



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE



VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, V.V.I.

Imunologie salmonelových infekcí u prasat

Disertační práce

Jan Gebauer

Vedoucí práce: MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.

Brno 2016

Bibliografický záznam

Autor:	Mgr. Jan Gebauer Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Imunologie salmonelových infekcí u prasat
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Fyziologie živočichů
Vedoucí práce:	MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Akademický rok:	2016/2017
Počet stran:	76+65
Klíčová slova:	<i>Salmonella</i> ; prase; vakcinace; křížová protektivita; pasivní přenos imunity; protilátková odpověď; DIVA; rekombinantní proteiny

Bibliographic Entry

Author	Mgr. Jan Gebauer Faculty of Science, Masaryk University Department of Experimental Biology
Title of Thesis:	Immunology of <i>Salmonella</i> infections in pigs
Degree programme:	Biology
Field of Study:	Animal Physiology
Supervisor:	MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Academic Year:	2016/2017
Number of Pages:	76+65
Keywords:	<i>Salmonella</i> ; pig; vaccination; cross-protectivity; passive immunity transfer; antibody response; DIVA; recombinant proteins

Abstrakt

Infekce netyfoidními kmeny salmonel jsou ve veterinární medicíně stále nevyřešeným dlouhotrvajícím problémem. Podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin je až 30 % chovů prasat v Evropě salmonela-pozitivních. Kromě technicko-hygienických opatření je vakcinace jednou z možností, jak předcházet salmonelovým infekcím v chovech. Kromě prokázání samotné účinnosti, je pro všeobecné rozšíření nutné, aby vakcína umožňovala rozlišení mezi zvířaty vakcinovanými a zvířaty po přirozené infekci. Tento tzv. DIVA přístup (differentiation of infected from vaccinated individuals) byl v pozměněné podobě využit i v této práci.

Tato disertační práce se zabývá právě vakcinací prasat proti netyfoidním sérovarům salmonel. Nejrozšířenějšími sérovary u prasat v Evropě jsou sérovary Typhimurium a Derby. Průběh infekce vyvolané těmito kmeny se však značně liší. Imunitní odpověď ve smyslu tvorby protilátek, ale i po *in vitro* stimulaci prasečích makrofágů, je výraznější po infekci vyvolané bakterií *Salmonella* Typhimurium. Nízká imunitní odpověď proti antigenům *Salmonella* Derby tak způsobuje delší přežívání bakterií v organismu hostitele a díky vylučování do prostředí také vyšší potenciální riziko pro ostatní zvířata i člověka. Navíc, jak bylo prokázáno u sajících selat vakcinovaných prasnic, pravděpodobně díky rozdílné antigenní výbavě mezi sérovary, nechrání protilátky proti *S. Typhimurium* vytvořené po vakcinaci před *S. Derby* infekcí. Z tohoto důvodu byla připravena a testována trivalentní vakcína obsahující antigeny Typhimurium, Derby a Infantis, dalšího sérovaru s občasným klinickým významem v ČR. Aplikací této vakcíny prasnicím před porodem jsme dokumentovali přenos maternální imunity na sající selata a jejich chráněnost před salmonelovou infekcí.

Na rozdíl od obecně používaného schématu vývoje negativní markerové vakcíny, jsme docílili schopnosti rozlišit jedince infikované od těch vakcinovaných i bez genetického zásahu do vakcinačního kmene. Analýzou protilátek vytvořených po infekci nebo vakcinaci inaktivovanou vakcínou, jsme identifikovali salmonelové antigeny, indukující protilátky zejména po vakcinaci a jiné antigeny indukující protilátky jen v případě infekce. Dva z těchto antigenů ve formě rekombinantních proteinů SipB a FliC byly použity pro konstrukci DIVA ELISY umožňující rozlišit

prasata infikovaná od prasat vakcinovaných. Tuto DIVA metodu by zřejmě bylo možné použít i při vývoji jiných inaktivovaných bakteriálních vakcín tam, kde jakýkoliv zásah do genomu vakcinačního kmene není žádoucí.

Abstract

Non-typhoid *Salmonella* infections constitute a persistent and still unsolved problem in veterinary medicine. According to the European Food Safety Authority, 30 % of pig breeding farms in Europe are *Salmonella*-positive. Except for technical and hygienic measures, vaccination can be one of the possibilities to prevent *Salmonella* infections in herds. For widespread use of a vaccine, it is necessary to be able to distinguish between vaccinated animals and animals after natural infection. So-called DIVA approach (differentiation of infected from vaccinated individuals), in a modified form, was also implemented in this thesis.

This dissertation is focused on pig vaccination against non-typhoid *Salmonella* serovars. The most common serotypes occurring in pigs in Europe are *S. Typhimurium* and *S. Derby*. However, the course of infection caused by these two serotypes is different. The immune response, in terms of antibody production and after *in vitro* stimulation of macrophages, is stronger after *Salmonella* Typhimurium infection. The weak response against *Salmonella* Derby antigens results in long-term colonization of internal organs, fecal shedding and a potential risk to other animals and even to humans. Furthermore, probably because of antigenic spectra differences between these two serovars, anti-*S. Typhimurium* antibodies developed after vaccination do not protect against *S. Derby* infection, as demonstrated in suckling piglets of vaccinated sows. For this reason, we developed a trivalent vaccine containing serotypes Typhimurium, Derby and Infantis, other serovar occasionally clinically important in the Czech Republic. By the administration of this vaccine to gestating sows, we showed the importance of maternal immunity transfer to suckling piglets and proved its protectivity against *Salmonella* infection.

The ability to differentiate infected from vaccinated individuals is generally attained by using negative marker vaccines. We achieved this goal without any genetic changes to the vaccine strain. We analysed the antibodies produced after infection or vaccination and identified *Salmonella* antigens that enable the differentiation between these two groups of animals. We proved the ability of SipB and FliC recombinant proteins to be used in DIVA ELISA distinguishing infected from vaccinated pigs. This DIVA method could be conveniently applied in the

development of bacterial vaccines especially when genetic modification of a vaccine strain is not desirable.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli MVDr. Jánů Matiašovicovi, Ph.D. za příkladné vedení v celém průběhu studia, cenné rady a pomoc při vypracování této disertační práce. Dále MVDr. Martinu Faldynovi, Ph.D. za nápadité rady a připomínky a podporu při studiu. Nemalé díky patří i kolegům z oddělení Imunologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, hlavně paní Haně Kudláčkové, dr. Radku Tesaříkovi, Ing. Lence Levé, Mgr. Ondřeji Polanskému a dalším za pomoc při experimentech a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále děkuji Mgr. Marcelu Kosinovi, Ph.D. z Bioveta, a.s., za spolupráci na některých experimentech.

Také děkuji své manželce a nejbližší rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

Publikace použité v této disertační práci vznikly za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky - NAVZ (QJ1210115) a ZV (MZE0002716202) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky – projekt AdmireVet (ED0006/01/01) a NPU I (LO1218).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 3. listopadu 2016

.....
Jméno Příjmení

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	12
1. ÚVOD	15
1.1. Charakterizace rodu <i>Salmonella</i>	15
1.2. Salmonelové infekce	15
1.3. Virulence salmonel	17
1.3.1. Povrchové struktury salmonel	18
1.4. Interakce salmonela-prase	19
1.4.1. Protilátková odpověď	23
1.4.2. Buněčná odpověď	24
1.5. Pasivní přenos imunity	25
1.6. Salmonelové vakcíny	26
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	28
3. MATERIÁL A METODY	29
3.1. Bakteriální kmeny	29
3.2. Srovnání patogeneze <i>S. Typhimurium</i> a <i>S. Derby</i> u prasat	29
3.2.1. Experimentální infekce prasat	29
3.2.2. Protilátková odpověď	30
3.2.3. Transformační test lymfocytů (LTT)	30
3.2.4. Uvolnění IFN γ z lymfocytů	31
3.2.5. <i>In vitro</i> infekce MDM	31
3.2.5.1. Smrt MDM a uvolnění laktát dehydrogenázy (LDH)	32
3.2.5.2. Uvolnění IL-1 β	32
3.2.5.3. Aktivace kaspázy-1	32
3.3. Vakcinace prasat	32
3.3.1. Infekce selat	33
3.3.2. Protilátková odpověď	33
3.3.3. Inhibice motility salmonel	33
3.3.4. Trivalentní inaktivovaná vakcína	33
3.3.4.1. Rozlišení sérovar-specifických protilátek	34
3.4. Rozlišení post-infekčních a post-vakcinačních protilátek	35
3.4.1. Infekce a vakcinace odstavených selat	36
3.4.2. Izolace IgG protilátek	36
3.4.3. Příprava proteinového lyzátu salmonel	36
3.4.4. Imunoafinitní chromatografie	37
3.4.5. LC-MS/MS	37
3.4.6. Příprava rekombinantních proteinů a jejich purifikace	38
3.4.7. Sérologické testování	39
3.4.7.1. Western blot	39
3.4.7.2. ELISA	40
3.5. Analýza dat	40
4. VÝSLEDKY	41

4.1.	Srovnání patogeneze <i>S. Typhimurium</i> a <i>S. Derby</i> u prasat	41
4.1.1.	Počty salmonel ve sledovaných orgánech po <i>in vivo</i> infekci	41
4.1.2.	Vylučování salmonel v trusu	42
4.1.3.	Protilátková odpověď	42
4.1.3.1.	Protilátková odpověď na thymu nezávislá	42
4.1.3.2.	Protilátková odpověď na thymu závislá	43
4.1.4.	Buněčná odpověď	44
4.1.5.	<i>In vitro</i> infekce MDM	44
4.2.	Vakcinace prasat	46
4.2.1.	Vakcinace prasníc před porodem	46
4.2.2.	Křížová protektivita sajících selat po vakcinaci prasníc proti SD infekci	48
4.2.3.	Trivalentní inaktivovaná vakcína	50
4.3.	Rozlišení post-infekčních a post-vakcinačních protilátek	52
4.3.1.	Expres salmonelových proteinů v závislosti na kultivačním médiu	52
4.3.2.	Imunoafinitní chromatografie s následnou MS	53
4.3.3.	Příprava rekombinantních proteinů	54
4.3.4.	Sérologické testování	56
4.3.4.1.	Western blot	56
4.3.4.2.	ELISA	56
4.3.4.3.	Časový průběh tvorby protilátek	57
5.	DISKUZE	59
6.	ZÁVĚR	67
7.	SEZNAM LITERATURY	68
8.	PŘÍLOHY	77

Seznam zkratek

BCA	- bicinchoninová kyselina ke stanovení koncentrace proteinů
BCR	- <i>B-cell receptor</i> - receptor B lymfocytů
BHI	- <i>brain heart infusion</i> – kultivační médium infuze mozkové a srdeční tkáně
CFU	- <i>colony-forming unit</i> – jednotky tvořící kolonie bakterií
CNBr	- <i>cyanogen bromide</i> - bromkyan
CPM	- <i>counts per minute</i> – počet signálů za minutu
Da	- Dalton – hmotnostní jednotka
DIVA	- <i>differentiation of infected from vaccinated animals/individuals</i> – metoda rozlišení infikovaných a vakcinovaných jedinců
DMEM	- <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> – médium pro kultivaci savčích buněk
DPI	- <i>days post infection</i> – počet dní od infekce
ECL	- <i>enhanced chemiluminescence</i> – vylepšená chemiluminiscence
EFSA	- <i>European food safety authority</i> – Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	- <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> – imunochemická metoda kvantitativního stanovení protilátek nebo antigenů
FAE	- <i>follicle-associated epithelium</i> – epiteliální buňky asociované s folikuly
FASP	- <i>filter-aided sample preparation</i> – metoda přípravy proteinů pro MS
FDR	- <i>false discovery rate</i> – míra falešně pozitivních výsledků
FPLC	- <i>fast protein liquid chromatography</i> – kapalinová chromatografie pro purifikaci proteinů
GMO	- geneticky modifikovaný organismus
ICLN	- <i>ileocaecal lymph node</i> – ileocékální mízní uzlina
iNOS	- <i>inducible nitric oxide synthase</i> – inducibilní syntáza oxidu dusnatého
IPTG	- isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB	- <i>lysogeny broth</i> - bakteriální kultivační LB médium
LC-MS	- <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i> - kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LDH	- laktát dehydrogenáza
LPS	- lipopolysacharid
LT	- laboratorní teplota
LTt	- lymfocyt transformační test
m/z	- <i>mass-to-charge ratio</i> – poměr hmotnosti k náboji, hmotnostní jednotka iontů v MS spektru
MAC	- <i>membrane attack complex</i> – komplex komplementových proteinů perforující membrány mikroorganismů
MACS	- <i>magnetic-activated cell sorting</i> – magneticky aktivované třídění buněk
MALT	- <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i> – lymfoidní tkáň asociovaná se sliznicí
MDM	- <i>monocyte-derived macrophages</i> – makrofágy derivované z monocytů
MHC	- <i>major histocompatibility complex</i> – hlavní histokompatibilní komplex
MS/MS	- tandemová hmotnostní spektrometrie s fragmentací iontů
MW	- <i>molecular weight</i> – molekulová hmotnost
MWCO	- <i>molecular weight cut-off</i> – mezní hodnota molekulové hmotnosti
OMP	- <i>outer membrane protein</i> – protein vnější membrány
PAMPs	- <i>pathogen-associated molecular pattern</i> – molekulární struktury asociované s patogenními mikroorganismy
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i> – fosfátový pufr
PBS/T	- PBS s Tween-20
ppm	- <i>parts per million</i> – jedna z milionu
PSM	- <i>peptide spectrum match</i> – shoda peptidových spekter
PVDF	- polyvinylidendifluorid
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> – médium pro kultivaci lidských buněk
SCV	- <i>Salmonella-containing vacuole</i> – vakuola obsahující salmonely
SD	- <i>Salmonella</i> Derby
SDS	- <i>sodium dodecyl sulfate</i> – dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS
SI	- <i>Salmonella</i> Infantis

SMLN	- <i>submandibular lymph node</i> – submandibulární mízní uzlina
SPI	- <i>Salmonella pathogenicity island</i> – ostrov patogenity salmonel
STM	- <i>Salmonella Typhimurium</i>
T3SS	- <i>Type 3 secretion system</i> – sekreční systém třetího typu
TDI	- trivalentní vakcína proti STM, SD a SI
TEAB	- <i>triethylammonium bicarbonate</i> – hydrogenuhličitan triethylamonný
TLR	- <i>Toll-like receptor</i> – receptory skupiny Toll
TMB	- 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin chromogenní substrát
uHPLC	- <i>ultra-high performance liquid chromatography</i> – kapalinová chromatografie za velmi vysokého tlaku

1. Úvod

1.1. Charakterizace rodu *Salmonella*

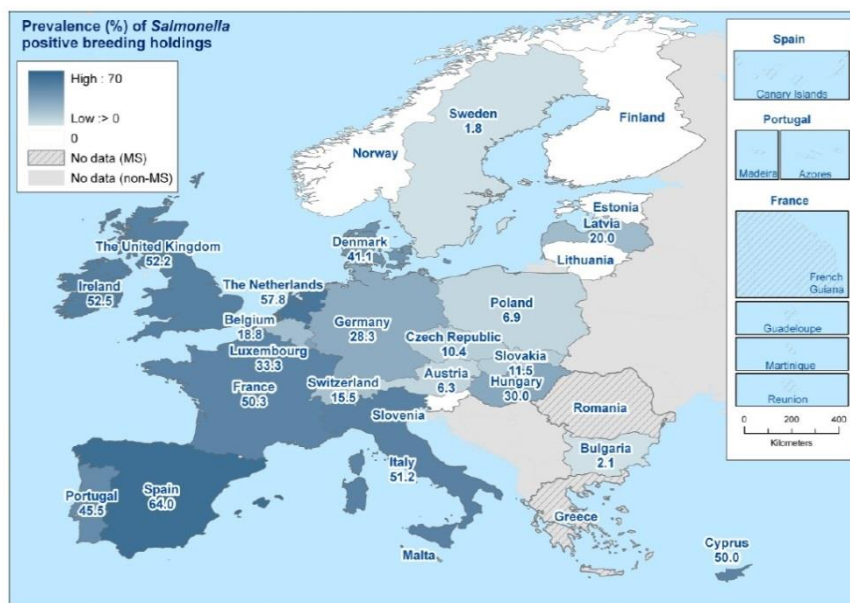
Bakterie rodu *Salmonella*, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, jsou gram-negativní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie, které způsobují různě závažná onemocnění zvířat i člověka. Taxonomicky se rozdělují do dvou druhů - *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. Zatímco hostitelé *S. bongori* jsou studenokrevní živočichové, převážně plazi, *S. enterica* napadá ptáky a savce a vyskytuje se tak na všech kontinentech planety. *Salmonella enterica* se dále dělí na 6 poddruhů - *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* a *indica*. V rámci poddruhů bylo dále popsáno na 2500 sérovarů na základě odlišnosti somatických O-antigenů a flagelárních H antigenů - Kauffman-White klasifikace (Grimont a Weill 2007).

Nejvíce rozšířeným taxonem, který má zároveň největší zdravotní i ekonomické dopady je *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, proto se v této práci budeme zabývat pouze sérovary této skupiny. Adaptace jednotlivých sérovarů na různé hostitelské organismy se liší a s tím i závažnost onemocnění způsobených salmonelou u různých živočišných druhů. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) a serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) jsou sérovary s širokým spektrem hostitelů - jsou schopny kolonizovat zažívací trakt mnoha živočišných druhů a jen zřídka způsobují systémová onemocnění. Řadí se tak mezi netyfoidní sérovary salmonel. Na opačné straně stojí *Salmonella* Typhi, která je adaptovaná výhradně na člověka, u kterého může vyvolat závažné systémové onemocnění. Tyfoidním sérovarem u prasat je *S. Choleraesuis*, jeho hostitelem však může být i člověk.

1.2. Salmonelové infekce

Po kampylobakterech jsou netyfoidní sérovary salmonel druhými nejčastějšími původci alimentárních onemocnění člověka v Evropě. Mezi nejčastější izoláty patří sérovary Enteritidis a Typhimurium (EFSA 2015). Zatímco *Salmonella* Enteritidis se na člověka přenáší nejčastěji z drůbeže, zdrojem nákazy *S. Typhimurium* jsou často

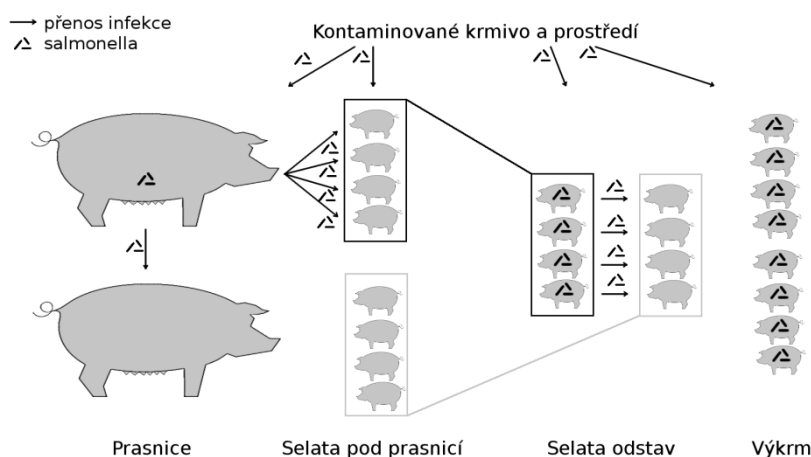
vepřové produkty. Podle šetření EFSA z roku 2008 je až 30 % všech chovů prasat v Evropě salmonela-pozitivních (viz Obr. 1).



Obrázek 1 Procento *Salmonella* pozitivních chovů prasat v jednotlivých zemích Evropy (EFSA 2009)

Výskyt různých sérovarů u prasat je v rámci Evropy značně heterogenní, obecně však převládají sérovary Typhimurium a Derby (EFSA 2009). V posledních letech je na vzestupu i monofazická varianta *S. Typhimurium*, která se od klasické - bifazické varianty liší strukturou bičíku (chybí fáze 2 flagelárního H antigenu). Podle Státního zdravotního ústavu navíc vzrůstá rezistence vůči běžně dostupným antibiotikům u obou zmíněných variant sérovaru Typhimurium (Žemličková a kol. 2013).

Netyfoidní sérovary salmonel u prasat způsobují gastrointestinální onemocnění většinou však s nevýrazným klinickým průběhem. Objevují se průjemy, lehce zvýšená teplota, selata vykazují nižší váhový přírůstek a s tím související i prodloužení doby výkrmu (Ahmed a kol. 2014). Problematický může být zejména sub-klinický průběh infekce z důvodů pozdního záchytu a možného šíření infekce v chovu. Zdrojem salmonel v chovech je obecně prostředí stáje a chovné technologie včetně krmiv, ale především ostatní infikovaná prasata v chovu nebo při nákupu nových selat nebo plemenných zvířat. Výrazným zdrojem nákazy pro selata jsou chronicky infikované prasnice, u nichž je porod iniciátorem exacerbace onemocnění s opětovným vylučováním salmonel do prostředí (Obr. 2, Wales a kol. 2011, Matiašovic 2012).



Obrázek 2 Zdroje a možné cesty přenosu salmonel v chovu (Matiašovic 2012)

1.3. Virulence salmonel

Za virulenci gram-negativních i gram-pozitivních bakterií jsou zodpovědné produkty genů, ležících na tzv. genomových ostrovech patogenity. Jejich přítomnost je obecně znakem patogenních kmenů bakterií a zcela chybí u nepatogenních kmenů stejného bakteriálního druhu. Tyto genomové ostrovy jsou evolučně nestabilní, může také docházet k horizontálnímu přenosu těchto elementů. Přednostně se integrují do oblasti genů pro tRNA, které jsou naopak v bakteriální říši velmi konzervované a jsou častým kotevním bodem pro inzerci cizorodé DNA, čehož mimo jiné využívají i bakteriofágy. Tyto elementy jsou od zbytku bakteriálního genomu rozlišitelné v důsledku jiného zastoupení GC bází (Schmidt a Hensel 2004).

U salmonel bylo doposud popsáno 23 ostrovů patogenity (SPI - *Salmonella* pathogenicity island) (Wisner a kol. 2012, Fookes a kol. 2011, Hayward a kol. 2013). Funkce jednotlivých SPI salmonel se výrazně liší. Pro patogenezi je nejdůležitější a je zároveň nejvíce popsán účinek SPI-1 a SPI-2 systémů. Proteiny SPI-1 se účastní první fáze infekce a umožňují invazi do nefagocytyjících buněk střevního epitelu. Efektorové SPI-1 proteiny způsobují reorganizaci aktinového cytoskeletu hostitelské buňky, dochází ke změnám na povrchu buněk v místě interakce a ke zřasení membrány (membrane ruffling), což vyústí v internalizaci bakterie (Schmidt a Hensel 2004, LaRock a kol. 2015). Některé SPI-1 proteiny jsou také zodpovědné za průjemové symptomy probíhající enteritidy. V membráně epiteliálních buněk jsou aktivovány chloridové kanály, dochází k sekreci chloridových iontů a tekutiny do lumen střeva (Wallis a Galyov 2000). Pokud je

salmonela fagocytována makrofágy, ve zvýšené míře exprimuje proteiny SPI-2 lokusu. Jejich působení umožňuje salmonele bránit se proti baktericidní aktivitě makrofágů, intracelulárně přežívat a replikovat se a šířit se tak do jiných částí hostitelského organismu. Proteiny SPI-2 zabraňují kolokalizaci NADPH oxidázy (Vazquez-Torres a kol. 2000) a iNOS (Chakravortty a kol. 2002) s vakuolou obsahující bakterie salmonel (SCV - *Salmonella*-containing vacuole). Produkty SPI-2 loku jsou také zodpovědné za systémový průběh infekce, v závislosti na konkrétním sérovaru a jeho hostiteli (Schmidt a Hensel 2004).

Z důvodu přítomnosti vnější membrány gram-negativních bakterií mají tyto bakterie vytvořeny speciální sekreční systémy, kterými mohou sekretovat efektorové proteiny z cytosolu na povrch bakterie nebo do extracelulárního prostoru, nebo je přímo translokovat do cytoplasmy přilehlých eukaryotických buněk (Schmidt a Hensel 2004). Pro funkci virulentních SPI-1 a SPI-2 proteinů je nejdůležitější sekreční systém třetího typu (T3SS), který je kódován geny ze SPI-1 i SPI-2. Jedná se o vysoce konzervovanou strukturu mezi gram-negativními patogenními bakteriemi. Je složená z více než 20 proteinů, z nichž některé vykazují homologii k exportnímu systému pro flagelární proteiny tvořící strukturu bičíku (Marlovits a Stebbins 2010). Oligomerní struktura membránových proteinů PrgH a PrgK kotví celý systém ve vnitřní membráně, další kotva proteinu InvG systém uchycuje v membráně vnější. Do extracelulárního prostoru vybíhá filament podobný jehle, tvořený jednotkami PrgI proteinu. Ten je zakončen strukturou proteinů SipB, SipC a SipD s několika transmembránovými doménami, které umožňují vytvořit pór v membráně eukaryotické buňky a skrze něj translokovat své efektorové proteiny do hostitelské buňky, kde modulují biochemické pochody, způsobují změny v cytoskeletární struktuře, v expresi genů a mohou vést k programované buněčné smrti buňky (Marlovits a Stebbins 2010, McGhie a kol. 2009, Galán 2009).

1.3.1. Povrchové struktury salmonel

Kromě proteinů sekrečního systému má salmonela na svém povrchu i jiné struktury důležité v patogenezi salmonelových onemocnění, rozpoznávané imunitním systémem hostitele. Již zmíněný bičík je proteinový komplex uchycen ve vnitřní membráně a svou rotací umožňuje bakterii pohyb. Extracelulární vlákno

bičíku je tvořeno mnoha kopiemi jednoho či dvou flagelárních proteinů - odtud vychází sérotypizace podle H antigenů - bifazické varianty salmonel exprimují proteiny FliC a FljB, monofazické varianty pouze jeden z nich (Neidhardt 1987, Grimont a Weill 2007). Proteiny bičíku jsou významnou antigenní strukturou, proti které se v průběhu infekce vytváří protilátky. V pozdějších fázích infekce, kdy se bakterie nachází uvnitř fagocytujících buněk, však salmonela snižuje expresi flagelárních proteinů a znesnadňuje tak jejich rozpoznání imunitními buňkami, zejména specifickými T lymfocyty, po prezentaci antigenu (Jantsch a kol. 2011, Cummings a kol. 2005).

Další významnou imunogenní strukturou gram-negativních bakterií je povrchový lipopolysacharid (LPS). LPS je též nazýván endotoxin z důvodu indukce patofyziologických reakcí hostitele, jako je septický šok, který zahrnuje horečku, leukocytopenii, snížený krevní tlak a až multiorgánové selhání (Focà a kol. 2012). Hydrofobní doména Lipid A, která je v největší míře zodpovědná za toxicitu, ukotvuje LPS ve vnější membráně bakterie. Na ni navazuje oligosacharidové jádro, složené z několika sacharidových reziduí a pokračuje polysacharidovými, velmi variabilními řetězci O-antigeny, který je vysoce imunogenní a sérologicky specifický. Sám o sobě nevykazuje toxicitu, ale díky své hydrofilní povaze umožňuje šíření toxického Lipidu A v hydrofilním prostředí *in vivo*, po odštěpení LPS z rostoucích bakterií nebo po jejich lýze (Todar 2009). O-antigeny obalují celý povrch bakterie a vytváří strukturu, která znesnadňuje fagocytózu salmonel. Zároveň znemožňují přichycení komplementu na povrch bakterie a jejich následnou lýzu (Murray a kol. 2005, Todar 2009). Toto je zřejmě jeden z důvodů nízké protektivity hostitelských protilátek proti LPS (MacLennan a kol. 2010).

1.4. Interakce salmonela-prase

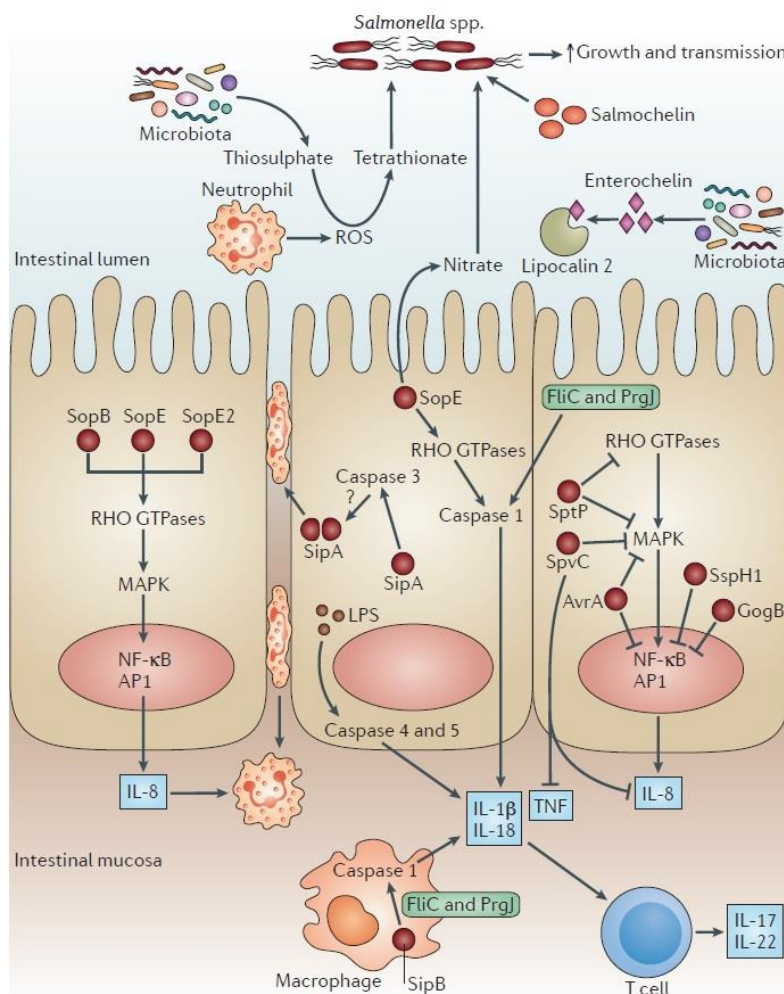
Bakterie salmonel se do těla hostitele dostávají nejčastěji orální cestou z kontaminované potravy nebo vody. Přežívají kyselé prostředí žaludku a dostávají se do kontaktu se střevním epitelem. Bylo popsáno několik možných cest, kterými se bakterie salmonel dostávají přes epiteliální bariéru do vnitřního prostředí hostitele. Využívají translokace efektorových proteinů SPI-1 lokusu, kdy salmonela aktivně invaduje do nefagocytujících buněk střevního epitele tím, že krátkodobě indukuje přeskupení aktinového cytoskeletu v místě kontaktu a dochází tak

k internalizaci bakterie do intracelulárního prostoru (Galán a Zhou 2000). Preferenční volbou je však využití M buněk - specializovaných epiteliálních buněk asociovaných s folikuly (FAE), jež pokrývají lymfoidní tkáň asociovanou se sliznicí (MALT) (Jones a kol. 1994). Úlohou M buněk je transepiteliální transport antigenů a mikroorganismů z lumen střeva do podpovrchových vrstev lymfoidní tkáně - k imunitním buňkám Peyerových plátů (Kraehenbuhl a Neutra 2000). Salmonela navíc využívá mechanismů, kterými indukuje transformaci epiteliálních buněk asociovaných s folikuly (FAE) na M buňky a podporuje tak prostup přes intestinální bariéru (Tahoun a kol. 2012).

Proteiny ze SPI-1 v těchto prvních fázích infekce umožňují vyvolání lokálního zánětu, čehož salmonela využívá hned v několika rovinách. Jednak dochází k atrakci fagocytů do místa zánětu, což jí pomáhá v kolonizaci dalších tkání. Intracelulární lokalizace pak umožňuje bakterii uniknout před baktericidní aktivitou neutrofilů, které jsou také ve velké míře atrahovány do místa zánětu (LaRock a kol. 2015). Zesilování inflamatorní odpovědi je navíc podpořeno zvýšenou expresí hostitelských Toll-like receptorů (TLR), které specificky vážou bakteriální LPS (TLR4) nebo flagelární proteiny (TLR5) (Cario a Podolsky 2000, Gewirtz a kol. 2001). Některé důsledky zánětlivé reakce organismu dávají salmonelám výhodu oproti ostatním bakteriím přítomným ve střevě. Dochází k akumulaci lipocalinu 2, hostitelskému proteinu, který eliminuje bakteriální siderofory a tím znemožňuje využívání iontů železa k růstu bakterií. Salmonelový siderofor salmochelin však není tímto proteinem ovlivněn (Raffatellu a kol. 2009). Navíc, reaktivní kyslíkové radikály vylučované do lumen střeva reagují s thiosulfátem, což je vedlejší produkt respirace bakterií normální střevní mikroflóry. Vzniklý tetrathionát je následně využíván salmonelami jako terminální akceptor elektronů při anaerobním růstu, který ale bakterie mikroflóry nejsou schopny využít (Winter a kol. 2010).

Fagocytóza bakterií makrofágy může probíhat SPI-1 závislým i nezávislým mechanismem. Po této endocytóze se salmonela nachází ve fagosomu, který vyžrává a formuje se v tzv. vakuolu obsahující salmonely (SCV) (Oh a kol. 1996). Zde už se ve větší míře uplatňují efektorové proteiny SPI-2 systému. Dokáží modifikovat obsah lipidů a proteinů uvnitř SCV, mění složení membrány a zabráňují splynutí této vakuoly s lysozomy a tím prodlužují přežívání salmonel uvnitř buněk (LaRock a kol. 2015). Proteiny translokované do cytosolu buňky

pomocí T3SS se vážou na mikrotubulární systém buňky, pomocí něhož se SCV v cytosolu pohybuje do středu (v časných fázích po internalizaci), kde dochází k



Obrázek 3 *Salmonella* a její působení ve střevě hostitele - konkurenční výhoda oproti normální střevní mikroflóře, stimulace produkce inflamatorních molekul (IL-8, IL-1 β , IL-18) a amplifikace zánětu ve sliznici střeva (LaRock a kol. 2015)

replikaci nebo naopak přesunu k periferii buňky (v pozdějším stádiu infekce) a následnému prostupu do přilehlých buněk (Guignot a kol. 2004, Szeto a kol. 2009). Tyto procesy byly popsány jak v epitelálních buňkách, tak ve fagocytech.

Jedním z mechanismů, jakým se hostitelský organismus brání přítomnosti salmonel, je indukce zánětu. Po rozpoznání specifických bakteriálních struktur jako je flagelin, proteiny T3SS nebo i cytosolický LPS (souhrnně PAMPs - pathogen-associated molecular patterns) dochází k aktivaci inflammasomu - multiproteinového komplexu, jehož sestavení vede k aktivaci kaspázy-1. Role Casp-1 je pak štěpení pro-IL-1 β a pro-IL-18 na funkční interleukin-1 β a interleukin-18 a

jejich uvolnění do extracelulárního prostoru, kde sehrávají roli pro-zánětlivých cytokinů (Yu a Finlay 2008). IL-18 stimuluje produkci interferonu- γ , indukuje upregulaci adhezivních molekul a aktivuje působení NK buněk. IL-1 β funguje jako endogenní pyrogen, atraktor a aktivátor neutrofilů a T lymfocytů, stejně jako B buněk s následnou produkcí protilátek (Martinon a Tschopp 2004). Aktivace kaspázy-1, a kaspázy-11 v případě detekce cytosolického LPS také spouští programovanou buněčnou smrt zprostředkovanou inflammasomem. Takováto programovaná smrt buňky, nazývaná pyroptóza, se liší od apoptózy právě indukci zánětu. Dochází ke štěpení DNA nukleázami difuzně po celém jádru, oproti oligonukleosomální fragmentaci, typické pro apoptózu. Dochází k přeskupování aktinového cytoskeletu a tvorbě pórů v plazmatické membráně, což způsobuje narušení iontového gradientu, influxu vody, bobtnání buňky a konečně k osmotické lýze a vylití intracelulárních molekul do prostoru, což amplifikuje prozánětlivé reakce. Tyto procesy byly popsány u makrofágů infikovaných bakteriemi salmonel (Fink a Cookson 2007).

