

Izolacja szczepów *Salmonella Typhimurium* var. *Copenhagen* od padłych gołębi i ocena ich immunogenności

BARBARA MAJER-DZIEDZIC, MICHAŁ POCHODYŁA*,
STANISŁAW TOKARZEWSKI**, ANDRZEJ POCHODYŁA***

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
*Laboratorios Hipra S.A., Av. La Selva, 13, 17170 Amer (Girona), Hiszpania
**AVI EXPERT SPWCP, ul. Gajowa 1, 20-827 Lublin
***VEPHARM, ul. Karpińskiego 7, 24-100 Puławy

Otrzymano 25.04.2014

Zaakceptowano 30.06.2014

Majer-Dziedzic B., Pochodyła M., Tokarzowski S., Pochodyła A.
**Isolation of *Salmonella Typhimurium* var. *Copenhagen* strains from dead pigeons
and evaluation of their immunogenicity**

Summary

The aim of the study was to isolate and identify the pathogen responsible for mortality in pigeons, and to choose the most immunogenic strain of *Salmonella* to prepare a vaccine. The study was conducted in two stages. The first stage consisted of isolating and identifying the strains, as well as preparing vaccine prototypes.

The material for bacteriological examination comprised samples of parenchymal organs (heart, liver, spleen), intestines, and swabs from synovial cavities. Three strains were isolated and identified as *Salmonella Typhimurium* var. *Copenhagen* by biochemical and serological tests. The isolates were used to prepare three prototype vaccines, which were combined with an adjuvant consisting of Carbomer and Ginseng extract.

In the second stage, the immunogenicity of the prototype vaccines was evaluated in 24 racing pigeons aged 6-8 weeks, which were divided into 4 experimental groups. Agglutination antibody titers in the serum of immunized birds were evaluated by the tube agglutination test at days 0, 7, 14, and 28 after vaccination. One of the three experimental vaccines generated higher agglutination titers than the others, and was selected for further testing.

Keywords: pigeons, *Salmonella Typhimurium* var. *Copenhagen*, vaccines, adjuvant

Salmonelloza jest jedną z najpoważniejszych i najczęściej diagnozowanych chorób bakteryjnych występujących u gołębi. Szacuje się, że stanowi nawet do 40% wszystkich schorzeń rozpoznawanych u tych ptaków (25). Występuje w każdej grupie wiekowej gołębi, ale największe straty (liczne upadki) dotyczą głównie piskląt i młodych osobników (6). Układ immunologiczny gołębi osiąga dojrzałość w wieku 3-4 miesięcy, dlatego salmonelloza młodych ptaków ma zwykle przebieg ostrzejszy (22). Schorzenie charakteryzuje się objawami klinicznymi o różnym nasileniu, m.in. biegunką, poliurią, kulawizną oraz utratą masy ciała i niezdolnością do lotu (25). Jest zwykle wywoływana przez specyficzny wariant *Salmonella Typhimurium* var. *Copenhagen*, pozbawiony antygeny O: 5, określanej jako „minus variant” *Salmonella Typhimurium* (O: 1, 4,12; H: i: 1, 2), a najczęściej izolowanymi podtypami są fagotypy DT 2, DT 99 i DT 104 *S. Typhimurium* var. *Copenhagen* (3, 17, 20).

Nosicielstwo bakterii *Salmonella*, a szczególnie *S. Typhimurium* jest u gołębi odnotowywane dosyć często. Ze względu na dużą liczbę ptaków wolno żyjących (w środowisku miejskim i wiejskim) i liczbę gołębi hodowlanych należy uwzględnić potencjalną rolę tej populacji w transmisji zarazki na człowieka (15). W badaniach nad stanem prewalencji bakterii *Salmonella* u gołębi wolno żyjących w środowisku wiejskim w USA, Pedersen (18) stwierdził obecność bakterii u ok. 8% badanych ptaków. Z kolei w Japonii (26) izolowano bakterie *Salmonella* od gołębi żyjących na terenach miejskich, co może sugerować również potencjalne zagrożenia dla ludzi.

Początkowo serowar *S. Typhimurium* var. *Copenhagen* izolowano wyłącznie od gołębi. Obserwacje z ostatnich lat wykazały jednak, że bakterie należące do tego serotypu stwierdzono w materiale pochodzącym od różnych gatunków zwierząt. Instytut Federalny ds. Zdrowia Ludzi i Medycyny Weterynaryjnej w Berlinie

(7) ujawnił, że po 2000 r. serowar *S. Typhimurium* var. Copenhagen był najczęściej izolowany od gołębi, ale jednocześnie stanowił połowę serowarów izolowanych od bydła i około 1/3 serowarów izolowanych od świń. Incydentalnie notowano również przypadki izolacji zarazków *S. Typhimurium* var. Copenhagen od psów, kotów, świń, cieląt oraz pojedyncze od drobiu (1). Środowisko naturalne często jest źródłem zakażenia innych gatunków zwierząt, które, podobnie jak ptaki żyjące w sąsiedztwie ludzi, są ważnym wektorem w rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych. Wprawdzie dotychczas nie odnotowano żadnego przypadku tego typu zoonozy, jednak nie można wykluczyć takiego niebezpieczeństwa i konieczności prowadzenia badań monitorujących (7).

