Středoškolská technika 2014

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Analýza protilátkové odpovědi prasat na vakcinaci proti Salmonella Typhimurium

(Analysis of antibody response of pigs to Salmonella Typhimurium vaccine)

Jan Urbásek

Gymnáziu Globe s. r. o. Bzenecká 23, Brno,

Konzultant: **MVDr. Ján Matiašovic Ph.D.**

Brno 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně, použil jsem pouze podklady (literaturu, SW atd.) uvedené v přiloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změněně kterých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Jan Urbásek

Poděkování.

Děkuji MVDr. Jánu Matiašovicovi Ph.D. za obětavou pomoc a podnětné připomínky, které mi během práce poskytoval.

ANOTACE

Cílem práce bylo ověřit, zda je možné použít měření hladiny protilátek proti fliC proteinu salmonel k detekci vakcinovaných prasat a zda vakcína založená na rfaC mutantovi *Salmonella* Typhimurium stimuluje imunitní systém prasat k produkci protilátek proti fliC. Pomocí ELISA metody byla měřena hladina protilátek u prasat vakcinovaných vakcínou připravenou z kmene *Salmonella* Typhimurium wt a kmene *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC. Bylo zjištěno, že protilátky proti fliC se u prasat tvoří po vakcinaci oběma kmeny. Tvorba protilátek proti fliC byla u zvířat vakcinovaných *Salmonella* Typhimurium wt detekována již 14 dní po vakcinaci, ale 28 dní po vakcinaci byla vysoká hladina protilátek i u zvířat vakcinovaných *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC. Sledováním hladin protilátek proti fliC proteinu je tak možné sledovat imunitní odpověď prasat na vakcinaci oběma vakcinačními kmeny.

Klíčová slova: salmonella; ELISA; fliC

Obsah **Strana**

1. Úvod……..... 7

1.1. Úvod do problematiky infekce *Salmonella* Typhimurium……..……. 7

1.2. Onemocnění a léčba……...…..……7

1.3. Diagnostika salmonelových infekcí……..…..……. 8

2. Teoretická část……...…….....….....9

2.1. *Salmonella*……..…...….…....9

2.2. Důležité antigeny Salmonel……10

2.3. Salmonelové infekce prasat……12

2.4. Protilátková odpověď prasat na infekci *Salmonella* Typhimurium..……..13

2.5. Sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat……..…..…….....13

2.6. Vakcíny…….…...…..……...13

3. Cíl práce…….…….…….....14

4. Metodika……..……..…….14

4.1. Úvod do metodiky……..14

4.2. ELISA fliC……...……..…….14

4.2.1. Potažení jamek mikrotitrační desky antigenem…….....15

4.2.2. Inkubace s vyšetřovanými séry……...…….……15

4.2.3. Přidání značených sekundárních protilátek a vývoj barevné reakce……15

4.2.4. Měřené vzorky…….……..……..17

4.2.5. Statistické vyhodnocení……...……...….17

5. Výsledky.....17

5.1. Hladiny protilátek v séru prasat po vakcinaci

Salmonella Typhimurium wt……..17

5.2. Porovnání hladin protilátek po vakcinaci…….…...…...19

6. Diskuze……21

7. Závěr……...…….22

8. Slovník pojmů…….…….…..……23

9. Literatura……..…..…….24

1. Úvod

1.1. Úvod do problematiky infekce *Salmonell*a Typhimurium

Infekce *Salmonella* Typhimurium jsou v lidské populaci a zároveň v chovech hospodářských zvířat celosvětovým problémem velkého měřítka. V rozvinutých zemích je hlavním zdrojem této infekce u člověka infekce z kontaminovaného zvířecího materiálu. Především je to možnost získání nákazy při nehygienické manipulaci s kontaminovaným syrovým masem a nedostatečná tepelná úprava masa a vajec (EFSA2008). V méně rozvinutých zemích, zejména subsaharské Afriky a jihovýchodní Asie, se *Salmonella* Typhimurium udržuje v populaci lidí i přímým přenosem z člověka na člověka (MacLennan a kol. 2008).

1.2. Onemocnění a léčba

U člověka je infekce *Salmonella* Typhimurium primárně nebezpečná především z důvodu dehydratace organizmu. Onemocnění je provázeno především intenzívními vodnatými průjmy, teplotou až horečkou a může se vyskytovat i zvracení. Nejvíce ohrožení jsou malé děti, senioři a lidi s oslabenou imunitou a těžkým onemocněním. Bakteriální průjmové infekce u těchto skupin obyvatelstva jsou často řešitelné pouze hospitalizací a v krajních případech, při oslabení organizmu, mohou vést až ke smrti. (Beneš a kol. 2009; http://www.wikiskripta.eu/index.php/Salmonelov%C3%A1_enteritida). Základem léčby salmonelových infekcí u člověka je tak léčba symptomatická. Což znamená snižování horečky, omezení zvracení a průjmů a důsledná rehydratace organizmu. Plošné užívání antibiotik při léčbě salmonelové infekce není příliš účinné a používá se pouze v těžkých případech, kdy infekce pronikne ze střeva dál do organismu (Dubanský a Drábek 2008). Při antibiotické léčbě rovněž dochází k narušení přirozené střevní mikroflóry, což může způsobit ještě větší progres choroby nebo pomalejší vyrovnání jedince s infekcí (http://www.wikiskripta.eu/index.php/Salmonelov%C3%A1_enteritida).