Pokud se po detekci bakteriálních struktur makrofágy aktivují pro-zánětlivé procesy, jedná se o tzv. M1 polarizaci makrofágů. Jde o klasickou odpověď na přítomnost patogenu a je indukovaná interferonem- γ , cytokiny (např. TNF- α) nebo bakteriálními produkty (LPS). Následuje zvýšená exprese MHC-II molekul, chemokinů a kostimulačních molekul (CD80 a CD86) a dochází k amplifikaci zánětlivé odpovědi. Působení SPI-1 systému salmonel však vede k nižší prozánětlivé odpovědi plicních alveolárních makrofágů (PAM) ve srovnání s mutantním kmenem Δ SPI-1 *in vitro*. Dochází spíše k M2 polarizaci těchto makrofágů - nízké expresi prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α), kaspázy-1, inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS) a dalších. Obecně se objevuje spíše T_H2 odpověď a probíhají procesy hojení a odstraňování odumřelých buněk. Salmonely se tak svými SPI-1 efekty snaží zabránit baktericidní aktivitě makrofágů a přivolání dalších imunitních buněk do místa zánětu (Kýrová a kol. 2012, Kýrová a kol. 2014). Z výše uvedeného tak vyplývá, že ačkoli salmonela dokáže některé procesy zánětlivé odpovědi v prvních fázích infekce využít ve svůj prospěch, ve fázi intracelulárního přežívání a diseminace v organismu aktivně zabraňuje indukci inflamatorní odpovědi.

1.4.1. Protilátková odpověď

Ačkoli je salmonela fakultativně intracelulární patogen, specifické protilátky proti salmonelovým strukturám hrají v imunitní odpovědi významnou roli. Vazba protilátek se tak uplatňuje ještě před invazí do hostitelských buněk a poté při programované smrti buněk obsahující salmonely, kdy se bakterie nacházejí v extracelulárním prostoru (Casadevall 1998). Specifické IgA protilátky lokalizované na sliznicích zabraňují bakteriím adherovat na povrch střeva a znemožňují tak invazi do epiteliálních buněk (Michetti a kol. 1994). Tyto protilátky jsou tak důležité při opakovaných infekcích nebo jako ochrana potomků při příjmu mateřského mléka či kolostra, kdy dochází k pasivnímu přenosu protilátek. Úloha sérových IgG a IgM protilátek je veskrze baktericidní. Ať už jde o aktivaci komplementového systému a tvorbu pórů v membráně bakterie pomocí MAC komplexu (membrane attack complex) s její následnou lýzou nebo o usnadnění vychytávání salmonel fagocyty přes Fc gamma receptory a jejich následné usmrcení pomocí oxidativního vzplanutí ve fagolysozomu (Ramachandran a kol. 2016).

Protilátková odpověď také záleží na antigenní výbavě bakterií. Silný antigenní potenciál má povrchový lipopolysacharid a jeho vnější část - O-antigen. Vysoký titr protilátek proti těmto strukturám však může inhibovat baktericidní aktivitu séra, jak ukázal MacLennan a kol. (2010) u HIV-infikovaných lidí. Komplementem zprostředkované zabíjení salmonel je indukováno spíše specifickými protilátkami proti proteinům vnější membrány salmonel. Trebicka a kol. (2013) však na zdravých jedincích ukazuje, že baktericidní aktivita sérového komplementu je zprostředkována i protilátkami proti LPS a dokonce, že dochází ke zkřížené reakci s protilátkami proti LPS běžně se vyskytujících bakterií mikroflóry gastrointestinálního traktu. Solubilní LPS uvolněný z povrchu *S. Typhimurium* ovšem kompetuje s LPS na povrchu bakterií o anti-LPS protilátky a inhibuje tak baktericidní aktivitu séra.

Další imunogenní strukturou povrchu salmonel je už zmíněný bičík, jenž je tvořen mnoha kopiemi proteinu flagellinu. Protilátky proti tomuto proteinu se mohou vázat na bakteriální bičík a, kromě opsonizace pro fagocyty, znesnadňovat jeho pohyb a neutralizovat motilitu celé bakterie. Tyto specifické protilátky však budou účinné pouze v prvních fázích salmonelové infekce - jak již bylo řečeno,

exprese flagelárních proteinů je salmonelou aktivně tlumena při internalizaci bakterie do intracelulárního prostoru (Cummings a kol. 2005, Alaniz a kol. 2006).

Indukce tvorby protilátek se v případě výše zmíněných antigenů děje mechanismem nezávislým na T lymfocytech. Povrchové struktury patogenních bakterií (lipopolysacharidy) a polymerní molekuly s opakujícími se motivy (flagelární proteiny) fungují jako tzv. T-nezávislé antigeny (Hořejší a Bartůňková 2009). Tyto polymerní antigeny se vážou na velký počet receptorů B buněk (BCR), tím je shlukují a dochází k aktivaci a proliferaci B lymfocytů. Pro následnou sekreci imunoglobulinů je však nutný druhý signál, kterým je vazba těchto struktur na Toll-like receptory (TLR-4 pro LPS a TLR-5 pro flagellin). Jedná se tedy o propojení vrozených mechanismů imunity s těmi adaptovanými pro rychlý a efektivní boj s infekčními mikroorganismy (Vos a kol. 2000). Těmito mechanismy se však tvoří imunoglobuliny třídy M a pouze některé subtypy třídy G (IgG3). K izotypovému přesmyku na další třídy protilátek je už zapotřebí zapojení T-lymfocytů (Sinha a kol. 1997). Specifické imunoglobuliny proti salmonelovým proteinům se také tvoří T-závislými procesy a vyžadují prezentaci antigenů v komplexu s MHC-II molekulami a vznik antigenně specifických klonů T_H buněk. Ty se pak účastní následných procesů spadajících do buněčné odpovědi.

1.4.2. Buněčná odpověď

Aktivované B lymfocyty mohou částečně sloužit, podobně jako makrofágy a dendritické buňky, jako antigen prezentující buňky - vystavují na svém povrchu peptidové antigeny v komplexu s MHC-II, po internalizaci komplexu antigenu a protilátky, a jsou pak rozpoznávány pomocnými T_H lymfocyty. Bakterie salmonel však mohou B lymfocyt infikovat bez předchozí vazby na BCR a může docházet ke kros-prezentaci, podobně jako v případě dendritických buněk a intracelulárních antigenů, a B buňky mohou poté na svém povrchu vystavovat antigen v komplexu s MHC-I a indukovat tak odpověď $CD8^+$ T buněk (López-Medina a kol. 2014). Adaptivní buněčná odpověď - odpověď specifických T-lymfocytů hraje velmi významnou roli při eliminaci salmonel v pozdější fázi infekce. To zahrnuje zejména zabíjení intracelulárních bakterií přežívajících v makrofázích ve slezině a játrech (Sinha a kol. 1997). Byly však popsány mechanismy, kdy dochází k negativní regulaci antigen-specifických $CD4$ i $CD8$ T buněk díky aktivaci programované smrti

buněk. Dochází ke zvýšené expresi PD-1 ligandu (programmed cell death protein) v infikovaných buňkách (makrofágy, B buňky), který se váže na PD-1 protein T lymfocytů. Nedochozí k proliferaci těchto buněk a k eliminaci bakterie následnými mechanismy, což může vést k chronickému průběhu infekce (López-Medina a kol. 2015).

Rovnováha mezi intenzitou zánětu a mírou indukce specifické buněčné a humorální odpovědi tak může vést k projevům akutní infekce, dlouhodobému bezpříznakovému bacilonosičství nebo i eliminaci infekce z organismu.

1.5. Pasivní přenos imunity

Díky epiteliochoriálnímu typu placenty prasat - krevní oběh matky a plodu odděluje šest vrstev tkáně, dochází k pasivnímu přenosu imunity výhradně postnatálně. Z mléčné žlázy získávají novorozenci kolostrum a mléko, jejichž složení se značně liší. Hlavní imunoglobulin kolostra je IgG s malým množstvím IgA a IgM protilátek. Proporcionálně odpovídá obsahu v séru, celková koncentrace je však ještě vyšší. Oproti tomu v mléku převládá IgA, který je syntetizován přímo v mléčné žláze (Bourne 1973, Pastoret a kol. 1998).

Přenos makromolekul (ne jen protilátek) přes gastrointestinální trakt novorozence je umožněn tvorbou vezikul v epiteliálních buňkách. Pokud se takto absorbují IgA protilátky, tyto jsou pak dále redistribuovány na slizniční povrchy. Prostup látek do cirkulace novorozence je možný pouze po omezenou dobu. Absorpce aktivních intaktních molekul je usnadněno několika faktory. Žaludek novorozenců ještě neprodukuje velké množství kyseliny chlorovodíkové, pepsin - dominantní proteolytický enzym žaludku je v prvních dnech nahrazen chymosinem, jenž specificky štěpí κ -kasein. Kolostrum navíc obsahuje inhibitory trypsinu, aby nedocházelo ke štěpení přijatých imunoglobulinů (Rooke a Bland 2002).

Během 24 až 36 hodin od porodu dochází k uzavření střeva (tzv. gut closure), což je děj indukovaný absorpcí jednoduchých sacharidů případně některými hormony (Rooke a Bland 2002). Po této době už není zvíře schopno protilátky transportovat přes basolaterální membránu enterocytů a využívat je tak v krevním řečišti. Zůstávají v lumenu střeva, kde však také hrají velmi důležitou roli v boji proti infekci v prvních týdnech života, než bude imunitní systém novorozence

schopen aktivně tvořit specifické protilátky. V této době se zároveň mění složení kolostra/mléka, kde začínají převládat právě imunoglobuliny třídy A.

Kromě přenosu protilátek je však dobře popsán i transfer leukocytů z kolostra do krevního oběhu potomka. Dominantní jsou v tomto případě polymorfonukleární leukocyty, velkou měrou jsou však zastoupeny i buňky adaptivní imunity - lymfocyty. Jejich počet je nejvyšší v době porodu a během následujících několika hodin konstantně klesá (Hlavová a kol. 2014). Překonávají epiteliální bariéru střeva a krví se dostávají do periferních tkání - mýzních uzlin, jater, sleziny, plic. Dominantním subtypem v prasečím kolostru jsou CD8⁺ oproti CD4⁺. Tyto lymfocyty jsou navíc, podobně jako kolostrální protilátky, antigenně specifické a pomáhají tak chránit novorozené sele před infekčním tlakem prostředí (Nechvátalová a kol. 2011).

1.6. Salmonelové vakcíny

Kontrola salmonelových infekcí v chovech hospodářských zvířat je díky schopnosti salmonel kolonizovat jiné zvířecí druhy a přežívat v prostředí nezbytná. Jednou z možných cest této kontroly je vakcinace. Kromě snížení samotné prevalence salmonelových onemocnění se vhodným očkováním také snižuje spotřeba antibiotik a tím i vznik rezistentních druhů bakterií (Andre a kol. 2008).

Dosud jediná komerčně dostupná vakcína pro prasata, registrovaná v Německu a Polsku, je vakcína Salmoporc®. Jedná se o živou, dvakrát atenuovanou vakcínu odvozenou od *S. Typhimurium* (Springer a kol. 2001). Vakcinace prasat touto vakcínou vede k významnému snížení kolonizace orgánů střeva a přilehlých mýzních uzlin salmonelami. Ačkoli kmen použitý ve vakcíně je odlišitelný od divokého typu pomocí auxotrofie nebo jinými molekulárně biologickými metodami, neumožňuje sérologické rozlišení zvířat infikovaných od těch vakcinovaných. Selke a kol. (2007) použili isogenní mutant vakcinačního kmene s delecí genu pro povrchový protein OmpD. Protilátky proti tomuto proteinu se vytváří u prasat po přirozené infekci, nikoli po aplikaci vakcíny. Toto je typický příklad negativní markerové vakcíny, který umožňuje odlišit zvířata vakcinovaná a infikovaná z protilátek v jejich séru - DIVA vakcíny (Differentiating Infected from VAccinated individuals) (van Oirschot 1999). Běžně používané sérologické diagnostické testy odhalující salmonelové infekce jsou založeny na detekci protilátek proti O-

antigenům povrchových lipopolysacharidů. Tyto testy však nedokáží rozeznat zvířata infikovaná od zvířat vakcinovaných, pokud se nepoužije vakcinační kmen s delecí v genu zodpovědném za sestavení LPS struktury. Leyman a kol. (2011) připravili mutantní kmeny *S. Typhimurium* s delecí genů *rfaL*, *rfaJ*, *rfaI*, *rfaG*, *rfaF* a *rbfA*, každý zodpovědný za připojování jiných mono/disacharidových jednotek při výstavbě LPS. Bearson a kol. (2016) připravili Δ *rfaH* mutantní kmen společně s mutací několika regulačních RNA genů. Obě skupiny dosáhly snížení kolonizace vnitřních orgánů po infekci *S. Typhimurium* resp. *S. Choleraesuis*. Bakteriální LPS však může hrát důležitou roli jako aktivátor imunitní odpovědi a může tak být důležitou součástí v navození protektivity takovéto vakcíny (Zariri a van der Ley 2015, Arenas 2012). Používání geneticky modifikovaných živých vakcinačních kmenů však s sebou také nese určitá rizika a omezení. Všeobecná netolerance GMO a složitý legislativní proces znesnadňuje zavedení takovéto vakcíny v chovech. Využití živých atenuovaných kmenů s sebou zase nese určité riziko v podobě opětovného znovuzískání patogenních vlastností.

2. Cíle disertační práce

- 1) Srovnání patogeneze onemocnění vyvolané dvěma nejčastěji se vyskytujícími sérovary salmonel u prasat - *S. Typhimurium* a *S. Derby*, zahrnující:
 - *in vivo* infekci prasat, kolonizaci jejich orgánů salmonelami, protilátkovou a buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď
 - odpověď po *in vitro* infekci izolovaných, z monocytů derivovaných prasečích makrofágů
- 2) Možnosti vakcinace prasat
 - vakcinace prasnic před porodem a přenos protektivní imunity na sající selata
 - křížová protektivita vakcíny odvozené od kmene *S. Typhimurium* před *S. Derby* infekcí
- 3) Rozlišení infikovaných prasat od prasat vakcinovaných připravovanou vakcínou - DIVA
 - nalezení antigenů rozlišujících vakcinovaná a infikovaná zvířata a příprava rekombinantních proteinů
 - návrh sérologických testů využívající tyto antigeny

3. Materiál a metody

3.1. Bakteriální kmeny

V této práci byly použity kmeny *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium (*S. Typhimurium*, STM), fágový typ DT104 (číslo kmene 1A5 bakteriální sbírky oddělení imunologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Derby (*S. Derby*, SD), kmen De1 (číslo kmene 19H3, Volf a kol. 2010) a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Infantis (*S. Infantis*, SI, číslo kmene 1A3 bakteriální sbírky oddělení imunologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství). Bakterie byly kultivovány přes noc při 37°C v LB médiu (Miller's LB Broth Base, Invitrogen, USA) nebo v BHI médiu (Brain heart infusion, Oxoid, Velká Británie), jak bude popsáno dále.

3.2. Srovnání patogeneze *S. Typhimurium* a *S. Derby* u prasat

3.2.1. Experimentální infekce prasat

Do infekčního experimentu byla zařazena sérologicky i bakteriologicky negativní selata z komerčního chovu odstavená 21 dní po narození. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin a infikována týden po ustájení - 28 dní od narození. První kontrolní skupina pěti zvířat byla salmonela-negativní po celou dobu experimentu. Druhá skupina pěti zvířat byla infikována orální cestou 1×10^8 CFU kultury *S. Typhimurium*. Třetí skupina o pěti zvířatech byla infikována 1×10^8 CFU kultury *S. Derby*. Poslední skupina 10 selat byla infikována směsnou kulturou *S. Typhimurium* a *S. Derby* ($5 \times 10^7 + 5 \times 10^7$ CFU). Během prvního týdne experimentu byly denně odebírány vzorky trusu pro každou skupinu zvířat. Od druhého týdne byly odebírány dvakrát týdně. Na konci experimentu - po 28 dnech byla selata v anestezii usmrcena a byly odebrány vzorky vnitřních orgánů - tonzily, sleziny, ileocékální mízní uzliny, ilea, céka a kolonu. Ze vzorků trusu a orgánů byly poté stanoveny počty salmonel vyšetím různého ředění vzorků homogenizovaných tkání na misky s agarem. Počty bakterií byly poté převedeny na logaritmické hodnoty. Vzorky negativní na přítomnost salmonel touto metodou byly obohaceny v polotuhém Rappapoort-Vassiliadis médiu (Oxoid, Velká Británie) pro kvalitativní

stanovení. Vzorkům pozitivním pouze touto metodou byla přiřazena hodnota 1, negativní vzorky v obou testech měly hodnotu 0.

3.2.2. Protilátková odpověď

Před samotnou infekcí a pak jednou týdně byla od každého zvířete odebrána periferní krev. Hladiny IgG protilátek proti salmonele byly stanoveny soupravou Salmotype® Pig Screen ELISA (Qiagen, Německo), detekující anti-LPS protilátky. IgM protilátky proti lipopolysacharidu byly naměřeny ELISA metodou s využitím purifikovaného O-antigenu kmene *S. Typhimurium* (Sigma-Aldrich, USA). Měření hladin protilátek proti SipB proteinu bylo provedeno stejnou metodou za použití rekombinantně připraveného proteinu SipB (viz sekce 3.4.6.). Antigeny v 0,05 M sodném karbonát-bikarbonátovém pufru o pH 9,6 byly při 4°C přes noc navázány do jamek mikrotitračních desek (MaxiSorp, Nunc, Dánsko) a poté blokovány po dobu 30 minut 1% kaseinovým hydrolyzátem (Imuna, ČR) v PBS s 0,05 % Tween-20 (PBS/T, Serva, Německo). Jamky byly následně inkubovány (1 hod, LT) se 100x ředěnými prasečími séry, promyty PBS/T a konečně inkubovány s kozím anti-prasečím IgG konjugovaným s HRP (A100-104P, Bethyl Laboratories, USA) nebo kozím anti-prasečím IgM konjugovaným s HRP (A100-100P, Bethyl Laboratories, USA). Po promytí byl přidán chromogenní substrát TMB Complete (Test-line, ČR) a po 10 minutách reakce zastavena 2 M kyselinou sírovou (Penta, ČR). Absorbance byly měřeny při 450 nm na přístroji Synergy H1 (Biotek, USA). Všechny vzorky byly ELISA metodami měřeny v duplikátech. Pozitivní hodnota byla stanovena jako průměr absorbancí kontrolních vzorků plus tři směrodatné odchylky (Jacobson 1998). Pozitivní hodnota komerční soupravy byla určena výrobcem jako 15 % interní pozitivní kontroly.

3.2.3. Transformační test lymfocytů (LTT)

Heparinizovaná krev selat byla inkubována se specifickým antigenem v množství 2,5 µg proteinů *S. Typhimurium* nebo *S. Derby* na mililitr krve, po dobu 5 dnů při 37°C v 5 % CO₂. 20 hodin před koncem inkubace bylo přidáno 50 µl RPMI média (GE Healthcare, Velká Británie) s ³H-thymidinem (5 µCi/ml). Inkorporace ³H-thymidinu jako markeru cDNA replikace a klonální expanze byla analyzována pomocí destičkového scintilačního čítače TopCount NXT™ (Packard Bioscience

Instrument Company, USA). Výsledky byly vyjádřeny stimulačními indexy, vypočítané jako poměr CPM (counts per minute) stimulovaných vzorků k CPM nestimulovaných kontrol. Mezní hodnota byla stanovena průměrem hodnot kontrolních vzorků plus trojnásobek standardní odchylky.

3.2.4. Uvolnění IFN γ z lymfocytů

Heparinizovaná krev selat byla inkubována se specifickým antigenem v množství 2,5 μ g proteinů *S. Typhimurium* nebo *S. Derby* na mililitr krve, po dobu 24 hodin při 37°C v 5 % CO₂. Poté byla centrifugací (10 min při 2400 $\times$ g) oddělena plasma a použita pro detekci uvolněného IFN γ komerčním ELISA kitem (Invitrogen, USA).

3.2.5. *In vitro* infekce MDM

Mononukleární buňky periferní krve byly izolovány z heparinizované krve tří zdravých, 2-4 měsíce starých selat pomocí centrifugace v hustotním gradientu v Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA). CD14⁺ buňky byly izolovány magnetickým sortingem s myší anti-prasečí CD14 monoklonální protilátkou (MCA1218, AbD Serotec, Velká Británie) využitím MACS separačního systému podle instrukcí výrobce (Miltenyi Biotec, Německo). Izolované buňky byly inkubovány při 37°C v 5 % CO₂ v DMEM médiu (Gibco, Life Technologies, USA) s 10% prasečím sérem (PAA, Velizy-Villacoublay, Francie) a antibiotiky (penicilin 100 IU/ml, Biotika, Slovensko; a streptomycin 0,2 mg/ml, Sigma, Německo). Po čtyřech dnech kultivace byly z monocyty derivované makrofágy (MDM) promyty čerstvým médiem bez antibiotik a následně byly infikovány *S. Typhimurium* nebo *S. Derby* v množství 10 bakterií na buňku. Po jedné hodině byly extracelulární bakterie zabity přídatkem gentamicinu (Sigma-Aldrich, USA) v koncové koncentraci 100 μ g/ml. Po další hodně bylo médium opět vyměněno za čerstvé s přídatkem gentamicinu (15 μ g/ml) k zabránění extracelulární replikace salmonel. MDM byly dále kultivovány 22 hodin.

3.2.5.1. Smrt MDM a uvolnění laktát dehydrogenázy (LDH)

Smrt MDM buněk byla stanovena měřením množství uvolněné laktát dehydrogenázy do média pomocí CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay podle doporučení výrobce (Promega, USA).

3.2.5.2. Uvolnění IL-1 β

IL-1 β uvolněný z MDM do média byl stanoven pomocí ELISA soupravy IL-1 β pig ELISA podle instrukcí výrobce (R&D Systems, USA).

3.2.5.3. Aktivace kaspázy-1

MDM buňky byly lyzovány v Laemmli pufru (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 (Carl Roth, Německo), 2 % SDS (Carl Roth, Německo), 10 % glycerol (Penta, ČR), 0,1 % β -merkaptoethanol (Sigma_aldrich, USA), 0.0005 % bromfenolová modř (Lachema, ČR)), separovány na 12% SDS-PAGE gelu a transferovány na PVDF membránu (Amersham, GE Healthcare, Velká Británie). Membrány byly přes noc blokovány v 1 % kaseinového hydrolyzátu (Imuna, ČR) při 4°C. Poté byly inkubovány s primárními protilátkami - králičí polyklonální protilátka proti kaspáze-1 (AP00006PU-N, Acris Antibodies, USA) nebo myší IgG proti β -aktinu (ab6276, Abcam, VB), jednu hodinu při pokojové teplotě. Po promytí v PBS s 0,05 % Tween-20 (Serva, Německo) byly 1 hodinu inkubovány při pokojové teplotě se sekundární protilátkou - kozí anti-králičí IgG (111-035-008, Jackson Immuno Research, USA) nebo oslí anti-myší IgG (715-035-151, Jackson Immuno Research, USA), obě konjugované s křenovou peroxidázou. Po dalším promytí byly komplexy Ag-Ab vizualizovány chemiluminiscenční soupravou ECL plus (GE Healthcare, VB).

3.3. Vakcinace prasat

Vakcinace prasnic v těchto experimentech probíhaly ve stejném schématu. 1 ml kultury *S. Typhimurium* kultivované v BHI (brain heart infusion) médiu (Oxoid, Velká Británie) do množství 1×10^9 CFU na ml, inaktivované formaldehydem (celkové množství 1 %) a smíchané se stejným objemem ISA50V2 adjuvans (Seppic, Francie), bylo aplikováno intramuskulárně do krku zvířete. Po 14 dnech od aplikace první dávky byla zvířata revakcinována stejnou dávkou vakcíny.

3.3.1. Infekce selat

Čtyři dny po narození byla selata vakcinovaných a nevakcinovaných prasnic inokulována 1×10^7 CFU kultury *S. Typhimurium* v experimentu stanovujícím chráněnost selat (4.2.1.) a $2,4 \times 10^7$ CFU kultury *S. Typhimurium* nebo $2,6 \times 10^7$ CFU *S. Derby* v následujícím experimentu srovnávajícím křížovou protektivitu (4.2.2.). Stanovení počtu salmonel kolonizujících jednotlivé orgány prasat je popsáno v sekci 3.2.1.

3.3.2. Protilátková odpověď

Hladiny specifických IgG protilátek proti salmonelle v séru byly stanoveny soupravou Salmotype® Pig Screen ELISA (Qiagen, Německo). Specifické IgA protilátky v séru a jejunu byly naměřeny ELISA metodou s O-antigenem LPS kmene *S. Typhimurium* (Sigma-Aldrich, USA) postupem podobným jako při měření IgG v sekci 3.2.2. Pro stanovení IgA protilátek byla séra 100x zředěna, jejunální laváž ředěna dvakrát v PBS (Lonza, Švýcarsko). Jako sekundární protilátky bylo použito kozí anti-prasečí IgA protilátky konjugované s HRP (A100-102P, Bethyl Laboratories, USA).

3.3.3. Inhibice motility salmonel

Vliv anti-STM protilátek na pohyblivost bakterií *S. Typhimurium* a *S. Derby* byl testován *in vitro* inhibičním testem (podle Forbes 2008). Misky s LB agarem (Invitrogen, USA) bez přidaného séra, se 100x nebo 1000x ředěným hyperimunním sérem (inaktivovaným teplem) vakcinovaných prasnic byly inokulovány 1 μ l 20 h kultury *S. Typhimurium* nebo *S. Derby* kultivované v tekutém LB médiu (Invitrogen, USA). Po dobu 8 hodin byla sledována migrace bakterií agarem. Test motility byl proveden dvakrát pro každé ze dvou prasečích sér.

3.3.4. Trivalentní inaktivovaná vakcína

Trivalentní vakcína byla připravena kombinací antigenů tří sérotypů salmonel - *S. Typhimurium*, *S. Derby* a *S. Infantis* (TDI vakcína). Stejně jako monovalentní vakcína i tato varianta využívá kultur inaktivovaných formaldehydem (1 % celkové koncentrace) a je smíchaná se stejným objemem adjuvans ISA50V2 (Seppic,

Francie). Trivalentní vakcína je připravována ve společnosti Bioveta, a. s., kde byla také ověřena účinnost této TDI vakcíny provedením infekčního experimentu na selatech vakcinované a nevakcinované prasnice ve stejném schématu jako je popisováno v kapitole 3.3. Selata byla inokulována stejným množstvím kultury STM, SD nebo SI a byla stanovena míra kolonizace střeva a přilehlé mízní uzliny jednotlivými kmeny salmonel.

3.3.4.1. Rozlišení sérovar-specifických protilátek

Pro rozlišení protilátek specifických pro jednotlivé sérovary jsme využili rozdílnosti v konkrétních antigenních strukturách salmonel. *S. Infantis* se od zbylých dvou sérovarů liší strukturou lipopolysacharidu. Ačkoli všechny tři sérovary disponují bičíky, tvořenými podjednotkami FliC proteinu, sekvence tohoto proteinu není shodná pro všechny sérovary. Byly vytvořeny fragmenty FliC proteinu se specifickou sekvencí pro *S. Typhimurium* a *S. Derby*. Primery pro tyto sekvence jsou uvedeny v Tabulce 1. Dále byly vytvořeny rekombinantní fragmenty těchto proteinů postupem shodným s postupem uvedeným v kapitole 3.4.6. Izolace LPS kmene *S. Infantis* byla provedena metodou fenolové extrakce. 200 ml noční kultury *S. Infantis* v tekutém LB médiu (Invitrogen, USA) bylo stočeno (10 min, 3500 × g) a promyto v PBS (Lonza, Švýcarsko), buněčná peleta resuspendována ve 20 ml deionizované vody a následně zahřátá na 68°C. Ke vzorku byl dále přidán stejný objem 90% fenolu (Reactivul, Rumunsko) zahřátého na 65-68°C a za stálého míchání byla udržována tato teplota. Po 30 minutách byla směs zchlazena na ledu na 5-10°C. Roztok byl centrifugován po dobu 30 minut při 1000 × g a byla odebrána horní vodná fáze. Vzorek byl 20 hodin dialyzován proti tekoucí vodě. Následně byl přidán 1 ml 30% octanu sodného (Dorapis, ČR) a 6-8 násobek objemu čistého ethanolu (Penta, ČR). Po centrifugaci byl vysrážený LPS postupně promyt v methanolu (J. T. Baker, USA), acetonu (Penta, ČR) a diethyletheru (Penta, ČR), který byl po stočení odpařen při laboratorní teplotě.

Pro analýzu specifických protilátek proti těmto antigenům byl proveden western blot podle stejného postupu jako je popsáno v kapitole 3.4.7.1. Byla analyzována séra myší vakcinovaných monovalentními inaktivovanými vakcínami stejného složení jako u vakcinace prasat (provedeno v Bioveta, a. s.). Myší séra byla 100x ředěna a jako sekundární protilátky bylo použito oslí anti-myší IgG protilátky

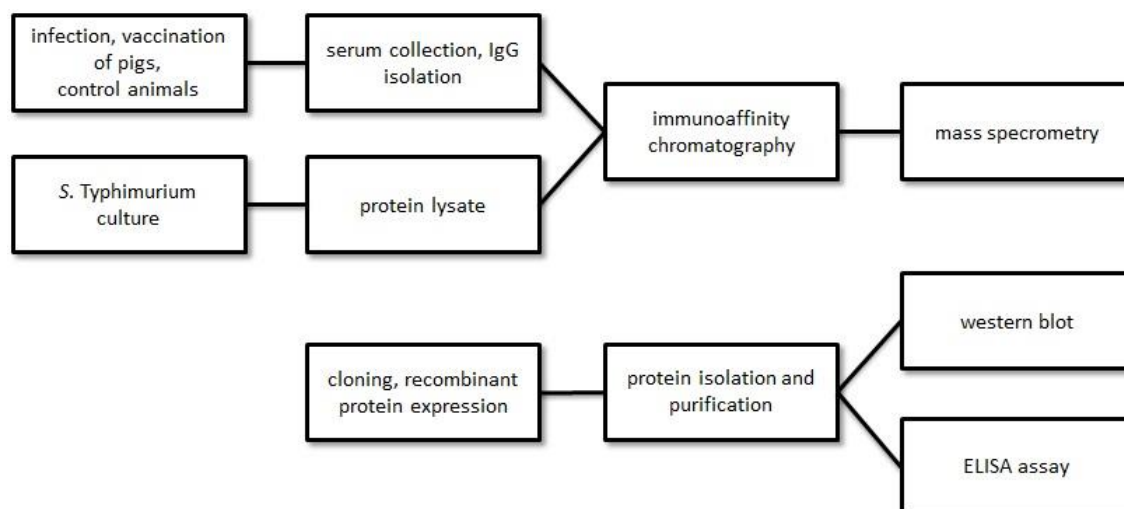
(715-035-151, Jackson ImmunoResearch, USA). Myší anti-HisTag protilátka (MA1-21315, Pierce, Thermo Scientific, USA), se stejnou sekundární protilátkou, byla použita jako pozitivní kontrola přítomnosti rekombinantního proteinu.

Tabulka 1 Primery sérovar-specifických fragmentů proteinu *FliC* a předpokládaná molekulová hmotnost produktů včetně sekvence HisTagu

Protein	Forward primer 5'-3'	Expected protein MW
	Reverse primer 5'-3'	
STM_FliC-frag	ACGCTGAATGTGCAACAAAAATATAAGGTC	26.0 kDa
	ACCTTCGGCTTTACTTGCAGCG	
SD_FliC-frag	GGGTTCAATGTTAATGGGCCAAAAGAAG	27.2 kDa
	GCCAGAAGCTGTTTTGTCAATAAACATGG	

3.4. Rozlišení post-infekčních a post-vakcinačních protilátek

K nalezení antigenů vhodných pro sérologické rozlišení infikovaných a vakcinovaných prasat byl použit postup znázorněný schématem na Obr. 1. Z kontrolních, sérologicky negativních zvířat, ze zvířat vakcinovaných a ze zvířat 28 dní po infekci bylo získáno sérum. Imunoafinitní chromatografií byly zachyceny antigeny *S. Typhimurium* vázající se na protilátky v kontrolních, post-infekčních a post-vakcinačních sérech. Hmotnostní spektrometrií byly tyto proteiny identifikovány. Vybrané proteiny byly klonovány do expresního vektoru *E. coli*, exprimovány a testovány western blotem s kontrolními, post-infekčními a post-vakcinačními séry. Vybrané antigeny byly použity pro konstrukci DIVA ELISA.



Obrázek 4 Schéma postupu experimentu vedoucí k nalezení DIVA antigenů

3.4.1. Infekce a vakcinace odstavených selat

V tomto infekčním experimentu bylo použito 36 selat po odstavu - 21 dní od narození a ty byly rozděleny do tří skupin po 12. První kontrolní skupina byla sérologicky negativní na protilátky proti salmonelle (stanoveno komerčním kitem Salmotype® Pig Screen ELISA, Qiagen, Německo). Dalších 12 selat bylo týden po ustájení infikováno orální cestou dávkou 1×10^8 CFU kulturou *Salmonella* Typhimurium kultivovanou v BHI médiu (Oxoid, Velká Británie). Třetí skupina zvířat byla vakcinovaná 1 ml vakcíny připravené z inaktivované kultury *S. Typhimurium*, jak je uvedeno v kapitole 3.3. Krev všech zvířat byla odebírána v týdenních intervalech.

3.4.2. Izolace IgG protilátek

Séra tří náhodně vybraných zvířat z každé skupiny byla smíchána a z nich izolovány IgG protilátky pomocí kolonek s Proteinem G (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare, Velká Británie) podle instrukcí výrobce. Afinitní chromatografie byla provedena na FPLC chromatografu (Pharmacia, Švédsko).

3.4.3. Příprava proteinového lyzátu salmonel

Bakterie *S. Typhimurium* byly kultivovány přes noc při 37°C v LB nebo BHI médiu. Kultura byla poté centrifugována ($3500 \times g$, 10 min) a peleta buněk třikrát promyta v PBS (Lonza, Švýcarsko). Buněčná peleta byla poté resuspendována v PBS a sonikována (Sonoplus HD 3100, Bandelin, Německo) s 0,1 mm zirkonium/křemennými kuličkami (BioSpec Products, USA). Sonikát byl centrifugován při $20.000 \times g$ a supernatant s proteiny odebrán. Peleta po stočení byla ještě resuspendována v roztoku 8 M močoviny (Serva, Německo), 0,1 % SDS (Carl Roth, Německo), 2 % Triton X-100 (Serva, Německo) a 25 mM hydrogenuhličitanu triethylamonného - TEAB (Sigma-Aldrich, USA) a poté opět stočena při $20.000 \times g$. Supernatanty z TEAB i ze sonikátu byly smíchány dohromady a použity jako antigen pro immunoafinitní chromatografii.

3.4.4. Imunoafinitní chromatografie

IgG izolované ze tří skupin zvířat byly kovalentně navázané na CNBr-aktivovanou Sepharosu (GE Healthcare, Velká Británie) podle návodu výrobce. Sepharosou s navázanými imunoglobuliny byly naplněny tři kolonky Econo-Pac (BioRad, USA) a použity v chromatografickém systému. Jako antigen byl použit proteinový lyzát z *S. Typhimurium* kultivované v LB médiu. Chromatografie probíhala ve vazném pufru - 20 mM fosfátový pufr o pH 7,0 (Serva, Německo), pro eluci salmonelových proteinů z kolon byl použit 0,1 M glycin-HCl (Serva, Německo) eluční pufr o pH 2,7. K eluovaným proteinům byl přidán 1 M Tris-HCl (Carl Roth, Německo), pH 9,0 pro upravení hodnot pH. Eluované proteiny byly poté identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

3.4.5. LC-MS/MS

Stejný postup identifikace proteinů z imunoafinitní chromatografie byl použit také pro stanovení exprese salmonelových proteinů v závislosti na kultivačních podmínkách.