Leczenie salmonellozy jest możliwe, jednak długotrwała terapia i ograniczona skuteczność sprawiają, że najpewniejszym sposobem zwalczania choroby u gołębi pozostają szczepienia ochronne, dlatego też bardzo istotne jest opracowanie właściwych programów profilaktycznych opartych na bezpiecznych i skutecznych biopreparatach.

Celem badań była izolacja czynnika chorobowego odpowiedzialnego za upadki gołębi, jego identyfikacja oraz wybór najbardziej immunogennego izolatu *Salmonella* celem przygotowania szczepionki.

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone w dwóch etapach. Etap pierwszy dotyczył izolacji szczepów, ich identyfikacji oraz przygotowania prototypów szczepionek. W tym celu wykonano następujące badania:

Badania bakteriologiczne. Materiał do badań bakteriologicznych stanowiły wycinki narządów mięsnych (serce, wątroba, śledziona) i jelit oraz wymazy z jam stawowych padłych gołębi. Wycinki narządów rozcierano i posiewano na podłoża bakteriologiczne służące do izolacji bakterii *Salmonella* spp., zgodnie z Polską Normą PN-EN ISO 6579:2003/ A1 (19). Do badań porównawczych użyto szczepu *S. Typhimurium*, który wyizolowano od padłej kury.

Badanie biochemiczne i serologiczne. Badanie właściwości biochemicznych wykonano przy użyciu komercyjnego testu ID 32E (BioMerieux). Wynik reakcji biochemicznej porównano z tabelą interpretacyjną dostarczoną przez producenta.

Wstępne badanie serologiczne wykonano z surowicą wieloważną, zawierającą aglutyniny przeciw antygenom rzęskowym HM. Następnie izolaty badano metodą aglutynacji szkiełkowej z użyciem surowic aglutynacyjnych zawierających przeciwciała przeciwko antygenom somatycznym O, antygenom rzęskowym H oraz antygenom Vi. Odczyn przeciw antygenom H wykonano z surowicą swoistą dla tych antygenów w pierwszej i drugiej fazie.

Badanie techniką PCR. Materiał do badań techniką PCR stanowiły 4 szczepy bakterii *Salmonella*. Trzy pochodzące od gołębi oznaczono jako 66-03, 67-03, 177-B-L, a od kury jako 68-11. Sekwencję referencyjną stanowił gen 16S rRNA *S. Typhimurium*. DNA ekstrahowano z każdej kolonii bakteryjnej i zawieszano w 50 µl 10 mM TRIS-HCl

oraz inkubowano uzyskaną zawiesinę bakterii w temperaturze 95°C przez 5 minut. Kontrolę powstawania produktu PCR przeprowadzono z zastosowaniem elektroforezy w 1% żelu agarozowym. Do sekwencjonowania użyto zestawu BigDye Terminator version 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing. Rozdział fragmentów po sekwencjonowaniu wykonano z wykorzystaniem aparatu ABI3730 Genetic Analyzer.

Primery, jakich użyto w reakcji PCR oraz w sekwencjonowaniu, zostały zaprojektowane na podstawie sekwencji genu *S. Typhimurium* 16S rRNA (GeneBank: X80681) przy użyciu programu PRIMER3.

Odczyty reakcji sekwencjonowania uzyskane dla poszczególnych prób składano w jeden kontig. Usuwanie sekwencji primerów z końców sekwencji, a następnie uzyskaną sekwencję konsensusową porównywano z bazą danych GeneBank (NCBI), używając algorytmu blastn. Graficzne porównanie złożenia otrzymanych konsensusów zostało wykonane w edytorze GeneDoc.

Prototypy szczepionek własnych. Antygeny szczepionkowe *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen zidentyfikowane jako szczepy 66-03, 67-03 oraz 177-B-L sporządzono według zmodyfikowanej metody opisanej przez Abdolvahab i Friendship (1) i połączono z adiuwantem przygotowanym według patentu nr PL P.396327.

Prototypy szczepionek zawierały inaktywowane formaliną pełne komórki *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen w ilości nie mniejszej niż 10^{9.0}CFU/1 dawkę (0,2 ml) oraz adiuwant o składzie: karbomer i ekstrakt żeń-szenia.

