめると、RBで増殖する運動性を示すサルモネラは全てMSRAで遊走するため供試可能で、検出感度はRBよりも優れていた。しかし、S. Derbyのような非運動性のサルモネラや、MSRAで増殖せずにHTTBでは増殖した株も存在したことから、サルモネラ症を疑う検査においては、選択性の異なる2種類以上の選択増菌培地を使用することを推奨する。

## DII法によるサルモネラH抗原決定の再検討

分離したサルモネラは血清型別判定のためH抗原を決定する必要がある。従来のH抗原決定法では液体培養、免疫血清を用いた試験管凝集反応、相誘導用免疫血清と半流動培地を用いた相誘導、そして再度の液体培養と試験管凝集反応を行うなど手技が煩雑であり、さらに試験管凝集反応用と相誘導用の2種類の免疫血清が必要となる。近年は遺伝子検査によるH抗原の迅速な決定法等も報告されているが<sup>[4,5]</sup>、主要なH抗原以外については未対応であり、定法である血清学的手法に勝る検査法はない。1968年にMohitは運動平板培地と免疫血清をしみこませたろ紙ディスク（免疫ディスク）を用いて2つの相を同時に決定できるDisc Immuno-Immobilization (DII) 法を報告した<sup>[3]</sup>。DII法では1つのH抗原しか持たない単相のサルモネラは該当する免疫血清によって凝集し、完全に運動が抑制されるため、免疫ディスク周辺で流星型の無菌部が形成される。一方、2つのH抗原

を持つ複相のサルモネラでは、免疫血清に該当する相が発現している菌は凝集して遊走しないが、もう1方の相が発現している菌は影響を受けずに遊走を続けるため、半円弧状のImmuno-Immobilization (II) 線を形成する。本法は簡便な方法であるが、この報告では独自に調整した免疫血清を使用していたため、保存剤としてアジ化ナトリウムを含む市販の試験管凝集反応用を使用する免疫血清（デンカ生研、東京）を用いて再検討した。

DII法に使用する運動培地には、栄養が乏しく免疫血清に含まれる抗体量以上に菌を増殖させないこと、サルモネラのべん毛運動を促進すること、保存剤の影響を抑えること、の3つが求められる。自作したMSRAに含まれるマグネシウムはサルモネラのべん毛運動を促進し<sup>[6]</sup>、また、カザミノ酸はストレスに対し抵抗性を持たせることが知られており<sup>[7]</sup>、*S. Typhimurium*等のMSRAで遊走する菌についてはDII法に供することができた。しかし、MSRAは*S. Abortusequi*や*S. Dublin*、*S. Uganda*の増殖を抑制したため、RBの濃度を5%に

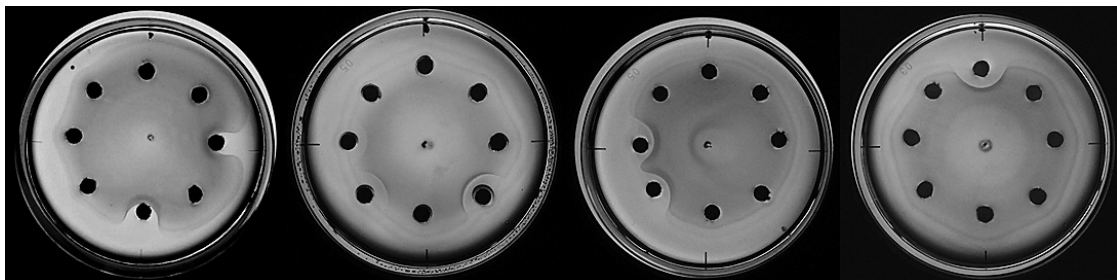


図2. DII法結果

左から *S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*、*S. Paratyphi B*、II線ディスク側より継代した *S. Paratyphi B*。免疫ディスクは上から時計回りにH-b、c、G、i、m、1、2、5を含有。該当する免疫ディスクで運動が抑制されている。一番左のシャーレ平板では流星型のII線が確認され、他の3枚のシャーレ平板では半円弧のII線が確認される。