100 µg proteinů (měřeno pomocí Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) bylo použito pro přípravu každého vzorku metodou FASP (Wiśniewski a kol. 2009). Každý vzorek byl pětkrát promyt v 8 M močovíně (Serva, Německo) v centrifugačních kolonkách Vivacon 500 (Sartorius Stedim, Německo) s 10.000 MWCO membránovým filtrem. 10 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich, USA) a 50 mM jodacetamid (Serva, Německo) v 25 mM TEAB pufru (Sigma-Aldrich, USA) byl použit pro redukci, respektive alkylaci proteinů. Proteiny byly poté štěpeny trypsinem (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, USA) v poměru 1:50 po dobu jedné hodiny při 37°C, poté přes noc při 25°C. Po centrifugaci Vivacon kolonky byly naštěpené peptidy odpařeny (DNA120 SpeedVac, Thermo Savant, USA) a peletka peptidů resuspendována v 0,1 % vodného roztoku kyseliny mravenčí (Sigma-Aldrich, USA), což je mobilní fáze kapalinové chromatografie (UltiMate 3000 RSLCnano, Dionex - Thermo Scientific, USA) před samotnou analýzou hmotnostním spektrometrem. Pro separaci a eluci peptidů byl použit dvouhodinový gradient se zvyšující se koncentrací acetonitrilu (0,1 % kyseliny mravenčí v acetonitrilu, obé Sigma-Aldrich, USA) (0 min - 4 %, 4 min - 4 %, 98 min -

45 %, 98,5 min - 90 %, 112 min - 90 %, 112,5 min - 4 %, 120 min - 4 %). Peptidy byly separovány na 25 cm koloně (Acclaim PepMap RSLC C18, 2 μ m, 100 Å, 75 μ m I.D., Thermo Scientific, USA) při průtoku 300 nl/min. uHPLC byl napojen na iontový zdroj EASY-Spray a hmotnostní spektrometr Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific, USA). Skenování probíhalo v rozmezí m/z 390-1700 a protonované peptidy s nábojovým číslem 2 a více byly automaticky vybrány pro data dependentní analýzu MS/MS a fragmentovány kolizí s plynem helia. Deset fragmentačních spekter bylo naměřeno po každém full skenu. Naměřená spektra byla poté zpracována pomocí softwaru Proteome Discoverer (ver. 1,4, Thermo Scientific, USA) s prohledávacími algoritmy Mascot (Matrix Science, USA) a Sequest HT (Thermo Scientific, USA). Oxidace methioninu a karbamidomethylace cysteinu byly přidány jako dynamické, respektive statické modifikace peptidů. Hmotnostní tolerance byly nastaveny na 10 ppm pro prekurzorové a 0,5 Da pro fragmentové ionty. Naměřená spektra byla prohledána proti Swiss-Prot databázi kmene *Salmonella* (2014/06) pro Mascot a Uniprot databázi kmene *Salmonella* (2013/04) pro Sequest HT. Pouze peptidy s FDR (false discovery rate) 0,05 byly považovány za správně identifikované.

3.4.6. Příprava rekombinantních proteinů a jejich purifikace

Primery pro všechny vybrané salmonelové proteiny byly navrženy pomocí NCBI/Primer BLAST a jsou uvedeny v Tabulce 2. Salmonelová DNA - supernatant z promyté a po dobu 10 min povařeně STM bakteriální kultury - sloužil jako templát pro PCR reakci s Taq polymerázou (Plain PP Master Mix, Top Bio, ČR). Produkty PCR reakcí byly purifikovány pomocí soupravy MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Německo), klonovány do pTrcHis-TOPO vektoru (Invitrogen, USA) a rekombinantní proteiny exprimovány v TOP10 One Shot chemicky kompetentních *E. coli* buňkách (Invitrogen, USA). IPTG v konečné koncentraci 1 mM byl použit pro indukci exprese proteinů. Rekombinantní proteiny s připojenými HisTag sekvencemi na svých N koncích byly izolovány v HiTrap Chelating HP kolonkách (GE Healthcare, VB) s navázanými ionty niklu. Ve zkratce - noční kultura transformovaných *E. coli* v LB médiu byla promyta v PBS a buňky byly sonikací rozbity. Po stočení sonikátu byl supernatant s proteiny převeden do vazného pufru (0,02 M fosfát sodný (Serva, Německo), 0,5 M NaCl (Carl Roth, Německo), 5 mM

imidazol (Serva, Německo), pH 7,4) s využitím odsolovacích kolonek (PD-10, Sephadex G-25, GE Healthcare, VB). Afinitní chromatografie s vázaným kovem byla provedena na FPLC systému (Pharmacia, Švédsko). Po promytí navázaných proteinů pufrém s vyšším obsahem imidazolu (40 mM) byly proteiny eluovány elučním pufrém (0,02 M fosfát sodný, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4).

Pokud bylo potřeba dalšího kroku purifikace, bylo toto provedeno pomocí preparativní elektroforézy na systému Model 491 Prep Cell (BioRad, USA) podle instrukcí výrobce. Pro ověření exprese a čistoty proteinů bylo využito SDS-PAGE a obarvením gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad, USA) a western blotu s myší anti-HisTag protilátkou (MA1-21315, Pierce, Thermo Scientific, USA).

Tabulka 2 Primery rekombinantních salmonelových proteinů a předpokládaná molekulová hmotnost produktů včetně sekvence HisTagu

Protein	Forward primer 5'-3'	Expected protein MW
	Reverse primer 5'-3'	
BamB	ATGCAATTGCGTAAATTACTTCTGCC	45.8 kDa
	TTAACGCGTAATCGCGTAGACC	
FlhC-frag	ACGCTGAATGTGCAACAAAAATATAAGGTC	25.8 kDa
	ACCTTCGGCTTTACTTGCAGCG	
MetQ	ATGGCGTTCAAATTCAAAACCTTTGCGG	33.3 kDa
	TTACCAGCCTTTCACCGCGCC	
PrgI	ATGGCAACACCTTGGTCAGGCTATC	12.7 kDa
	TTAACGGAAGTTCTGAATAATGGCAGCATC	
SipC	ATGTTAATTAGTAATGTGGGAATAAATCCCGCC	46.8 kDa
	TTAAGCGCGAATATTGCCTGCGAT	
SipD	ATGCTTAATATTCAAATTATTCCGCT	41.0 kDa
	TTATCCTTGCAGGAAGCTTTT	
SseB	ATGTCTTCAGGAAACATCTTATGGGGAA	25.4 kDa
	TCATGAGTACGTTTTCTGCGCTATC	
SurA	ATGAAGAACTGGAAAACGCTGCTTC	51.1 kDa
	TTAGTTACTCAAATCTTAACGTAAGCGCTG	
SipB	ATGGTAAATGACGCAAGTAGCATTAGCCG	66.3 kDa
	TTATGCGCGACTCTGGCGCAGAATAAAAC	
OppA	ATGTCTAACATCACGAAAAAAGTTTG	65.1 kDa
	TTAATGTTTGATAATATATAAGTTTTTCACATAAAT	

3.4.7. Sérologické testování

3.4.7.1. Western blot

Purifikované rekombinantní proteiny v Laemmli pufru (viz kapitola 3.2.5.3.) byly separovány na 10% a 12% SDS-PAGE gelech a přeneseny na PVDF membrány (Amersham, GE Healthcare, VB), které byly následně blokovány 1% kaseinovým

hydrolyzátem (Imuna, ČR) přes noc při 4°C. Poté byly membrány inkubovány se 100x ředěnými prasečími séry po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Po promytí v PBS s 0,05 % Tween-20 (PBS/T, Serva, Německo) byly 1 hodinu inkubovány při pokojové teplotě s kozím anti-prasečím IgG konjugovaným s křenovou peroxidázou (A100-104P, Bethyl Laboratories, USA). Po dalším promytí byly komplexy Ag-Ab vizualizovány chromogenním substrátem diaminobenzidinem (Sigma-Aldrich, USA) s přidaným peroxidem vodíku (Penta, Česká republika).

3.4.7.2. ELISA

Postup stanovení IgG protilátek proti rekombinantním proteinům byl stejný, jako je popsáno v sekci 3.2.2. Hladiny IgG protilátek proti LPS byly stanoveny pomocí komerčního ELISA kitu Salmotype® Pig Screen ELISA (Qiagen, Německo).

3.5. Analýza dat

Všechny grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism, ver.5 (GraphPad Software, USA). Statistická významnost rozdílů mezi skupinami v *in vivo* testech kolonizace orgánů a hladin protilátek, a *in vitro* testech IL-1 β , LDH a testu motility byla analyzována ANOVA párovým testem s post-hoc Bonferroniho testem vícenásobného porovnání. Rozdíly mezi skupinami v ELISA byly vyjádřeny pomocí ANOVA s Dunnovým post-hoc testem.

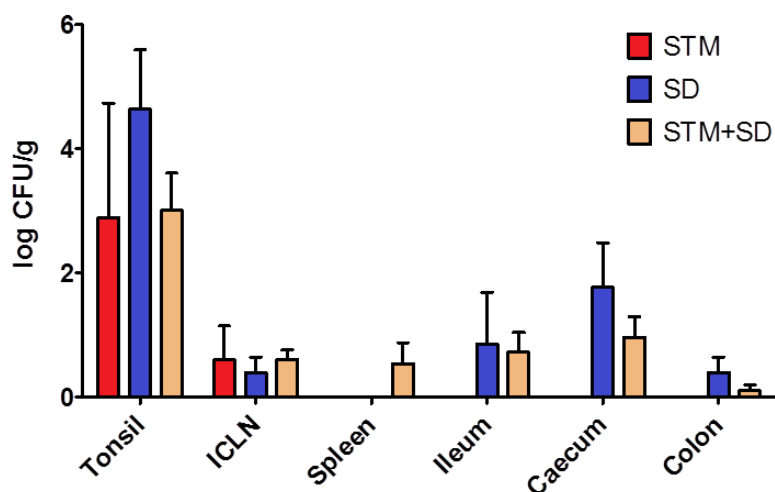
4. Výsledky

4.1. Srovnání patogeneze *S. Typhimurium* a *S. Derby* u prasat

Tato kapitola shrnuje výsledky prezentované v publikaci Matiašovic a kol. 2014 (viz příloha). Na této práci jsem se podílel odběrem a zpracováním orgánů prasat, měřením protilátkové odpovědi a měřením aktivace kaspázy-1 pomocí western blotu.

4.1.1. Počty salmonel ve sledovaných orgánech po *in vivo* infekci

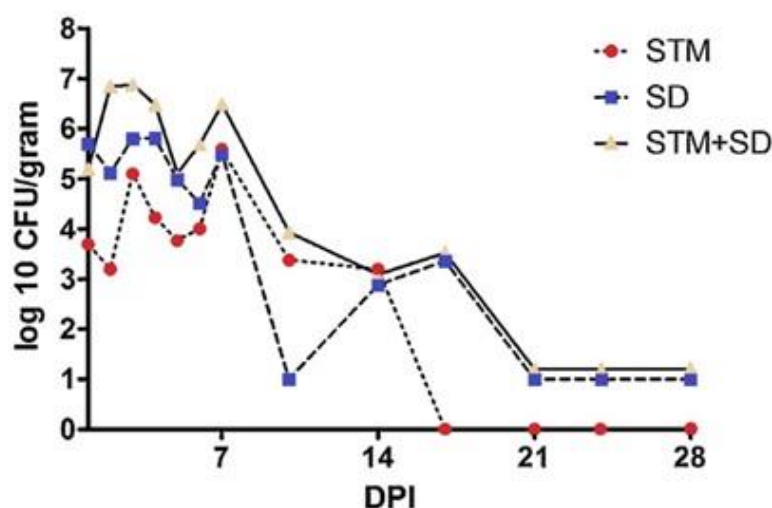
Odstavená selata byla před započítím experimentu sérologicky i bakteriologicky negativní na přítomnost salmonel. Na konci experimentu - po 28 dnech byla utracena a byla stanovena míra kolonizace některých orgánů bakteriemi salmonel. Kontrolní skupina zvířat byla negativní ve všech sledovaných orgánech. Ve skupině po infekci *S. Typhimurium* byla 4 z 5 selat bakteriologicky pozitivní na přítomnost salmonel v tonsile a 3 z 5 v ileocékálních mízních uzlinách. Všechny další sledované orgány byly po 28 dnech negativní. U *S. Derby* infikovaných zvířat byla prokázána přítomnost salmonel v tonsile u všech selat, ve stěně céka u 4 z 5 selat. V dalších orgánech - ileocékálních mízních uzlinách, stěně ilea a kolonu bylo vždy alespoň jedno zvíře pozitivní (Obr. 5). Kolonizace orgánů selat po směsné infekci *S. Typhimurium* a *S. Derby* se podobalo samostatné infekci *S. Derby*. Kolonizace sleziny však byla oproti negativnímu průběhu u obou monoinfekcí pozitivní u tří z deseti selat v případě smíšené infekce.



Obrázek 5 Počty salmonel ve vzorcích orgánů 28 dní po infekci. Hodnoty jsou udány jako logaritmus průměru počtu salmonel na gram tkáně, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměru.

4.1.2. Vylučování salmonel v trusu

Během celého infekčního experimentu byly odebírány směsné vzorky trusu zvlášť pro každou skupinu. Zvířata kontrolní skupiny byla negativní v celém průběhu experimentu. U selat po infekci *S. Typhimurium* byl pozitivní záchyt od prvního po 14. den infekce, poté byl trus bakteriologicky negativní. U skupin selat po infekci *S. Derby* a směsné infekci byly bakterie salmonel detekovány v celém průběhu experimentu.



Obrázek 6 Průběh vylučování bakterií jednotlivých sérovarů salmonel v trusu během experimentu. Hodnoty jsou udány jako logaritmus průměru počtu salmonel na gram vzorku trusu. DPI - dny po infekci

4.1.3. Protilátková odpověď

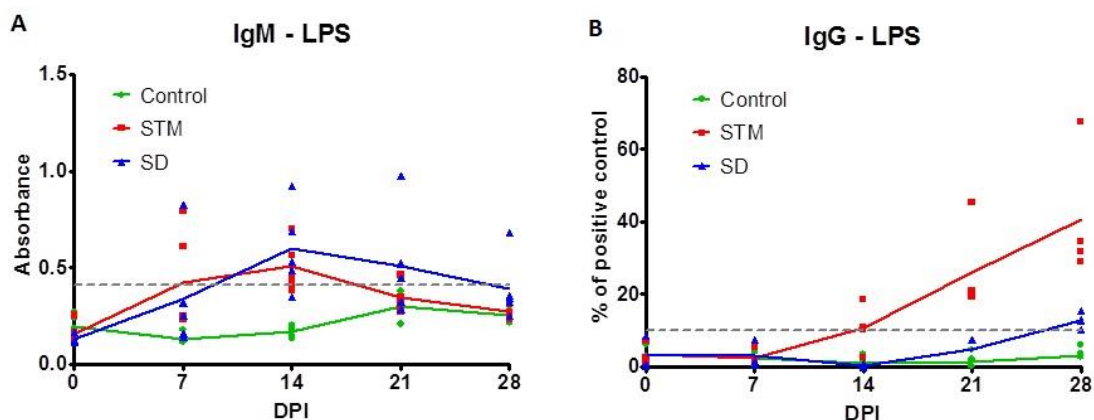
Dále byla změřena protilátková odpověď na salmonelové antigeny na thymu nezávislé (LPS) a T-dependentní antigeny (protein SipB).

4.1.3.1. Protilátková odpověď na thymu nezávislá

Všechna zvířata kontrolní skupiny byla během celého experimentu sérologicky negativní na IgM i IgG protilátky proti O-antigenům lipopolysacharidů. Zvýšené hladiny IgM protilátek byly u obou infikovaných skupin (STM i SD) detekovatelné po 7 dnech od infekce s maximem ve 14. dni. Dále hladina těchto imunoglobulinů u infikovaných skupin konstantně klesala (Obr. 7 A).

Anti-LPS IgG protilátky (Obr. 7 B) vykazovaly pozdější nástup tvorby. Rozdíly v indukcii tvorby protilátek mezi infikovanými skupinami byly v tomto případě významné. Zatímco u selat po SD infekci překročily IgG protilátky pozitivní hladinu

až po 4 týdnech od infekce, zvýšené hladiny IgG u STM infikovaných zvířat byly detekovatelné už po 14 dnech s dalším nárůstem v průběhu experimentu.

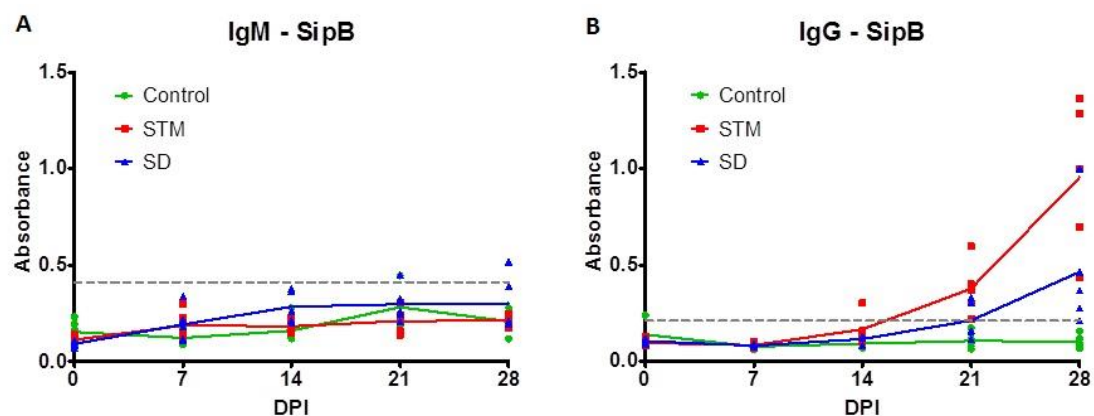


Obrázek 7 IgM protilátková odpověď (A) a IgG protilátková odpověď (B) proti O-antigenům LPS u prasat infikovaných *S. Typhimurium* nebo *S. Derby*. Zobrazeny jsou hodnoty jednotlivých zvířat, spojovací křivky reprezentují průměrné hodnoty. Šedé čárkované linie zobrazují prahovou hodnotu pozitivitu (viz sekce Materiál a metody). DPI - dny po infekci

4.1.3.2. Protilátková odpověď na thymu závislá

Neinfikovaná zvířata vykazovala negativní hodnoty IgM i IgG protilátek proti SipB - povrchovému proteinu salmonel. Specifické IgM hladiny protilátek překročily pozitivní hladinu pouze u jednoho zvířete ze skupiny po SD infekci 21. a 28. den (Obr. 8 A). Všechna ostatní byla negativní na přítomnost anti-SipB IgM protilátek v séru v celém průběhu experimentu.

Vzestup hladin IgG protilátek proti SipB proteinu (Obr. 8 B) kopíroval průběh tvorby protilátek proti lipopolysacharidu u obou skupin. Vyšší hladiny IgG byly naměřeny u skupiny STM infikovaných selat od 14. až po 28. den experimentu.



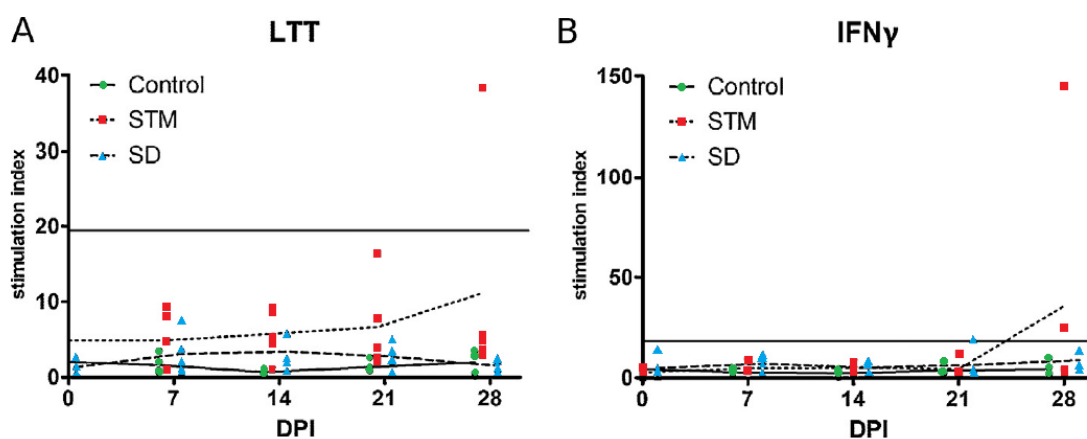
Obrázek 8 IgM protilátková odpověď (A) a IgG protilátková odpověď (B) proti proteinu SipB u prasat infikovaných *S. Typhimurium* nebo *S. Derby*. Zobrazeny jsou hodnoty jednotlivých zvířat, spojovací křivky reprezentují průměrné hodnoty. Šedé čárkované linie zobrazují prahovou hodnotu pozitivitu (viz sekce Materiál a metody). DPI - dny po infekci

4.1.4. Buněčná odpověď

Pro stanovení schopnosti buňkami zprostředkované složky imunity selat odpovídat na specifické antigeny *S. Typhimurium* a *S. Derby*, byl proveden Transformační test lymfocytů (LTT) a měření uvolnění IFN- γ specifickými lymfocyty infikovaných selat.

Proliferace a transformace T-buněk v odpovědi na specifický antigen (Obr. 9 A) byla detekována pouze u jednoho zvířete ze skupiny infikované *S. Typhimurium* 28. den po infekci. Žádné ostatní zvíře nevykazovalo zvýšenou aktivitu specifických lymfocytů v celém průběhu experimentu.

Zvýšené hladiny IFN- γ vyplaveného ze stimulovaných buněk (Obr. 9 B) byly naměřeny pouze u dvou selat po STM infekci a až 28. den po infekci. Buňky všech ostatních zvířat byly negativní v celém průběhu experimentu.



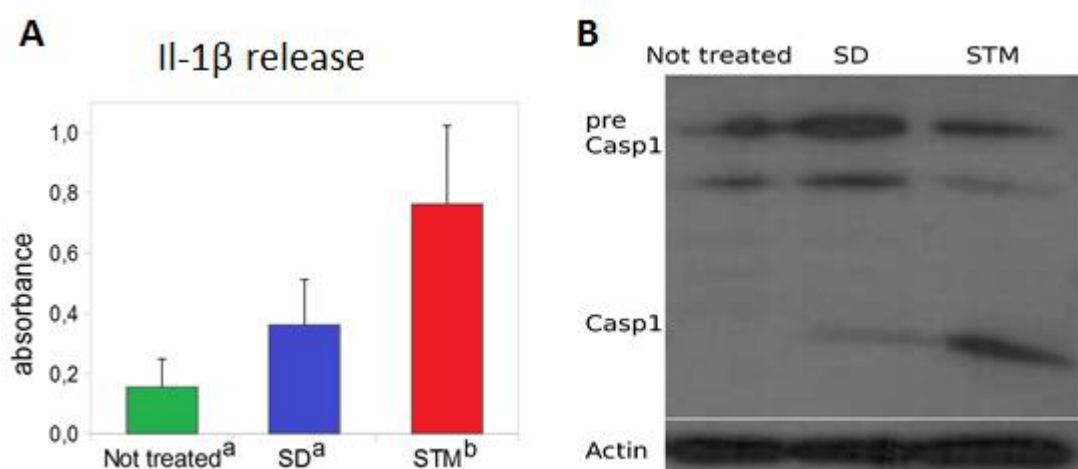
Obrázek 9 Stimulační indexy pro Lymfocyt transformační test (A) a sekreci IFN- γ (B) STM a SD stimulovaných T lymfocytů. Zobrazeny jsou hodnoty buněk jednotlivých zvířat, spojovací křivky reprezentují průměrné hodnoty. Vodorovné linie zobrazují prahovou hodnotu pozitivitu (viz sekce Materiál a metody). DPI - dny po infekci

4.1.5. *In vitro* infekce MDM

Z důvodů rozdílné protilátkové odpovědi selat na *S. Typhimurium* a *S. Derby* infekci jsme analyzovali interakci makrofágů s těmito sérovary. Po 24 hodinové *in vitro* infekci z monocytů derivovaných makrofágů jsme naměřili téměř identické počty salmonel ($5,01 \pm 0,05 \log_{10}$ u STM a $5,02 \pm 0,02 \log_{10}$ u SD). I přesto byla odpověď takto stimulovaných makrofágů rozdílná na několika úrovních.

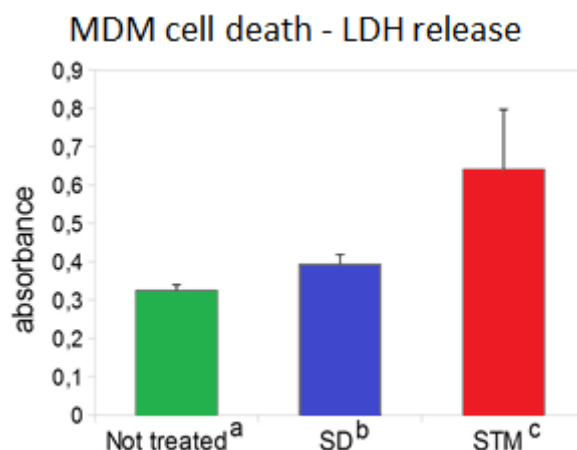
Programovaná smrt makrofágů, jako jeden z mechanismů obrany při salmonelové infekci, byla sledována pomocí uvolnění interleukinu-1 β . Tomu

předchází štěpení prekursoru IL-1 β v cytosolu buňky na maturovanou formu cytokinu pomocí aktivní kaspázy-1. Zatímco zvýšení hladiny uvolněného IL-1 β z MDM infikovaných *S. Derby* nebylo oproti kontrolním buňkám statisticky významné, STM infikované makrofágy vykazovaly významně vyšší hladiny uvolněného IL-1 β oproti dvěma předchozím skupinám (Obr 10 A). Aktivace kaspázy-1 koresponduje s těmito výsledky, kdy bylo naměřeno vyšší procento aktivní Casp-1 oproti prekursoru pre-Casp-1 u MDM infikovaných *S. Typhimurium* (Obr. 10 B).



Obrázek 10 Aktivace pyroptotické dráhy infikovaných makrofágů. Uvolnění IL-1 β do média (A) a aktivace kaspázy-1 (B) po stimulaci MDM *S. Derby* a *S. Typhimurium*. Rozdílné indexy u grafu A naznačují statistickou významnost ($p < 0,05$), chybové úsečky pak směrodatnou odchylku průměru.

Aktivace této pyroptotické dráhy vede ke smrti buňky bez vytvoření apoptotických tělísek a tak se obsah buňky vylévá do okolního prostředí, čímž se indukuje zánět. Smrt makrofágů byla sledována pomocí měření laktát dehydrogenázy uvolněné do média z těchto buněk (Obr. 11). Největší cytotoxický efekt na MDM měla infekce *S. Typhimurium*, což koresponduje s množstvím aktivní kaspázy-1.



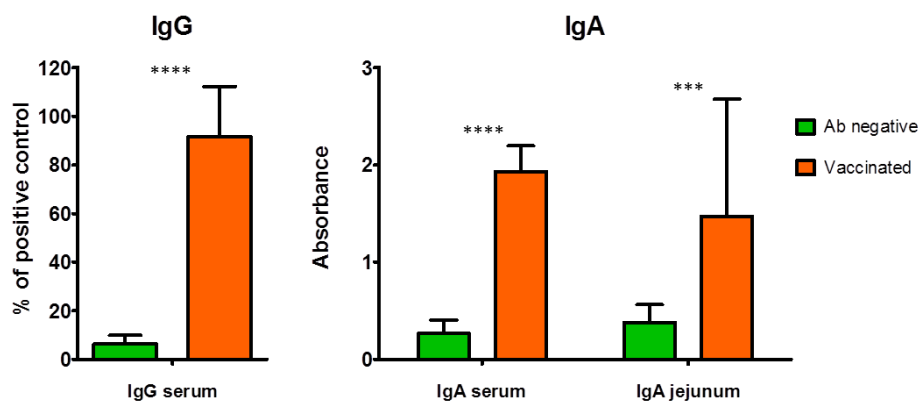
Obrázek 11 Aktivace pyroptotické dráhy infikovaných makrofágů. Uvolnění LDH do extracelulárního prostoru MDM po stimulaci *S. Derby* a *S. Typhimurium*. Rozdílné indexy naznačují statistickou významnost ($p < 0,05$), chybové úsečky pak směrodatnou odchylku průměru.

4.2. Vakcinace prasat

4.2.1. Vakcinace prasnic před porodem

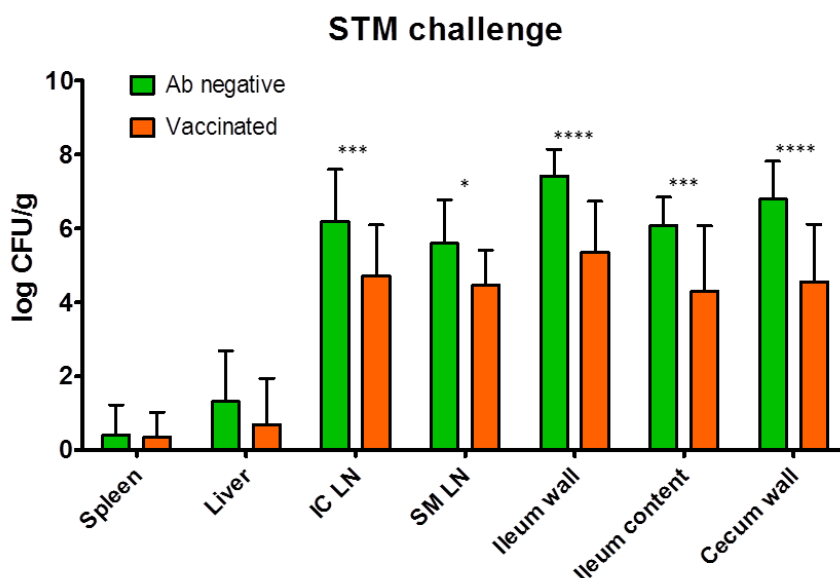
Tato kapitola shrnuje výsledky publikace Matiašovic a kol. 2013 (viz Seznam literatury), na které jsem se přímo nepodílel, avšak všechny následující výsledky a proběhlé experimenty z ní vycházejí nebo se na ni odkazují.

V tomto pokusu byla testována potenciální chráněnost novorozených selat pasivním přenosem imunity od vakcinovaných prasnic. Třetí den po porodu, před samotným infekčním pokusem, byla selatům odebrána krev a byly stanoveny hladiny získaných, specifických IgG a IgA protilátek proti LPS salmonel (Obr. 12). Po dalších třech dnech - na konci infekčního experimentu byly stanoveny specifické IgA protilátky z výplachu střeva. U všech selat byly zaznamenány několikanásobně vyšší hodnoty IgG i IgA získaných z kolostra a mléka vakcinovaných matek oproti selatům nevakcinovaných prasnic.



Obrázek 12 Hladiny získaných, specifických, anti-salmonelových IgG a IgA protilátek selat od vakcinovaných a nevakcinovaných prasnic. IgG a IgA v séru jsou měřeny v den infekce, IgA v laváži jejunum po 3 dnech - na konci experimentu. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměry všech zvířat ve skupině, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku průměru. Hvězdičky pak míru statistické významnosti.

Po třech dnech trvání infekčního pokusu byla selata utracena a v jejich orgánech stanovena míra kolonizace salmonelami. Ve sledovaných orgánech střeva - stěně ilea a céka a v obsahu ilea a také v mizních uzlinách - ileocékální a submandibulární byl signifikantně nižší počet salmonel oproti selatům nevakcinované prasnice, a to o jeden až dva řády. Ve slezině a játrech nebyly rozdíly v počtu salmonel mezi oběma skupinami zvířat (Obr. 13).

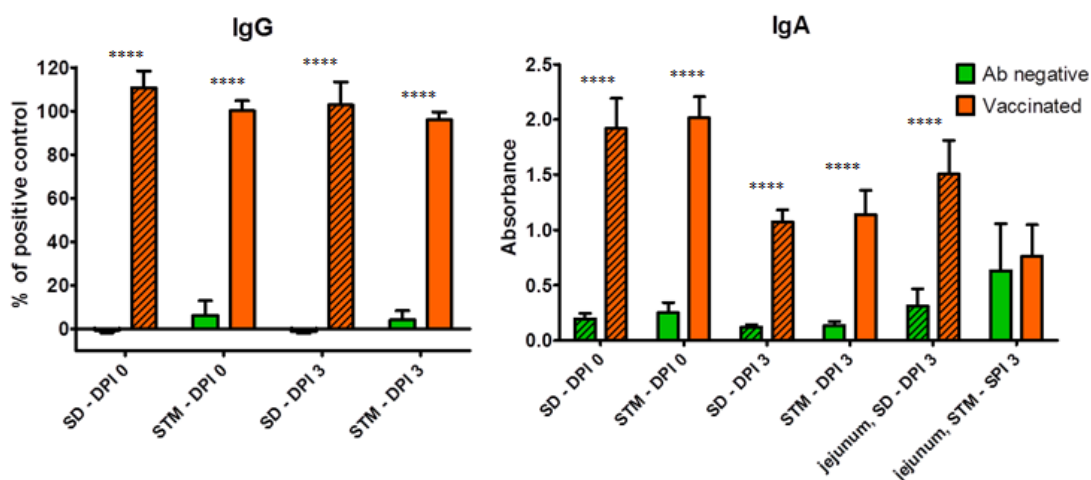


Obrázek 13 Počty salmonel ve vzorcích orgánů 3 dny po *S. Typhimurium* infekci selat vakcinovaných a nevakcinovaných prasnic. Hodnoty jsou udány jako logaritmus průměru počtu salmonel na gram tkáň, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměru. Hvězdičky pak míru statistické významnosti.

4.2.2. Křížová protektivita sajících selat po vakcinaci prasnic proti SD infekci

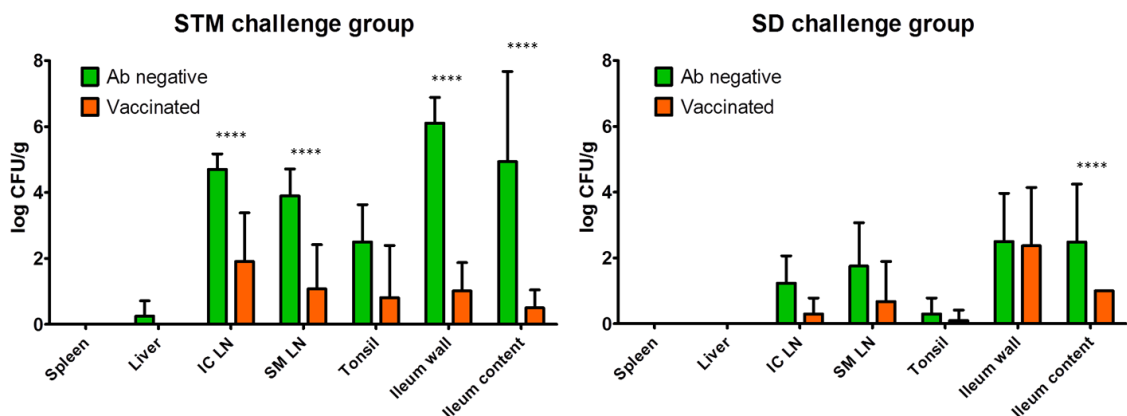
Z důvodů prokázaného zvýšení chráněnosti selat vakcinovaných prasnic před infekcí homologním kmenem, ale také rozdílné patogenezi onemocnění vyvolané infekcí *S. Typhimurium* a *S. Derby* jsme chtěli zjistit, zda imunizace prasnic vakcínou odvozenou od sérotypu *Typhimurium* bude chránit selata i před infekcí sérotypem *Derby*. Tato kapitola zabývající se potenciální křížovou protektivitou selat popisuje výsledky publikace Gebauer a kol. 2016a (viz příloha), na které jsem se podílel odběrem a zpracováním orgánů a zpracováním výsledků měření protilátek i kolonizace orgánů.

U obou infekčních skupin došlo k vysokému nárůstu specifických anti-salmonelových IgG i IgA protilátek získaných od vakcinované matky (Obr. 14). Zatímco hladiny specifických IgG protilátek byly stejné v den infekce i po třech dnech po infekci, u specifických IgA protilátek v séru selat došlo k téměř 50 % snížení po třech dnech infekce u selat infikovaných jak STM, tak SD.



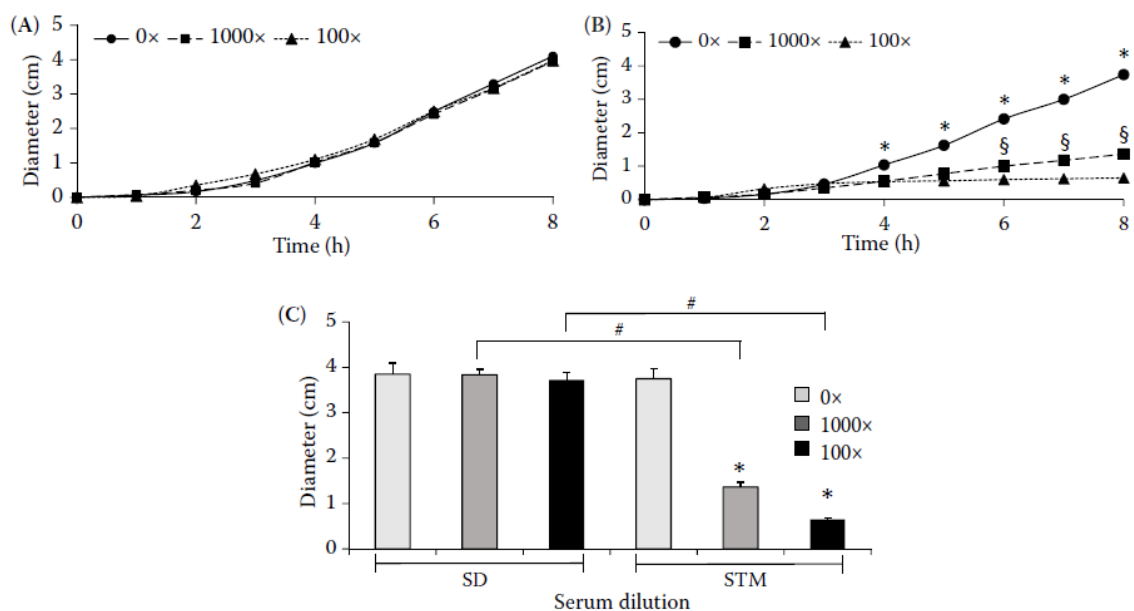
Obrázek 14 Hladiny získaných specifických, anti-salmonelových IgG a IgA protilátek selat od vakcinovaných a nevakcinovaných prasnic. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměry všech zvířat ve skupině, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Hvězdičky pak míru statistické významnosti.