Jałowość kontrolowano przez posiewy na podłoża agarowe z krwią, podłoża wybiórcze XLD oraz podłoża Wrzoska, a nieszkodliwość oceniano na białych myszach, którym podano dootrzewnowo 1 dawkę szczepionki (0,2 ml) i obserwowano przez okres 7 dni.

W drugim etapie badań przeprowadzono ocenę immunogenności prototypów szczepionek własnych przygotowanych na bazie wyizolowanych szczepów i zidentyfikowanych jako *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen.

Gołębie. Badania przeprowadzono na 6-8-tygodniowych gołębiach pocztowych (24 ptaki) z prywatnych hodowli. Od ptaków przetrzymywanych w wolierach pobierano krew w celu określenia obecności przeciwciał przeciwko salmonellozie oraz kał w celu wykrycia bakterii *Salmonella*, kokcydii z rodzaju *Eimeria* oraz nicieni *Ascaridia* i *Capillaria*. Ponadto pobierano materiał z wola gołębi na obecność pierwotniaków *Trichomonas* spp. Gołębie podzielono na 4 grupy doświadczalne (po 6 gołębi), z których jedna stanowiła grupę kontrolną. Ptaki szczepiono podskórnie, podając w okolicę grzbietu szyi po 0, 2 ml preparatu.

Grupę I stanowiły gołębie immunizowane prototypem szczepionki przygotowanym na bazie szczepu 66-03. Grupa II otrzymała preparat pochodzący z izolatu 67-03, a grupa III z izolatu 177-B-L. Grupie kontrolnej (K) podano zbuforowany roztwór soli (PBS).

Wstępną ocenę immunogenności wykonano przy użyciu testu aglutynacji próbówkowej.

Aglutynacja próbówkowa. Odczyn aglutynacji wykonywano według standardowej procedury stosowanej w laboratoriach mikrobiologicznych. Antygen do odczynu stanowiła zawiesina inaktywowanych bakterii *Salmonella* Typhimurium (szczep kurzy oznaczony jako 68-11), o gę-

stości odpowiadającej w przybliżeniu standardowi 3×10^8 według skali McFarlanda. Wysokość miana przeciwciał aglutynacyjnych w surowicach gołębi oceniano po 0, 7, 14, 28 dniach po immunizacji.

W badaniach zastosowano różne warianty temperaturowe (temperatura pokojowa – 24 godziny, 37°C – 2 godziny, 4°C – 24 godziny oraz łączona 37°C – 2 godziny i 4°C – 24 godziny). Wybrano wariant optymalny, tzn. rozcieńczoną surowicę z antygenem przetrzymywano 2 h w 37°C, a później przenoszono do chłodni na 24 godziny.

Wyniki i omówienie

Od padłych gołębi wyizolowano szczepy *Salmonella*, które oznaczono jako 66-03, 67-03 oraz 177-B-L.

Badanie biochemiczne tych izolatów z wykorzystaniem komercyjnych testów ID 32E firmy BioMerieux wykazało, że należą one do podgatunku *S. enterica*. Szczepy różniły się rozkładem inozytoli i lizyny. Szczep kurzy 68-11 wykorzystany do badań porównawczych dekarboksylował lizynę, podobnie jak dwa izolaty gołębie 66-03 i 177-B-L (tab. 1).

Badanie serologiczne izolatów gołębi oznaczonych jako: 66-03, 67-03, 177-B-L oraz izolatu kurzego 68-11 wykazało ich pozytywne reakcje z surowicą wieloważną zawierającą aglutyniny przeciw antygenom rzęskowym HM. Potwierdza to przynależność wyizolowanych szczepów do rodzaju *Salmonella*. Dalsze typowanie przeprowadzone z surowicami O-swoistymi umożliwiło zaliczenie szczepów do grupy 04 (B) wg. klasyfikacji Kaufmanna-White'a. Badane szczepy izolowane od gołębi, w odróżnieniu od szczepu „kurzego” 68-11, wykazały brak składnika O: 5 antygeny somatycznego, co pozwoliło na zaklasyfikowanie ich do *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen. Kolejny test wykonany z surowicą swoistą dla badanych antygenów H w pierwszej i drugiej fazie wykazał dwufazowość antygenów rzęskowych; I faza (faza H_i) oraz II faza (H₂), co potwierdziło przynależność wyizolowanych pałeczek do serotypu Typhimurium. (tab. 2).

Badania porównawcze sekwencji gołębi izolatów (66-03, 67-03, 177-B-L) *Salmonella* sp. i izolatu kurzego (68-11) z bazą danych GeneBank (NCBI) wykazały, że wszystkie izolaty pochodzące od gołębi były zgodne z sekwencją referencyjną, którą stanowił gen 16S rRNA *S. Typhimurium* z bazy danych GeneBank (NCBI) (GeneBank: X80681). Jednonukleotydom różnicę (oznaczoną literą c) wykazano w pozycji 291 w przypadku szczepu izolowanego od kur (ryc. 1).