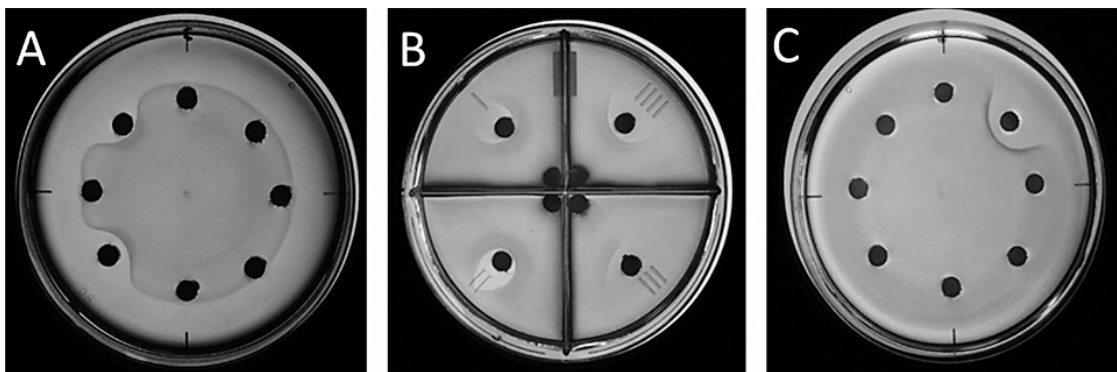


図3. *S. Choleraesuis*のDII法結果と免疫ディスク相誘導

DII法における免疫ディスクは上から時計回りにH-b、c、G、i、m、1、2、5を含有（AおよびB）。初代のDII法（A）ではH-1と5でII線を形成した。4分画シャーレ中央に菌を接種し、その上をH-1の免疫ディスクで被覆した免疫ディスク相誘導の結果（B）、左下の分画では菌の運動が完全に抑制されII線を形成し、他の3分画では菌は免疫ディスク周辺に到達している。図3-B左下の分画のII線より免疫ディスク側からDII法に継代した結果、H-cで運動が抑制されてII線を形成し（C）、相誘導が行われたことが確認される。

薄め、カザミノ酸0.1%、食塩0.36%、寒天0.3%を加えた新たなDII法用の平板の運動培地を作成した。非運動性の*S. Derby*を除いた19血清型24株を運動培地の中央に接種し、その辺縁に試験管凝集反应用到に使用する各種免疫血清(H-a、b、c、d、eh、G、i、k、L、m、en、p、r、s、t、w、x、y、z、z<sub>1</sub>、z<sub>10</sub>、z<sub>13</sub>、z<sub>15</sub>、z<sub>29</sub>、1、2、5および7) 10μlを染み込ませた免疫ディスクを静置して37°Cで培養した結果、*S. Dublin*は40時間後、*S. Abortusequi*は60時間後に、その他の株では24時間以内に、サルモネラは免疫ディスクまで到達した。非特異的な運動抑制はみられず、**図2**に示すとおり単相の血清型の株は、全て該当する免疫ディスクで無菌部が形成され、複相の血清型の株では*S. Paratyphi B*、*S. Mbandaka*、および*S. Choleraesuis*の3血清型を除いて該当する免疫ディスクでII線が形成された。*S. Paratyphi B* (4, 12 : b : 1, 2) は2相のH-1およびH-2でII線が形成されたが、1相のH-bでは形成されなかった。そこで形成されたII線よりディスク側から釣菌し、再度試験を行ったところ、H-bでII線が形成された。*S. Mbandaka* (6, 7 : z<sub>10</sub> : e, n, z<sub>15</sub>) についても2相のH-enおよびz<sub>15</sub>のみでII線が

**表 3. 各時間後の相誘導成立試験数**  
(5回の試験中、定法/免疫ディスク法における相誘導成立試験数)

S. Choleraesuis株	15時間後	24時間後	40時間後	48時間後
Ab-ch	0/0	1/2	4/4	4/4
ATCC 10708	0/4	3/5	5/5	5/5
L-2454	0/3	0/5	4/5	5/5
L-2722	0/0	0/0	4/1	5/1

形成されたが、同様に継代するとH-z<sub>10</sub>でII線が形成された。一方*S. Choleraesuis* (6, 7 : c : 1, 5) は2相のH-1およびH-5で運動が完全に抑制され、その先に遊走する菌は確認できなかった (**図3-A**)。サルモネラの相変異はhin遺伝子の逆転によって生じるが、その頻度は10<sup>-5</sup>~10<sup>-3</sup>とされており[8]、1相発現菌と2相発現菌は混在していると考えられている。*S. Paratyphi B*や*S. Mbandaka*のような相変異が生じにくく2つのH抗原の発現比が偏る株では、発現比の少ない相の凝集量が少ないためII線が確認できず、さらに発現比が偏る*S. Choleraesuis*では優勢な相が発現している菌に該当する免疫ディスクにおいて多量の菌が凝集し、これが障壁となって極少数のもう1つの相が発現している菌はディスクに向かって遊走できなかったと考察された。

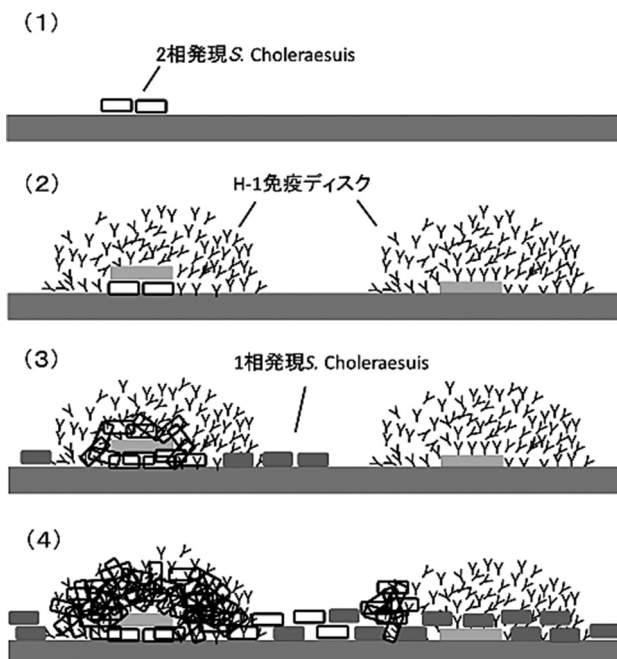
以上のことからDII法は、多くの場合一度に両相のH抗原を決定でき、ある程度の相誘導能を有することも判明したが、相変異が生じにくい株についてはさらなる検討が必要となった。