Nejúčinnějším bojem proti salmonelovým infekcím u lidí je především eliminace získání infekce ze zvířecího materiálu, jako je infikované maso a vejce. Toho lze docílit jednak dostatečným poučením obyvatelstva, jak při

úpravě potravin hygienicky postupovat a samozřejmě se snažit co nejvíce eliminovat výskyt infekce u zvířat.

1.3. Diagnostika salmonelových infekcí

V této práci se zaobírám problematikou diagnostiky infekce *Salmonella* Typhimurium v chovech prasat, které jsou vedle chovu drůbeže hlavním zdrojem výskytu salmonelových infekcí u lidí. V chovech drůbeže a prasat je výskyt této infekce běžný a má velký socioekonomický dopad. Ve vyspělých zemích světa se daří výskyt salmonel redukovat díky provozně-technologickým opatřením v chovech prasat a hygienickým opatřením při porážce prasat a zpracování masa, tato opatření jsou však cenově velmi nákladná. Dalším vhodným způsobem boje se salmonelovou infekcí je vakcinace zvířat. Intenzivní výzkum v oblasti vývoje salmonelových vakcín vedl k vývoji účinných vakcín proti běžným sérotypům salmonel v chovech drůbeže (Desin a kol. 2013). Jiná je situace v chovech prasat. Na trhu dnes existuje jediná salmonelová vakcína pro prasata (kmen *Salmonella* Typhimurium), která je poměrně dost účinná, avšak ne příliš využívaná. Problémem je použití živého vakcinačního kmene, který může přetrvávat v organizmu vakcinovaných prasat. Dalším problémem je nemožnost rozlišit jedince vakcinovaného a infikovaného. Použitý kmen ve vakcíně v těle očkovaného zvířete vytvoří stejné spektrum protilátek, jako u zvířete infikovaného. Proto při serologických rozborech nejsme schopni rozlišit zvíře infikované, které může mít bakterie stále v organizmu a zvíře, které má protilátky vytvořené postvakcinačně (Selke a kol. 2007). V současné době je ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. vyvíjena ve spolupráci s farmaceutickou společností Bioveta a.s. vakcína proti *Salmonella* Typhimurium v chovech prasat, která má za cíl eliminovat výše uvedené nedostatky. Cílem této práce je v rámci projektu vývoje vakcíny ověřit možnost rozšíření stávající sérologické diagnostiky salmonelových infekcí prasat.

Teoretická část

2.1. *Salmonella*

Bakterie rodu *Salmonella* z čeledi *Enterobacteriaceae* patří mezi rozšířené patogeny způsobující onemocnění chovných zvířat (prasata, skot a drůbež). Rovněž jsou jedním z hlavních původců bakteriálních střevních onemocnění u člověka. Salmonely patří do rozsáhlé skupiny bakterií označované jako Gram-negativní podle způsobu barvení metodou, který zavedl dánský bakteriolog Hans Christian Gram v roku 1884. Dělíme je na dva podruhy a to jsou *Salmonella enterica subsp. bongori* a *Salmonella enterica subsp. enterica. Salmonella enterica subsp. bongori* se vyskytuje převážně u plazů. *Salmonella enterica subsp. enterica* se běžně vyskytuje nejen u plazů, ale i u ptáků a savců. Rozdělujeme ji do přibližně 2500 sérovarů. Tyto sérovary dělíme do tří hlavních skupin:

1. sérovary způsobující systémové (tyfoidní) onemocnění - jsou specifické pro jednoho hostitele (např. *Salmonella enterica subsp. enterica* sérovar Typhi u člověka)

2. sérovary sdružené s jedním hostitelem, které způsobují onemocnění i u jiných druhů (např. *Salmonella enterica subsp. enterica* sérovar Choleraesuis u prasat)

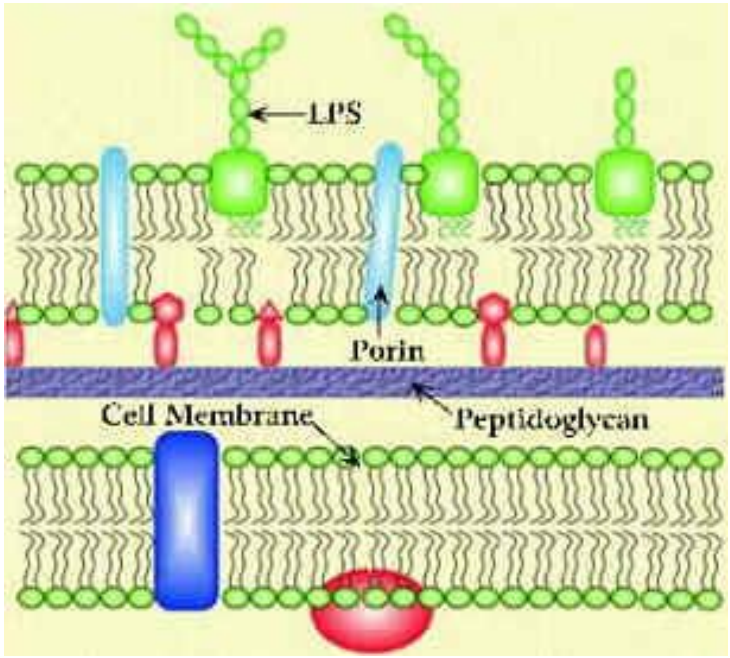
3. sérovary vzácně způsobující systémové infekce, které mají schopnost osídlovat zažívací trakt více druhů živočichů (např. *Salmonella enterica subsp. enterica* sérovar Typhimurium, *Salmonella enterica subsp. enterica* sérovar Enteritidis)

Názvy sérovarů se běžně zkracují například ze *Salmonella enterica subsp. enterica* sérovar Typhimurium na *Salmonella* Typhimurium a tento způsob označování používám i v této práci.