Jałowość i nieszkodliwość prototypów szczepionek własnych została potwierdzona w posiewach bakteriologicznych oraz w próbie biologicznej na myszach białych. Posiewy na agarze z krwią, podłożu wybiórczym XLD oraz podłożu Wrzoska dały wynik ujemny. Białe myszy po podaniu dotrzewnowym nie wykazywały żadnych objawów ubocznych w okresie obserwacji.

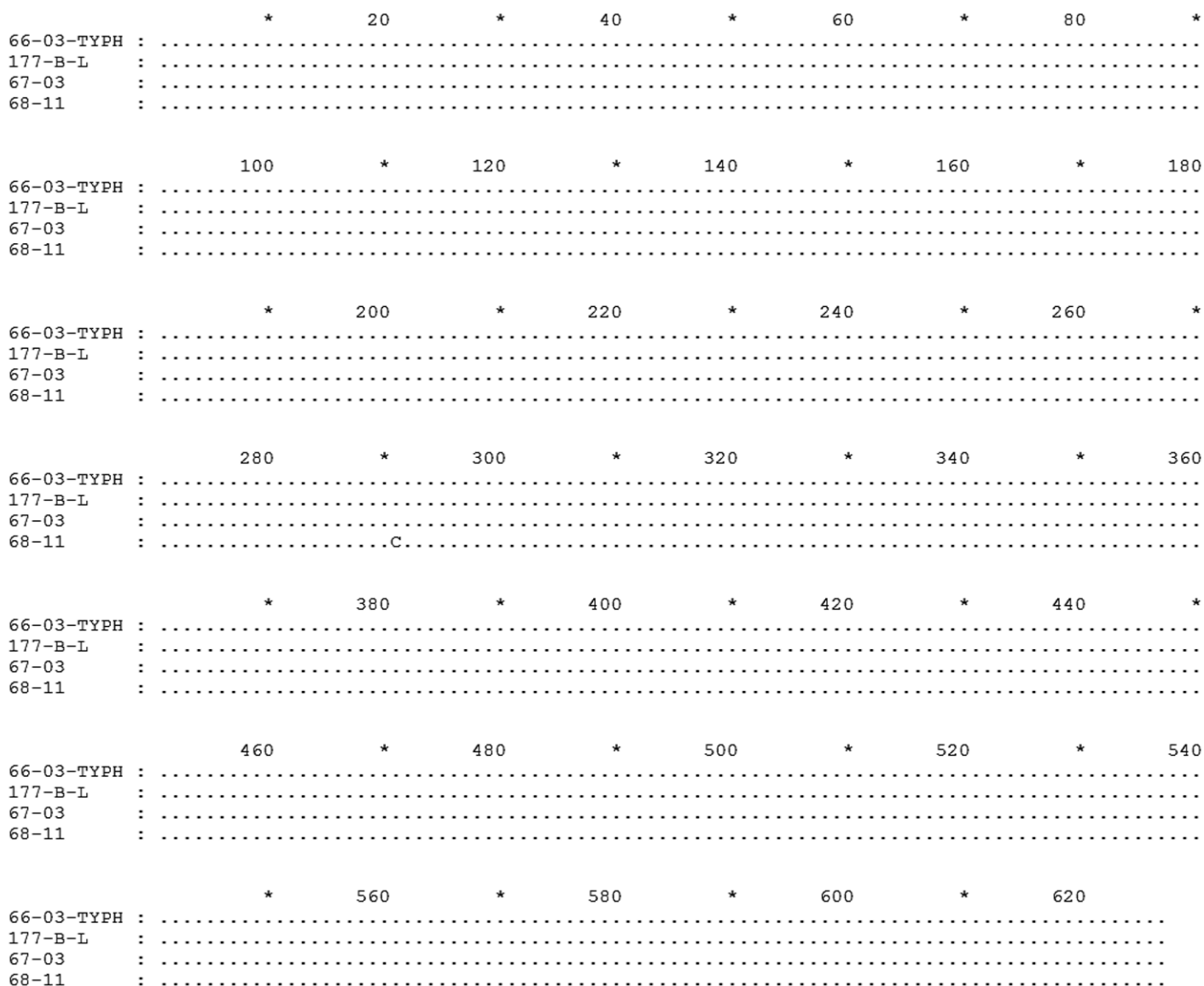
Średnie wartości poziomu mian przeciwciał aglutynacyjnych w surowicach immunizowanych gołębi