これまでの結果から、本試験で作成した運動培地は試験管凝集反应用到免疫血清に含まれる保存剤の影響を抑えることが判明していたため、この2つを用いた新たな相誘導法を検討した。

### 新たな相誘導法の開発

運動培地に*S. Choleraesuis*を接種した直後に免疫血清H-1を染み込ませた免疫ディスクで接種部を被覆することにより、増殖の過程で出現した相変異菌が優先的に遊走させる方法を考えた。その原理は**図4**に示すとおりで、およそ3 cm離れた場所に静置した免疫ディスクにより、相誘導の成否を確認することができる。

試験した結果、**図3-B**に示すとおり離れた免疫ディスクに菌が到達し、そこから継代した菌をDII法に供して相誘導されていることを確認した (**図3-C**)。そこで農研機構 動物衛生研究部門で保管されていた*S. Choleraesuis* 3株を加え、半流動のSIM培地と保存剤を含まない相誘導用免疫血清を用いた定法と誘導能との比



**図 4. 免疫ディスク相誘導法の原理**

(1) 2相発現の*S. Choleraesuis*を運動培地に接種。(2) 菌接種部と3 cm程度離れた所にH-1免疫ディスクを静置する。(3) 増殖の過程で1相発現菌が出現し遊走を開始する。2相発現菌は抗体に捕捉され遊走できない。(4) 優先して遊走を開始した1相発現菌は離れた免疫ディスクに到達。2相発現菌も被覆した免疫ディスクの抗体量以上に増殖すると遊走を開始するが、離れた免疫ディスクにより運動が抑制されるため、ディスク周辺から釣菌した菌は相変異した菌であると考えられる。

較を行った。その結果、誘導速度こそ劣るものの、誘導効率率は定法以上であることが判明した (表 3)。本法は免疫ディスク相誘導 (Immuno-disc phase inversion) 法と命名し、DII法に組み合わせることにより数枚の運動培地と試験管凝集反応に使用する各種免疫血清のみで供試した全てのサルモネラのH抗原を決定することが可能となり、その作業時間は極めて短く簡便であった<sup>[9,10]</sup>。

## ま と め

サルモネラ症が発生した農場では排菌動物の摘発が重要である。開発したMSRAは糞便などの共雑菌がある場合でもサルモネラの分離能に優れ、サルモネラ分離陰性の判断に定法では必要な選択分離培地への継代が不要である。さらに検出菌株がMSRAで遊走し、血清型まで判明しているサルモネラ症での農場等の検査においては該当H抗原に対応する免疫ディスクをMSRAに静置することにより、多くの場合24時間以内にサルモネラ分離の有無と同時に血清型別を行うことが可能となる。本報告で紹介した検査法は非常に簡便であり、相誘導用免疫血清が不要となり経済的であることから、今後のサルモネラ症防疫対策に係る検査・診断に大いに役立つものとする<sup>[9,10]</sup>。

## 引用文献

- [1] Goossens H, Wauters G, de Boeck M, Janssens M, Butzler J P: Semisolid selective-motility enrichment medium for isolation of salmonellae from fecal specimens, *J Clin Microbiol*, 19, 940-941 (1984)
- [2] Hine EAS, Steffen EK, Wagner JE: New semisolid agar for the detection of motile salmonellae, *J Clin Microbiol*, 26, 875-878 (1988)
- [3] Mohit B: Disc immuno-immobilization method for simultaneous typing and isolation of *Salmonella* flagellar phases, *J Bact*, 96, 160-164 (1968)
- [4] Echeita MA, Usera MA: Rapid identification of *Salmonella spp.* phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR", *Res Microbiol*, 149, 757-761 (1998)
- [5] Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita M: Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella spp.*, *J Clin Microbiol*, 42, 2581-2586 (2004)
- [6] Park SY, Pontes MH, Groisman EA: Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, 1850-1855 (2015)
- [7] Park YK, Bearson B, Bang SH, Bang IS, Foster JW: Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*, *Mol Microbiol* 20, 605-611 (1996)
- [8] Silverman M: Phase variation in *Salmonella*: genetic analysis of a recombinational switch, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 391-395 (1979)
- [9] Fujihara M, Tabuchi T, Uegaki K: Growth kinetics of *Salmonella enterica* in Hajna tetrathionate broth, Rappaport broth and modified semisolid Rappaport agar, *J Vet Med Sci*, 78, 435-438 (2016)
- [10] Fujihara M, Tamamura Y, Tabuchi T, Uegaki K: Identification and phase inversion of *Salmonella* flagellar antigens, using immuno-discs, *J Vet Med Sci*, 80, 434-439 (2018).