2.2. Důležité antigeny Salmonel

Bakteriální buňky Salmonel se skládají z množství různých látek, z nichž mnohé představují cizorodý antigen pro imunitní systém prasat. Silně imunogenní jsou zejména složky bakteriální buněčné stěny.

Buněčná stěna Salmonel se stejně jako u dalších Gram-negativních baktérií skládá z vnitřní buněčné membrány, vrstvy peptidoglykanu a vnější membrány (Obr.1). Ve vnější membráně jsou zakotveny různé imunologicky významné molekuly, například lipopolysacharidy (LPS) a proteiny.



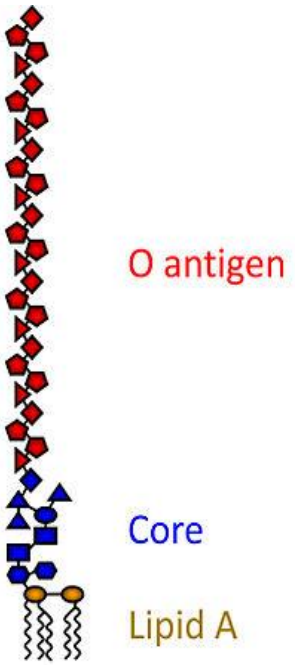
Obr. 1: Struktura buněčné stěny Gram-negativních baktérií

Zdroj: http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/04a_Gram/Gram.h25.jpg

Lipopolysacharid

Lipopolysacharid je typickou součástí bakteriální stěny Gram-negativních baktérií. Tvoří ochrannou bariéru bakteriální buňky. Je zodpovědný za mnohé negativní projevy infekce, jako je např. septický šok. Je také silným

antigenem, proti kterému se tvoří vysoké hladiny protilátek. Ve vnější stěně je ukotvený pomocí lipidu A, jinak se skládá převážně z různých typů cukrů (Obr. 2). V koncové části nazývané O-antigen se zastoupení různých druhů cukrů mezi sérovary Salmonel liší. Na různé varianty O-antigenů odpovídá imunitní systém hostitele produkcí specifických protilátek. Cílená mutace Salmonel, která inaktivuje gen rfaC, způsobí, že z celé struktury zůstane zachován pouze lipid A a kousek navazující core části (Brabetz a kol. 1997). Takoví mutanti postrádají O-antigen a nemohou se tak proti němu vytvářet protilátky. Vedlejším důsledkem je porucha stavby bičíku.



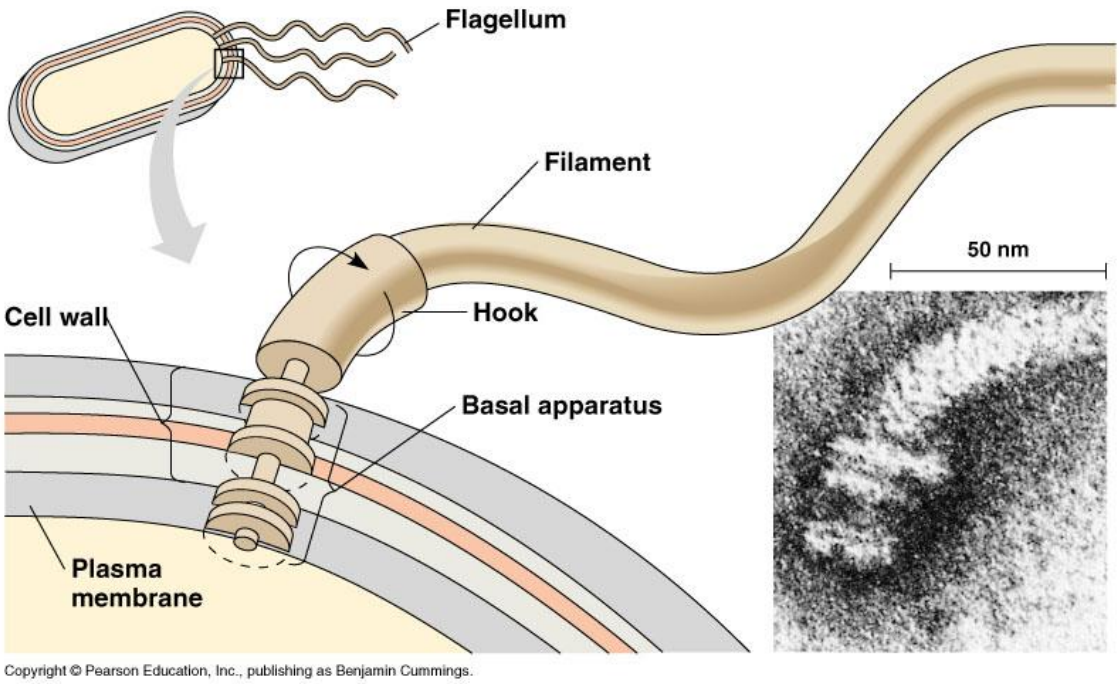
Obr. 2: Struktura lipopolysacharidu

Zdroj: http://nl.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide

Bičík

Bičík umožňuje baktériím aktivní pohyb. Představuje velmi komplikovanou strukturu složenou z mnoha různých proteinů (Obr. 3). Je zakotven v membráně a koncovou částí (filamentum) vysoko přesahuje ostatní povrchové molekuly bakteriální membrány. Filamentum je tvořeno jen jedním proteinem (fliC), který představuje pro imunitní systém infikovaného jedince

důležitý antigen. U Salmonel s mutací v genu rfaC, nezbytným pro tvorbu větší části lipopolysacharidu, dochází k poruchám sestavování bičíku a většina proteinu fliC zůstává uvnitř bakteriální buňky (Crhanova a kol 2011).