Tab. 1. Aktywność biochemiczna izolatów *Salmonella* Typhimurium

Test biochemiczny	Szczepy			
	66/03	67/03	177-B-L	68/11
Ornityna (dekarboksylacja)	+	+	+	+
Arginina (dihydroliza)	-	-	-	-
Lizyna (dekarboksylacja)	+	-	+	+
Ureaza	-	-	-	-
L-arabitol (fermentacja)	-	-	-	-
Galakturonian (fermentacja)	-	-	-	-
5-ketoglukonian	+	+	+	+
Lipaza	+	+	+	+
Czerwień fenolowa	+	+	+	+
β-glukozydaza	-	-	-	-
Mannitol (fermentacja)	+	+	+	+
Maltoza (fermentacja)	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-
N-acetylo-beta glukozamidaza	-	-	-	-
β-galaktozydaza	-	-	-	-
Glukoza (fermentacja)	+	+	+	+
Sacharoza (fermentacja)	-	-	-	-
L-arabinoza (fermentacja)	+	+	+	+
D-adonitol (fermentacja)	-	-	-	-
α-glukozydaza	-	-	-	-
α-galaktozydaza	+	+	+	+
Trehaloza (fermentacja)	+	+	+	+
Ramnoza (fermentacja)	+	+	+	+
Inozytol (fermentacja)	+/-	+	-	+/-
Adonitol (fermentacja)	-	-	-	-
Palatynoza (fermentacja)	-	-	-	-
β-glukuronidaza	-	-	-	-
Celobioza (fermentacja)	-	-	-	-
Sorbitol (fermentacja)	+	+	+	+
α-maltozydaza	-	-	-	-
Malonian	-	-	-	-
Arylamidaza kwasu 1-asparginowego	-	-	-	-

Tab. 2. Wyniki badania serologicznego izolatów *S. Typhimurium*

Test serologiczny	Szczepy			
	66/03	67/03	177-B-L	68/11
NaCl	-	-	-	-
HM	+++	+++	+++	+++
O4	+++	+++	+++	+++
O5	-	-	-	+++
H 1,2,5	+++	+++	+++	+++
H 2	+++	+++	+++	+++
H 5	-	-	-	-



Ryc. 1. Graficzne porównanie złożenia otrzymanych konsensusów wykonane w edytorze GeneDoc

w badanych grupach (I-III) oraz kontrolnej (K) zestawiono w tab. 3.

Najwyższe miana aglutynacyjne (320) uzyskano 28. dnia w grupie gołębi immunizowanych prototypem szczepionki opartej na szczepie 66-03. W grupie II i III miana były niższe i wynosiły 73,33 (szczep 67-03) oraz 50 (szczep 177-B-L).

Rozpoznanie zakażeń na tle salmonellozy nie jest możliwe na podstawie objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych. Ostateczne rozpoznanie musi

Tab. 3. Porównanie średniego miana przeciwciał aglutynacyjnych w surowicach gołębi pomiędzy grupami (I-III) (n = 6)

Grupa	Liczba dni po immunizacji			
	0	7	14	28
I (szczep 66-03)	10,00	20,00	36,67	320
II (szczep 67-03)	10,00	10,00	20,00	73,33
III (szczep 177-B-L)	10,00	10,00	36,67	50,00
K	10,00	10,00	20,00	10,00

być zweryfikowane badaniami bakteriologicznymi, które potwierdzają obecność pałeczek w materiale klinicznym. Uzyskane wyniki badań bakteriologicznych i biochemicznych pozwoliły sklasyfikować wszystkie izolaty jako gatunek *S. enterica subsp. enterica*. Kolejne testy z użyciem swoistych surowic dla antygenów somatycznych oraz antygenów rzęskowych I- i II fazy określiły serowar badanych izolatów. Szczepy izolowane od gołębi w odróżnieniu od szczepu izolowanego od kury (68-11) wykazały brak antygeny somatycznego O: 5, co określiło ich przynależność do serotypu *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen. Wykazana dwufazowość antygenów rzęskowych potwierdziła przynależność izolatów do tego serotypu. Uzyskane wyniki własne zgodne są z badaniami Dorn i wsp. (3), Pasmans i wsp., (17) oraz Rabsch i wsp. (20), którzy uważają, że salmonellozę gołębi wywołuje najczęściej *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen, wariant pozbawiony antygeny O: 5, określany jako „minus variant” *Salmonella* Typhimurium