Zatímco paralelně probíhající experimentální infekce *S. Typhimurium* prokázala zvýšenou chráněnost selat vakcinovaných matek - bylo naměřeno významné snížení počtu salmonel ve střevě, mizních uzlinách a tonsile, po infekci *S. Derby* selat prasnice vakcinované STM vakcínou nedošlo ke statisticky významnému snížení kolonizace vnitřních orgánů (Obr. 15).



Obrázek 15 Počty salmonel ve vzorcích orgánů 3 dny po *S. Typhimurium* a *S. Derby* infekci selat STM vakcinovaných a nevakcinovaných prasnic. Hodnoty jsou udány jako logaritmus průměru počtu salmonel na gram tkáně, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku průměru. Hvězdičky pak míru statistické významnosti.

V následujícím *in vitro* experimentu jsme testovali účinky protilátek ze séra STM vakcinované prasnice na motilitu salmonel obou sérovarů. Pohyblivost bakterií byla měřena na agarových miskách bez a s různým ředěním hyperimunního séra. Zatímco anti-STM protilátky účinně inhibovaly pohyblivost *S. Typhimurium* bakterií už po 4 hodinách interakce, v případě sérovaru Derby nedošlo k žádnému snížení motility ani po 8 hodinách v přítomnosti těchto protilátek.



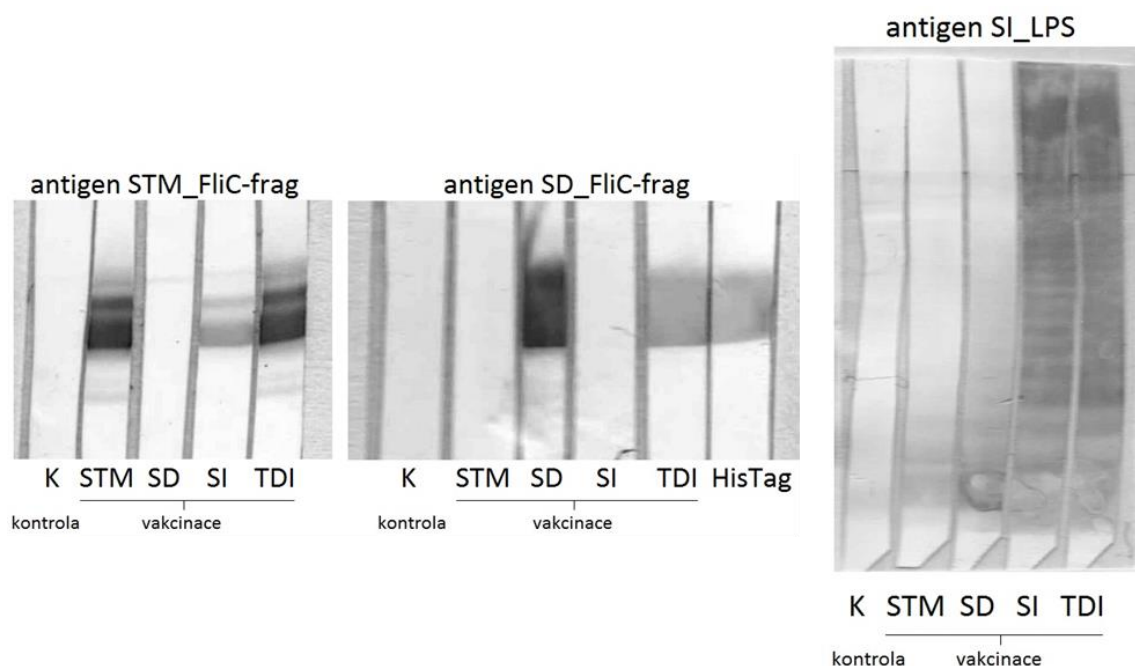
Obrázek 16 Vliv anti-STM protilátek na motilitu bakterií *S. Derby* (A) a *S. Typhimurium* (B). Průměr bakteriálních kroužků na agarových miskách bez séra a s různým ředěním STM hyperimunního séra, byl měřen v čase. Po 8 hodinách byla motilita obou sérovarů porovnána (C). Všechny hodnoty v grafu reprezentují průměr čtyř nezávislých experimentů. *, § nebo # označují statistickou významnost

($p < 0,05$). * - inhibice motility v 1000x a 100x ředěném séru oproti kontrole bez séra; § - rozdíl mezi 1000x a 100x ředěným sérem; # - rozdíly mezi *S. Derby* a *S. Typhimurium* motilitou ve stejném ředění séra

4.2.3. Trivalentní inaktivovaná vakcína

*Z důvodu snížené křížové protektivity monovalentní salmonelové vakcíny proti infekci nehomologními sérovary jsme připravili inaktivovanou vakcínu obsahující antigeny tří v Evropě nejrozšířenějších sérovarů salmonel - *S. Typhimurium*, *S. Derby* a *S. Infantis* (TDI vakcína). Příprava TDI vakcíny je sepsána do podoby funkčního vzorku Kosina a kol. 2015 (viz příloha), na kterém jsem se podílel.*

Po podání trivalentní inaktivované vakcíny jsme chtěli prokázat tvorbu specifických protilátek proti všem třem antigenům. Využili jsme rozdílu ve struktuře flagelárního proteinu FliC mezi sérovary *Typhimurium* a *Derby* a dále toho, že povrchový lipopolysacharid *S. Infantis* se liší od obou zmíněných sérovarů. Připravili jsme proto rekombinantní fragmenty FliC proteinu specifické pro *S. Typhimurium* a *S. Derby* (STM_FliC-frag a SD_FliC-frag) a z kultury *S. Infantis* izolovali povrchový LPS. Specifita těchto antigenů byla ověřena se séry myší, které byly imunizované inaktivovanou STM, SD, SI a TDI vakcínou. Z obrázků western blotů (Obr. 17) je patrné, že na antigen STM_FliC-frag se vážou protilátky myši po STM a TDI vakcinaci, s mnohem nižší afinitou i protilátky myši po SI vakcinaci, avšak rozlišitelně od dvou předchozích skupin. Antigen SD_FliC-frag naopak reaguje pouze se sérem myši po SD vakcinaci a také po podání trivalentní vakcíny. Dostatečná specifita *S. Infantis* antigenu SI_LPS byla prokázána i pro SI a TDI vakcinovaná zvířata.



Obrázek 17 Western blot antigenů STM_FliC-frag, SD_FliC-frag a SI_LPS se séry myší vakcinovaných monovalentní inaktivovanou vakcínou STM, SD nebo SI a trivalentní TDI vakcínou. Anti HisTag protilátka je použita pro potvrzení přítomnosti rekombinantního proteinu.

Specifická účinnost TDI vakcíny byla prokázána v infekčním experimentu i na prasečím modelu. Selata vakcinovaných i nevakcinovaných prasnic byla rozdělena do skupin a infikována třemi sérovary (STM, SD a SI). Ve sledovaných orgánech - ileu, kolonu a IC mízní uzlině bylo naměřeno snížení počtu bakterií u selat vakcinovaných prasnic všech tří infekčních skupin. Snížení po infekci SD ve stěně kolonu nebylo statisticky významné.

	ileocékální mizní uzlina			stěna ilea			stěna kolonu		
	STM	SD	SI	STM	SD	SI	STM	SD	SI
Selata nevakcinované prasnice	4,84	3,98	4,87	6,03	4,07	P=8 N=0	4,33	2,08	4,56
Selata vakcinované prasnice	0,20*	0,71*	0,85*	1,73*	1,18*	P=7 N=6	1,60*	1,07	1,10*

Chi2*

Obrázek 18 Počty salmonel ve vzorcích orgánů 3 dny po *S. Typhimurium*, *S. Derby* a *S. Infantis* infekci selat TDI vakcinovaných a nevakcinovaných prasnic. Hodnoty jsou udány jako logaritmus průměru počtu salmonel na gram tkáně, hvězdičky představují statistickou významnost ($p < 0,05$, *t*-test). Chi2 - statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl v počtu salmonela pozitivních (P) a salmonela negativních (N) vzorků po vyšetření metodou ISO6579 testovaný Chi2 testem.

4.3. Rozlišení post-infekčních a post-vakcinačních protilátek

Pro širší využití vakcín ve veterinární medicíně je nutné disponovat diagnostickým testem, který umožňuje rozlišit zvířata přirozeně infikovaná od těch vakcinovaných. Zavedli jsme postup, který umožňuje toto rozlišení i po aplikaci už hotové TDI vakcíny, bez předchozího zásahu do genomu vakcinačního kmene. Kapitola 4.3. popisuje tento postup a i s jeho výsledky je prezentován v publikaci Gebauer a kol. 2016b (viz příloha). Na této práci jsem se podílel kultivací bakterií, jejich zpracováním a analýzou hmotnostní spektrometrií a imunoafinitní chromatografií, stejně jako přípravou a izolací rekombinantních proteinů a jejich následné testování.

Použití konkrétních salmonelových proteinů pro sérologické rozlišení je chráněno národním patentem č. 305077 z roku 2015 (viz příloha) a sestavení DIVA ELISA je sepsáno do podoby funkčního vzorku Matiašovic a kol. 2014 (viz příloha). Na obou těchto výsledcích jsem se podílel.

4.3.1. Exprese salmonelových proteinů v závislosti na kultivačním médiu

Nejdříve jsme testovali, zda se liší spektrum proteinů exprimované salmonelou v závislosti na kultivačním médiu. LB tekuté médium bylo použito jako standardní médium pro kultivaci bakterií. Médium, ve kterém byly kultivovány vakcinační kmeny - BHI médium bylo použito pro porovnání exprese proteinů. Z hmotnostně spektrometrické analýzy celého proteomu salmonel jsme našli rozdíly v relativním zastoupení a kvantitě některých důležitých salmonelových proteinů. Zatímco LB médium indukovalo tvorbu SPI-1 proteinů, důležitých pro invazi salmonel do hostitelských buněk, v BHI médiu byla exprese těchto proteinů velmi nízká. Proteiny patřící do SPI-2 lokusu, zodpovědné za přežívání salmonel v pozdější fázi infekce, nebyly ve velké míře exprimovány ani v jednom médiu. Naopak flagelární proteiny se tvořily ve velkém množství v obou médiích, relativně více pak v LB. Relativní kvantifikace je v Tabulce 3 znázorněna metodou *spectral counting* a vyjádřena pomocí PSMs (shoda peptidových spekter). Spíše než absolutní číslo PSM je porovnání hodnot stejného proteinu v různém médiu více

informativní. Proteiny PepN (Aminopeptidáza N) a GapA (Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) jsou v tabulce uvedeny pouze jako referenční proteiny.

Tabulka 3 Vybrané salmonelové proteiny kódované SPI-1 nebo SPI-2 a proteiny bičíku a jejich exprese v LB nebo BHI médiu stanovená hmotnostní spektrometrií. Relativní kvantifikace jednotlivých proteinů je zobrazena jako PSMs (peptide spectrum matches).

Locus	Protein	Accession number	PSMs	
			LB	BHI
SPI-1	SipA	P0CL52	37	2
SPI-1	SipB	Q56019	31	4
SPI-1	SipC	P0CL47	50	3
SPI-1	SipD	Q56026	10	0
SPI-1	PrgI	P41784	5	2
SPI-1	SptP	P74873	20	0
SPI-1	SopA	Q8ZNR3	16	5
SPI-1	SopB	O30916	38	0
SPI-1	SopE2	Q7CQD4	5	0
SPI-1 and -2	SteA	Q8ZPD7	0	0
SPI-1 and -2	SopD	P40722	5	0
SPI-2	SopD2	Q8ZQC8	3	0
SPI-2	SseB	Q7BVH7	0	3
SPI-2	PipB	Q8ZQ59	0	1
SPI-2	PipB2	Q8ZMM8	4	0
flagellar proteins	FliC	P06179	132	77
	FljB	P52616	107	61
reference proteins	PepN	Q8ZQ76	48	39
	GapA	P0A1P0	185	279

4.3.2. Imunoafinitní chromatografie s následnou MS

Po izolaci IgG protilátek ze sér kontrolních zvířat, zvířat po infekci a zvířat po vakcinaci jsme provedli imunoafinitní chromatografii s proteinovým lyzátem *S. Typhimurium*. Pomocí hmotnostní spektrometrie jsme identifikovali salmonelové proteiny zachycené na protilátkách z kontrolních sér, post-infekčních a post-vakcinačních sér a eluované z chromatografických kolon ve třech nezávislých bězích. Zatímco většina proteinů byla shodná ve všech vzorcích, identifikovali jsme několik proteinů salmonel, které se vyskytovaly v relativně vyšším množství v „post-infekční“ nebo „post-vakcinační“ frakci. Proteiny SipB, SipC a MetQ se ve větší míře zachytávaly na protilátky post-infekčního séra, zatímco OppA, BamB a SurA

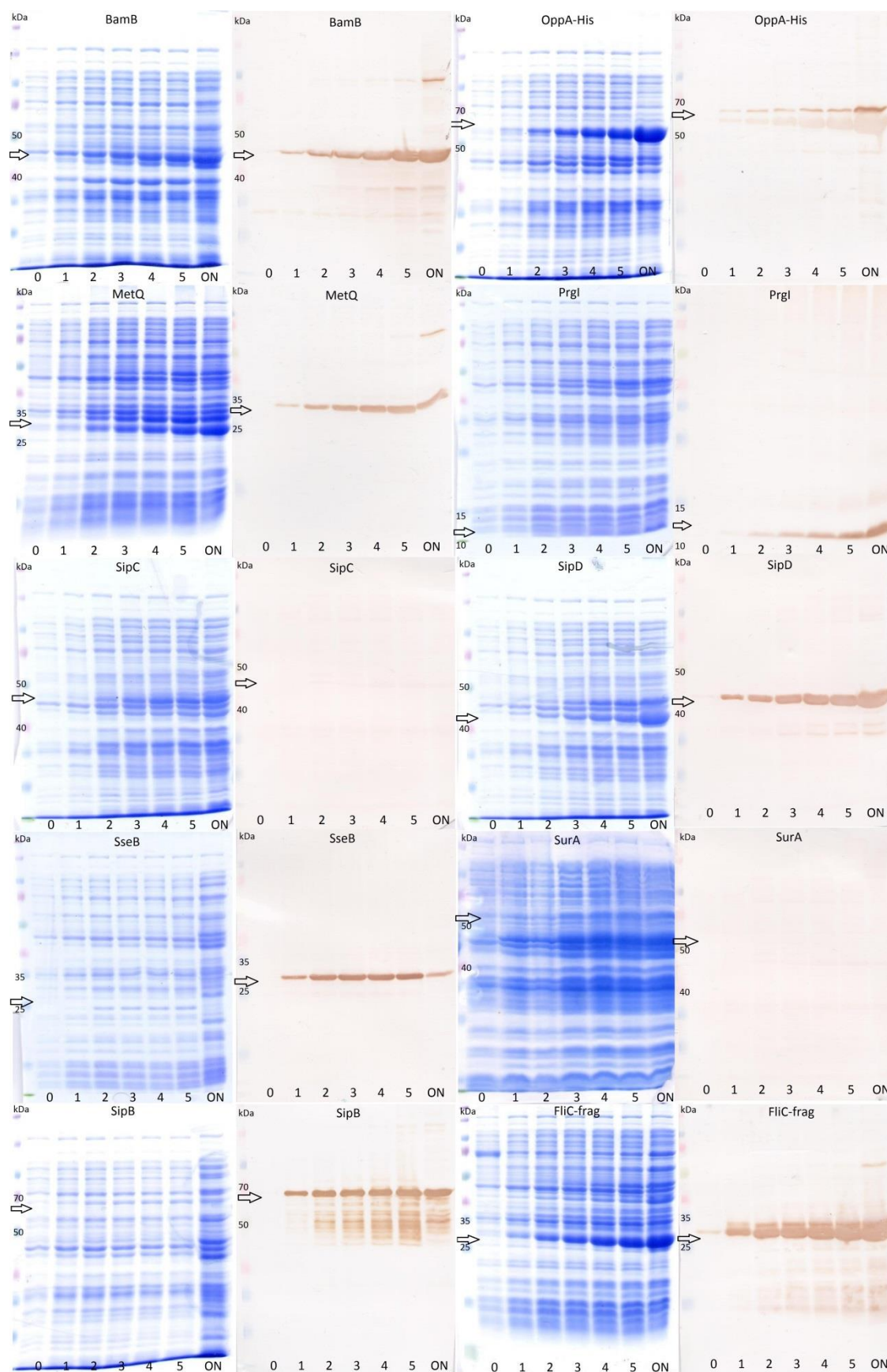
proteiny byly nalezeny převážně ve frakcích eluovaných z post-vakcinačních protilátek. Zařadili jsme také identifikaci dalších salmonelových proteinů (SipD, SseB, PrgI a FliC), zapojených do infekčního procesu, ovšem přítomnost vyšší hladiny protilátek proti těmto strukturám v některé frakci se nepotvrdila. Relativní kvantifikace proteinů je v tabulce opět uvedena jako PSM.

Tabulka 4 MS identifikace a relativní kvantifikace salmonelových proteinů s vyšší afinitou k protilátkám z post-infekčního nebo post-vakcinačního séra. Relativní kvantifikace jednotlivých proteinů je zobrazena jako PSMs (peptide spectrum matches). Proteiny SipD, SseB, PrgI a FliC byly zařazeny z důvodu jejich zapojení do infekčního procesu spíše než z výsledků imunoafinitní chromatografie.

Protein name	Accession number	PSMs (peptide spectrum matches)		
		control	post-infection	post-vaccination
Cell invasion protein SipB	Q56019	3, 0, 22	29, 20, 27	13, 7, 25
Cell invasion protein SipC	P0CL47	5, 1, 22	4, 33, 31	0, 15, 26
D-methionine-binding lipoprotein MetQ	Q8ZRN1	3, 1, 10	12, 5, 11	0, 1, 9
Periplasmic oligopeptide-binding protein OppA	P06202	1, 0, 0	1, 0, 0	25, 9, 14
Outer membrane protein assembly factor BamB	H9L451	0, 1, 0	0, 0, 0	7, 10, 0
Chaperone SurA	Q7CR87	0, 0, 1	0, 0, 0	21, 15, 4
Cell invasion protein SipD	Q56026	7, 0, 0	4, 15, 0	4, 0, 1
Secreted effector protein SseB	Q7BVH7	0, 0, 2	2, 0, 0	0, 0, 1
Protein PrgI	P41784	4, 2, 0	1, 2, 0	2, 3, 1
Flagellin FliC	P06179	0, 22, 29	5, 29, 26	19, 54, 63

4.3.3. Příprava rekombinantních proteinů

Všechny proteiny uvedené z předchozí tabulce byly připraveny jako rekombinantní proteiny v *E. coli* expresním systému. Sekvence proteinů, které na svém N-konci obsahují signální peptid, byly navrženy bez těchto peptidů. Jinak měly všechny proteiny totožnou sekvenci s divokým typem *S. Typhimurium*, kromě flagelárního FliC proteinu, který byl připraven jako 26 kDa fragment nativního proteinu (viz kapitola 3.3.4.1.). Expres rekombinantních proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE a potvrzena na western blotu s anti-HisTag protilátkou (Obr. 19). Čtyři z deseti vybraných proteinů (MetQ, SurA, PrgI a SipC) nebyly exprimovány v dostatečném množství a čistotě a nebyly tak zařazeny do následujícího sérologického testování.

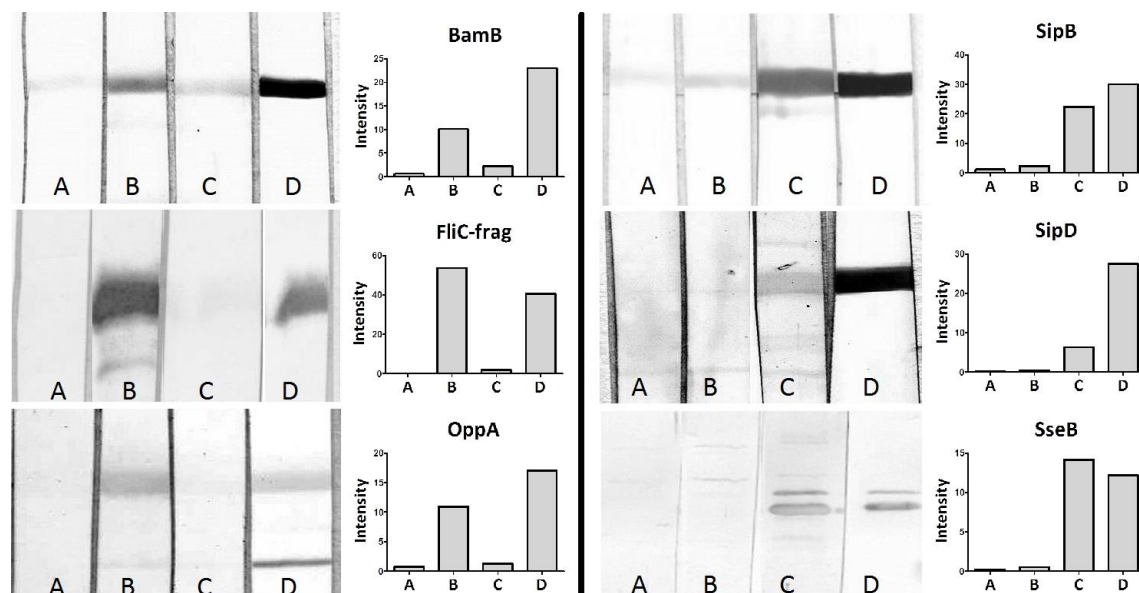


Obrázek 19 Expres rekombinantních proteinů v čase (0-5 hod po indukci, ON - overnight - 20 h po indukci) zobrazená SDS-PAGE a western blotem. Šipky zobrazují předpokládanou molekulovou hmotnost produktů. Western blot je vizualizován pomocí anti-HisTag protilátky.

4.3.4. Sérologické testování

4.3.4.1. Western blot

Purifikované rekombinantní proteiny byly použity jako antigeny pro sérologickou analýzu pomocí western blotu. PVDF membrány byly inkubovány se směsnými séry tří zvířat z každé skupiny (kontrolní, infikované, vakcinované). Proteiny SipB, SipD a SseB byly detekovány sérem infikovaných zvířat (sloupec C, na Obr. 20) s vyšší intenzitou oproti kontrolnímu séru a séru vakcinovaných zvířat. Naopak proteiny BamB, FliC-frag a OppA reagovaly s post-vakcinačním sérem (sloupec B na Obr. 20) s vyšší intenzitou než s kontrolním a post-infekčním sérem. Anti-HisTag protilátka byla použita jako pozitivní kontrola přítomnosti rekombinantního proteinu (sloupec D na Obr. 20).



Obrázek 20 Western blot purifikovaných rekombinantních proteinů se směsnými séry prasat kontrolní skupiny (A), prasat vakcinovaných (B) a prasat po infekci (C). Jako pozitivní kontrola bylo použito anti-HisTag protilátky (D). Napravo od obrázků western blotu jsou grafy relativních denzit jednotlivých proužků.

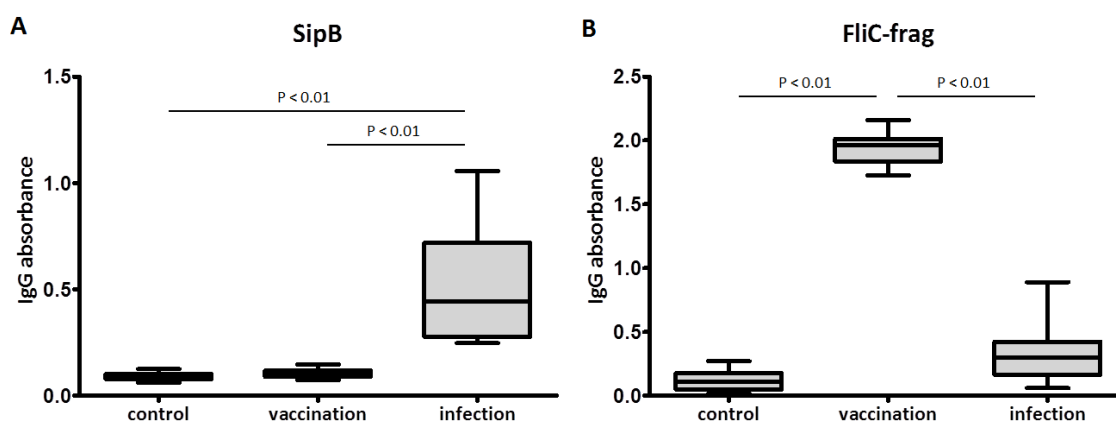
4.3.4.2. ELISA

Z výsledků western blotu byly vybrány proteiny SipB a FliC-frag pro testování kvantitativní specifické protilátkové odpovědi ELISA metodou. Individuální vzorky sér 12 zvířat z každé skupiny byly použity pro měření hladin IgG protilátek proti těmto proteinům. Hladiny protilátek proti SipB proteinu v sérech kontrolních zvířat vykazovaly hodnoty absorbancí mezi 0,062 a 0,126; séra vakcinovaných zvířat měla

hodnoty absorbancí mezi 0,075 a 0,147. Rozdíly mezi těmito dvěma skupinami nebyly statisticky významné. Séra infikovaných prasat s antigenem SipB vykazovaly hodnoty absorbancí od 0,248 do 1,056. Hodnoty post-infekčních sér byly statisticky významně ($p < 0,01$) odlišné od hodnot sér dvou předchozích skupin (Obr. 21 A).

Hladiny protilátek proti FliC-frag proteinu v sérech kontrolních zvířat vykazovaly hodnoty absorbancí mezi 0,018 a 0,271; séra infikovaných zvířat měla hodnoty absorbancí mezi 0,060 a 0,891. Rozdíly mezi těmito dvěma skupinami nebyly statisticky významné. Séra vakcinovaných prasat s antigenem FliC-frag vykazovaly hodnoty absorbancí od 1,727 do 2,159. Hodnoty těchto post-vakcinačních sér byly statisticky významně ($p < 0,01$) odlišné od hodnot sér kontrolních a post-infekčních (Obr. 21 B).

Proteiny SipB a FliC-frag tak mohou sloužit jako markerové antigeny použitelné v sérologických diagnostických testech pro rozlišení zvířat infikovaných, vakcinovaných a zvířat, které nepřišly do kontaktu s kmenem *Salmonella* Typhimurium.

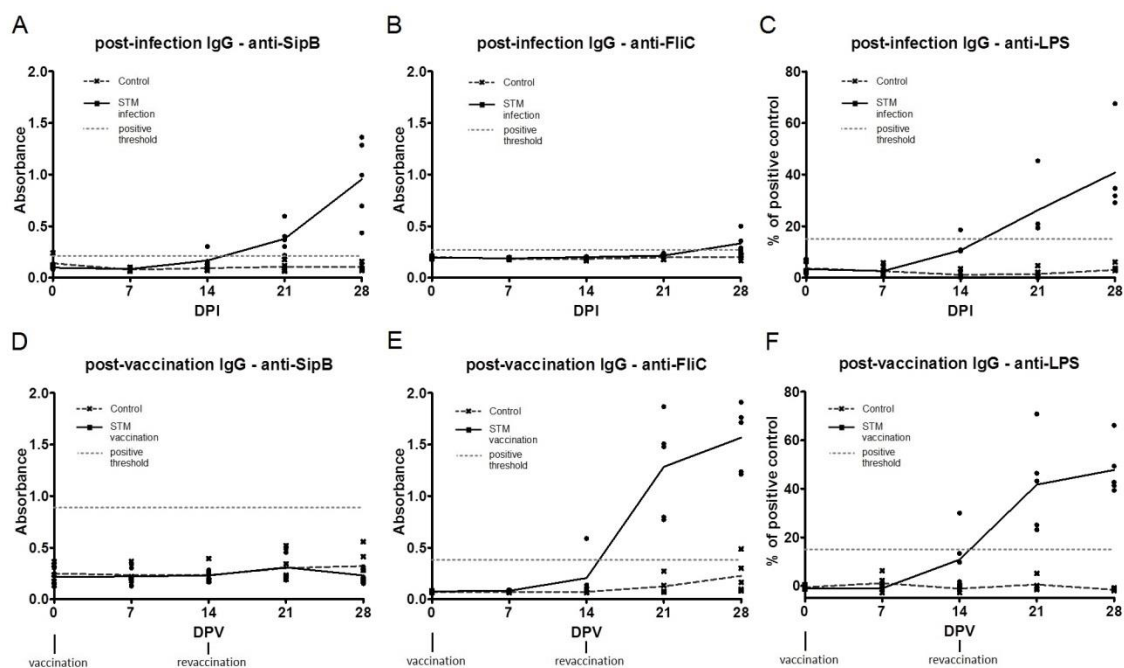


Obrázek 21 Grafy absorbancí IgG ze séra kontrolních ($N=12$), vakcinovaných ($N=12$) a infikovaných ($N=12$) prasat s rekombinantními proteiny SipB (A) a FliC-frag (B) pomocí ELISA.

4.3.4.3. Časový průběh tvorby protilátek

Z následujících grafů časového průběhu tvorby imunoglobulinů můžeme vidět, že post-infekční IgG protilátky proti SipB proteinu (Obr. 22 A) se tvoří mezi druhým a třetím týdnem po infekci a jejich hladina nadále roste, zatímco hladina post-infekčních protilátek proti flagellinu (Obr. 22 B) překročila pozitivní hranici pouze u tří z pěti zvířat a až 28. den od infekce. Naopak po vakcinaci nepřekročily hladiny anti-SipB protilátek (Obr. 22 D) hraniční hodnotu během 28 dní a IgG protilátky

proti FliC proteinu (Obr. 22 E) se ve větší míře tvoří po revakcinaci, tj. od 14. dne od prvotní imunizace. Pro porovnání byla změřena protilátková odpověď proti O-antigenům povrchových lipopolysacharidů komerčně dostupným ELISA kitem, a to jak po infekci (Obr. 22 C), tak i po vakcinaci (Obr. 22 F). Jak jsme očekávali, naměřili jsme podobný průběh tvorby IgG protilátek v obou skupinách - infikovaných i vakcinovaných zvířat.



Obrázek 22 Časový průběh tvorby IgG protilátek proti SipB (A, D), FliC-frag (B, E) a O-antigenům LPS (C, F) u prasat po infekci (A, B, C) a po vakcinaci (D, E, F), ve srovnání s kontrolními zvířaty. Šedé linie vyjadřují prahovou hodnotu pozitivitu (viz sekce Materiál a metody). DPI - dny po infekci, DPV - dny po vakcinaci.

5. Diskuze

Salmonelové infekce v chovech hospodářských zvířat jsou stále problémem v evropských zemích a představují potenciální riziko i pro člověka. Ačkoli je zastoupení jednotlivých salmonelových sérovarů v chovech prasat v rámci střední a západní Evropy značně heterogenní, nejčastěji izolované jsou sérovary Typhimurium a Derby, méně pak Infantis (EFSA 2009). Interakce prasat s kmenem *Salmonella* Typhimurium je v literatuře relativně dobře popsána, infekce vyvolané sérovarem Derby nejsou příliš studovány (Österberg a kol. 2009, Ivanek a kol. 2012). Podle průběhu onemocnění u prasat, které je téměř bezpříznakové, lze většinu kmenů obou sérovarů považovat za slabě virulentní. Je také důležité zmínit, že infekce prasat stejným sérovarem může vést k různému průběhu a rozdílné imunitní odpovědi u různých jedinců, jak bylo dokumentováno v případě STM infekcí (Boyen a kol. 2008, Bergeron a kol. 2010, Xiong a kol. 2010).

Infekce odstavených selat našimi izoláty *S. Derby* (SD) a *S. Typhimurium* (STM) skutečně vedlo k rozdílnému průběhu a rozdílné imunitní odpovědi na přítomnost patogenu. *S. Typhimurium* infikovaná prasata vylučovala bakterie pouze dva týdny po inokulaci, což koresponduje se závěry studie Scherer a kol. (2008). Oproti tomu byly bakterie sérovaru Derby prasaty vylučovány v trusu v celém průběhu experimentu. A ačkoli množství vylučovaných salmonel bylo od 21. dne nízké, může stále představovat rizikový zdroj kontaminace prostředí nebo jiných prasat. Jak jsme předpokládali, vylučování salmonel koresponduje s kolonizací vnitřních orgánů u obou sérovarů. *S. Typhimurium* byla po 28 dnech od infekce nalezena pouze v lymfatických uzlinách - tonsile a ileocékální mízní uzlině, zatímco *S. Derby* byla detekována i v částech střeva. Slezina byla kolonizována oběma sérovary pouze u smíšené infekce. Ačkoli klinické příznaky infikovaných prasat nenaznačovaly zhoršený průběh *S. Derby* infekce, delší přežívání salmonel ve střevě prasat indikuje slabou imunitní odpověď na antigeny *S. Derby*.

Tato hypotéza byla podpořena měřením protilátkové odpovědi na antigeny obou sérovarů. Vzestup hladin IgM imunoglobulinů tvořených bez pomoci T-lymfocytů (anti-LPS IgM) i v kooperaci s aktivovanými T buňkami (IgM proti povrchovému proteinu SipB) nevykazoval rozdíly mezi STM a SD infikovanými zvířaty. IgM protilátky proti T-dependentnímu antigenu dokonce nepřekročily

prahovou hodnotu. Oproti tomu tvorba IgG protilátek proti STM antigenům je prokazatelně rychlejší a dosahuje vyšších hladin než odpověď na SD antigeny. To je však částečně v rozporu s výsledky švédské skupiny (Österberg a kol. 2009), která popsala vysoké hladiny protilátek u *S. Derby* infikovaných prasat už od 14 dne po inokulaci. Důvodem může být právě zmiňovaná rozdílnost kmenů salmonel i v rámci jednoho sérovaru.

Prvotní protilátková odpověď, která představuje tvorbu IgM protilátek bez pomoci aktivovaných T lymfocytů, odpovídá na LPS antigen bez rozdílu mezi sérovary, zatímco tvorba protilátek třídy G ve spolupráci s T lymfocyty, je v tomto případě sérovar specifická.

Odpověď buňkami zprostředkované imunity - aktivace a proliferace specifických lymfocytů, byla studována pomocí Transformačního testu lymfocytů a vyplavení IFN- γ . Obě metody prokázaly zvýšení proliferační aktivity po stimulaci antigenem STM pouze u lymfocytů jednoho zvířete a až 28 dní po infekci. Buňky ostatních zvířat nevykazovaly zvýšenou proliferaci. Toto zjištění částečně koresponduje s nízkými hladinami IgM protilátek proti T-závislým antigenům a zároveň to zvyšuje důležitost mechanismů tvorby protilátek proti konzervovaným strukturám bakterií bez kooperace specifických lymfocytů (Yang a kol. 2007).

Delší přežívání bakterií *S. Derby* v orgánech hostitele a zároveň nižší hladiny IgG specifických protilátek proti SD antigenům koresponduje také s nižší odpovědí makrofágů derivovaných z monocyty po *in vitro* stimulaci. Odpovědí na intracelulární přítomnost salmonel je často aktivace kaspázy-1, sestavení inflamasomu, štěpení prekurzorů IL-1 β a IL-18 na aktivní formy a jejich uvolnění z buňky a nakonec kaspáza-1-dependentní buněčná smrt při současné indukci zánětu (Fink a Cookson 2007, Yu a Finlay 2008, Yeretssian a kol. 2008). MDM stimulované *S. Typhimurium* však vykazovaly signifikantně vyšší hladiny jak cytosolické kaspázy-1, tak i extracelulární IL-1 β v porovnání s MDM infikovanými *S. Derby*. Nižší hladina uvolněného LDH pak už jen dokumentuje přežívání makrofágů bez indukce zánětlivé odpovědi po SD stimulaci.