Obr. 3: bakteriální bičík

Zdroj: http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/27.7.jpg

2.3. Salmonelové infekce prasat

Nejběžnější vstupní branou infekce *Salmonella* Typhimurium je u prasat trávící aparát, zvláště poslední část tenkého střeva - ileum. Salmonely poté prochází přes mízní uzliny střeva, rozšiřují se a akumulují v organizmu a dále přetrvávají v kryptách mandlí (tonzil). Tonzily jsou tak spolu s mízními uzlinami střeva orgánem s největší pravděpodobností záchytu salmonel (Wood et al., 1989). Experimentální infekce prasat ukazují, že nejčastějšími projevujícími se příznaky jsou nechutenství, skleslost, zvracení, zvýšená teplota a průjmy až krvavá stolice. Dalším příznakem je exkrece bakterií v trusu zvířat. Úmrtnost nakažených jedinců je obecně velmi nízká (Brumme et al., 2007; Scherer et al., 2008). Infekce prasat salmonelami však často nevyvolávají zřetelné klinické

příznaky, zato jsou schopné dlouhodobé perzistence v organizmu jedince, který představuje zdroj infekce pro ostatní zvířata a potencionální zdroj kontaminace jatečných produktů během jatečného zpracování (Boyen et al., 2008).

2.4. Protilátková odpověď prasat na infekci *Salmonella* Typhimurium

Na infekci *Salmonella* Typhimurium odpovídá imunitní systém prasat produkcí protilátek třídy IgM a později i IgG. Po infekci dochází k tvorbě protilátek jak proti O-antigenům, tak i proti dalším antigenům tohoto patogena (MacLennan a kol. 2008). Komerčně dostupné ELISA soupravy jsou založeny na detekci protilátek proti povrchovým O antigenům (Szabó a kol. 2008). Přestože je známo, že ne všechna infikovaná zvířata jsou schopna dosáhnout vysokých hladin protilátek, je detekce IgG specifických protilátek spolehlivou metodou nepřímé detekce salmonel v chovu (Nielsen et al., 1995).

2.5. Sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat

Pro úspěšné zavedení jakékoli vakcíny proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica ssp. enterica* je nutné odlišení zvířat vakcinovaných od zvířat infikovaných. Po přirozené infekci prasat netyfoidními sérovary *Salmonella enterica ssp. enterica* i po vakcinaci prasat jakoukoli vakcínou obsahující O-antigeny *Salmonella enterica ssp. enterica* dochází k produkci IgG protilátek proti těmto antigenům. Zavedené sérologické metody detekce protilátek proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica ssp. enterica* u prasat jsou založeny na detekci protilátek proti O-antigenům těchto sérovarů (Szabó a kol. 2008). Dosavadní sérologické metody tak identifikují prasata vakcinovaná stejně jako prasata infikovaná.

2.6. Vakcíny

Možností jak sérologicky odlišit infikovaná prasata od prasat vakcinovaných je tvorba vakcinačních kmenů *Salmonella* Typhimurium postrádajících O-antigeny (Leyman a kol. 2011). Takto upravené vakcinační kmeny tak nemohou vyvolávat tvorbu protilátek proti O-antigenům. To umožňuje odlišit zvířata vakcinovaná od zvířat infikovaných, protože divoký kmen *Salmonella* Typhimurium tvorbu protilátek proti O-antigenům vyvolává. Na druhou stranu je nutné imunitní odpověď na vakcinaci měřit jiným způsobem. Jednou z možností je měření tvorby protilátek na proteiny salmonel, které jsou přítomny i u vakcinačních kmenů. V této práci se zabývám měřením protilátek prasat proti proteinu fliC, základní součásti bičíku *Salmonella* Typhimurium.

3. Cíl práce

Cílem práce je ověřit zda je možné použít měření hladiny protilátek proti fliC proteinu k detekci vakcinovaných prasat a zda vakcína založená na rfaC mutantovi stimuluje imunitní systém prasat k produkci protilátek proti fliC.

4. Metodika

4.1. Úvod do metodiky

Hladina protilátek proti fliC proteinu byla měřena v sérech kontrolních, nevakcinovaných prasat a prasat vakcinovaných dvěmi experimentálními vakcínami. Jedna z nich byla založena na inaktivovaném divokém kmenu *Salmonella* Typhimurium, druhá na inaktivovaném delečním mutantu *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC. Vzorky krve byly odebrány z jugulární žíly v den vakcinace, 14 dní po vakcinaci (DPV), kdy zvířata byla také revakcinovaná. Poslední odběr krve byl 28 dní po první vakcinaci. V kontrolní, nevakcinované skupině bylo 13 prasat, ve skupině vakcinované *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC rovněž 13 prasat a ve skupině vakcinované *Salmonella* Typhimurium wt 11

prasat. ELISA k detekci protilátek proti fliC v séru prasat byla zavedena v laboratoři imunologie VÚVeL v rámci předchozích experimentů. Této části experimentu jsem se nezúčastnil.