(O: 1, 4, 12; H:i: 1, 2). Kolejny etap badań dotyczył genotypowej charakterystyki wyizolowanych szczepów gołębi i szczepu kurzego w oparciu o analizę 16S rRNA. Według Jordan i wsp. (8), Rabsch i wsp., Skov i wsp. (23) oraz Weisburg i wsp. (27), metoda typowania rybosomalnego pozwala określić regiony unikalne dla danego gatunku. Ponieważ nukleotydy ułożone są w określonej sekwencji kodującej, odmienne sekwencje w pokrewnych organizmach mogą świadczyć o ewolucyjnej rozbieżności między tymi organizmami, a najbardziej konserwatywna jest część 16S rRNA należąca do tego samego gatunku (11). Uzyskane wyniki w badaniach własnych mogą sugerować, że w obszarze uznawanym za najbardziej konserwatywny pojawiła się zmiana, która może być początkiem różnicowania się szczepów kurzych i gołębi. Wynik ten potwierdza obserwacje Jordan i wsp. (8), którzy porównując różne metody molekularne różnicowania szczepów *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Typhimurium, stwierdzili, że analiza 16S rRNA powinna być stosowana jako skuteczna metoda różnicująca serowary *Salmonella*. Niemniej jednak precyzyjne badanie filogenetyczne możliwe jest dopiero po sekwencjonowaniu 7 genów referencyjnych *Salmonella*, do których należą geny: *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *Pure*, *sucA* i *thrA* (9), co będzie stanowiło obszar kolejnych badań.

Eliminacja zakażeń pałeczkami *Salmonella* mimo ogromnych nakładów finansowych napotyka na trudności, a stosowanie antybiotykoterapii u ptaków zakażonych nie przynosi oczekiwanych rezultatów. Nieliczne doniesienia odnośnie do skuteczności terapii antybiotykowej u gołębi wskazują na nabywanie oporności *Salmonella* na chemioterapeutyki stosowane najczęściej w leczeniu (15). Większość ukazujących prac odnosi się do badań przeprowadzonych na kurach (2, 24).

Długotrwała i kosztowna terapia nie zawsze gwarantuje skuteczne wyleczenie ptaków. Należy pamiętać o statusie ozdrowieńców, gdyż takie osobniki mogą zostać nosicielami i siewcami bakterii, stanowiąc zagrożenie epidemiologiczne dla innych ptaków w stadzie. Narastająca szybko oporność bakterii oraz zagrożenia pozostałości antybiotyków w tkankach zwierząt oraz potencjalne skażenie środowiska wskazują na konieczność stosowania swoistej immunoprofilaktyki, jako najbardziej efektywnej metody ochrony ptaków przed zakażeniami pałeczkami *Salmonella*.

Opracowanie szczepionki wymagało takiego dobrania składników, aby preparat skutecznie stymulował rozwinięcie się silnej i długotrwałej odpowiedzi immunologicznej oraz cechował się wysokim marginesem bezpieczeństwa. Istotną częścią badań był dobór odpowiedniego adiuwantu, który spełniałby powyższe kryteria. W dostępnym piśmiennictwie ukazało się wiele prac opisujących możliwość wykorzystania saponin izolowanych zwłaszcza z korzenia żeń-szenia (*Radix panax ginseng*), zwanych ginsenozydami

wspomagającymi reakcje immunologiczne zwierząt na antygeny bakteryjne i wirusowe. W 2009 r. ukazała się praca Mi-Hyoung Kim i wsp. (12), którzy w badaniach na myszach wykazali immunostymulujący wpływ ekstraktu żeń-szenia, wyrażający się przyspieszeniem dojrzewania komórek dendrytycznych (DC) oraz wzmocnieniem sekrecji IFN- γ i IL-4. Ponadto Rivera i wsp. (21) w eksperymentach na myszach immunizowanych inaktywowanym parwowirusem świń (PPV) udowodnili, że preparat zawierający frakcję ginsenozydu Rb1 stymulował wzrost aktywności fagocytarnej makrofagów i leukocytów polimorfonuklearnych, a sam żeń-szeń indukował produkcję interferonu i stymulował wzrost aktywności limfocytów Tc. Z kolei Li i wsp. (10) w eksperymencie na kurczętach immunizowanych antygenem NDV w adiuwancie niekompletnym Freund'a (INF) wzbogaconym ginsenozydami żeń-szenia wykazali statystycznie istotny wzrost mian przeciwciał hemaglutynujących (HI) oraz zwiększenie proliferacji splenocytów w porównaniu do grupy kontrolnej immunizowanej szczepionką NDV w adiuwancie INF. W ostatnich swoich pracach z 2010 r. uczeni koreańscy (14) w badaniach na myszach stymulowanych dootrzewnowo ekstraktem żeń-szenia oraz immunizowanych doustnie zabitymi bakteriami *S. Typhimurium* wykazali, że ekstrakt żeń-szenia silnie pobudza specyficzną odpowiedź serologiczną na aplikowany doustnie inaktywowany antygen bakteryjny. Również Zhai (28) wykazał na kurczętach immunoadiuwancyjny efekt doustnej suplementacji żeń-szenia po immunizacji ptaków atenuowanym wirusem rzekomego pomoru drobiu (NDV). U suplementowanych żeń-szeniem kurcząt stwierdzano wysokie miana przeciwciał HI anty NDV, zwiększoną proliferację limfocytów oraz wzrost liczby limfocytów śródnamionkowych (iEL) dwunastnicy i jelit cienkich.