Celková imunitní odpověď prasat na přítomnost bakterií *S. Derby* je nižší oproti odpovědi na *S. Typhimurium* infekci, s čímž souvisí delší přežívání *S. Derby* uvnitř hostitele. A to i přesto, že *S. Typhimurium* a *S. Derby* patří do stejné séroskupiny mající stejnou strukturu O-antigenů (Grimont a Weill 2007) a vrozené

mechanismy imunity cílené na konzervované struktury bakterií, jako je povrchový lipopolysacharid, tak budou obdobné. Odlišnost imunitní odpovědi tak může souviset s rozdíly v ostrovech patogenity mezi sérovary a také vyšší adaptovaností *S. Derby* na prasata oproti více promiskuitnímu sérovaru Typhimurium (Hayward a kol. 2013, Volf a kol. 2010, Hauser a kol. 2011).

Jednou z možností, jak snížit množství salmonel v chovech zvířat, je zavedení vakcinace. Jediná komerčně dostupná vakcína je založená na živém atenuovaném kmeni a není dosud příliš akceptována chovateli. Z tohoto důvodu jsme testovali možnost vývoje inaktivované vakcíny. Podáním vakcíny sestavené z inaktivované kultury *S. Typhimurium* a adjuvans ISA50V2 selatům po odstavu, jsme nedocílili jejich dostatečné chráněnosti před infekcí homologním kmenem bakterie (nepublikované výsledky). Využili jsme však vysokých titrů specifických protilátek vytvořených po aplikaci takové vakcíny k jejich pasivnímu přenosu na potomstvo. Kolostrální/laktogenní imunity a přenosu protilátek na sající potomky se využívá i při testování živých vakcín proti *S. Choleraesuis* (Chu a kol. 2007) nebo *S. Typhimurium* (Hur a Lee 2010). Vysokých hladin specifických IgG i IgA protilátek v séru a IgA ve výplachu střeva sajících selat jsme docílili aplikací inaktivované vakcíny prasnicím před porodem. Takto získané protilátky z kolostra a mléka snižují celkové zatížení orgánů střeva a mízních uzlin salmonelami u čelenžovaných selat. Jelikož průběh infekce vyvolané *S. Derby* a *S. Typhimurium* je rozdílný, v dalším experimentu jsme se pokusili zjistit, zda vytvořené specifické protilátky proti antigenům *S. Typhimurium* budou chránit sající selata i před infekcí kmenem *S. Derby*. Zkřížená protektivita byla studována i jinými skupinami s rozdílnými výsledky. Zatímco Farzan a Friendship (2010) neprokázali snížení vylučování nehomologních sérotypů salmonel u prasat vakcinovaných živou *S. Choleraesuis* vakcínou, snížení séroprevalence na jatkách (Maes a kol. 2001, Schwarz a kol. 2011) a snížení počtu *S. Typhimurium* v ileu takto vakcinovaných prasat (Letellier a kol. 2001) bylo dokumentováno jinými skupinami.

V našem experimentu došlo u všech selat STM vakcinovaných matek k přenosu vysokých hladin specifických protilátek, a zatímco jsme pozorovali snížení kolonizace orgánů selat infikovaných STM, u selat po SD infekci nedošlo k výraznému snížení počtu *S. Derby*. Snížená chráněnost je pravděpodobně

způsobena rozdílnou antigenní výbavou obou sérovarů. Zatímco *S. Typhimurium* disponuje bifazickými bičíky - dvěma strukturně mírně odlišnými proteiny FliC a FljB, *S. Derby* je monofazický sérotyp, obsahující pouze FliC protein ve své flagelární struktuře (Grimont a Weill 2007). Navíc, proteiny FliC obou sérovarů mají shodnou sekvenci ze 79 % a to pouze pro prvních 190 aminokyselin, z celkových zhruba 500 (srovnání sekvence pomocí blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)). Protilátky vytvořené proti bičíku jednoho sérotypu tak budou mít omezenou reaktivitu proti druhému sérovaru. To se také potvrdilo při *in vitro* testech motility salmonel s inaktivovanými hyperimunními séry prasnice vakcinované vakcínou odvozenou od *S. Typhimurium*. Za pohyblivost salmonel jsou zodpovědné převážně bičíky, a pokud dojde k navázání imunoglobulinů na flagelární struktury, dochází k inhibici motility salmonel. Z důvodu rozdílné struktury flagellinu mezi sérovary však nedochází k inhibici motility bakterií *S. Derby* protilátkami proti STM antigenům. Předpokládáme, že protilátky proti flagellinu, ať už třídy IgG nebo IgA, jsou velmi důležité při zabránění prostupu salmonel přes střevní stěnu. V pozdějších fázích totiž salmonela flagelární proteiny neexprimuje (Cummins a kol. 2005, Jantsch a kol. 2011, Zheng a kol. 2016) a tyto protilátky se tak už na bakterie nevážou. Sérové protilátky získané z kolostra a specifické IgG a sIgA v lumenu střeva z mléka prasnice tak velmi pravděpodobně hrají důležitou roli v kontrole infekce v prvních dnech života selat, což potenciálně snižuje šíření salmonel mezi ostatní prasata v chovu (Wales a kol. 2011, Wales a Davies 2016).

Z důvodu nízké křížové protektivity monovalentní vakcíny byla připravena multivalentní vakcína proti třem nejrozšířenějším sérovarům salmonel v Evropě (EFSA 2009) - *S. Typhimurium*, *S. Derby* a *S. Infantis*. Kromě prokázané účinnosti TDI vakcíny ve smyslu snížení počtu salmonel (STM, SD i SI) v orgánech po infekci selat vakcinovaných prasnic, jsme také připravili antigeny umožňující rozlišit protilátky proti jednotlivým sérovarům. Využili jsme toho, že *S. Infantis* patří do séroskupiny C₁ s O-antigeny typu 6, 7, zatímco *Typhimurium* a *Derby* jsou ve skupině B s O-antigeny stejného typu - 1, 4, 5, 12 (Grimont a Weill 2007). Sérovary *Derby* a *Typhimurium* jsou zase rozlišitelné díky výše zmíněné rozdílnosti flagelárního proteinu FliC.

Pro zavedení vakcíny pro hospodářská zvířata na trh je důležité, aby bylo možné rozlišit takto vakcinovaná zvířata od zvířat přirozeně infikovaných. Přítomnost protilátek proti konkrétnímu patogenu je totiž indikátorem proběhlé nebo probíhající infekce a takové zvíře je považováno za potenciálního přenašeče patogenu. Proto se při vývoji vakcín využívá přístupu DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated individuals) (van Oirschot 1999). V užším slova smyslu se jedná o vývoj a použití tzv. markerových vakcín, přesněji negativních markerových vakcín, kdy u vakcinačního kmene chybí antigen, vyskytující se u divokého typu, který běžně indukuje tvorbu protilátek. Test založený na detekci sérových protilátek proti tomuto antigenu tak dokáže rozlišit mezi zvířaty infikovanými a vakcinovanými. Jedna z prvních takových vakcín byla navržena skupinou van Oirschota proti viru způsobujícímu Aujezskyho chorobu prasat (van Oirschot a kol. 1986). Co se týče prasečích vakcín proti salmonelle, bylo testováno několik přístupů ve vývoji převážně živých vakcín. Selke a kol. (2007) deletovali u vakcinačního kmene *S. Typhimurium* gen pro povrchový protein OmpD, Leyman a kol. (2011) navrhli řadu mutantních kmenů STM v genech zodpovědných za sestavení LPS, Bearson a kol. (2016) připravili podobnou mutaci v LPS (Δ rfaH) společně s delecí několika regulatorních RNA genů *S. Choleraesuis*. Tyto vakcinační kmeny umožňují u prasat rozlišit post-vakcinační a post-infekční protilátky. Ve všech těchto případech však může být problémem používání geneticky modifikovaných organismů, a to jak z hlediska legislativy, tak i z všeobecné neochoty přijímat GMO. My jsme v této práci využili jiného přístupu, a to analýzy již vytvořených protilátek prasat po infekci nebo vakcinaci nemodifikovanou inaktivovanou vakcínou. Využili jsme toho, že salmonela, a obecně patogenní bakterie, exprimují různé spektrum proteinů v závislosti na okolním prostředí (Mekalanos 1992, Altier 2005, Blair a kol. 2013, Zheng a kol. 2016). BHI médium, použité ke kultivaci vakcinačního kmene, neindukuje expresi pro invazi důležitých SPI-1 proteinů oproti LB médiu a také oproti přirozené infekci, kdy salmonela využívá právě těchto proteinů k invazi do hostitele. LB médium v tomto případě částečně napodobuje prostředí *in vivo* a spouští expresi SPI-1 proteinů, zatímco bohaté BHI médium neindukuje produkci virulentních faktorů salmonely. Podobných výsledků dosáhli Jaradat a Bhunia (2002) v práci studující různé kultivační podmínky bakterie *Listeria*

monocytogenes, naznačující, že bakterie produkují více virulentních faktorů v nutričně chudých podmínkách pro snazší adaptaci na nové prostředí.

Pomocí imunoafinitní chromatografie a hmotnostní spektrometrie jsme ukázali, že po infekci prasat se skutečně tvoří protilátky proti jiným antigenům, než po vakcinaci inaktivovanou STM vakcínou. Pomocí těchto metod bylo vytipováno několik salmonelových proteinů, které byly připraveny jako rekombinantní proteiny (SipB, SipC, MetQ, OppA, BamB a SurA). Navíc jsme připravili i proteiny, které se sice těmito metodami nepotvrdily jako post-infekční nebo post-vakcinační antigeny, ale také se účastní infekčního procesu jako zástupci SPI-1 nebo SPI-2 lokusu - SipD, SseB a PrgI, a také významný imunogenní flagelární protein FliC. Proteiny SipB, SipC a SipD jsou zástupci SPI-1 systému, který je důležitý pro invazi salmonel do hostitelských buněk. Tyto proteiny tvoří koncovou strukturu sekrečního systému 3. typu (T3SS), který interaguje s eukaryotickými buňkami (Miold a kol. 2001, Marlovits a Stebbins 2010). SseB protein kódovaný SPI-2 lokusem funguje jako translokátor efektorových proteinů do hostitelských buněk a podporuje intracelulární přežívání bakterií (Waterman a Holden 2003). Tyto proteiny jsou tak nezbytné pro virulenci salmonel a také jsou kandidáty pro indukci tvorby protilátek. To bylo také potvrzeno sérologickou analýzou western blotem s post-infekčními séry a je to v souladu s předchozími zjištěními (Desin a kol. 2010, Lee a kol. 2012). Na druhou stranu, pokud je salmonela kultivována *in vitro* v BHI médiu, tyto proteiny nejsou exprimovány v takovém množství, aby se proti nim u vakcinovaného jedince protilátky vytvořily. Je však třeba mít na paměti, že právě virulentní faktory jsou častými induktory protilátkové odpovědi, s čímž může souviset i samotná účinnost vakcíny. V předchozí práci jsme však demonstrovali dostatečnou chráněnost po podání vakcinačního kmene kultivovaného právě v médiu, které neindukuje expresi SPI-1 proteinů.

I přes to, že flagellin má imunostimulační vlastnosti a také může fungovat jako účinné adjuvans pro nejrůznější bakteriální vakcíny (das Gracas Luna a kol. 2000, Smith a kol. 2003, Honko a kol. 2006), exprese flagelárních proteinů je selektivně tlumena při intracelulární lokalizaci salmonel během infekce (Cummings a kol. 2005, Jantsch a kol. 2011, Zheng a kol. 2016). Bičíky, jako extracelulární struktury povrchu bakterií tak mohou být dobrými kandidáty post-vakcinačních antigenů, pokud je použito kultivačních podmínek vedoucích k indukci flagelárních proteinů.

To se potvrdilo pro FliC rekombinantní protein pomocí western blotu i ELISA, ale překvapivě ne imunoafinitní chromatografií. Můžeme tak spekulovat, zda je to způsobeno obecně velkým množstvím FliC proteinu v lyzátech a saturací protilátek proti tomuto proteinu, zkříženou reaktivitou anti-flagelárních protilátek indukovaných jinými bakteriemi nebo prostě nespecifickou interakcí s matricí chromatografické kolony. Sérologické testy western blot a ELISA však potvrdily vyšší hladiny post-vakcinačních protilátek oproti kontrolním a post-infekčním sérům. Proteiny BamB (Outer membrane protein assembly factor) a OppA (Periplasmic oligopeptide-binding protein) jsou lokalizovány ve vnější membráně, respektive periplasmě a oba jsou zapojeny do procesů transmembránového transportu látek - OppA jako permeáza (Hiles a kol. 1987) a BamB jako součást komplexu vnější membrány zodpovědného za inzerci beta-barelů (Hagan a kol. 2011). Jejich role v infekčním procesu není známa, ale je zajímavé, že jsou tyto proteiny mnohem méně imunogenní při infekci než při vakcinaci. Společně s FliC tak mohou být dobrými kandidáty pro sérologické rozlišení zvířat vakcinovaných a infikovaných.

Podobnou diskrepanci výsledků imunoafinitní chromatografie a sérologických testů jako pro FliC fragment, jsme sledovali také pro SseB protein. To, že nebyl identifikován ani v jedné chromatografické frakci, je však způsobeno nulovou expresí tohoto proteinu při kultivaci salmonel *in vitro*. SPI-2 kultivační podmínky, které by měly napodobovat intracelulární prostředí makrofágů, vyžadují odlišné složení kultivačního média a úpravu jeho pH (Beuzón a kol. 1999, Coombes a kol. 2004, Sherry a kol. 2011).

Rekombinantní antigeny proteinů SseB, SipB a SipD byly pomocí western blotu testovány jako post-infekční antigeny. Hladina protilátek proti těmto proteinům, měřená jako denzita proužků western blotu, byla nejméně desetkrát vyšší u post-infekčních sér, oproti kontrolním a post-vakcinačním sérům. Na druhé straně, proteiny BamB, OppA a fragment FliC proteinu byly potvrzeny jako post-vakcinační antigeny. Hladina protilátek proti těmto proteinům byla alespoň desetkrát vyšší u skupiny zvířat po vakcinaci, než u kontrolní nebo infikované skupiny. Nakonec byly dva vybrané proteiny - SipB a FliC-frag použity pro kvantitativní sérologické testování na jednotlivých zvířatech. Všechny 12 post-infekčních sér vykazovalo vyšší hodnoty absorbance se SipB proteinem než 12 kontrolních a 12 post-vakcinačních

sér ($p < 0.01$). Naopak všech 12 post-vakcinačních sér vykazovalo vyšší hodnoty absorpance s FliC-frag proteinem než 12 kontrolních a 12 post-infekčních sér ($p < 0.01$). Vývoj tvorby protilátek proti těmto proteinům v čase kopíruje průběh anti-LPS protilátek. Měření hladin protilátek proti O-antigenům salmonel je standardizovaná, komerčně dostupná metoda pro průkaz salmonelové infekce (Szabó 2008). Zvýšené hladiny IgG protilátek proti SipB jsou detekovatelné zhruba tři týdny po infekci, podobně jako LPS protilátky. Hladiny anti-FliC IgG protilátek očkovaných jedinců se zvyšují po revakcinaci, tj. mezi 14 a 21 dnem od aplikace první dávky, stejně jako anti-LPS protilátky měřené komerční soupravou.

Indukce exprese různého spektra bakteriálních proteinů, jejich potenciální expozice rozpoznávacím mechanismům imunitního systému a analýza vytvořených specifických protilátek může být s výhodou použita pro rozlišení mezi infikovanými a vakcinovanými zvířaty bez jakéhokoli zásahu do genomu vakcinačního kmene. Tento postup analýzy vytvořených protilátek a hledání bakteriálních antigenů rozlišujících post-infekční a post-vakcinační protilátky může být teoreticky využit i pro již vyvinuté a fungující inaktivované bakteriální vakcíny.

6. Závěr

- Průběh onemocnění prasat vyvolané použitými kmeny *S. Typhimurium* a *S. Derby* je rozdílný. Imunitní odpověď na *S. Typhimurium* antigeny je mnohem výraznější, a to jak ve smyslu protilátkové odpovědi, tak i po *in vitro* infekci prasečích makrofágů. Kolonizace orgánů je v prvních dnech infekce méně výrazná u *S. Derby* infikovaných selat, ale bakterie přetrvávají v těchto orgánech po delší dobu a jsou během této doby vylučovány do prostředí.
- Prokázali jsme důležitost maternální - kolostrální a laktogenní imunity u prasat. Vakcinace prasnic před porodem vakcínou připravenou z inaktivované kultury *S. Typhimurium*, způsobuje snížení kolonizace orgánů sajících selat po infekci *S. Typhimurium*, ale ne po infekci *S. Derby*.
- Trivalentní vakcína připravena z inaktivovaných kultur *S. Typhimurium*, *S. Derby* a *S. Infantis* chrání sající selata před infekcí jednotlivými sérovary salmonel.
- Analýzou vytvořených protilátek zvířat po infekci a vakcinaci jsme našli salmonelové antigeny, které lze použít pro sérologické rozlišení infikovaných prasat a prasat vakcinovaných inaktivovanou salmonelovou vakcínou. Tento postup lze využít pro návrh DIVA bakteriálních vakcín zvláště tam, kde genetické zásahy do vakcinačního kmene nejsou žádoucí.

7. Seznam literary

Ahmed ST, Mun HS, Yoe H, Yang CJ: Monitoring of behaviour using a video-recording system for recognition of *Salmonella* infection in experimentally infected growing pigs. *Animal* 2015; 9(1):115-21

Alaniz RC, Cummings LA, Bergman MA, Rassoulia-Barrett SL, Cookson BT: *Salmonella* typhimurium coordinately regulates FliC location and reduces dendritic cell activation and antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2006; 15; 177(6):3983-93

Altier C: Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* 2005; 43(Spec No):85-92

Andre FE, Booy R, Bock HL, Clemens J, Datta SK, John TJ, Lee BW, Lolekha S, Peltola H, Ruff TA, Santosham M, Schmitt HJ: Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. *Bulletin of the World Health Organization* 2008; 86(2):81-160

Arenas J: The role of bacterial lipopolysaccharides as immune modulator in vaccine and drug development. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2012; 12(3):221-35

Bearson BL, Bearson SMD, Kich JD: A DIVA vaccine for cross-protection against *Salmonella*. *Vaccine* 2016; 34(10):1241-1246

Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F, Quessy S: Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine. *Can J Vet Res* 2010; 74:11-17

Beuzón CR, Banks G, Deiwick J, Hensel M, Holden DW: pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology* 1999; 33(4):806-816

Blair JMA, Richmond GE, Bailey AM, Ivens A, Piddock LJV: Choice of bacterial growth medium alters the transcriptome and phenotype of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLOS One* 2013; 8(5): e63912

Bourne FJ: The immunoglobulin system of the suckling pig. *Proceedings of the Nutrition Society* 1973; 32(3):205-215

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

- Cario E, Podolsky DK: Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68(12):7010-7
- Casadevall A: Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends in Microbiology* 1998; 6(3):102-107
- Coombes BK, Brown NF, Valdez Y, Brumell JH, Finlay BB: Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(48):49804-49815
- Cummings LA, Rassouljian Barrett SL, Wilkerson WD, Fellnerova I, Cookson BT: FliC-specific CD4+ T cell responses are restricted by bacterial regulation of antigen expression. *J Immunol* 2005; 174:7929-7938
- Chakravortty D, Hansen-Wester I, Hensel M: *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* 2002; 195:1155-1166
- Chu C-Y, Wang S-Y, Chen Z-W, Chien M-S, Huang J-P, Chen J-J, Hong L-S, Shiau A-L, Tsai J-L, Wu C-L: Heterologous protection in pigs induced by a plasmid-cured and crp gene-deleted *Salmonella* Choleraesuis live vaccine. *Vaccine* 2007; 25(41):7031-7040
- Desin TS, Mickael CS, Lam PK, Potter AA, Köster W: Protection of epithelial cells from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion by antibodies against the SPI-1 type III secretion system. *Can J Microbiol* 2010; 56(6):522-526
- EFSA: Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal* 2009; 7(12): [93 pp.]
- EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015; 13(12):4329
- Farzan A, Friendship RM: A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling *Salmonella* infection and the association of *Salmonella*-shedding and weight gain in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2010; 74:258-263
- Fink SL, Cookson BT: Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* 2007; 9(11):2562-2570
- Focà A, Liberto MC, Quirino A, Matera G: Lipopolysaccharides: from Erinyes to Charites. *Mediators of Inflammation* 2012; doi:10.1155/2012/684274

Fookes M, Schroeder GN, Langridge GC, Blondel CJ, Mammina C, Connor TR, Seth-Smith H, Vernikos GS, Robinson KS, Sanders M, et al. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. PLoS Pathog 2011;7:e1002191

Forbes SJ, Eschmann M, Mantis NJ: Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium motility and entry into epithelial cells by a protective antilipopolysaccharide monoclonal immunoglobulin A antibody. Infection and Immunity 2008; 76:4137–4144

Galán JE, Zhou D: Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. PNAS 2000; 97(16):8754-8761

Galán JE: Common themes in the design and function of bacterial effectors. Cell Host Microbe 2009; 5:571-579

Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL: Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J Immunol 2001; 167:1882–1885

das Gracias Luna M, Sardella FF, Ferreira LC: *Salmonella* flagellin fused with a linear epitope of colonization factor antigen I (CFA/I) can prime antibody responses against homologous and heterologous fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Res Microbiol 2000; 151:575-582

Grimont PAD, Weill F-X: Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, 2007

Guignot J, Caron E, Beuzón C, Bucci C, Kagan J, Roy C, Holden DW: Microtubule motors control membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. J Cell Sci 2004; 1(117):1033-45

Hagan CL, Silhavy TJ, Kahne D: β -Barrel membrane protein assembly by the Bam complex. Annu Rev Biochem 2011; 80:189-210

Hauser E, Hebner F, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Prager R, Schroeter A, Rabsch W, Fruth A, Malorny B: Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. Int J Food Microbiol 2011; 151:141–149

Hayward MR, Jansen VA, Woodward MJ: Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. BMC Genom 2013; 14:365

Hiles ID, Gallagher MP, Jamieson DJ, Higgins CF: Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella* Typhimurium. J Mol Biol 1987; 195, I1:125-142

Hlavová K, Štěpánová H, Faldyna M: The phenotype and activation status of T and NK cells in porcine colostrum suggest these are central/effector memory cells. The Veterinary Journal 2014; 202(3):477-482

Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB: Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. Infect Immun 2006; 74:1113-1120

Hořejší V, Bartůňková J: Základy imunologie. Triton 2009. 4. vydání, ISBN: 978-80-7387-280-9

Hur J, Lee JH: Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis. Vet Microbiol 2010; 143:2-4

Ivanek R, Österberg J, Gautam R, Lewerin SS: *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose- and serotype-dependent in pigs. PLoS ONE 2012; 7, e34660

Jacobson RH: Factors in selecting serum samples for use in determining the positive/negative threshold (cut-off) in ELISA. In: Diagnosis and Epidemiology of Animal Disease in Latin America. 1998. IAEA-TECDOC-1055, pp. 25–28

Jantsch J, Chikkaballi D, Hensel M: Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. Immunological reviews 2011; 240:185-195

Jaradat ZW, Bhunia AK: Glucose and nutrient concentrations affect the expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 2002; 68(10):4876-4883

Jones BD, Gori N, Falkow S: *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. The Journal of Experimental Medicine 1994; 180:15-23

Kraehenbuhl JP, Neutra MR: Epithelial M cells: differentiation and function. Annu Rev Cell Dev Biol 2000; 16:301-332

Kýrová K, Štěpánová H, Rychlík I, Volf J: SPI-1 encoded genes of *Salmonella* Typhimurium influence differential polarization of porcine alveolar macrophages in vitro. BMC Veterinary Research 2012; 8(115): doi: 10.1186/1746-6148-8-115.

Kýrová K, Štěpánová H, Rychlík I, Polanský O, Levá L, Sekelová Z, Faldyna M, Volf J: The response of porcine monocyte derived macrophages and dendritic cells to *Salmonella* Typhimurium and lipopolysaccharide. BMC Veterinary Research 2014; 10(244): doi: 10.1186/s12917-014-0244-1

- LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI: *Salmonellae* interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology* 2015; 13:191-205
- Lee S-J, Liang L, Juarez S, Nanton MR, Gondwe EN, Msefula CL, Kayala MA, Necchi F, Heath JN, Hart P, Tsolis RM, Heyderman RS, Mac Lennan CA, Felgner PL, Davies DH, McSorley SJ: Identification of a common immune signature in murine and human systemic *Salmonellosis*. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109(13):4998-5003
- Letellier A, Messier S, Lessard L, Chénier S, Quessy S: Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2001; 65:168–172
- 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; 29(20):3679-3685
- López-Medina M, Perez-Lopez A, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V: *Salmonella* modulates B cell biology to evade CD8+ T cell-mediated immune responses. *Front Immunol* 2014; 5: Article 586
- López-Medina M, Carrillo-Martín I, Leyva-Rangel J, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V: *Salmonella* impairs CD8 T cell response through PD-1: PD-L axis. *Immunobiology* 2015; 220(12):1369-1380
- MacLennan CA, Gilchrist JJ, Gordon MA, Cunningham AF, Cobbold M, Goodall M, Kingsley RA et al.: Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal *Salmonella* in HIV-Infected African adults. *Science* 2010; 328:508-512
- Maes D, Gibson K, Trigo E, Saszak A, Grass J, Carlson A, Blaha T: Evaluation of cross-protection afforded by a *Salmonella* Choleraesuis vaccine against *Salmonella* infections in pigs under field conditions. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* 2001; 114:339–341
- Marlovits T. C., Stebbins C. E.: Type III secretion systems shape up as they ship out. *Current Opinion in Microbiology* 2010; 13:47-52
- Martinon F, Tschopp J: Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117:561-574
- Matiašovic J: *Salmonely* v chovech prasat. *Veterinářství* 2012; 62:357-359
- Matiasovic J, Kudlackova H, Babickova K, Stepanova H, Volf J, Rychlik I, Babak V, Faldyna M: Impact of maternally-derived antibodies against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *The Veterinary Journal* 2013; 196:114-115

- McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V: *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* 2009, 12:117-124
- Mekalanos JJ: Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992; 174(1):1-7
- Michetti P, Porta N, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Blum AL, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella* Typhimurium. *Gastroenterology* 1994; 107(4):915-923
- Mirolid S, Ehrbar K, Weissmüller A, Prager R, Tschäpe H, Rüssmann H, Hardt WD: *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2. *J Bacteriol* 2001; 183(7):2348-58
- Murray GL, Attridge SR, Morona R: Inducible serum resistance in *Salmonella* typhimurium is dependent on wzz(fepE)-regulated very long O antigen chains. *Microbes Infect* 2005; 7(13):1296-304
- Nechvátalová K, Kudláčková H, Levá L, Babíčková K, Faldyna M: Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011; 142:89-102
- Neidhardt FC: *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: cellular and molecular biology. Wahington, D.C. : American Society for Microbiology 1987, ISBN 0914826891
- Oh YK, Alpuche-Aranda C, Berthiaume E, Jinks T, Miller SI, Swanson JA: Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 1996; 64(9):3877-83
- van Oirschot JT, Rziha HJ, Moonen PJLM, Pol JMA, van Zaane D: Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. *J Gen Virol* 1986; 67:1179-1182
- van Oirschot J T. Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol* 1999; 73,12-3:195-205
- Österberg J, Lewerin SS, Wallgren P: Patterns of excretion and antibody responses of pigs inoculated with *Salmonella* Derby and *Salmonella* Cubana. *Vet Rec* 2009; 165:404–408
- Pastoret P-P, Griebel P, Bazin H, Govaerts A et al.: Handbook of vertebrate immunology. Academic Press 1998, ISBN: 0-12-546401-0

Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsolis RM, Bevins CL, Solnick JV, Dandekar S, Bäumlér AJ: Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe* 2009; 5(5):476-486

Ramachandran G, Tennant SM, Boyd MA, Wang JY, Tulapurkar ME, Pasetti MF, Levine MM, Simon R: Functional activity of antibodies directed towards flagellin proteins of non-typhoidal *Salmonella*. *PLoS One* 2016; 11(3): e0151875

Rooke JA, Bland IM: The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science* 2002; 78(1):13-23

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

Schmidt H, Hensel M: Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17:14-56

Schwarz P, Kich JD, Kolb J, Cardoso M: Use of an avirulent live *Salmonella* Choleraesuis vaccine to reduce the prevalence of *Salmonella* carrier pigs at slaughter. *Veterinary Records* 2011; 169:553

Sherry AE, Inglis NF, Stevenson A, Fraser-Pitt D, Everest P, Smith DGE, Roberts M: Characterisation of proteins extracted from the surface of *Salmonella* Typhimurium grown under SPI-2-inducing conditions by LC-ESI/MS/MS sequencing. *Proteomics* 2011; 11:361-370

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; 75(5):2476-83

Sinha K, Mastroeni P, Harrison J, Demarco de Hormaeche R, Hormaeche CE: *Salmonella* Typhimurium aroA, htrA, and aroD htrA mutants cause progressive infections in athymic (nu/nu) BALB/c mice. *Infection and Immunity* 1997; 65(4):1566-1569

Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Rassoulían Barrett SL, Cookson BT, Aderem A: Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 2003; 4:1247-1253

- Springer S, Lindner T, Steinbach G, Selbitz H-J: Investigation of efficacy of a genetically-stable live *Salmonella* Typhimurium vaccine for use in swine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2001; 114:342-345
- 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(1):65-9.
- Szeto J, Namolovan A, Osborne SE, Coombes BK, Brumell JH: *Salmonella*-containing vacuoles display centrifugal movement associated with cell-to-cell transfer in epithelial cells. Infect Immun 2009; 77(3):996-1007
- Tahoun A, Mahajan S, Paxton E, Malterer G, Donaldson DS, Wang D, Tan A, Gillespie TL, O'Shea M, Roe AJ, Shaw DJ, Gally DL, Lengeling A, Mabbott NA, Haas J, Mahajan A: *Salmonella* transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. Cell Host Microbe 2012; 12(5):645-656
- Todar K: The mechanisms of bacterial pathogenicity. Lectures in Microbiology, University of Wisconsin-Madison (2009)
- Trebicka E, Jacob S, Pirzai W, Hurley BP, Cherayil BJ: Role of antilipopolysaccharide antibodies in serum bactericidal activity against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in healthy adults and children in the United States. Clinical and Vaccine Immunology 2013; 20(10):1491-1498
- Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC: *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. Science 2000; 287:1655-1658
- Volf J, Havlickova H, Hradecka H, Ondrackova P, Matiasovic J, Faldyna M, Rychlik I: Epidemiology and interaction of *Salmonella enterica* serovar Derby, Infantis and Typhimurium with porcine alveolar macrophages. Vet Microbiol 2010; 146, 105-110
- Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ: B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. Immunol Rev 2000; 176:154-70
- Wales AD, Cook AJ, Davies RH: Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. Vet Rec 2011; 168(10):267-76
- Wales AD, Davies RH: *Salmonella* Vaccination in Pigs: A Review. Zoonoses Public Health 2016; doi: 10.1111/zph.12256
- Wallis, TS, Galyov EE: Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritidis. Mol Microbiol 2000; 36:997-1005

Waterman SR, Holden DW: Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 2003; 5(8):501-11

Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, Russell JM, Bevins CL, Garry Adams L, Tsolis RM, Roth JR, Bäumler AJ: Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 2010; 467(7314):426-429

Wisner A, Desin T, White A, Potter A, Köster W: The *Salmonella* pathogenicity island-1 and -2 encoded Type III secretion systems, *Salmonella* - a diversified superbug, Mr. Yashwant Kumar (Ed.), 2012 ; ISBN: 978-953-307-781-9

Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M: Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6(5):359-62

Xiong N, Brewer MT, Day TA, Kimber MJ, Barnhill AE, Carlson SA: Evaluation of the pathogenicity and virulence of three strains of *Salmonella* organisms in calves and pigs. *Am J Vet Res* 2010; 71:1170–1177

Yang Y, Tung JW, Ghosn EEB, Herzenberg Leonard A, Herzenberg Leonore A: Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(11):4542-4546

Yeretssian G, Labbé K, Saleh M: Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine* 2008; 43(3):380-390

Yu HB, Finlay BB: The caspase-1 inflammasome: a pilot in innate immune responses. *Cell Host Microbe* 2008; 4(3):198-208

Zariri A, van der Ley P: Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2015; 14(6):861-876

Zheng X, Zhang Q, Ji Y, Zhao X, Ni B, Xu S, Huang X: Expression and secretion pattern of FljB of *Salmonella enterica* serovar Typhi in different culture conditions. *Microb Pathog* 2016; 95:142-147

Žemličková H, Dědičová D, Jakubů V, Mach J, Kolínská R, Malíková E, Urbášková P, et al.: Antibiotická rezistence u netyfoidních sérovarů *Salmonella ssp.* v České republice. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie* 2013; 62(2):43-49

8. Přílohy

Publikace v recenzovaných časopisech

Příloha A

Immune response of pigs to *Salmonella enterica* serovar Derby and Typhimurium infections

Jan Matiasovic, Hana Stepanova, Hana Kudlackova, Hana Havlickova, Frantisek Sisak, Ivan Rychlik, Katarina Chlebova, Lenka Leva, Alena Osvaldova, Jan Gebauer, Martin Faldyna (*Veterinary Microbiology*, 2014)

Příloha B

Maternal immunity induced by inactivated *S. Typhimurium* vaccine is less protective to *S. Derby* challenge than to *S. Typhimurium* challenge in suckling piglets

Jan Gebauer, Alena Osvaldova, Hana Kudlackova, Michaela Maceckova, Frantisek Sisak, Hana Havlickova, Petra Ondrackova, Lenka Leva, Martin Faldyna, Jan Matiasovic (*Veterinarni medicina*, 2016a)

Příloha C

A proteomic approach to the development of DIVA ELISA distinguishing pigs infected with *Salmonella Typhimurium* and pigs vaccinated with a *Salmonella Typhimurium*-based inactivated vaccine

Jan Gebauer, Hana Kudlackova, Marcel Kosina, Kamil Kovarcik, Radek Tesarik, Alena Osvaldova, Martin Faldyna, Jan Matiasovic (*BMC Veterinary Research*, 2016b)

Patenty

Příloha D

Použití antigenů *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat

Ján Matiašovic, Jan Gebauer, Hana Kudláčková, Marcel Kosina, Kamil Kovařík, Radek Tesařík, Alena Osvaldová (*Národní patent č. 305077*, 2015)

Funkční vzorky

Příloha E

ELISA test pro sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium

Ján Matiašovic, Jan Gebauer, Hana Kudláčková, Marcel Kosina, Kamil Kovařík, Radek Tesařík, Alena Osvaldová (*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., 2014*)

Příloha F

Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů *Salmonella* Derby, *Salmonella* Infantis a *Salmonella* Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat

Marcel Kosina, Ján Matiašovic, Jan Gebauer, Hana Kudláčková, Lenka Levá, Hana Havlíčková, Vladimír Vrzal, František Šišák (*Bioveta, a.s., 2015*)

Příloha A

Immune response of pigs to *Salmonella enterica* serovar Derby and Typhimurium infections

Jan Matiasovic, Hana Stepanova, Hana Kudlackova, Hana Havlickova, Frantisek Sisak, Ivan Rychlik, Katarina Chlebova, Lenka Leva, Alena Osvaldova, Jan Gebauer, Martin Faldyna

Veterinary Microbiology, 2014



Immune response of pigs to *Salmonella enterica* serovar Derby and Typhimurium infections



Jan Matiasovic^{a,*}, Hana Stepanova^a, Hana Kudlackova^a, Hana Havlickova^a,
Frantisek Sisak^a, Ivan Rychlik^a, Katarina Chlebova^{a,b}, Lenka Leva^a,
Alena Osvaldova^{a,c}, Jan Gebauer^{a,b}, Martin Faldyna^a

^a Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic

^b Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Czech Republic

^c Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2013

Received in revised form 31 January 2014

Accepted 3 February 2014

Keywords:

Pig

Salmonella

Typhimurium

Derby

Immune response

ABSTRACT

Interaction between pigs and *Salmonella enterica* serovar Derby (*Salmonella* Derby) is much less understood in comparison with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium). To study interactions of weaned piglets with *Salmonella* Derby, we compared the course of infections with *Salmonella* Derby De1 and *Salmonella* Typhimurium DT104 strains, both isolated from pig herds with a long history of asymptomatic infection.

Salmonella Derby strain used was shed during the 28-day experiment period, while *Salmonella* Typhimurium strain was not found in faeces after day 17 post-infection. When the piglets were co-infected with both strains, *Salmonella* Derby was present in faeces until the end of the experiment, whilst *Salmonella* Typhimurium disappeared after day 21 post-infection. At the end of the experiment, *Salmonella* Derby was present in more tissues when compared with *Salmonella* Typhimurium. Piglets infected with *Salmonella* Typhimurium responded earlier with synthesis of anti-lipopolysaccharide IgM and IgG antibodies and with higher antibody levels compared to piglets infected with *Salmonella* Derby. Cellular immune response to both strains was very low and was detected later than was the onset of IgG antibody production.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) and *Salmonella enterica* serovar Derby (*Salmonella* Derby) are two of the most frequent *Salmonella enterica* serovars found in pigs across the EU. While *Salmonella* Typhimurium can colonise many animal species, *Salmonella* Derby is adapted to pigs. Contaminated pork is a common source of human *Salmonella* Derby

isolates in Europe (Hauser et al., 2011; Kerouanton et al., 2013).