4.2. ELISA fliC

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je metoda sloužící ke zjištění hladin protilátek proti sledovanému antigenu v odebraných vzorcích. Nejprve byly jamky mikrotitrační destičky potaženy antigenem (proteinem fliC), potom byla přidána vyšetřovaná séra a nakonec bylo měřeno množství navázaných protilátek pomocí značených králičích protilátek proti prasečímu IgG.

4.2.1. Potažení jamek mikrotitrační desky antigenem

Do každé jamky mikrotitrační desky bylo napipetováno 100 µl roztoku proteinu fliC *Salmonella* Typhimurium o koncentraci 1 µg/ml. Po 16 hodinové inkubaci v chladničce byla deska 4x promyta v automatické promývačce k vymytí nenavázaného proteinu.

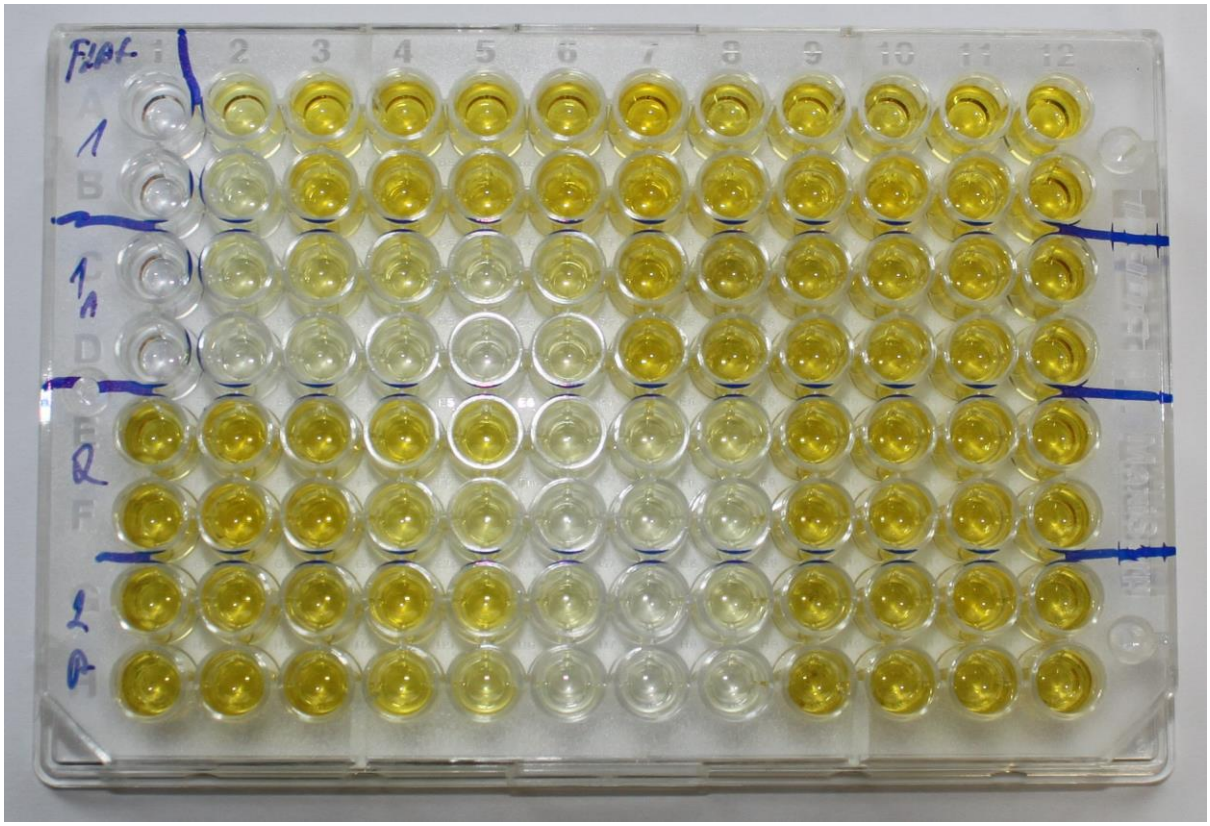
4.2.2. Inkubace s vyšetřovanými séry

Do jamek mikrotitračních destiček jsem napipetoval připravené vyšetřované sérum. Každé sérum bylo pipetované do dvou jamek, každý vzorek se tak měřil dvakrát. Při inkubaci došlo k navázání protilátek ze séra na antigen, který byl navázán na stěně každé jamky mikrotitrační destičky. Inkubace proběhla při pokojové teplotě po dobu 20 až 30 minut. Poté jsem promyl mikrotitrační destičky v automatické promývačce, aby byl odstraněn zbytek séra.