Niektórzy autorzy zalecają zastosowanie, jako adiuwantów karbomerów – wielkocząsteczkowych polimerów kwasu akrylowego usieciowanego polialkenyłowymi eterami cukrów lub polialkoholi. Jak wykazały badania Mumford (13), karbomer w trakcie polimeryzacji zatrzymuje w swojej „sieci” cząsteczki antygeny szczepionkowego, przedłużając uwalnianie go z miejsca wstrzyknięcia. Ten proces umożliwia prezentację antygenów komórkom efektorowym, co skutkuje wzmocnieniem odpowiedzi immunologicznej i poprawą skuteczności szczepionki (13). Podobna formuła adiuwantu została zastosowana w produkcji szczepionki przeciwko paramyksowirozie gołębi (4) oraz salmonellozie gołębi (5).

Duchatel i Vindeogel (4) porównując bezpieczeństwo oraz właściwości immunogenne szczepionek przeciwko paramyksowirozie gołębi z zastosowaniem adiuwantu olejowego oraz karbomerowego wykazali, że szczepionka z adiuwantem karbomerowym stymulowała silniejszą i wyrównaną reakcję przeciwciał HI oraz nie wywoływała powikłań. Ci sami autorzy (5) porównując efektywność eksperymentalnych

bakteryn zawierających pełne komórki *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen i adiuwant karbome-rowy, wykazali silną odpowiedź immunologiczną, wyrażającą się serokonwersją przeciwciał oraz ograniczeniem siewstwa zarazka w zakażeniu kontrolnym (*challenge*).

Po prześledzeniu wyników badań licznych autorów stosujących jako adiuwanty oddzielnie karbomery lub ekstrakty żen-szenia uznano, że połączenie obu składników w jednym adiuwancie powinno wzmacniać właściwości immunogenne inaktywowanej szczepionki.

W badaniach własnych wykazano, że eksperymentalna szczepionka oparta na izolacie 66-03 *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen w połączeniu z adiuwantem zawierającym karbomer i ekstrakt żen-szenia, według patentu zgłoszonego w Urzędzie Patentowym RP pod numerem P-396327, jest bezpieczna w stosowaniu oraz generuje najwyższe miana przeciwciał aglutynacyjnych.