In this work, focused on comparing infections of pigs with *Salmonella* Derby and with *Salmonella* Typhimurium, we used strains isolated from herds with a long history of asymptomatic infection with *Salmonella* spp. in sows and piglets. These low-virulence strains could represent a higher risk for food safety than virulent strains due to their inapparent presence over a long period of time on farms.

Natural infection of pigs with *Salmonella* Typhimurium is usually asymptomatic and is relatively well known (Wood et al., 1989; Boyen et al., 2008; Scherer et al., 2008; Volf et al., 2012). The course of infection with *Salmonella*

* Corresponding author. Tel.: +420 5 3333 1317; fax: +420 5 4121 1229.
E-mail address: matiasovic@vri.cz (J. Matiasovic).

Derby in pigs is less well understood, but data available indicate that it is less severe than following *Salmonella* Typhimurium infection (Osterberg et al., 2009; Ivanek et al., 2012). Moreover, pigs can be naturally co-infected with both serovars (Rowe et al., 2003; Šišák et al., 2011), but such conditions have never been addressed experimentally.

To characterise the course of infection and the immune response of pigs to a low-virulence *Salmonella* Derby De1 PFGE type strain and to compare the infection with a low-virulence strain of *Salmonella* Typhimurium DT104 phage type we performed experimental infections in pigs with each strain separately, and also with a mixture of both strains.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Salmonella enterica serovar Typhimurium phage type DT104 strain (strain number 19H4), hereinafter referred to as *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella enterica* serovar Derby strain De1 (strain number 19H3) (Volf et al., 2010), hereinafter referred to as *Salmonella* Derby, isolated from asymptomatic carrier sows were used in this study. To enable discrimination between *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in mixed infections, a spontaneous nalidixic acid resistant mutant was selected in *Salmonella* Derby strain. The same nalidixic acid resistant *Salmonella* Derby strain was used also for *Salmonella* Derby only infection. Static 16-hour-old cultures grown in LB broth (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, US) at 37 °C were used for inoculation in all the experiments.

2.2. Animal infection

The experimental protocol was approved by the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Ref. No. MZE 921). Piglets used were confirmed to be both serologically and bacteriologically negative (as determined by the methods mentioned below). The breed chosen was mixed white breed from a commercial pig farm. Piglets weaned at day 21 of life were divided into 4 groups and infected on day 28 of life. All groups were strictly separated in a barrier facility at the Veterinary Research Institute. Five animals in group 1 served as non-infected controls. Five piglets in group 2 were orally infected with 5×10^8 CFU of *Salmonella* Typhimurium. Five animals in group 3 were orally infected with 5×10^8 CFU of *Salmonella* Derby. The last group, consisting of 10 piglets, was orally infected with a mixture of half dose of each strain (2.5×10^8 CFU of *Salmonella* Typhimurium + 2.5×10^8 CFU of *Salmonella* Derby). During the first week post-infection, faeces were collected separately for each group as a pooled sample per pen on a daily basis. From week 2 till the end of experiment on day 28 post-infection (pi), faeces were collected twice a week. At the end of the experiment, animals were sacrificed by exsanguination from arteria brachialis in deep anaesthesia induced by a mixture of tiletamine, zolazepam (Zoletil, Virbac, Carros, France), xylazine (Xylazin Riems, Bioveta,

Czech Republic) and ketamine (Narketan, Vétroquinol S.A., Lure, France). Then, tissue samples from the tonsils, spleen, ileocaecal lymph nodes, ileum, caecum and colon were taken for *Salmonella* enumeration. Quantitative bacteriology was performed by plating ten-fold serial dilutions of faeces and homogenised samples of organs on XLD agar plates containing 20 mg/l of novobiocin (Sigma–Aldrich, Munich, Germany). Counts of *Salmonella* after direct plating were logarithmically (log10) transformed. Samples negative for *Salmonella* after direct plating were subjected to enrichment in modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) for qualitative *Salmonella* determination. Samples positive only after the enrichment were assigned a value of one, and negative samples were assigned a value of zero. Differentiation between *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in organ samples from animals with mixed infection was performed by individual testing of all colonies grown on XLD plates taken from the appropriate dilution for nalidixic acid resistance on XLD plates containing 20 mg/l of nalidixic acid (Merck, Whitehouse Station, NJ, US).

2.3. Antibody response

Ten ml of heparinised peripheral blood was taken prior to infection and then each 7 days till the end of the experiment. IgG antibodies were determined using Salmotype® Pig Screen ELISA (Labor Diagnostik, Leipzig, Germany). IgM antibodies were determined by an in-house ELISA, prepared as follows: plates were coated with antigen (*Salmonella* Typhimurium LPS purified by phenol extraction, Sigma–Aldrich, Munich, Germany) and incubated with a 100× diluted plasma sample. Secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (Goat anti-pig IgM conjugate, Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, US) and TMB substrate (Test-line, Brno, Czech Republic) were then used for the development of a colour reaction. ELISA plates were measured on multi-detection microplate reader Synergy 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT, US). The cut-off level for serological positivity was 10% of internal positive control in the case of Salmotype ELISA and mean of absorbance values plus 2× standard deviation of the non-infected control animals in the case of home-made IgM ELISA (Jacobson, 1998).

2.4. *Salmonella* antigen preparation

Salmonella Typhimurium and *Salmonella* Derby antigens for lymphocyte transformation test and IFNγ release test were prepared from an overnight culture of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Derby grown in LB broth (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, US). Bacterial cultures were washed twice in phosphate-buffered saline, sonicated and centrifuged. Supernatants were filter-sterilised, protein concentration was determined colorimetrically (BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Waltham, MA, US) on multi-detection microplate reader Synergy 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT, US) and diluted to protein concentration as indicated below for LTT and IFNγ release test.

2.5. Lymphocyte transformation test (LTT)

The ability of blood lymphocytes to respond to the specific antigens by proliferation was tested by using the lymphocyte transformation test. Blood samples supplemented with antibiotics (100 IU/ml of penicillin, Biotika, Slovenská Ľupča, Slovak Republic, and 0.2 mg/ml of streptomycin, Sigma–Aldrich, Munich, Germany) were incubated with or without a specific antigen (2.5 µg of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Derby proteins per ml of blood) or with 10 µg/ml of concanavalin (Sigma–Aldrich, Munich, Germany) as a mitogen positive control (Jeklova et al., 2007) for 5 days at 37 °C in 5% CO₂. Twenty hours prior to harvesting, 50 µl of RPMI (PAA, Velizy-Villacoublay, France) medium with ³H-thymidine (5 µCi/ml) was added. The incorporation of ³H-thymidine as a marker of DNA replication and clonal expansion was analysed by a TopCount NXT™ microplate scintillation counter (Packard Bioscience Instrument Company, PerkinElmer, Waltham, MA, US). The results were expressed as stimulation indices which have been calculated as the ratio of counts per minute (CPM) in the stimulated samples to CPM in the non-stimulated controls. The cut-off level was set as a mean of fold change values of control animals plus 3 × standard deviation (Jacobson, 1998).

2.6. IFNγ-release test

IFNγ released by lymphocytes in response to a specific antigen (*Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Derby lysates) was measured on heparinised blood samples collected prior to the infection and then every 7 days post-infection till the end of the experiment. Blood was incubated with a specific antigen (2.5 µg of *Salmonella* proteins per ml of blood) for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, plasma was separated by centrifugation at 2400 × g for 10 min and used for the detection of released IFNγ by ELISA (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) on multi-detection microplate reader Synergy 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT, US). IFNγ expression at the mRNA level was measured by qPCR as described previously (Stepanova et al., 2011).

3. Results

3.1. *Salmonella* shedding in faeces

Faeces of all animals in the control group remained culture negative during the entire experiment.

In *Salmonella* Typhimurium infected piglets, *Salmonella* was detected from day 1 to day 14 pi, ranging from log 3.19 to log 5.57 CFU/g of faeces. From day 17 pi until the end of the experiment, cultures of faeces from piglets infected with *Salmonella* Typhimurium yielded negative results (Fig. 1A). Piglets infected with *Salmonella* Derby shed *Salmonella* at higher levels than those infected with *Salmonella* Typhimurium. Moreover, faeces from *Salmonella* Derby infected piglets remained culture positive until the end of the experiment on day 28 pi (Fig. 1A), but the level of *Salmonella* Derby shedding was low.

In the group infected with a mixture of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby, the faecal shedding was similar to that observed in *Salmonella* Derby infected piglets, i.e. higher *Salmonella* counts were detected in faeces than in the case of *Salmonella* Typhimurium infected piglets. Also, the faecal samples remained *Salmonella* positive until the end of the experiment (Fig. 1A). The percentage of *Salmonella* Typhimurium in faecal samples has never exceeded 50% and *Salmonella* Derby usually predominated over *Salmonella* Typhimurium. From day 21, only *Salmonella* Derby was present in faeces of piglets infected with both *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby. The level of *Salmonella* Derby shedding was low, similarly to *Salmonella* Derby mono-infection (Fig. 1B).

3.2. *Salmonella* tissue colonisation 28 days post-infection

Organs of all animals in the control group were culture negative at 28 days pi.

Out of 5 piglets infected with *Salmonella* Typhimurium, only the tonsils in four animals and ileocaecal lymph nodes in three animals remained culture positive at 28 days pi. All other tissue samples yielded culture negative results (Fig. 2; Table 1 in the Supplement). In *Salmonella* Derby infected piglets, all tonsil samples were culture positive

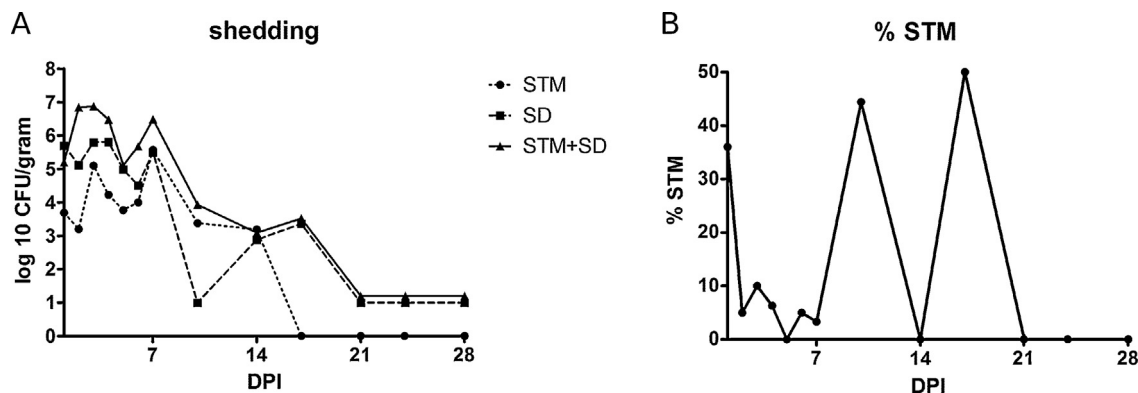


Fig. 1. *Salmonella* faecal shedding. Panel A, *Salmonella* counts in faecal samples from piglets infected with *Salmonella* Typhimurium (STM), *Salmonella* Derby (SD) or with a mixture of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby. Panel B, percentage of *Salmonella* Typhimurium in faecal samples from piglets infected with a mixture of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby. DPI – day post-infection.

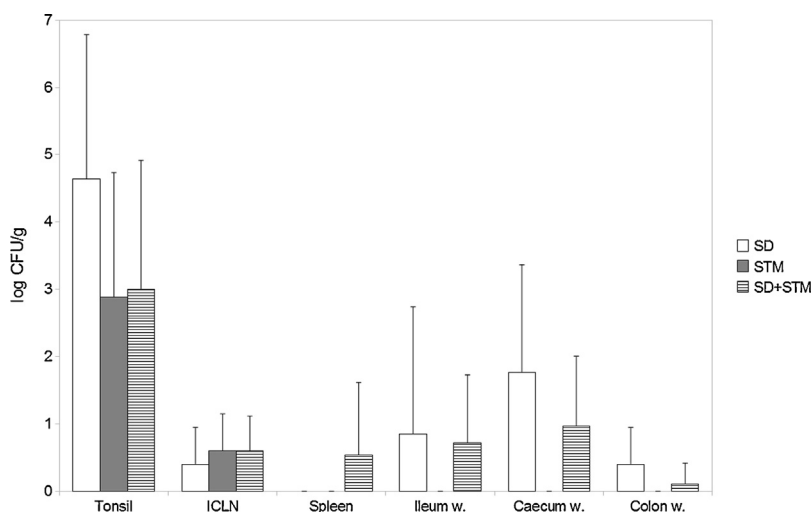


Fig. 2. *Salmonella* counts in tissue samples 28 days after oral infection. *Salmonella* Derby was present in the tested tissues in a higher amount when compared with *Salmonella* Typhimurium infected piglets. Values shown are medians of *Salmonella* counts per gram of tissue, error bars represent Q3–Q1 intervals. White columns – animals infected with *Salmonella* Derby (SD), grey columns – animals infected with *Salmonella* Typhimurium (STM), shaded columns – animals infected with both serovars. w. – wall.

28 days pi but caecum wall samples were culture positive in four out of five animals. Other organs such as ileocaecal lymph nodes, ileum wall and colon wall were culture positive in at least one animal at 28 days pi (Fig. 2; Table 1 in the Supplement). In the piglets infected with a mixture of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby, the colonisation profile was similar to that recorded in the piglets infected with *Salmonella* Derby alone, except for the spleen, which was culture positive in three out of ten animals, but negative in both monoinfection groups (Table 1 in the Supplement). The percentage of *Salmonella* Typhimurium in the positive samples ranged from 0 to 60% (Table 2 in the Supplement).

3.3. Antibody response

All animals in the control group remained serologically negative during the entire experiment.

Salmonella Typhimurium-infected animals developed average IgM antibody level above the cut-off value (0.41)

on day 7 or 14 pi, with the maximum IgM production recorded on day 14 pi (Fig. 3A). Individually, it was two out of five animals on day 7 pi, four animals on day 14 pi and one animal on day 21 pi. *Salmonella* Derby infected animals developed average IgM antibody level above the cut-off value on day 14 or 21 pi (Fig. 3A). Individually, it was one out of five animals on day 7 pi, four animals on day 14 pi, three animals on day 21 pi and one animal on day 28 pi. The IgM antibody response was therefore delayed by one week when compared with *Salmonella* Typhimurium infected piglets.

IgG levels began to increase above the cut-off level (10.00) from day 14 in *Salmonella* Typhimurium infected piglets. IgG antibody levels further increased until day 28 pi. Individually, it was three out of five animals on day 14 pi and four on day 21 and day 28 pi. One animal remained unresponsive during all the experiment. IgG levels in *Salmonella* Derby infected piglets exceeded the cut-off level on day 28 pi (Fig. 3B). Individually, it was three out of five animals on day 28 pi. The IgG antibody response was

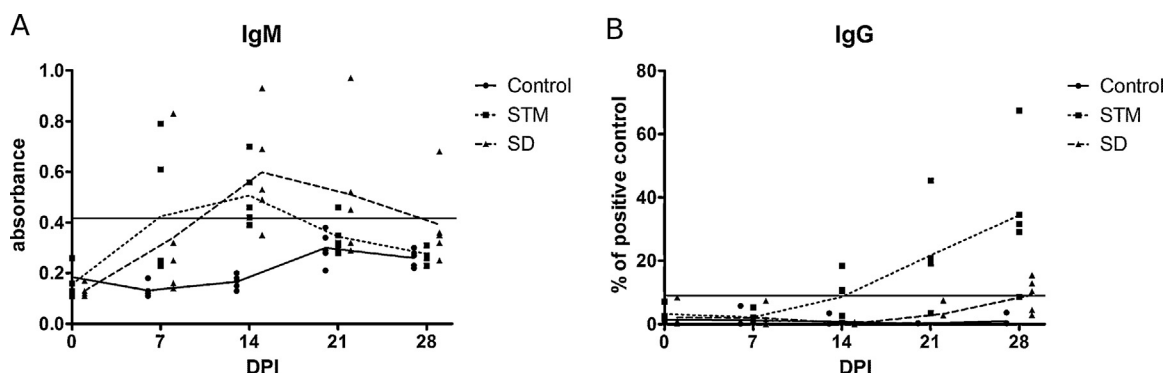


Fig. 3. IgM antibody response (panel A) and IgG antibody response (panel B) of piglets infected with *Salmonella* Typhimurium (STM) or *Salmonella* Derby (SD). Individual piglet values and lines linking averages of each group are shown. Cut-off value for serological positivity is shown in the diagram. DPI – day post-infection.

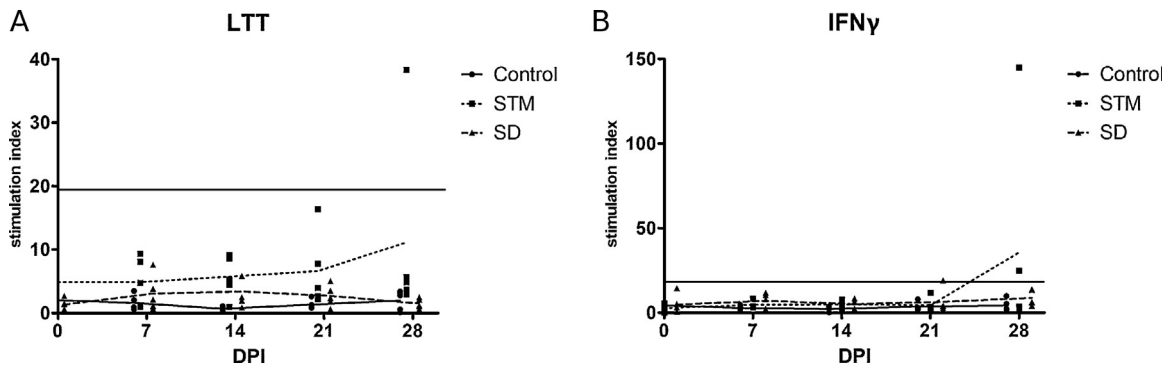


Fig. 4. Cell-mediated immune response to *Salmonella* Typhimurium (STM) and *Salmonella* Derby (SD) infection. Panel A, lymphocyte transformation test. Panel B, IFN γ release test. In each panel, individual values of stimulation index plus average values linked with lines are shown. Cut-off values for LTT or IFN γ release test positivity are shown in the diagram. DPI – day post-infection.

therefore delayed by two weeks when compared with *Salmonella* Typhimurium infected piglets.

Due to the fact that *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby express the same O-antigens, antibody response was not determined in piglets infected with a mixture of both serovars.

3.4. Cell-mediated immune response to *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby infection

Cell-mediated immune response of piglets to *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby infection was characterised by using the lymphocyte transformation test (LTT) and IFN γ release test. All animals in the control group were negative in both tests during the entire experiment.

Using LTT, a stimulation index higher than the cut-off value (stimulation index 19.08) was detected only at day 28 pi in one out of the five animals infected with *Salmonella* Typhimurium. Lymphocytes of none of the piglets infected with *Salmonella* Derby proliferated in response to *Salmonella* Derby antigen above the cut-off value in any time point (Fig. 4A).

No IFN γ release by lymphocytes was detected by ELISA at any time point and in any group of piglets (data not shown). However, an increase of IFN γ in stimulated cells above the cut-off (16.58) level was detected at the mRNA level in two out of five animals on day 28 pi in the *Salmonella* Typhimurium infected group and in one out of five animals at day 21 pi in the *Salmonella* Derby infected group (Fig. 4B).

4. Discussion

Although some data regarding the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Derby in pigs has emerged recently (Osterberg et al., 2009; Ivanek et al., 2012), the interaction of this serovar with pigs is still far from being completely understood. For this reason, we compared the course of infection and immune response of pigs infected with the selected *Salmonella enterica* serovar Derby De1 strain and infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 strain.

Strains of *Salmonella* Derby De1 and *Salmonella* Typhimurium DT104 used in our experiment were

selected on the basis of their similar behaviour in pig herds, where they were present without clinical signs of disease in sows or piglets and thus considered as low-virulence strains. The *Salmonella* Derby strain was previously identified as a strain having a prevalent De1 PFGE profile (47% of all *Salmonella* Derby isolates) within the Czech Republic (Volf et al., 2010). Similar prevalence of one dominant PFGE profile in *Salmonella* Derby isolates was lately also reported in Sardinia (Piras et al., 2011) and in Germany (Hauser et al., 2011). The relationship between prevalent strains described in all three articles is unknown, but it suggests that the epidemiological situation connected with *Salmonella* Derby may be similar to that with *Salmonella* Typhimurium, where the DT104 strain is common in pigs around Europe (Baggesen et al., 2000; Bolton et al., 2013). It is important to note that infection of pigs with different strains, even of the same serovar, may lead to a different course of infection and immune response development, as documented in the case of *Salmonella* Typhimurium (Boyen et al., 2008; Bergeron et al., 2010; Xiong et al., 2010; Van Parys et al., 2013). Although frequently used in similar type of experiments, using a spontaneous nalidixic acid-resistant *Salmonella* Derby mutant may influence the course of infection and immune response development to this strain (Björkman et al., 1998; Revollo and Ferreira, 2010). Thus, strains used could be considered as examples of particular types of strains, rather than their representatives.

Faecal shedding of *Salmonella* Typhimurium strain used, its tissue distribution and IgM and IgG responses of pigs were similar to those reported in several previous papers (Wood et al., 1989; Vieira-Pinto et al., 2005; Scherer et al., 2008; Volf et al., 2012). In contrast to *Salmonella* Typhimurium, shedding of *Salmonella* Derby strain used in this study was detected during the entire experiment. Although the level of *Salmonella* Derby shedding was low from day 21 pi, it could still become a source of contamination for other pigs and the environment. As expected, shedding of both strains corresponded with the intestinal colonisation. In comparison with *Salmonella* Typhimurium found in tonsils and ileocaecal lymph nodes, *Salmonella* Derby was found 28 days pi also in all parts of the intestinal tract. Interestingly, *Salmonella* Typhimurium was also present in the caecum and ileum, but only in the

case of co-infection with both strains. Moreover, the co-infection led to the presence of both strains in the spleen, which was not observed in any of the groups following monoinfection. We thus did not observe any apparent competition between both strains during the co-infection of pigs.

Concerning the antibody response, IgM antibody response to *Salmonella* Typhimurium was observed earlier than the IgM response to *Salmonella* Derby infection and the same was true also for IgG response. However, our findings contradict the results published by a Swedish group (Osterberg et al., 2009; Ivanek et al., 2012) who detected high levels of IgG antibodies after *Salmonella* Derby infection from day 14 pi when using a lower infection dose than in our experiment, or even earlier when using a higher infection dose. In our experiment, only *Salmonella* Typhimurium infected piglets developed IgG antibodies as early as from day 14 pi. The relationship between *Salmonella* Derby strains used in Osterberg's and our experiments is unknown, but the differences in the immune response observed were probably strain-dependent.

The relative contribution of T helper cells to antibody production was tested in the lymphocyte transformation test and IFN γ release assay. Both tests addressing the antigen-specific cell-mediated response detected very weak response only in some animals and as late as day 28 pi. Since the IgM-IgG switch in *Salmonella* Typhimurium infected piglets was detected on day 14 pi, this suggests that the switch was independent of the presence of antigen-specific T helper cells.

5. Conclusions

In our experiment *Salmonella* Derby De1 strain used induced a lower immune response than *Salmonella* Typhimurium DT104 strain, but colonised the intestine more heavily. No competition between both strains was observed in the group co-infected with both strains. Next, we have shown that the IgG immune response to *Salmonella* Typhimurium infection was independent on the presence of antigen-specific cell response.

Competing interests

The authors have no financial or personal relationships with other people or organisations that could have inappropriately influenced our work.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mrs. L. Faldikova, MSc. and Mr. Paul Veater (Bristol, United Kingdom) for correcting and proofreading the manuscript. The technical assistance of Pavlina Opatova is appreciated. This study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (projects QH81062 and MZe 0002716202) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (AdmireVet project: CZ.1.05/2.1.00/01.0006, ED0006/01/01).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.003>.

The following is the supplementary data to this article:

References

- Baggesen, D.L., Sandvang, D., Aarestrup, F.M., 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1581–1586.
- Bergeron, N., Corriveau, J., Letellier, A., Daigle, F., Quessy, S., 2010. Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine. *Can. J. Vet. Res.* 74, 11–17.
- Björkman, J., Hughes, D., Andersson, D.I., 1998. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3949–3953.
- Bolton, D.J., Ivory, C., McDowell, D., 2013. A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *Int. J. Food. Microbiol.* 160, 298–303.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Pasmans, F., 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.* 130, 1–19.
- Hauser, E., Hebner, F., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Prager, R., Schroeter, A., Rabsch, W., Fruth, A., Malorny, B., 2011. Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 141–149.
- Ivanek, R., Osterberg, J., Gautam, R., Sternberg Lewerin, S., 2012. *Salmonella* fecal shedding and immune responses are dose- and serotype-dependent in pigs. *PLoS ONE* 7, e34660.
- Jacobson, R.H., 1998. Factors in selecting serum samples for use in determining the positive/negative threshold (cut-off) in ELISA. In: *Diagnosis and Epidemiology of Animal Disease in Latin America*. IAEA-TECDOC-1055, pp. 25–28.
- Jeklova, E., Leva, L., Kudlackova, H., Faldyna, M., 2007. Functional development of immune response in rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 221–228.
- Kerouanton, A., Rose, V., Weill, F.X., Granier, S.A., Denis, M., 2013. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serotype Derby isolated from pigs, pork, and humans in France. *Foodborne Pathog. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2013.1537>.
- Osterberg, J., Lewerin, S.S., Wallgren, P., 2009. Patterns of excretion and antibody responses of pigs inoculated with *Salmonella* Derby and *Salmonella* Cubana. *Vet. Rec.* 165, 404–408.
- Piras, F., Brown, D.J., Meloni, D., Mureddu, A., Mazzette, R., 2011. Investigation of *Salmonella enterica* in Sardinian slaughter pigs: prevalence, serotype and genotype characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 201–209.
- Revollado, L., Ferreira, A.J., 2010. *Salmonella* antibiotic-mutant strains reduce fecal shedding and organ invasion in broiler chicks. *Poult. Sci.* 89 (Oct (10)) 2130–2140.
- Rowe, T.A., Leonard, F.C., Kelly, G., Lynch, P.B., Egan, J., Quirke, A.M., Quinn, P.J., 2003. *Salmonella* serotypes present on a sample of Irish pig farms. *Vet. Rec.* 153, 453–456.
- Scherer, K., Szabó, I., Rösler, U., Appel, B., Hensel, A., Nöckler, K., 2008. 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.* 71, 699–705.
- Šišák, F., Havlíčková, H., Matiasovic, J., Karpíšková, R., 2011. Serological and bacteriological evaluation of *Salmonella* status in swine herds. *Czech J. Food Sci.* 29 (S) 107–109.
- Stepanova, H., Pavlova, B., Stromerova, N., Matiasovic, J., Kaevska, M., Pavlik, I., Faldyna, M., 2011. Cell-mediated immune response in swine infected with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142, 107–112.
- Van Parys, A., Boyen, F., Leyman, B., Verbrughe, E., Maes, D., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2013. Induction of seroconversion and persistence of *Salmonella* Typhimurium in pigs are strain dependent. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.03.007>.
- Vieira-Pinto, M., Temudo, P., Martins, C., 2005. Occurrence of salmonella in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 476–481.

- Volf, J., Havlickova, H., Hradecka, H., Ondrackova, P., Matiasovic, J., Faldyna, M., Rychlik, I., 2010. Epidemiology and interaction of *Salmonella enterica* serovar Derby, Infantis and Typhimurium with porcine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* 146, 105–110.
- Volf, J., Stepanova, H., Matiasovic, J., Kyrova, K., Sisak, F., Havlickova, H., Leva, L., Faldyna, M., Rychlik, I., 2012. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signalling in palatine tonsils. *Vet. Microbiol.* 156, 127–135.
- Wood, R.L., Pospischil, A., Rose, R., 1989. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1015–1021.
- Xiong, N., Brewer, M.T., Day, T.A., Kimber, M.J., Barnhill, A.E., Carlson, S.A., 2010. Evaluation of the pathogenicity and virulence of three strains of *Salmonella* organisms in calves and pigs. *Am. J. Vet. Res.* 71, 1170–1177.

Příloha B

Maternal immunity induced by inactivated *S. Typhimurium* vaccine is less protective to *S. Derby* challenge than to *S. Typhimurium* challenge in suckling piglets

Jan Gebauer, Alena Osvaldova, Hana Kudlackova, Michaela Maceckova, Frantisek Sisak, Hana Havlickova, Petra Ondrackova, Lenka Leva, Martin Faldyna, Jan Matiasovic

Veterinarni medicina, 2016a

Maternal immunity induced by inactivated *S. Typhimurium* vaccine is less protective to *S. Derby* challenge than to *S. Typhimurium* challenge in suckling piglets

J. GEBAUER^{1,2}, A. OSVALDOVA^{1,3}, H. KUDLACKOVA¹, M. MACECKOVA^{1,2}, F. SISAK¹, H. HAVLICKOVA¹, P. ONDRACKOVA¹, L. LEVA¹, M. FALDYNA¹, J. MATIASOVIC¹

¹Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

²Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Derby are the most common serovars of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* found in pigs in Europe. We previously observed that suckling piglets of sows vaccinated with an *S. Typhimurium*-based inactivated vaccine are protected against homologous strain challenge. To develop this vaccine for commercial use, potential crossprotectivity of this vaccine to challenge with *S. Derby* was tested. Two sows were vaccinated with an *S. Typhimurium*-based inactivated vaccine while two other sows remained serologically negative. Four-day-old suckling piglets from both groups were orally challenged with *S. Derby* or *S. Typhimurium*. Maternally-derived immunity against *S. Typhimurium* protected piglets against *S. Typhimurium* challenge, when a significant ($P < 0.05$) decrease in *S. Typhimurium* count was found in ileocaecal and submandibular lymph node, tonsil, ileum and ileum content. On the other hand, after *S. Derby* challenge, significant ($P < 0.05$) decrease in *S. Derby* count was detected only in ileum content. Although both serovars belong to the same O:4 serogroup, other antigenic structures, for example the flagellin, are different. In a subsequent in-vitro experiment, we found that serum from vaccinated sows inhibited the motility of *S. Typhimurium* but not the motility of *S. Derby*. Our results indicate that protectivity of *S. Typhimurium* vaccine against *S. Derby* infection is limited.

Keywords: vaccination; crossprotectivity; antibody

Abbreviations

BHI = brain-heart infusion, **ELISA** = Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, **LPS** = lipopolysaccharide, **SD** = *Salmonella enterica* serovar Derby, **STM** = *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Pigs are the second most important source of *Salmonella* infection for humans in Europe after poultry (Anonymous 2009). One way to decrease a risk of *Salmonella* transmission from pig meat and slaughter products to humans is to decrease the number of *Salmonella*-positive pigs at slaughter. Piglets can be infected soon after birth when the

infected sow or its environment is the infection source (Proux et al. 2001; Boughton et al. 2007). The immunity of newborn piglets could be crucial for eliminating this source of infection. Previously, we demonstrated that vaccination of pregnant sows with experimental inactivated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) vaccine

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. QJ1210115) and the MEYS of the Czech Republic under the NPU I program (Project No. LO1218).

induces colostral immunity responsible for the protection of suckling piglets when challenged with a homologous strain (Matiasovic et al. 2013). Because *Salmonella enterica* serovar Derby (S. Derby) and *S. Typhimurium* belong to the same O:4 group (Grimont and Weill 2007), the aim of the study was to test potential crossprotectivity of *S. Typhimurium* vaccine to *S. Derby* challenge.

MATERIAL AND METHODS

The animal care protocol and its use in this experiment were approved by the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZE1358). Four sows negative for *Salmonella*-specific antibodies, tested with Salmotype pig screen ELISA Kit (Labor Diagnostik, Germany) were used in the experiment. Two sows were vaccinated intramuscularly into the neck with 1 ml of inactivated *S. Typhimurium* vaccine four and two weeks before parturition and developed antibody response to the vaccine. The in-house vaccine was prepared from *S. Typhimurium* DT104 incubated overnight in BHI medium to 1×10^9 CFU per ml, inactivated with 1% formaldehyde and mixed with ISA50V2 adjuvant (Seppic, France) (Matiasovic et al. 2013). None of the sows shed *Salmonella* sp. one week before and four days after parturition when checked daily by the ISO 6579:2002 bacterial culture method.

IgG antibodies were measured using Salmotype pig screen ELISA Kit and IgA antibodies with a home-made ELISA based on *S. Typhimurium* O-antigens (Matiasovic et al. 2013). Briefly, Maxisorp plates (Nunc, Denmark) were coated with *S. Typhimurium* LPS (Sigma-Aldrich, USA). Serum samples were diluted 100 times and jejunal lavage two times in PBS and applied to coated plates. After incubation, the secondary antibody (Goat anti-pig IgA conjugate, Bethyl Laboratories, USA) conjugated with horseradish peroxidase was added. Subsequently, TMB substrate (Test-line, Czech Republic) was applied and the signal was measured at 450 nm on microplate reader Synergy H1 (Biotek, USA).

Four days after birth, suckling piglets of one vaccinated ($n = 10$) and one serologically negative sow ($n = 8$) were orally inoculated with 2.4×10^7 CFU of *S. Typhimurium* (STM challenge group) homologous to the vaccine strain (dose volume 2 ml). Similarly, piglets of two other sows ($n = 10$ in each group) were

orally inoculated with 2.6×10^7 CFU of *S. Derby* (SD challenge group) (Matiasovic et al. 2014). All animal groups were individually housed in barrier pens. All piglets remained with their mothers until euthanized by exsanguination from the arteria brachialis under deep anaesthesia at 72 h post inoculation, i.e. at the end of the experiment when the *Salmonella* load within tissues was anticipated to be maximal (Wood and Rose 1992).

Quantitative bacteriology was performed by plating ten-fold serial dilutions of homogenised organ samples on XLD agar plates. After direct plating, counts of *Salmonella* were logarithmically transformed. Samples negative for *Salmonella* according to the aforementioned method, were subjected to the enrichment in semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) for qualitative *Salmonella* determination. Samples positive only after enrichment were taken as a value of one, and a value of zero was assigned to negative samples.

Influence of anti-*S. Typhimurium* antibodies on *S. Typhimurium* and *S. Derby* motility was tested *in vitro* according to Forbes et al. (2008). LB agar (0.3 g of agar per 100 ml, Invitrogen, USA) plates without antibodies or containing $100 \times$ or $1000 \times$ diluted heat-inactivated serum from both vaccinated sows were inoculated with 1 μ l of overnight culture of *S. Typhimurium* or *S. Derby*. The diameter of migrating bacteria was measured in duplicates each hour of 8 h of cultivation. A test was performed four times, twice for serum from each sow. *Salmonella*-specific antibody levels in the serum samples of both sows were 86% and 116% of positive control of Salmotype pig screen ELISA Kit.

The significance of differences among groups for *in vivo* and for *in vitro* experiments was tested by ANOVA followed by the Bonferroni's Multiple Comparison Test. Differences with $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

On Day Two after inoculation, piglets in all groups developed mild diarrhoea. The only clinical difference among groups was a slightly, but significantly higher body temperature at day two after inoculation in piglets from the serologically negative sow ($39.8^\circ\text{C} \pm 0.3$), when compared to their counterparts from the vaccinated sow ($39.3^\circ\text{C} \pm 0.3$) in *S. Typhimurium* challenge group.

doi: 10.17221/8679-VETMED

Table 1. *Salmonella*-specific antibody levels in the blood and jejunal lavage from suckling piglets

Challenge group	IgG DPI 0	IgG DPI 3	IgA DPI 0	IgA DPI 3	IgA DPI 3 jejunum
SD; Ab neg.; <i>n</i> = 10	−0.52 ± 0.37 ^a	−1.08 ± 0.30 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.05 ^a
STM; Ab neg.; <i>n</i> = 8	6.41 ± 2.18 ^a	4.20 ± 1.52 ^a	0.25 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.63 ± 0.15 ^{ac}
SD; vacc.; <i>n</i> = 10	110.70 ± 2.43 ^b	102.70 ± 3.38 ^b	1.92 ± 0.09 ^b	1.07 ± 0.04 ^b	1.51 ± 0.10 ^b
STM; vacc.; <i>n</i> = 10	100.10 ± 1.47 ^c	95.89 ± 1.19 ^b	2.02 ± 0.06 ^b	1.14 ± 0.07 ^b	0.76 ± 0.09 ^c

DPI = day post infection, SD = *S. Derby* challenge, STM = *S. Typhimurium* challenge, Ab neg. = piglets from the sow negative for *Salmonella*-specific antibodies, vacc. = piglets from the vaccinated sow, *n* = number of animals in group

Values are presented as a mean ± SEM. Within a column, values with different superscripts (^{a, b, c}) differ significantly (*P* < 0.05)

Piglets from both vaccinated sows had significantly higher amounts of *Salmonella*-specific IgG and IgA antibodies in the blood (Table 1) than piglets from serologically negative sows. Piglets from the vaccinated sow in the SD challenge group had slightly, but significantly higher amounts of IgG at Day 0 post infection (DPI 0) than piglets from the vaccinated sow in the STM challenge group. The levels of specific IgA in jejunal lavage in piglets of the vaccinated sow in the SD challenge group were significantly higher than in piglets from the serologically negative sow, whereas in the STM challenge group, the difference between piglets from vaccinated and serologically negative sows was not significant.