4.2.3. Přidání značených sekundárních protilátek a vývoj barevné reakce

Do mikrotitračních destiček s navázanými protilátkami prasat na antigen jsem napipetoval králičí protilátky značené křenovou peroxidázou (tzv. „konjugát“), které se při další inkubaci navázaly na protilátky prasečí. Tato inkubace trvala také 20 až 30 minut. Po inkubaci jsem znovu promyl

mikrotitrační destičky v automatické promývačce, aby byly odstraněny přebývající nenavázané králičí protilátky. Dalším krokem bylo přidání TMB substrátu pipetou do jamek destiček, kdy došlo ke katalytickému rozkladu substrátu pomocí křenové peroxidázy navázané na králičí protilátky. Tato reakce způsobila modré zabarvení jednotlivých jamek destiček. Intenzita zbarvení byla úměrná množství králičích protilátek s navázanou křenovou peroxidázou v každé jamce. Tato reakce byla po 30 minutách zastavena přidáním 0,5 M H_2SO_4. Přidání kyseliny sírové také změnilo modré zabarvení na žluté (Obr. 4). Takto připravené destičky jsem vložil do spektrometru Synergy H a při vlnové délce 450 nm proběhlo měření. Výsledky jsem poté zanesl do grafu.



Obr. 4: Mikrotitrační destička po zastavení reakce připravená k měření. Ve sloupci 1 jsou kontrolní séra bez protilátek a s protilátkami. V ostatních jamkách jsou vyšetřovaná séra. Intenzita žlutého zabarvení odpovídá množství protilátek navázaných na antigen fliC.

4.2.4. Měřené vzorky

Vyšetřovaná séra pocházela z experimentu, jak je zmíněno výše. Séra byla před měřením 300 x naředěna ředícím roztokem.

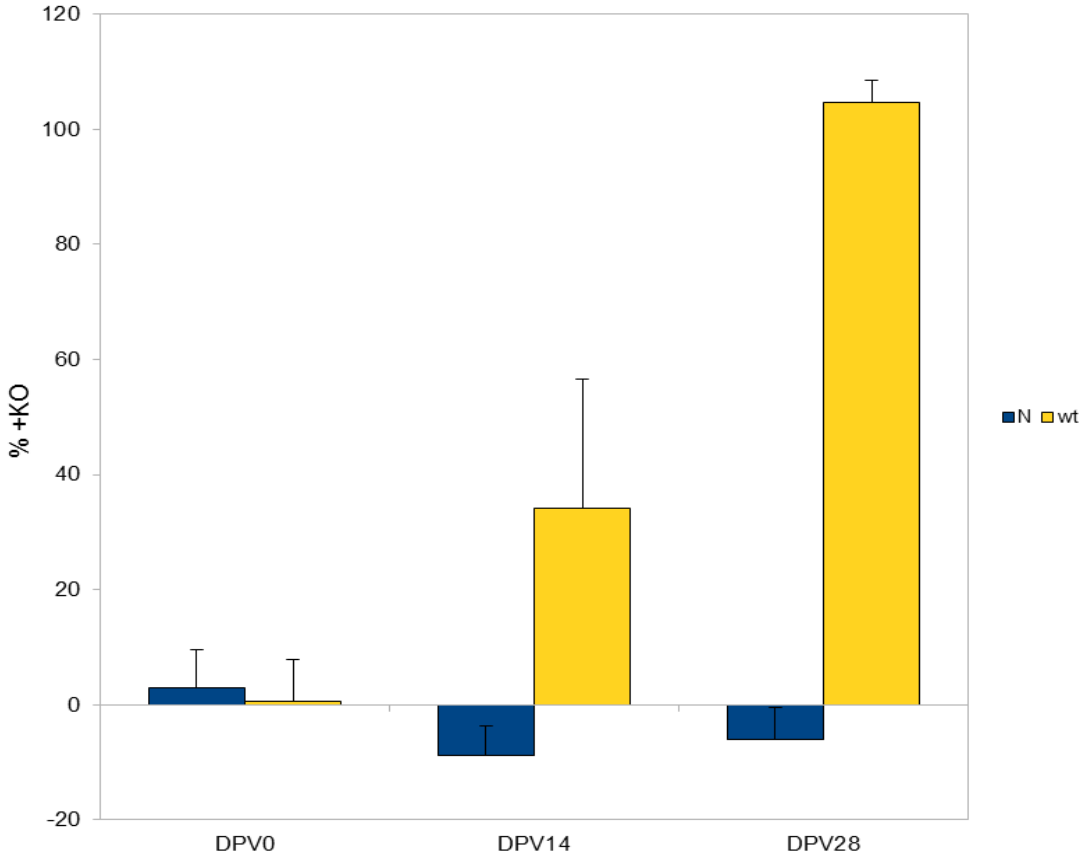
4.2.5 Statistické vyhodnocení

Změny hladin protilátek u skupiny v různých časech byly testovány pomocí ANOVA testu s opakovaným pozorováním a rozdíly mezi časy byly dále testovány Tukey testem. Rozdíly mezi skupinami v jednom čase byly testovány pomocí ANOVA testu s Bonferoniho post-testy. Hladina významnosti byla $P < 0,05$. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu GraphPadPrism5.

5. Výsledky

5.1. Hladiny protilátek v séru prasat po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt.

V den vakcinace (DPV0) byly hladiny protilátek u kontrolní skup. a skup. vakcinované *Salmonella* Typhimurium wt téměř nulové, 14 DPV hladiny protilátek u wt stoupaly a je patrný rozdíl mezi nevakcinovanými prasaty, u kterých neproběhl nárůst protilátek, a prasaty vakcinovanými *Salmonella* Typhimurium wt, u kterých se hladina protilátek pohybovala průměrně nad 38% (Graf 1). 28 DPV je již tento rozdíl markantní, protože hladina protilátek u nevakcinovaných prasat zůstala stále na nule a hladina u vakcinovaných prasat *Salmonella* Typhimurium wt se dostala ke 100% hodnoty kontrolního séra. Rozdíly v hladinách protilátek u prasat vakcinovaných *Salmonella* Typhimurium wt byly mezi DPV0, DVP14 i DPV28 statisticky významné.