Biorąc pod uwagę wyniki testów, izolat 66-03 *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen został wyselekcjonowany do dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. *Abdolvahab F., Friendship R. M.*: A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling *Salmonella* infection and the association of *Salmonella*-shedding and weight gain in pig. *Can. J. Vet. Res.* 2010, 74, 258-263.
2. *Boś M.*: Wpływ procesu nabywania antybiotykooporności na wybrane cechy fenotypowe i genotypowe pałeczek z rodzaju *Salmonella* w badaniach in vitro. Praca doktorska, Akademia Rolnicza, Lublin 2000.
3. *Dorn Ch., Schroeter A., Helmuth R.*: *Salmonella* isolates typed in national reference laboratory in Germany in years 1998-2001. International Symposium „*Salmonella* and *Salmonellosis*”, Plouffragan, France 2002, s. 603-604.
4. *Duchatel J. P., Vindevogel H.*: Assessment of vaccination of pigeons against paramyxovirus type 1 infection with inactivated aqueous- suspension or oil-emulsion vaccines. *Avian Pathol.* 1986, 15, 455-465.
5. *Duchatel J. P., Vindevogel H.*: Premiers essais de vaccination de pigeons contre la paratyphose au moyen de vaccins inactives adjuvés aqueux. *Ann. Med. Vet.* 1996, 140, 161-163.
6. *Faddoul G. P., Fellows G. W.*: Clinical Manifestations of Paratyphoid Infection in Pigeons. *Avian Dis.* 1965, 22, 377-381.
7. *French G., Schwarz S.*: Genotyping and identification of the resistance genes of multiresistant *Salmonella enteritidis* subsp. Enteric serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from different animal sources. *Mat z konf. Salmonella and Salmonellosis*, 2002, 13S, 483-488.
8. *Jordan R., van Heerden E., Hugo C. J., Pieter L. A.*: Using current molecular techniques for rapid differentiation of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium. *Afr. J. Biotechnol.* 2009, 8, 1815-1818.
9. *Leekitcharoenphon P., Lukjancenko O., Friis C., Frank M., Aarestrup F. M., Ussery D.*: Genomic variation in *Salmonella* Enterica core genes for epidemiological typing. *BMC Genomics* 2012, 13, 88.
10. *Li Y., Yan X., Hu S.*: Ginseng Stem-Leaf Saponins and Oil Adjuvant Synergistically promote the immune responses to Newcastle Disease in chickens. *J. Animal Vet. Adv.* 2012, 11, 2423-2428.
11. *Lukjancenko O., Wassenaar T. M., Ussery D. W.*: Comparison of 61 sequenced *Escherichia Coli* Genomes. *Microbiol. Ecol.* 2010, 60, 708-720.
12. *Mi-Hyoung Kim, Yun-Young Byon, Eun-Ju Ko, Jie-Young Song, Yeon-Sook Yun, Taekyun Shin, Hong-Gu Joo.*: Immunomodulatory Activity of Ginsan, a Polysaccharide of *Panax* Ginseng, on Dendritic Cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2009, 13, 169-175.
13. *Mumford J. A., Wilson H., Hannant D., Jessett D. M.*: Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. *Epidemiol. Infect.* 1994, 112, 421-437.
14. *Na H. S., Lim Y. J., Yun Y. S., Kweon M. N., Lee H. C.*: “Ginsan enhances humoral antibody response to orally delivered antigen”. *Immune Network.* 2010, 10, 5-14.
15. *Pasmans F., Baert K., Martel A., Bousquet-Melou A., Lanckriet R., De Boever S., Van Immerseel F., Eeckhaut V., de Backer P., Haesebrouck F.*: Induction of the Carrier State in Pigeons Infected with *Salmonella* enteric subspecies enterica Serovar Typhimurium PT99 by Treatment with Florfenicol: a Matter of Pharmacokinetics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008, 52, 954-961.
16. *Pasmans F., Van Immerseel F., Hermans K., Heyndrickx M., Collard J.-M., Ducatelle R., Haesebrouck R., Haesebrouck F. L.*: Assessment of Virulence of Pigeon Isolates of *Salmonella enterica* subsp. enterica Serovar Typhimurium Variant Copenhagen for Humans. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 2000-2002.
17. *Pasmans F., Van Immerseel F., Heyndrickx M., Martel A., Godard C., Wildemaue C., Ducatelle R., Haesebrouck F.*: Host adaptation of pigeon isolates of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium variant Copenhagen phage type 99 is associated with enhanced macrophage cytotoxicity. *Infect. Immunol.* 2003, 71, 6068-6074.
18. *Pedersen K., Clark L., Andelt W. F., Salman M. D.*: Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in rock pigeons captured in Fort Collins, Colorado. *J. Wild. Dis.* 2006, 42, 46-55.
19. Polski Komitet Normalizacyjny, Mikrobiologia żywności i pasz, Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp., zmiana do Polskiej Normy, dotyczy PN-EN ISO 6579: 2003, Mikrobiologia żywności i pasz, Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp. PN-EN ISO 6572:2003/A1, grudzień 2007.
20. *Rabsch W., Tschape H., Baeumler A. J.*: Host adaptation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium variants. Reports and Communications, *Salmonella* and *Salmonellosis*, Saint-Brieuc, France 2002, 13S, 483-488.
21. *Rivera E., Ekholm Pettersson F., Inganäs M., Paulie S., Gronvik K. O.*: The Rb1 fraction of ginseng elicits a balanced Th1 and Th2 immune response. *Vaccine* 2005, 23, 5411-5419.
22. *Selvaraj P., Pitchappan R. M.*: Post-hatching development of the Immune System of Pigeon, *Columba Livia*. *Devel. Comp. Immunol.* 1988, 12, 879-884.
23. *Skov M. N., Sandvang D., Torpdahl M., Baggesen D. L.*: Investigation of sources of human *Salmonella* Typhimurium infections in Denmark- using pulsed field gel electrophoresis and plasmid analysis. Reports and Communications, *Salmonella* and *Salmonellosis*, Saint-Brieuc, France 2002, 55-61.
24. *Skowron M.*: Wpływ antybiotykoterapii na wartość wybranych metod stosowanych w diagnostyce zakażeń pałeczkami z rodzaju *Salmonella*. Praca doktorska, Akademia Rolnicza, Lublin 2005.
25. *Szeleszczuk P., Kosowska G.*: *Salmonelloza*. Wciąż najważniejszy problem w patologii gołębi. *Weterynaria w terenie* 2007, 2, 47-52.
26. *Tanaka C., Miyazawa T., Watarai M., Ishiguro N.*: Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2005, 67, 951-953.
27. *Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J.*: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991, 173 (2), 697-703.
28. *Zhai L., Li Y., Wang W., Wang Y., Hu S.*: Effect of oral administration of ginseng stem-and-leaf saponins (GSLs) on the immune responses to Newcastle disease vaccine in chickens. *Vaccine* 2011, 29, 5007-5014.

Adres autora: prof. dr hab. Majer-Dziedzic Barbara, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin; e-mail: barbara.dziedzic@up.lublin.pl