Piglets from the vaccinated sow in the STM challenge group had a significantly lower *Salmonella* Typhimurium count in the ileocaecal lymph node, submandibular lymph node, tonsil, ileum wall and ileum content than piglets from the serologically negative sow (Table 2). The spleen was not colonised in any animal and the liver was positive only after enrichment in two piglets from the serologically negative sow. This difference was not statistically significant.

Piglets from the vaccinated sow in the SD challenge group had a significantly lower *S. Derby* count in ileum content than piglets from the serologically negative sow (Table 2). However, *S. Derby* counts in the ileocaecal lymph node, submandibular lymph node, tonsil and ileum were not significantly different. The spleen and liver were *S. Derby* negative in all animals.

DISCUSSION

Although piglets from the vaccinated sow challenged with *S. Derby* acquired high levels of anti-*S. Typhimurium* antibodies (even higher than piglets from the vaccinated sow challenged with *S. Typhimurium*), their protection against *S. Derby* infection, measured as a significant decrease in *Salmonella* counts in tissues, was lower than in the *S. Typhimurium* challenge group. This might have been influenced by overall lower colonisation of organs by *S. Derby*, but also by differences in protein sequences between *S. Derby* and *S. Typhimurium*. Although both serovars have the same structure of O-antigens, the sequence of fliC protein, the major component of the flagellum, shows 78% similarity

Table 2. *Salmonella enterica* serovar Derby or Typhimurium counts in tissues

Challenge group	Spleen	Liver	IC LN	SM LN	Tonsil	Ileum wall	Ileum content
SD; Ab neg.; <i>n</i> = 10	0.00	0.00	1.24 ± 0.26	1.75 ± 0.42	0.30 ± 0.15	2.50 ± 0.46	2.49 ± 0.72
SD; vacc.; <i>n</i> = 10	0.00	0.00	0.30 ± 0.15	0.68 ± 0.39	0.10 ± 0.10	2.37 ± 0.56	1.00 ± 0.00*
STM; Ab neg.; <i>n</i> = 8	0.00	0.25 ± 0.16	4.71 ± 0.17	3.90 ± 0.29	2.51 ± 0.40	6.11 ± 0.28	4.94 ± 1.37
STM; vacc.; <i>n</i> = 10	0.00	0.00	1.91 ± 0.47*	1.08 ± 0.42*	0.81 ± 0.50*	4.02 ± 0.27*	2.50 ± 0.22*

SD = *S. Derby* challenge, STM = *S. Typhimurium* challenge, Ab neg. = piglets from the sow negative for *Salmonella*-specific antibodies, vacc. = piglets from the vaccinated sow, IC = ileocaecal, LN = lymph node, SM = submandibular, *n* = number of animals in group

Data for the sampled tissues are presented as a mean ± SEM of log 10 values of *S. Typhimurium* or *S. Derby* CFU/g for each group. Asterisks indicate the significance of differences (*P* < 0.05) between piglets from vaccinated and serologically negative sow within challenge group

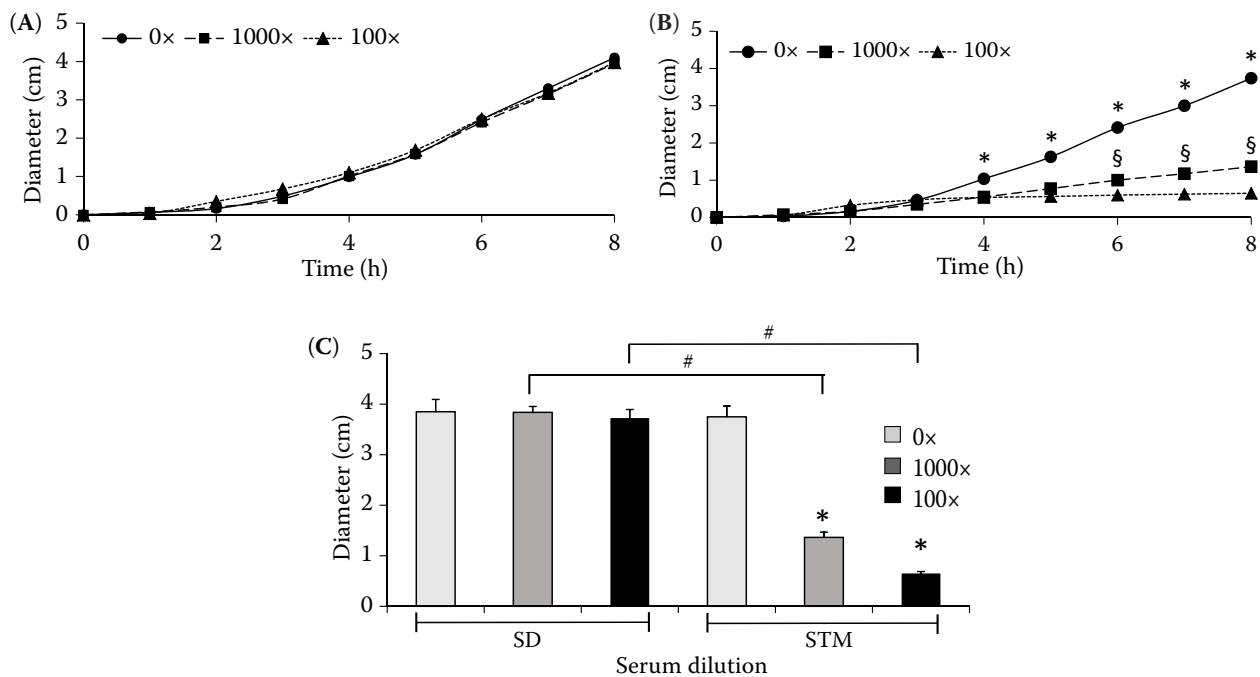


Figure 1. Influence of anti-*S. Typhimurium* antibodies on *S. Typhimurium* and *S. Derby* motility. The diameter of *S. Derby* (A) and *S. Typhimurium* (B) bacterial ring was gradually measured in agar plates with different concentrations of antibodies against *S. Typhimurium* (0 × = without serum, 1000 × and 100 × diluted serum) incubated for 8 h. The last hour, motility of *S. Derby* and *S. Typhimurium* was compared (C). Each image represents the average of four separated experiments. *, # or § represents *P*-value of less than 0.05 that was considered significant. SD = *S. Derby*; STM = *S. Typhimurium*

* = inhibition of bacterial motility in 1000 × and 100 × diluted serum when compared to plates without serum

§ = difference in motility between 1000 × and 100 × dilution of serum

= significance between *S. Derby* and *S. Typhimurium* motility on the plates with the same serum dilutions

only to the first 190 amino acids (aa) from about 500 aa forming the whole protein (STM 495 aa, SD 504 aa) when compared by blastp using default settings (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). In accordance with this finding, the motility test showed that *in vitro* anti-*S. Typhimurium* antibodies significantly reduced the motility of *S. Typhimurium* but not *S. Derby* (Figure 1). In this test, the presence of anti-*S. Typhimurium* antibodies in LB semi-solid agar significantly reduced motility of *S. Typhimurium* from 4 h post inoculation. Under the same conditions the motility of *S. Derby* was not significantly reduced. The motility of both serovars on plates without antibodies was not significantly different. Another important antigenic target for protective antibodies is membrane protein ompD (Gil-Cruz et al. 2009), which has 89% similarity between these two serovars. Different epitopes of *S. Derby* proteins thus may limit the protectivity of antibodies induced by *S. Typhimurium* vaccine.

In the past, an effort was made to test crossprotectivity of *S. Choleraesuis* live attenuated vaccine to *S. Typhimurium* challenge. In a controlled study it was found that live attenuated *S. Choleraesuis* vaccine did not reduce shedding (Letellier et al. 2000), but could stimulate local immunity and reduce the presence of *S. Typhimurium* in the ileum in swine (Letellier et al. 2001). Some field studies found that live attenuated *S. Choleraesuis* vaccine reduced seroprevalence and *Salmonella* isolation in pigs at slaughter (Maes et al. 2001; Schwarz et al. 2011), whereas others, working with a vaccine based on *S. Typhimurium* var. Copenhagen, the crossprotectivity did not observed (Farzan and Friendship 2010).

It has to be taken into account that our data were obtained from a limited number of animals. Nevertheless, it was found that crossprotectivity of antibodies developed after vaccination was reduced between *Salmonella* Typhimurium and Derby serovars.

doi: 10.17221/8679-VETMED

Acknowledgement

The authors wish to thank Dr. Ludmila Faldikova (Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic) and Mr. Paul Veater (Bristol, United Kingdom) for proofreading the manuscript.

REFERENCES

- Anonymous (2009): Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs in the EU, 2008 – Part A: Salmonella prevalence estimates. *EFSA Journal* 7, 1377.
- Boughton C, Egan J, Kelly G, Markey B, Leonard N (2007): Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of Salmonella Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* 4, 33–40.
- Farzan A, Friendship RM (2010): A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling Salmonella infection and the association of Salmonella-shedding and weight gain in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 74, 258–263.
- Forbes SJ, Eschmann M, Mantis NJ. (2008): Inhibition of Salmonella enterica serovar Typhimurium motility and entry into epithelial cells by a protective antilipopolysaccharide monoclonal immunoglobulin A antibody. *Infection and Immunity* 76, 4137–4144.
- Gil-Cruz C, Bobat S, Marshall JL, Kingsley RA, Ross EA, Henderson IR, Leyton DL, Coughlan RE, Khan M, Jensen KT, Buckley CD, Dougan G, MacLennan IC, Lopez-Macias C, Cunningham AF (2009): The porin OmpD from nontyphoidal Salmonella is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 9803–9808.
- Grimont PAD, Weill FX (2007): Antigenic Formulae of The Salmonella Serovars. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France.
- Letellier A, Messier S, Lessard L, Quessy S (2000): Assessment of various treatments to reduce carriage of Salmonella in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64, 27–31.
- Letellier A, Messier S, Lessard L, Chénier S, Quessy S (2001): Host response to various treatments to reduce Salmonella infections in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 65, 168–172.
- Maes D, Gibson K, Trigo E, Saszak A, Grass J, Carlson A, Blaha T (2001): Evaluation of cross-protection afforded by a Salmonella Choleraesuis vaccine against Salmonella infections in pigs under field conditions. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* 114, 339–341.
- Matiasovic J, Kudlackova H, Babickova K, Stepanova H, Volf J, Rychlik I, Babak V, Faldyna M (2013): Impact of maternally-derived antibodies against Salmonella enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *The Veterinary Journal* 196, 114–115.
- Matiasovic J, Stepanova H, Kudlackova H, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I, Chlebova K, Leva L, Osvaldova A, Gebauer J, Faldyna M (2014): Immune response of pigs to Salmonella enterica serovar Derby and Typhimurium infections. *Veterinary Microbiology* 170, 284–290.
- Proux K, Cariolet R, Fravalo P, Houdayer C, Keranflech A, Madec F (2001): Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of Salmonella typhimurium. *Veterinary Research* 32, 591–600.
- Schwarz P, Kich JD, Kolb J, Cardoso M (2011): Use of an avirulent live Salmonella Choleraesuis vaccine to reduce the prevalence of Salmonella carrier pigs at slaughter. *Veterinary Records* 169, 553.
- Wood RL, Rose R (1992): Populations of Salmonella typhimurium in internal organs of experimentally infected carrier swine. *American Journal of Veterinary Research* 53, 653–658.

Received: 2015–10–07

Accepted after corrections: 2015–11–30

Corresponding Author:

Jan Matiasovic, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic
E-mail: matiasovic@vri.cz

Příloha C

A proteomic approach to the development of DIVA ELISA distinguishing pigs infected with *Salmonella* Typhimurium and pigs vaccinated with a *Salmonella* Typhimurium-based inactivated vaccine

Jan Gebauer, Hana Kudlackova, Marcel Kosina, Kamil Kovarcik, Radek Tesarik, Alena Osvaldova, Martin Faldyna, Jan Matiasovic

BMC Veterinary Research, 2016b

(Rukopis byl přijat k publikaci dne 2. 11. 2016)

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

A proteomic approach to the development of DIVA ELISA distinguishing pigs infected with *Salmonella* Typhimurium and pigs vaccinated with a *Salmonella* Typhimurium-based inactivated vaccine

Jan Gebauer^{1,2*}, Hana Kudlackova¹, Marcel Kosina³, Kamil Kovarcik⁴, Radek Tesarik¹, Alena Osvaldova^{1,5}, Martin Faldyna¹ and Jan Matiasovic¹

Abstract

Background: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is one of the most common enteropathogenic bacteria found in pigs in Europe. In our previous work, we demonstrated the protective effects in suckling piglets when their dams had been vaccinated with an *S. Typhimurium*-based inactivated vaccine. This study is focused on a procedure leading to serological discrimination between vaccinated and infected pigs. As we supposed, distinct environment during natural infection and in bacterial cultures used for vaccine preparation led to a slightly different spectrum of expressed *S. Typhimurium* proteins. The examination of porcine antibodies produced after the experimental infection with *S. Typhimurium* or after vaccination with *S. Typhimurium*-based inactivated vaccine by affinity chromatography and mass spectrometry revealed differences in antibody response applicable for serological differentiation of infected from vaccinated animals.

Results: Antibodies against *Salmonella* SipB, SipD and SseB proteins were detected at much higher levels in post-infection sera in comparison with control and post-vaccination sera. On the other hand, proteins BamB, OppA and a fragment of FliC interacted with antibodies from post-vaccination sera with a much higher intensity than from control and post-infection sera. In addition, we constructed ELISA assays using post-infection antigen - SipB protein and post-vaccination antigen - FliC-fragment and evaluated them on a panel of individual porcine sera.

Conclusions: The analysis of antibody response of infected and vaccinated pigs by proteomic tools enabled to identify *S. Typhimurium* antigens useful for distinguishing infected from vaccinated animals. This approach can be utilized in other challenges where DIVA vaccine and a subsequent serological assay are required, especially when genetic modification of a vaccine strain is not desirable.

Keywords: Porcine, *Salmonella* Typhimurium, DIVA vaccine, Recombinant protein, Mass spectrometry

* Correspondence: gebauer@vri.cz

¹Department of Immunology, Veterinary Research Institute, Hudcova296/70, 62100 Brno, Czech Republic

²Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska267/2, 611 37 Brno, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Infections caused by non-typhoid *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) constitute a persistent problem in human and veterinary medicine. *Salmonella* Typhimurium is the most frequent serotype found in pigs. Contaminated pork and porcine products are thus a source of infection for human consumers [1]. A possible way to moderate the *Salmonella* burden in pigs is vaccination. A successful and widely used vaccine should allow distinguishing vaccinated animals from those that were naturally infected, so-called DIVA approach (Differentiating Infected from Vaccinated individuals) [2]. Available diagnostic serological tests for the evaluation of *Salmonella* infections in pigs are based on measurements of the level of antibodies induced by O-antigens, the outer segment of bacterial lipopolysaccharide (LPS) [3]. These assays do not allow us to distinguish infected and vaccinated animals when *Salmonella* strain without any deletion in genes responsible for lipopolysaccharide formation is used for vaccination [4]. On the other hand, LPS plays a role as an inducer of the immune response, which might be beneficial for the vaccination itself [5, 6]. Selke et al. [7] introduced a live negative-marker vaccine based on *Salmonella* Typhimurium strain with deleted gene for the outer membrane protein *ompD*. Bearson et al. [8] prepared a similar attenuated live negative-marker vaccine with a deletion of multiple small regulatory RNAs combined with *rfaH* mutation. However, using a genetically modified live bacterial strain as a vaccine may be questionable because of current regulation and public non-acceptance of genetically modified organisms in Europe.

With an unmodified inactivated *Salmonella* Typhimurium-based vaccine for pigs developed in our previous work we achieved a similar level of protectivity for suckling piglets [9] as Selke et al. [7]. In this study, we extend the development of this vaccine to include DIVA testing. We took advantage of the fact that *Salmonella* express virulence factors (proteins from SPIs - *Salmonella* pathogenicity islands) in an environment-dependent manner. We thus expected differences in bacterial protein expression under in vitro and in vivo conditions. We analysed the antibody response to the vaccine based on inactivated *Salmonella* Typhimurium cultivated in vitro and the antibody response of animals infected with live bacteria.

Based on this, we introduced a method for discovering *Salmonella* proteins able to induce condition-specific antibody production, which allows us to serologically distinguish animals that were vaccinated from those infected with *Salmonella* Typhimurium.

Methods

Bacterial strain

Salmonella enterica serovar Typhimurium phage type DT104 strain (strain number 1A5, from bacterial

collection at Veterinary Research Institute, originally isolated from healthy sow), hereinafter referred to as *Salmonella* Typhimurium, was used in this experiment. Bacteria were cultivated overnight at 37 °C in Miller's LB Broth Base (Invitrogen, USA) or brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid, UK) for certain analyses as described below.

Vaccination and infection of pigs

Three groups of animals consisting of twelve white mixed-breed piglets (bought from a commercial stud) weaned 21 days after birth were used in the experiment. Pigs in the first group remained serologically negative for anti-*Salmonella* antibodies (determined by Pig Screen ELISA, Qiagen, Germany). Another twelve animals were orally infected one week after housing with 1×10^8 CFU of *Salmonella* Typhimurium grown in BHI medium and blood was collected 28 days after the infection. The last group of animals was vaccinated intramuscularly into the neck with 1 ml of a vaccine prepared from 1×10^9 CFU of *Salmonella* Typhimurium grown in BHI medium, inactivated with formaldehyde and adjuvanted with Montanide ISA50V2 (Seppic, France). The first dose was administered one week after housing and the second dose two weeks later. Blood was collected 14 days after the second dose of a vaccine.

Antibody fraction preparation

Serum samples from three random animals from each group were pooled together and IgG fractions were isolated using Protein G columns (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare, UK) according to the manufacturer's protocol. Affinity chromatography was performed on an FPLC instrument (Pharmacia, Sweden).

Antigen preparation

The same procedure of preparing bacterial protein lysate was used for the comparison of *Salmonella* Typhimurium protein expression when cultivated in LB or BHI medium using MS and for immunoaffinity chromatography.

Salmonella Typhimurium was grown overnight at 37 °C in LB and BHI medium, as noted above. The culture was then centrifuged ($3,500 \times g$, 10 min), and a cell pellet was washed 3 times in PBS (Dulbecco's, Lonza, Switzerland). The cell pellet was resuspended in PBS and sonicated (Sonopuls HD 3100, Bandelin, Germany) with zirconia/silica beads (BioSpec Products, USA). The sonicate was centrifuged at $20,000 \times g$ and the supernatant with proteins was taken. The pellet was then resuspended in 8 M urea (Serva, Germany), 0.1 % SDS (Carl Roth, Germany), 2 % Triton X-100 (Serva, Germany) and 25 mM triethylammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich, USA) and centrifuged at $20,000 \times g$ again. The supernatant was mixed

with the supernatant from the previous step and together used as an antigen for subsequent analysis.

Immunoaffinity chromatography

IgGs from all three sample groups were covalently bound to CNBr-activated Sepharose (GE Healthcare, UK) according to the manufacturer's protocol. Sepharose with bound immunoglobulins was loaded into 3 plastic cartridges (BioRad, USA) creating liquid chromatography columns. The same antigen (protein lysate from *Salmonella* Typhimurium grown in LB) was used for all three IgG columns - column with antibodies from negative control animals, from vaccinated animals and from infected animals. 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 (Serva, Germany) served as a binding buffer. 0.1 M glycine-HCl (Serva, Germany), pH 2.7 was used for elution of bound proteins and 1 M Tris-HCl (Carl Roth, Germany), pH 9.0, was added to collection tubes for pH adjustment. Protein eluates were then used for analysis by mass spectrometry.

LC-MS/MS analysis

100 µg of proteins (measured with Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) was used for each sample preparation with the FASP (filter-aided sample preparation) method [10]. Each sample was washed five times with 8 M urea (Serva, Germany) in Vivacon 500 centrifugal tubes (Sartorius Stedim, Germany) with 10,000 MWCO membrane filter. Dithiothreitol (10 mM, Sigma-Aldrich, USA) and iodoacetamide (50 mM, Serva, Germany) in triethylammonium bicarbonate buffer (25 mM, Sigma-Aldrich, USA) were used for reduction and alkylation, respectively. Proteins were then digested with trypsin (Promega, USA) in 1:50 ratio, for one hour, at 37 °C and then overnight at 25 °C. After centrifugation, the eluate with digested peptides was evaporated (DNA120 SpeedVac, Thermo Savant, USA), peptide pellet was resuspended in 0.1 % aqueous formic acid (Sigma-Aldrich, USA) which serves as a mobile phase for liquid chromatography (UltiMate 3000 RSLCnano, Dionex -Thermo Scientific, USA). For separation and elution of peptides, 2-h gradient with increasing (0 min - 4 %, 4 min - 4 %, 98 min - 45 %, 98.5 min - 90 %, 112 min - 90 %, 112.5 min - 4 %, 120 min - 4 %) concentrations of acetonitrile (0.1 % formic acid in acetonitrile, Sigma-Aldrich, USA) at a flow rate of 300 nl/min was used. Peptides were separated on a 25 cm column (Acclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm I.D., Thermo Scientific, USA). uHPLC was connected to EASY-Spray ion source and Orbitrap Velos Pro mass spectrometer (Thermo Scientific, USA). A survey scan over the m/z range 390–1700 was used to identify protonated peptides with charge states of at least 2, which were automatically selected for data-dependent MS/MS

analysis and fragmented by collision with helium gas. Ten fragment mass spectra after each full scan were recorded. Measured spectra were then searched using Proteome Discoverer (version 1.4, Thermo Scientific, USA) software with Mascot (Matrix Science, USA) or Sequest HT (Thermo Scientific, USA) as a searching algorithm. Oxidation of methionine as a dynamic, and carbamidomethylation of cysteine as a static modification was used. Precursor and fragment mass tolerances were set up as 10 ppm and 0.5 Da, respectively. Swiss-Prot database for *Salmonella* strain was used (based on 2014/06 release) in Mascot and Uniprot database for *Salmonella* strain (from 2013/04) was used in Sequest HT. Only peptides with a false discovery rate less than 0.05 were considered as well identified. Proteins that were uniquely found in each sample - proteins bound to the IgG fraction from sera from either vaccinated or infected animals, but not from control pigs were then pinpointed as candidate antigens for serological discrimination.

Recombinant protein preparation and its purification

Appropriate primers (Tab. 1) for each selected protein were designed using NCBI/Primer-BLAST. PCR reaction with *Salmonella* DNA (supernatant from washed cell culture heated in distilled water for 10 min at 95 °C) as a template and Taq polymerase (Plain PP Master Mix, Top Bio, Czech Republic) was carried out. PCR products were purified (MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, Germany), then cloned into the pTrcHis-TOPO vector (Invitrogen, USA) and recombinant proteins were expressed in TOP10 One Shot chemically competent *E. coli* cells (Invitrogen, USA). IPTG was used as an inducer of the expression. Recombinant proteins with N-terminal His-Tag were isolated on HiTrap Chelating HP columns (GE Healthcare, UK) with attached nickel ions. Briefly, an overnight *E. coli* culture in LB broth (Invitrogen, USA) was centrifuged and washed in PBS (Dulbecco's, Lonza, Switzerland) and cells were disrupted by sonication (Sonopuls HD 3100, Bandelin, Germany). After centrifugation, supernatant with proteins was transferred to a binding buffer (0.02 M sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.4) using desalting columns (PD-10, Sephadex G-25 M, GE Healthcare, UK). Metal-chelate affinity chromatography was performed on an FPLC system (Pharmacia, Sweden). After washing with a buffer containing an increased concentration of imidazole (40 mM), His-Tagged proteins were finally eluted with the elution buffer (0.02 M sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 250 mM imidazole, pH 7.4).

If further purification was needed, we performed a preparative electrophoresis in a polyacrylamide gel (Model 491 Prep Cell, BioRad, USA) according to the manufacturer's protocol. For protein expression and purity verification, SDS-PAGE and western blot with a mouse anti-

Table 1 Primer pairs of DNA sequences for used proteins (or polypeptide fragments) and their expected molecular weight including HisTag

Protein	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Expected protein molecular weight
BamB	ATGCAATTGCGTAAATTACTTCTGCC	TTAACGCGTAATCGCGTAGACC	45.8 kDa
FliC-frag	ACGCTGAATGTGCAACAAAAATAAGGTC	ACCTTCGGCTTTACTTGCAGCG	25.8 kDa
MetQ	ATGGCGTTCAAATTCAAAACCTTTGCGG	TTACCAGCCTTTCACCGCGCC	33.3 kDa
PrgI	ATGGCAACACCTTGGTCAGGCTATC	TTAACGGAAGTCTGAATAATGGCAGCATC	12.7 kDa
SipC	ATGTTAATTAGTAATGTGGGAATAATCCCGCC	TTAAGCGCGAATATTGCCTGCGAT	46.8 kDa
SipD	ATGCTTAATATTCAAATATTTCGGCT	TTATCCTTGCAAGAAAGCTTTT	41.0 kDa
SseB	ATGTCTTCAGGAAACATCTTATGGGGAA	TCATGAGTACGTTTTCTGCGCTATC	25.4 kDa
SurA	ATGAAGAACTGGAACGCTGCTTC	TTAGTTACTCAAATCTTAACGTAAGCGCTG	51.1 kDa
SipB	ATGGTAAATGACGCAAGTAGCATTAGCCG	TTATGCGCGACTCTGGCGCAGAATAAAC	66.3 kDa
OppA	ATGTCTAACATCACGAAAAAAGTTTG	TTAATGTTTGATAATATATAAGTTTTCACATAAAT	65.1 kDa

HisTag antibody (Pierce, Thermo Scientific, USA) was used.

Western blot

Purified recombinant proteins were resolved on a 10 % SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes (Amersham, GE Healthcare, UK), which were subsequently blocked in 1 % casein hydrolysate (Imuna, Czech Republic) overnight at 4 °C. The membranes were incubated with 100× diluted porcine sera for one hour at room temperature (RT), washed in PBS with 0.05 % Tween-20 (PBS/T, Serva, Germany) and then incubated (one hour, RT) with goat anti-pig IgG conjugated with HRP (Bethyl Laboratories, USA). After a washing step, the protein bands were visualized with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, USA). Western blots were performed with group-specific pooled sera samples.

ELISA assay

Purified recombinant proteins in 0.05 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) were coated (4 °C overnight) on microtiter plates (MaxiSorp, Nunc, Denmark) that were blocked afterwards with 1 % casein hydrolysate in PBS/T (30 min). The plates were subsequently incubated (one hour, RT) with 100× diluted porcine sera, washed with PBS/T and then incubated (one hour, RT) with goat anti-pig IgG conjugated with HRP (Bethyl Laboratories, USA). After a washing step, the colour was developed by adding the chromogenic substrate TMB Complete (Test-line, Czech Republic) and the reaction was stopped with 2 M sulfuric acid (Penta, Czech Republic). The absorbance was measured at 450 nm on Synergy H1 (Biotek, USA). IgG antibody response to LPS was determined by commercially available Pig Screen ELISA (Qiagen, Germany). The individual serum samples were tested in duplicate by ELISA. Positive thresholds in time course graphs were counted as an average plus three standard deviations of all control

samples and time zero samples of respective groups [11]. Positive thresholds for LPS commercial kit were provided by a manufacturer.

Statistical evaluation

Densities of western blot bands were calculated using ImageJ software (ver. 1.48). Differences between groups in ELISA assays were evaluated by ANOVA with Dunn's post test using GraphPad Prism (ver. 5). All graphs were also made using GraphPad Prism software (GraphPad Software, USA).

Results

Protein expression profiles in different media

At first, we examined protein expression profiles of *Salmonella* growing in different cultivation media. LB broth was used as a standard growth medium for cultivation of bacteria. For comparison, brain heart infusion (BHI), a highly nutritious medium was used as a vaccine preparation medium when the vaccine was proved to be protective [9]. From the whole-proteome mass spectrometry analysis, we observed the differences in LB and BHI cultures in relative quantities of several proteins that belong to the SPI-1 and SPI-2 loci which are important for the virulence of *Salmonella*. Relative quantification was attained using spectral counting and, in Tab. 2, it is shown as PSMs (peptide spectrum matches) for all peptides which identify the protein. Since PSMs depend on the length of a protein, the comparison of PSM value for the same protein between each medium is more informative rather than the absolute number. Note that the shown proteins are only representatives of the SPI-1 and SPI-2 loci and not the complete list.

All selected SPI-1 proteins were expressed in much higher amounts in LB medium than in BHI medium while proteins belonging to the SPI-2 locus were not highly expressed in either of the media. Flagellar proteins that also play an important role in the first stages

Table 2 Several selected proteins belonging to SPI-1 and/or SPI-2 locus and their relative amounts produced by *S. Typhimurium* grown in LB and BHI medium, respectively

	Locus	Protein	Accession number	PSMs	
				LB	BHI
t2.6	SPI-1	SipA	P0CL52	37	2
t2.7	SPI-1	SipB	Q56019	31	4
t2.8	SPI-1	SipC	P0CL47	50	3
t2.9	SPI-1	SipD	Q56026	10	0
t2.10	SPI-1	PrgI	P41784	5	2
t2.11	SPI-1	SptP	P74873	20	0
t2.12	SPI-1	SopA	Q8ZNR3	16	5
t2.13	SPI-1	SopB	O30916	38	0
t2.14	SPI-1	SopE2	Q7CQD4	5	0
t2.15	SPI-1 and-2	SteA	Q8ZPD7	0	0
t2.16	SPI-1 and-2	SopD	P40722	5	0
t2.17	SPI-2	SopD2	Q8ZQC8	3	0
t2.18	SPI-2	SseB	Q7BVH7	0	3
t2.19	SPI-2	PipB	Q8ZQ59	0	1
t2.20	SPI-2	PipB2	Q8ZMM8	4	0
t2.21	flagellar proteins	FliC	P06179	132	77
t2.22		FljB	P52616	107	61
t2.23	reference proteins	PepN	Q8ZQ76	48	39
t2.24		GapA	P0A1P0	185	279

Recombinant protein preparation

All proteins listed in Table 3 were prepared as recombinant proteins in an *E. coli* expression system. The sequences of all proteins containing signal peptides at their N-termini were designed without this peptide. Otherwise, they possessed an identical sequence as naturally occurring in *S. Typhimurium* except FliC protein. Due to an inability of full-length protein expression, flagellar protein FliC was expressed only as a 22 kDa fragment. The expression of proteins was endorsed by SDS-PAGE and confirmed by western blot with an anti-HisTag antibody (Fig. 1 and Additional file 1: Figure S1). Four out of ten selected proteins (MetQ, SurA, PrgI, SipC) were not expressed in sufficient amount or purity and were not included in subsequent serological testing.

Serological testing

Western blot

Purified recombinant proteins were then used as antigens for serological analysis. After western blot, PVDF membranes were incubated with pooled serum samples from three animals of each group (control, infected and vaccinated animals). As shown in Fig. 2, proteins SipB, SipD and SseB presumed to be “post-infection” antigens were detected by sera of infected animals with a higher intensity than by sera of control or vaccinated animals. On the other hand, proteins BamB, FliC-frag and OppA, supposed to be “post-vaccination” antigens, were detected by sera of vaccinated pigs with a higher intensity than by sera of control or infected animals. Anti-HisTag antibody was used as a positive control for recombinant protein presence (D in Fig. 2).

ELISA assay

Based on western blot results, proteins SipB and FliC-frag were selected for testing specific antibody response of individual animals by ELISA method. Serum samples from 12 animals in each group were used for measuring antibody levels against recombinant SipB and FliC-frag proteins.

Antibody levels against SipB protein in sera of control animals had the values of absorbance between 0.062 and 0.126; sera of vaccinated animals had the values of absorbance between 0.075 and 0.147. The difference in absorbance between these two groups was not statistically significant. Sera of infected pigs had the values of absorbance between 0.248 and 1.056. These values were significantly different ($P < 0.01$) from the two previous groups of animals.

Antibody levels against FliC-frag proteins in sera of control animals had the values of absorbance between 0.018 and 0.271; sera of infected animals had the values of absorbance between 0.060 and 0.891. The difference in absorbance between these two groups was not statistically

of an invasion were expressed in both media in high amounts. Proteins PepN (Aminopeptidase N) and GapA (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A) are mentioned only as reference proteins.

Mass spectrometry analysis of immunoaffinity chromatography samples

Salmonella protein lysates preparations and consecutive immunoaffinity chromatography analyses resulted in three sets of samples for MS identification (*Salmonella* proteins bound to antibodies from control, infected or vaccinated animals). While most of the proteins were identified in all three samples in similar proportion, we found several proteins that were identified in relatively higher amounts in “post-infection” or “post-vaccination” fraction (Tab. 3). Relative amounts are shown as peptide spectrum matches (PSMs). Proteins SipB and SipC from SPI-1 were found in eluates from the column with post-infection sera while several proteins (OppA, BamB and SurA) were predominantly bound to antibodies in post-vaccination sera. We also included the identification of proteins that were chosen for their involvement in the infection process (SipD, SseB, PrgI and FliC) rather than from immunoaffinity chromatography/MS analysis only.