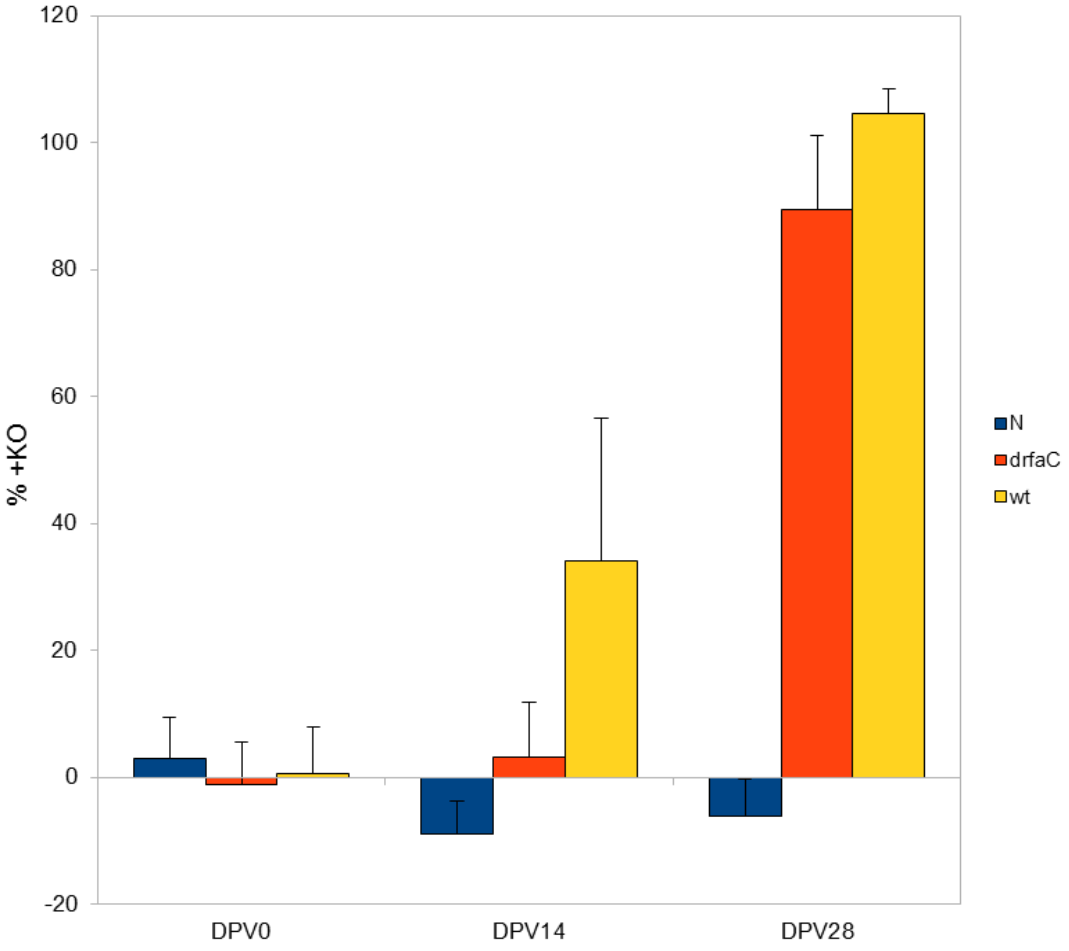


Graf 1: Hladiny protilátek v séru prasat po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt.

5.2. Porovnání hladin protilátek po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt a ΔrfaC

Porovnání hladin protilátek po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt a po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC. DPV0 byly hladiny protilátek nulové i u prasat očkovaných *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC (Graf 2). DPV 14 byl mezi skupinami patrný statisticky významný rozdíl, kdy tvorba protilátek u prasat očkovaných *Salmonella* Typhimurium wt byla kolem 38% průměrně a u prasat očkovaných *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC byla pouze na 4% průměrně. Nárůst hladiny protilátek mezi DPV0 a DPV14 nebyl u prasat očkovaných *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC statisticky významný. DPV 28 je patrný markantní nárůst protilátek u obou skupin vakcinovaných prasat. Hladina protilátek zvířat vakcinovaných *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC byla DPV28

statisticky významně vyšší oproti DPV0 i DPV14. Přestože téměř dosáhla hodnot hladiny protilátek po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt, byla DPV 28 hladina protilátek u zvířat vakcinovaných *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC statisticky významně nižší než po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt.



Graf 2: porovnání hladin protilátek po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt a vakcinaci *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC.

6. Diskuze

Kmeny salmonel s mutacemi v genech pro syntézu lipopolysacharidu jsou zkoušeny jako možné vakcinační kmeny pro přípravu vakcín k tlumení výskytu salmonel v chovech prasat (Leyman a kol. 2011). Současné metody sledování hladin protilátek proti salmonelám jsou ovšem založeny na detekci protilátek proti lipopolysacharidu (Szabó a kol. 2008). Z tohoto důvodu je nutné protilátkovou odpověď na mutanty v genech pro syntézu lipopolysacharidu měřit jiným způsobem. V práci jsem se zabýval možností detekovat imunitní odpověď na vakcinaci kmenem *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC pomocí sledování hladin protilátek proti proteinu fliC a použití tohoto postupu i po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt.

Je známo, že ΔrfaC mutant *Salmonella* Typhimurium má poruchu tvorby bičíku, ale důležitý strukturální protein bičíku fliC je shromažďován uvnitř bakteriální buňky (Crhanova a kol. 2011). Z výsledků měření hladin protilátek proti proteinu fliC je zřejmé, že u prasat po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC dochází k tvorbě protilátek proti tomuto proteinu. Proti vakcinaci *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC byla tvorba protilátek 14 dní po primovakcinaci nižší než po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt. Přestože 28 dní po vakcinaci byly hladiny protilátek po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC stále statisticky významně nižší než po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt, dosahovaly již vysokých hladin.

Možnost detekce imunitní odpovědi na vakcinaci prasat *Salmonella* Typhimurium wt i *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC měřením hladiny protilátek proti fliC proteinu rozšiřuje stávající sérologické metody a vytváří možnost použití kmenů salmonel defektních v syntéze lipopolysacharidu k přípravě vakcín.

7. Závěr

Měření hladiny protilátek proti fliC proteinu je možné použít k detekci zvířat vakcinovaných *Salmonella* Typhimurium wt i *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC. Vakcinace prasat *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC vede k tvorbě protilátek proti fliC proteinu. Oproti vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt je tvorba protilátek 14 den po primovakcinaci *Salmonella* Typhimurium ΔrfaC nižší, ale 28 den po primovakcinaci, tj. 14 den po revakcinaci, se hladina protilátek blížila hladině protilátek po vakcinaci *Salmonella* Typhimurium wt.

8. Slovník pojmů

antigen – látka vyvolávající imunitní reakci organizmu

tyfoidní – průběh onemocnění, kdy se infekce šíří celým organismem

netyfoidní – průběh onemocnění s postižením převážně jednoho orgánu (střeva)

sérovar – skupina kmenů mikrobů, které se vyznačují stejnými nebo velmi podobnými antigeny

inkubace – zde držení vzorku za definovaných podmínek po určitou dobu nutnou k průběhu reakce

wt – divoký kmen

ΔrfaC – delece (odstranění) genu rfaC

9. Literatura

EFSA Scientific Report (2008): Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs,in the EU. The EFSA Journal 2006–2007, 2008, 135:1–111.

MacLennan CA, Gondwe EN, Msefula CL, Kingsley RA, Thomson NR, White SA, Goodall M, Pickard DJ, Graham SM, Dougan G, Hart CA, Molyneux ME, Drayson MT. The neglected role of antibody in protection against bacteremia caused by nontyphoidal strains of Salmonella in African children. J Clin Invest. 2008 Apr;118(4):1553-62.

V. DUBANSKÝ, DRÁBEK J. Klinické příznaky a neobvyklé průběhy salmonelových infekcí u lidí. Veterinářství 2008;58:404-412.

BENEŠ, J., et al. Infekční lékařství. Praha : Galén, 2009

Desin TS, Köster W, Potter AA.Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. Expert Rev Vaccines. 2013 Jan;12(1):87-96.

Selke M, Meens J, Springer S, Frank R, Gerlach GF. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a Salmonella enterica serovar Typhimurium live negative-marker vaccine.Infect Immun. 2007 May;75(5):2476-83.

Brabetz W, Müller-Loennies S, Holst O, Brade H. Deletion of the heptosyltransferase genes rfaC and rfaF in Escherichia coli K-12 results in an Re-type lipopolysaccharide with a high degree of 2-aminoethanol phosphate substitution.Eur J Biochem. 1997 Jul 15;247(2):716-24.

Crhanova M, Malcova M, Mazgajova M, Karasova D, Sebkova A, Fucikova A, Bortlicek Z, Pilousova L, Kyrova K, Dekanova M, Rychlik I. LPS structure influences protein secretion in Salmonella enterica.Vet Microbiol. 2011 Aug 26;152(1-2):131-7.

Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of persistent Salmonella typhimurium infection in internal organs of swine. Am. J. Vet. Res., 1989, 50:1015–1021.

Brumme S, Arnold T, Sigmarsson H, Lehmann J, Scholz HC, Hardt WD, Hensel A, Truyen U, Roesler U. Impact of Salmonella Typhimurium DT104 virulence factors invC and sseD on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. Vet. Microbiol., 2007, 124:274–285.

Scherer K, Szabó I, Rösler U, Appel B, Hensel A, Nöckler K. Time course of infection with Salmonella typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. J. Food Prot., 2008, 71:699–705.

Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. Vet. Microbiol., 2008, 130:1–19.

Szabó I, Scherer K, Roesler U, Appel B, Nöckler K, Hensel A. Comparative examination and validation of ELISA test systems for Salmonella typhimurium diagnosis of slaughtering pigs. Int. J. Food Microbiol., 2008, 124:65–69.

Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P. The serological response to Salmonella serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. Vet. Microbiol., 1995, 47:205–218.

Leyman B, Boyen F, Van Parys A, Verbrugghe E, Haesebrouck F, Pasmans F.Salmonella Typhimurium LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs.Vaccine. 2011 Mar 15.