Table 3 Identification and relative quantification of chosen proteins in terms of Peptide Spectrum Matches for all three runs

Protein name	Accession number	PSMs (peptide spectrum matches)		
		Control	Post-infection	Post-vaccination
Cell invasion protein SipB	Q56019	3, 0, 22	29, 20, 27	13, 7, 25
Cell invasion protein SipC	P0CL47	5, 1, 22	30, 33, 31	7, 18, 26
D-methionine-binding lipoprotein MetQ	Q8ZRN1	3, 1, 0	12, 5, 11	0, 0, 9
Periplasmic oligopeptide-binding protein OppA	P06202	7, 0, 0	31, 0, 0	25, 16, 14
Outer membrane protein assembly factor BamB	H9L451	0, 2, 0	0, 0, 7	7, 10, 0
Chaperone SurA	Q7CR87	1, 5, 1	2, 0, 21	21, 15, 15
Cell invasion protein SipD	Q56026	7, 3, 0	4, 15, 0	4, 14, 1
Secreted effector protein SseB	Q7BVH7	0, 0, 0	2, 0, 0	1, 0, 1
Protein PrgI	P41784	0, 2, 0	1, 2, 0	2, 0, 1
Flagellin FliC	P06179	3, 22, 17	23, 29, 26	19, 17, 63

significant. Sera of vaccinated pigs had the values of absorbance between 1.727 and 2.159. These values were significantly different ($P < 0.01$) from two previous groups of animals (Fig. 3). Hence, proteins SipB and FliC-frag may serve as marker proteins applicable for serological discrimination between vaccinated pigs, pigs after natural infection and pigs without any contact with *S. Typhimurium*. When compared to a non-infected group, from graphs showing the time course of antibody response (Fig. 4) we

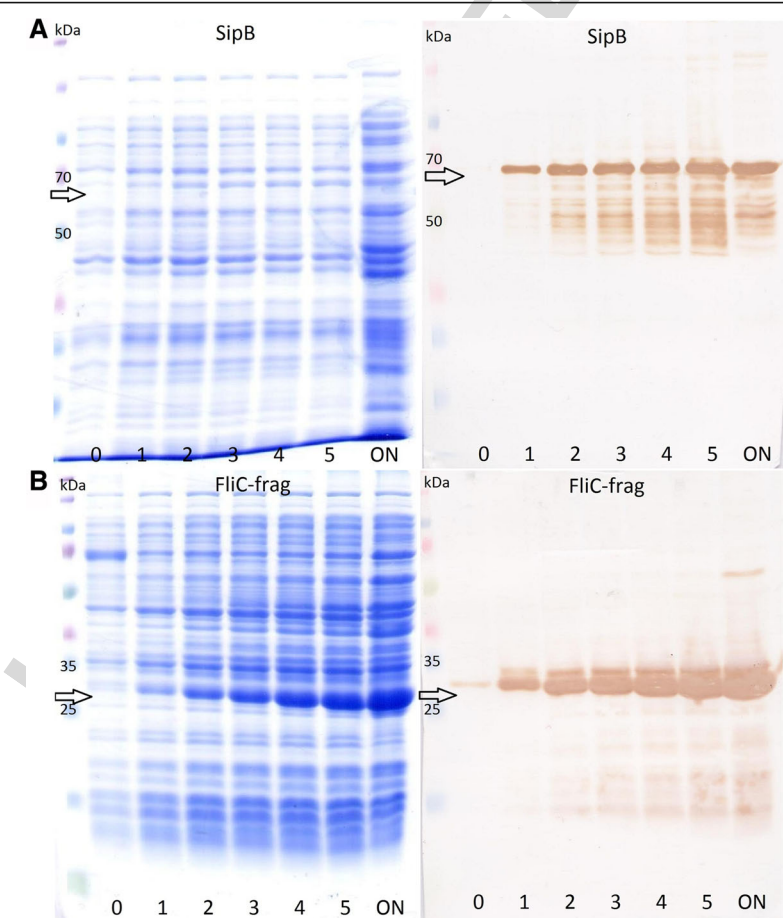
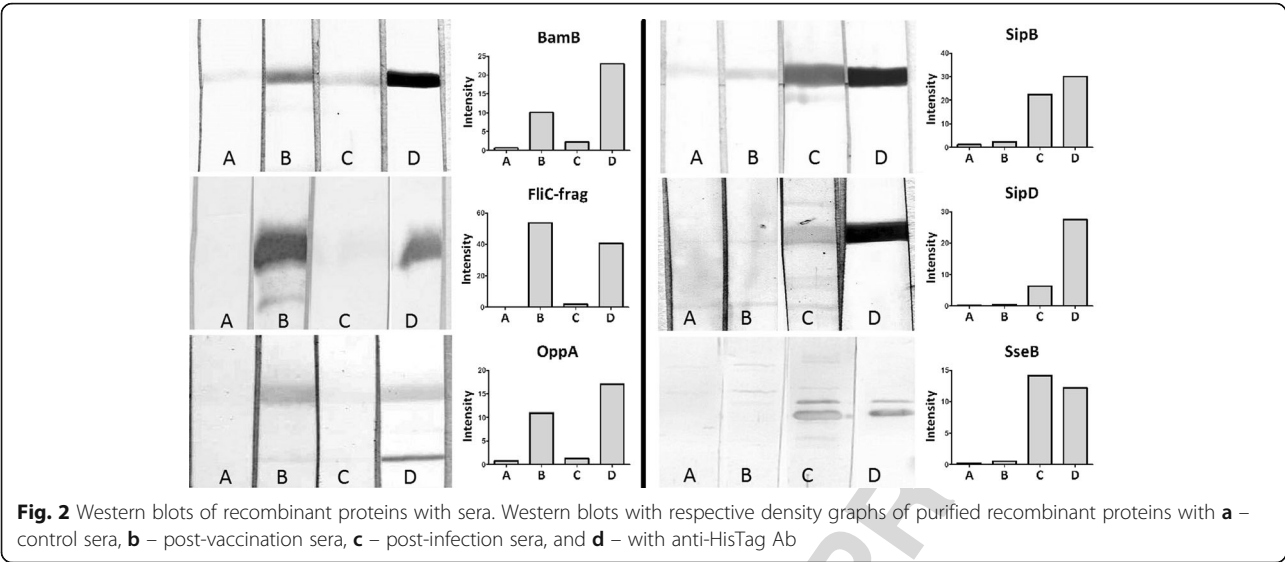


Fig. 1 Recombinant proteins expressions. Coomassie-stained gels and western blots of SipB (a) and FliC-frag (b) proteins. Time scale expression is shown in hours post induction (0–5 h, ON - overnight). Arrows indicate the expected molecular weight of a product. Expression of other proteins can be found in Additional file 1: Figure S1

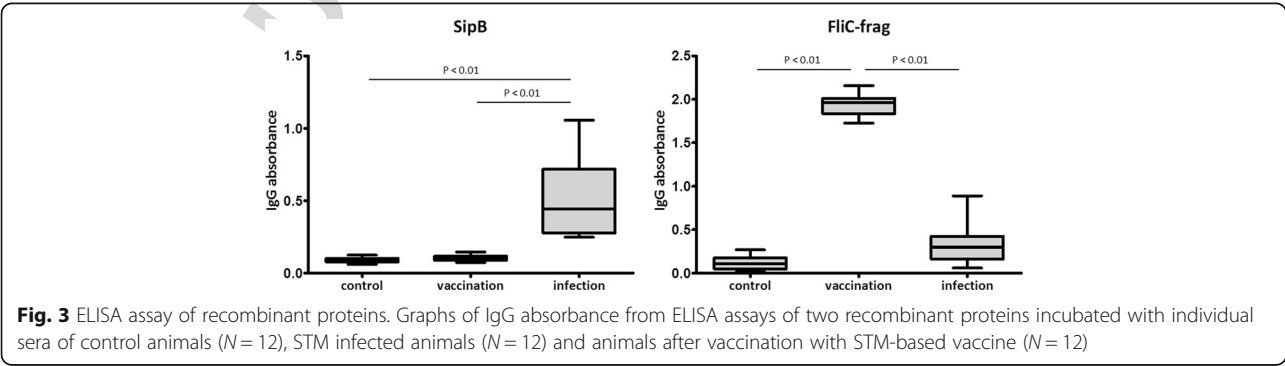


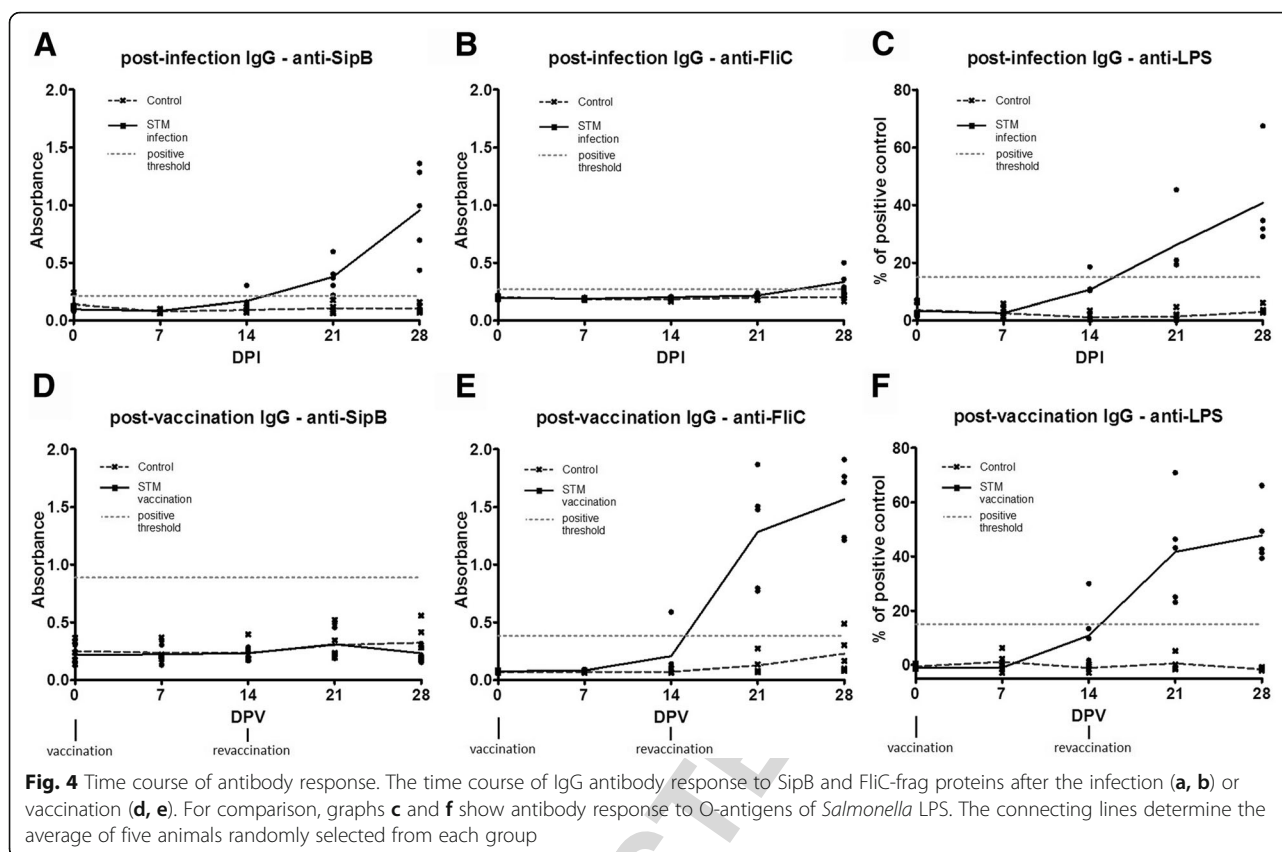
can see the increase of anti-SipB IgG level from the third week of infection but not significant differences for anti-FliC antibodies throughout the infection experiment (Fig. 4a, b). In contrary, the vaccination does not induce anti-SipB antibody production but anti-FliC IgGs are detectable after 14 days that is the time of revaccination (Fig. 4d, e). For comparison, we measured the level of post-infection and post-vaccination antibodies against O-antigens - the outer segments of surface lipopolysaccharides using commercially available ELISA kit. As expected, we found a similar pattern of immunoglobulin G production in both, infected and vaccinated groups. Additionally, a concentration of IgM antibodies against SipB protein did not exceed positive threshold after the infection. Anti-LPS IgMs were detectable on day 7 and 14 in two and four pigs respectively (see Additional file 1: Figure S2).

Discussion

Although the vaccination of animals against bacterial pathogens helps to moderate the severity of infection and is widely used in veterinary medicine, there are several issues that have to be solved during the development

process and before introducing such vaccines to the market. Besides the induction of humoral and cellular immunity - the protectivity itself, in many cases, we must ensure a proper distinction between animals after the natural infection and vaccinated animals – i.e. DIVA vaccines [12]. We believe that using a vaccine with differentiability of infected and vaccinated animals enable establishment of *Salmonella* control programs in pig herds. This goal is currently not possible using the only licensed live attenuated vaccine [7]. In a case of *Salmonella* DIVA vaccines, several groups followed the path of a negative marker vaccine [7, 8], which uses a vaccine strain with a deleted gene for an antigenic protein. Host antibodies against this protein are thus found only in naturally infected animals and are absent in vaccinated animals. However, using live attenuated genetically modified *Salmonella* vaccine strains in pig herds is not straightforward. We proved inactivated *Salmonella* vaccine efficiently protects suckling piglets against infection [9] and further developed a DIVA method whereby there is no need for using a live genetically modified organism as an antigen for a vaccine. To develop DIVA assay, we decided to use a novel approach





based on examination of the natural antibody response against *Salmonella* Typhimurium after the infection and after the vaccination with a *Salmonella* Typhimurium-based inactivated vaccine. We took advantage of that *Salmonella* Typhimurium undergoes several different stages during the infection according to its localization and to the host immune response. Following these conditions, bacteria change the expression of virulence and protecting proteins [13, 14] that are subsequently exposed to the immune system.

Besides proven protectivity of the used vaccine in suckling piglets [9], we found that antibodies produced after the infection, are indeed different from those after the vaccination. From the immunoaffinity chromatography and mass spectrometry, we selected the following candidate proteins – SipB, SipC, MetQ, OppA, Bam and SurA. Then, we added some proteins that were not determined by the aforementioned method, but are known to be involved in the infection process as they belong to the SPI-1 or SPI-2 locus – SipD, SseB and PrgI and a highly immunogenic flagellar protein FliC.

Proteins SipB, SipC and SipD are representatives of the SPI-1 system which is responsible for invading the host cells. It is well established that these proteins form a tip of a needle structure of the type III secretion system complex that interacts with the eukaryotic cells [13, 15]. Protein

SseB encoded by the SPI-2 locus acts as a translocator that mediates translocation of effector proteins into the host cells and promotes bacterial survival [16]. These proteins are therefore crucial for virulence and are candidates for inducing the antibody response that was also confirmed in this work. On the other hand, when *Salmonella* Typhimurium was cultivated *in vitro* in BHI culture medium as a vaccine batch, these proteins were not expressed in amounts able to induce antibody production. SPI-1 proteins were nevertheless found in high amounts when *Salmonella* had grown in LB medium. This medium is therefore not applicable for a vaccine batch preparation because it could induce production of the same antibodies as after a natural infection. Nutrient-limiting conditions provided by LB broth partially resemble *in vivo* environment and trigger SPI-1 proteins expression, while rich BHI medium does not induce production of *Salmonella* virulence factors. Jaradat and Bhunia [17] suggested a similar explanation as gained from their results in different growth conditions of *Listeria monocytogenes*, stating that bacteria produce more virulence factors in a nutritionally poor milieu in order to adapt to the new environment. On the other hand, bacterial virulence factors seem to be good candidates for antibody response induction and therefore for the vaccine protectivity in general. However, we showed that the efficacy of our vaccine prepared

from a culture grown in a medium not inducing the expression of SPI proteins is high [9].

In spite of the fact that flagellin has powerful immunostimulatory properties and may play a role as a potent adjuvant in a variety of anti-bacterial vaccines [18–20], it was also shown that expression of flagellar proteins is selectively repressed when *Salmonella* is located intracellularly during the infection [21, 22]. The flagellum as an extracellular structure on the surface of a bacterium could be a good candidate as a post-vaccination antigen if an appropriate growth medium capable of promoting the expression of flagellar proteins is used. This was proved for FliC protein fragment by western-blot and ELISA but interestingly not by PSM spectra of immunoaffinity eluates. We speculate this was caused by overall high amount of anti-FliC antibodies in all samples and the capacity of immunoaffinity columns was probably saturated. Only western-blot and ELISA were able to show much higher anti-FliC antibody level in post-vaccination sera than in post-infection and control sera. PSM for FliC in control sample was probably caused by cross-reactivity of anti-flagellar antibodies induced by other bacteria in control animals. The other possible explanation is very high expression of FliC protein in cultures and possible unspecific binding in the chromatography column. Proteins BamB (Outer membrane protein assembly factor) and OppA (Periplasmic oligopeptide-binding protein) are located on the outer membrane and the periplasm, respectively, which makes them easy targets for the immune system. Although both proteins are involved in transmembrane transport (OppA as a permease [23] and BamB as a part of the outer membrane protein assembly complex involved in insertion of beta-barrel proteins [24]), their role in the infection is not known. Interestingly, both proteins are much less immunogenic during infection than after vaccination. This finding makes them together with FliC good candidates for serological differentiation between infected and vaccinated animals.

After successful isolation of recombinant proteins, we tested them using western blot and ELISA with post-infection, post-vaccination and control serum samples to prove their ability to distinguish between infected and vaccinated animals. Proteins SseB, SipB and SipD were confirmed to be highly immunogenic during the infection. This is in agreement with previous findings [25, 26]. The level of antibodies against these proteins, measured as a density of bands on western blots, was, at least, ten times higher in a group of infected animals than in a group of control or vaccinated animals. On the other hand, proteins BamB, OppA and FliC-frag were confirmed to be highly immunogenic during the vaccination of pigs. The level of antibodies against these proteins was, at least, ten times higher in a group of

vaccinated animals than in a group of control or infected animals. As in the case of FliC, there is a partial discrepancy with immunoaffinity chromatography results in the case of SseB protein when it showed a similar level of binding to post-infection and post-vaccination antibodies. However, it can be explained by low expression of SseB in cultivation media and thus possible incomplete saturation of all specific antibodies present in the chromatography column.

Finally, proteins SipB and FliC-frag were selected for ELISA assays to examine the interaction with 36 porcine serum samples. All 12 post-infection sera exhibited higher absorbance with the SipB protein than 12 control and 12 post-vaccination sera. In contrast, all 12 post-vaccination sera exhibited higher absorbance with the FliC-frag protein than 12 control and 12 post-infection sera. All differences were statistically significant ($P < 0.01$). The time-dependent onset of IgG antibody levels against SipB after the infection, and against FliC after the vaccination imitates the increase of IgG against surface lipopolysaccharide. These two proteins are thus considered as useful antigens for serological differentiation of infected and vaccinated animals.

In general, induction of different protein expression profiles, their potential exposure to the immune recognition machinery and subsequent specific antibody production can be conveniently applied for the differentiation between infected and vaccinated animals without any intervention into the genome of an organism used as a vaccine strain.

Conclusions

Using antibodies from previously vaccinated and infected animals and using immunoaffinity chromatography and mass spectrometry tools, we identified *Salmonella* proteins that induce post-infection and post-vaccination specific antibody production. Gene cloning and recombinant protein expression techniques were used for antigen preparation that allows serological distinction between infected animals and animals vaccinated with a *Salmonella*-based inactivated vaccine.

This approach can be utilized in many other challenges where DIVA vaccine and a subsequent serological assay are required, especially when genetic modification of a vaccine strain is not desirable.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Recombinant proteins expressions. Coomassie-stained gels and western blots of recombinant proteins. Time scale expression is shown in hours post induction (0–5 h, ON - overnight). Arrows indicate the expected molecular weight of a product. **Figure S2.** IgM antibody response. The time course of IgM antibody response to SipB protein and to *Salmonella* LPS after the infection. The connecting

lines determine the average of five animals randomly selected from each group. (PDF 434 kb)

Additional file 2: Identified *Salmonella* proteins from different media. Mass spectrometry identification of *Salmonella* proteins and a comparison of expression between two cultivation media (LB vs BHI). (XLSX 433 kb)

Additional file 3: Identified proteins from immunoaffinity chromatography. Mass spectrometry identification of *Salmonella* proteins bound to control, post-infection or post-vaccination serum. Immunoaffinity chromatography was made in triplicates. (XLSX 913 kb)

Abbreviations

BHI: Brain-heart infusion; CFU: Colony-forming unit; DIVA: Differentiation of infected and vaccinated animals; FASP: Filter-aided sample preparation; FPLC: Fast protein liquid chromatography; HRP: Horseradish peroxidase; LB: Lysogeny broth; LPS: Lipopolysaccharide; MS: Mass spectrometry; PSM: Peptide spectrum match; PVDF: Polyvinylidene difluoride; SPI: *Salmonella* pathogenicity island; TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; uHPLC: Ultra-high pressure liquid chromatography

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Ludmila Faldikova for correcting and proofreading of the manuscript.

Funding

This study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (QJ1210115, RO0516) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LO1218 from the MEYS of the CR under the NPU I program).

Availability of data and material

The datasets of proteomic results from culture media comparison and immunoaffinity chromatography are included within Additional files 2 and 3 of the article. All other data generated or analysed during this study are included in this published article. Proteins mentioned in patent 305077 can be used in serological methods for experimental purposes.

Authors' contributions

JG carried out immunoaffinity chromatography, mass spectrometry, and the cloning and wrote the first and the final draft of the manuscript. HK performed all ELISA assays including their validation. MK contributed to culture media testing and in vaccination design. KK designed the serological assays. RT did the isolation and the purification of recombinant proteins. AO participated in the experimental infection and vaccination and sample collection. MF helped to design the animal experiments, obtained financial support and took part in the revising of the manuscript. JM was responsible for the whole project, generated the working hypothesis, designed the experiments, obtained financial support, revised the draft and wrote the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

Using SseB, Gene ID: 1252916; SipB, Gene ID: 1254408; SipD, Gene ID: 1254406; FliC, Gene ID: 1253480 and BamB, Gene ID: 1254042 proteins in serological methods differentiating infected and vaccinated pigs is covered by Czech patent number 305077. Except of Martin Faldyna, all authors are holders of 305077 patent rights. Marcel Kosina is an employee of Bioveta company which potentially may have a commercial benefit from results of this work. The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable

Ethics approval

All animal experiments were performed at animal barrier facility at Veterinary Research Institute. The experimental protocol was approved by the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Ref. No. MZE 921). Based on current legislation, the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech

Republic has exclusive rights to approve infection experiments on animals in the Czech Republic (Act No 246/1992 Coll.).

Author details

¹Department of Immunology, Veterinary Research Institute, Hudcova296/70, 62100 Brno, Czech Republic. ²Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska267/2, 611 37 Brno, Czech Republic. ³Bioveta a. s., Komenského212/12, 683 23 Ivanovice na Hane, Czech Republic. ⁴Department of Virology, Veterinary Research Institute, Hudcova296/70, 62100 Brno, Czech Republic. ⁵Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic.

Received: 21 April 2016 Accepted: 3 November 2016

References

- Anonymous. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008 – Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA J. 2009;7:1377.
- van Oirschot JT. Diva vaccines that reduce virus transmission. J Biotechnol. 1999;73(12–3):195–205.
- Vico JP, Engel B, Buist WG, Mainar-Jaime RC. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Salmonella* spp. in meat juice from finishing pigs in Spain. Zoonoses Public Health. 2010;57 Suppl 1:107–14.
- 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;29(20):3679–85.
- Zariri A, van der Ley P. Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant. Expert Rev Vaccines. 2015;14(6):861–76.
- Arenas J. The Role of Bacterial Lipopolysaccharides as Immune Modulator in Vaccine and Drug Development. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2012;12(3):221–35.
- Selke JM, 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;75(5):2476–83.
- Bearson BL, Bearson SMD, Kich JD. A DIVA vaccine for cross-protection against *Salmonella*. Vaccine. 2016;34(10):1241–6.
- Matiasovic J, Kudlackova H, Babickova K, Stepanova H, Volf J, Rychlik I, Babak V, Faldyna M. Impact of maternally-derived antibodies against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. Vet J. 2013;196(1):114–5.
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods. 2009;6(5):359–62.
- Jacobson RH. Factors in selecting serum samples for use in determining the positive/negative threshold (cut-off) in ELISA. Diagnosis and Epidemiology of Animal Disease in Latin America 1998. IAEA-TECDOC-1055, pp. 25–28.
- Pasick J. Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. Anim Health Res Rev. 2004;5(2):257–62.
- Mirold S, Ehrbar K, Weissmüller A, Prager R, Tschäpe H, Rüssmann H, Hardt WD. *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2. J Bacteriol. 2001;183(7):2348–58.
- McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. Curr Opin Microbiol. 2009;12(1):117–24.
- Marlovits TC, Stebbins CE. Type III secretion systems shape up as they ship out. Curr Opin Microbiol. 2010;13:47–52.
- Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. Cell Microbiol. 2003;5(8):501–11.
- Jaradat ZW, Bhunia AK. Glucose and nutrient concentrations affect the expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2002;68(10):4876–83.
- Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Rassoulani Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. Nat Immunol. 2003;4:1247–53.
- das Gracas Luna M, Sardella FF, Ferreira LC. *Salmonella* flagellin fused with a linear epitope of colonization factor antigen I (CFA/I) can prime antibody

- 729 responses against homologous and heterologous fimbriae of
730 enterotoxigenic *Escherichia coli*. Res Microbiol. 2000;151:575–82.
- 731 20. Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective
732 adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia*
733 *pestis*. Infect Immun. 2006;74:1113–20.
- 734 21. Cummings LA, Rassoulia Barrett SL, Wilkerson WD, Fellnerova I, Cookson
735 BT. FliC-specific CD4⁺ T cell responses are restricted by bacterial regulation
736 of antigen expression. J Immunol. 2005;174(12):7929–38.
- 737 22. Lai MA, Quarles EK, López-Yglesias AH, Zhao X, Hajjar AM, Smith KD. Innate
738 immune detection of flagellin positively and negatively regulates
739 *Salmonella* infection. PLoS One. 2013;8(8):e72047.
- 740 23. Hiles ID, Gallagher MP, Jamieson DJ, Higgins CF. Molecular characterization
741 of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. J Mol Biol. 1987;
742 195(1):125–42.
- 743 24. Hagan CL, Silhavy TJ, Kahne D. β -Barrel Membrane Protein Assembly by the
744 Bam Complex. Annu Rev Biochem. 2011;80:189–210.
- 745 25. Lee S-J, Liang L, Juarez S, Nanton MR, Gondwe EN, Msefula CL, Kayala MA,
746 Necchi F, Heath JN, Hart P, Tsolis RM, Heyderman RS, Mac Lennan CA,
747 Felgner PL, Davies DH, McSorley SJ. Identification of a common immune
748 signature in murine and human systemic Salmonellosis. Proc Natl Acad Sci.
749 2012;109(13):4998–5003.
- 750 26. Desin TS, Mickael CS, Lam PK, Potter AA, Köster W. Protection of epithelial
751 cells from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion by antibodies
752 against the SPI-1 type III secretion system. Can J Microbiol. 2010;56(6):522–6.
- 753

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Příloha D

Použití antigenů *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat

Ján Matiašovic, Jan Gebauer, Hana Kudláčková, Marcel Kosina, Kamil Kovařík,
Radek Tesařík, Alena Osvaldová

Národní patent č. 305077, 2015

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 077

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-1048**
(22) Přihlášeno: **20.12.2013**
(40) Zveřejněno: **22.04.2015**
(Věstník č. 16/2015)
(47) Uděleno: **11.03.2015**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.04.2015**
(Věstník č. 16/2015)

(56) Relevantní dokumenty:
Selke M et al. 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, 75(5), 2476-83.; Matiasovic J et al. Impact of maternally-derived antibodies against Salmonella enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. Vet. J., 2013, 196(1), 114-5.; Leyman B et al. Salmonella Typhimurium LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs. Vaccine, 2011, 29(20), 3679-85..
EP 2189164; WO 2007/112518.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.,
Brno, CZ
Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, CZ

(72) Původce:
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D., Mokrý, CZ
Mgr. Jan Gebauer, Opava, CZ
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ
Mgr. Marcel Kosina, Hranice, CZ
MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D., Brno, CZ
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ
MVDr. Alena Osvaldová, Praha, CZ

tomu zvířata vakcinovaná se identifikují tak, že mají oproti zvířatům infikovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD. Sérologické odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je nutné pro uplatnění ozdravných postupů, jejichž cílem je snížení procenta Salmonella pozitivních jatečných prasat. Dalším důvodem nutnosti odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je vyloučení falešné positivity vakcinovaných prasat při odhadu promořenosti chovů prasat Salmonella ssp. pomocí již zavedených sérologických metod v některých zemích západní Evropy.

(54) Název vynálezu:
Použití antigenů Salmonella enterica ssp. enterica sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat

(57) Anotace:
Řešení popisuje způsob sérologického odlišení prasat infikovaných Salmonella enterica ssp. enterica sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře Salmonella enterica ssp. enterica sérovar Typhimurium, při kterém se ve vzorku séra stanoví metodu ELISA nebo westernblot hladina protilátek proti alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny SseB, Gene ID: 1252916; SipB, Gene ID: 1254408 a SipD, Gene ID: 1254406 a alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny FliC, Gene ID: 1253480 a YfgL, Gene ID: 1254042. Infikovaná zvířata se identifikují tak, že mají oproti zvířatům vakcinovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL, naproti

CZ 305077 B6

Použití antigenů *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat

5 Oblast techniky

Vynález se týká sérologické diagnostiky a imunoprophylaxe salmonelových infekcí prasat. Sérologické odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je nutné pro uplatnění ozdravných postupů, jejichž cílem je snížení procenta *Salmonella* pozitivních jatečných prasat. Dalším důvodem nutnosti odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných je vyloučení falešné positivity vakcinovaných prasat při odhadu promořenosti chovů prasat *Salmonella ssp.* pomocí již zavedených sérologických metod v některých zemích západní Evropy. Vynález umožňuje sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

Dosavadní stav techniky

Nejčastějšími původci salmonelových infekcí prasat v České republice i většiny zemí Evropské unie jsou netyfoidní sérovary *Salmonella enterica ssp. enterica*, zejména pak sérovary Typhimurium a Derby, které se vyskytují v přibližně 65 % případů kultivačního zachytu salmonel. Dalších 25 % případů kultivačního zachytu salmonel u prasat představují sérovary Enteritidis a Agona (EFSA 2008). Jednou z metod tlumení výskytu netyfoidních salmonelových infekcí prasat může být vakcinace prasat proti původcům infekcí, ale jediná dosud registrovaná vakcína (v Německu a Polsku) je na bázi živého vakcinačního kmene a je zatím jen málo používána. Autoři vynálezu experimentálně ověřili účinnost vakcinace prasnic vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium na snížení množství salmonel v orgánech sajících selat (Matiašovic a kol. 2013) a potvrdili tak účinnost vakcinace prasat inaktivovanou vakcínou *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium pozorovanou dříve na úrovni stáda (Roesler a kol. 2006).

Pro úspěšné zavedení jakékoli vakcíny proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica ssp. enterica* je nutné odlišení zvířat vakcinovaných od zvířat infikovaných. Zavedené sérologické metody detekce protilátek proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica ssp. enterica* u prasat jsou založeny na detekci protilátek proti O–antigenům těchto sérovarů. 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 antigenům. Dosavadní sérologické metody tak identifikují prasata vakcinovaná stejně jako prasata infikovaná.

Možností jak sérologicky odlišit infikovaná prasata od prasat vakcinovaných je vývoj vakcín na bázi vakcinačních kmenů postrádajících O–antigeny (Leyman a kol. 2011). Cílené nebo náhodné genetické modifikace vakcinačních kmenů komplikují vývoj vakcíny a případné použití genetiky modifikovaných kmenů znesnadňuje registraci vakcíny.

Živá atenunovaná vakcína registrovaná v Německu a Polsku (IDT Biologica GmbH, Německo) je dále vyvíjena za účelem odlišení postinfekčních a postvakcinačních protilátek. Vakcína indukuje tvorbu protilátek proti O–antigenům. Autoři volili metodu delečního mutanta, kdy vakcinační kmen postrádá protein ompD a tudíž se vůči němu nevytváří po vakcinaci protilátka, na rozdíl od divokého kmene, který stimuluje imunitní systém prasete k produkci protilátek proti ompD proteinu. Odlišení vakcinovaných zvířat od infikovaných tak spočívá v sérologické detekci protilátek proti ompD proteinu. Problém takto upravené živé vakcíny je snížená protektivita oproti původnímu vakcinačnímu kmeni (Selke a kol. (2007)

Vakcína založená na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium (Matiasovic a kol. 2013) je vyvíjena do komerční podoby týmy obou přihlašovatelů. Vakcína indukuje tvorbu protilátek proti O-antigenům. Jiná vakcína založená na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium nebo inaktivované kultuře jiných sérovarů *Salmonella enterica ssp. enterica* není komerčně dostupná.

Je známo, že po infekci lidí nebo zvířat živým kmenem *Salmonella enterica ssp. enterica* dochází k tvorbě protilátek proti různým antigenům tohoto patogena, mimo jiné i proti většině proteinů, které jsou předmětem přihlášky vynálezu (SseB – Lee a kol. 2012, SipB–Durand a kol. 2013, SipD – Desin a kol. 2010, FliC – Bergman a kol. 2005). Předložený vynález umožňuje porovnáním hladin protilátek proti některým proteinům *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium odlišením prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře divokého kmene *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium bez nutnosti modifikace vakcinačního kmene.

Literatura k Dosavadnímu stavu techniky

1. The EFSA Journal, 2008, 135: 1–111.

2. Matiasovic, J., Kudlackova, H., Babickova, K., Stepanova, H., Volf, J., Rychlik, I., Babak, V., Faldyna, M. Impact of maternally-derived antibodies against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. Veterinary Journal. 2013, 196: 114–115.

3. Roesler, U., Heller, P., Waldmann, K. H., Truyen, U., Hensel, A. Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella typhimurium* infection in the offspring. Journal of Veterinary Medicine B, 2006, 53, 224–228.

4. 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, 29: 3679–3685.

5. Selke, M., Meens, J., Springer, S., Frank, R., Gerlach, G. F. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. Infection and Immunity, 2007, 75:2476–2483.

6. Lee, S. J., Liang, L., Juarez, S., Nanton, M. R., Gondwe, E. N., Msefula, C. L., Kayala, M. A., Necchi, F., Heath, J. N., Hart, P., Tsois, R. M., Heyderman, R. S., MacLennan, C. A., Felgner, P. L., Davies, D. H., McSorley, S. J. Identification of a common immune signature in murine and human systemic Salmonellosis, Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 4998–5003.

7. Durand, D., Ochoa, T. J., Bellomo, S. M., Contreras, C. A., Bustamante, V. H., Ruiz, J., Cleary, T. G. Detection of secretory immunoglobulin A in human colostrum as mucosal immune response against proteins of the type III secretion system of *Salmonella*, *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli*. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32: 1122–1126.

8. Desin, T. S., Mickael, C. S., Lam, P. K., Potter, A. A., Köster, W. Protection of epithelial cells from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion by antibodies against the SPI-1 type III secretion system. Can J Microbiol, 2010, 56: 522–526.

9. Bergman, M. A., Cummings, L. A., Alaniz, R. C., Mayeda, L., Fellnerova, I., Cookson, B. T. CD4+–T-cell responses generated during murine *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection are directed towards multiple epitopes within the natural antigen FliC. Infection and Immunity, 2005, 73: 7226–7235.

Podstata vynálezu

Dosud nebyl znám způsob jak odlišit zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře divokého kmene *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Podstatou vynálezu je zjištění, že po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enteri-*

ca sérovar Typhimurium dochází k tvorbě protilátek proti proteinům *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium kvalitativně jiným způsobem než po infekci a že tento rozdíl je použitelný k odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných.

- 5 Podstata vynálezu tak spočívá v použití dvou skupin proteinů *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium jako antigenů pro detekci protilátek v séru, kolostru a masové šťávě prasat. Tyto dvě skupiny proteinů rozdílným způsobem indukují tvorbu protilátek po infekci prasat *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

10 Proti proteinům SseB, Gene ID: 1252916; SipB, Gene ID: 1254408, SipD, Gene ID: 1254406 se po přirozené infekci prasat vytváří vysoké hladiny protilátek, zatímco po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium se protilátky proti těmto proteinům netvoří vůbec, nebo jen ve velmi malé míře. To umožňuje detekovat zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

15 Proti proteinům FliC, Gene ID: 1253480; YfgL, Gene ID: 125042 se po přirozené infekci prasat protilátky netvoří vůbec, nebo jen v malé míře, zatímco po vakcinaci prasat vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium se proti těmto proteinům vytváří vysoké hladiny protilátek. To umožňuje detekovat zvířata vakcinovaná vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

20 Vyhodnocení hladin protilátek proti proteinům SseB, SipB, SipD a proti proteinům FliC a YfgL tak umožňuje odlišit zvířata infikovaná od zvířat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Vysoká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL identifikuje zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium nebo i jiným sérovarem *Salmonella enterica ssp. enterica*, v závislosti na antigenní příbuznosti uvedených proteinů. Vysoká hladina protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD identifikuje zvířata vakcinovaná vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Vysoké hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata infikovaná i vakcinovaná. Nízké nebo žádné hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata, která buď nebyla infikovaná ani vakcinována nebo zvířata u nichž nedošlo k tvorbě protilátek po infekci nebo vakcinaci.

Příklady uskutečnění vynálezu

- 40 Sérologické odlišení zvířat infikovaných od zvířat vakcinovaných za použití antigenů podle vynálezu je možné například pomocí ELISA testu nebo westernblotu.

ELISA test

- 45 Při použití izolovaného proteinu SseB (GeneID:1252916) jako antigenu v ELISA testu, je naměřená absorbance ve směsném vzorku séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 2x vyšší než ve směsném vzorku séra prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než ve směsném vzorku séra kontrolních neinfikovaných prasat.

- 50 Při použití izolovaného proteinu FliC (GeneID:1253480) jako antigenu v ELISA testu, je naměřená absorbance ve směsném vzorku séra prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 3x vyšší než ve směsném vzorku séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než ve směsném vzorku séra kontrolních neinfikovaných prasat.

Výše uvedené ELISA testy se připraví potažením jamek jedné mikrotitrační desky rekombinantním proteinem SseB a druhé mikrotitrační desky rekombinantním proteinem FliC, oba v pracovním ředění 1 µg/ml v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 µl na jamku (inkubace 16 hodin, 4 °C). Následně se desky třikrát promyjí PBS v obsahem 0,05% Tween 20 (PBS-T, pH 7,2). Vyšetřované vzorky prasečího séra nebo plazmy se ředí 100x v PBS-T s přídavkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 µl se aplikují do jamek mikrotitrační desky. Po inkubaci (1 h, 37 °C, vlhká komůrka) se desky třikrát promyjí roztokem PBS-T a do jamek se přidá 100 µl konjugátu značeného křenovou peroxidázou (Goat anti-pig IgG conjugate, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) v příslušném pracovním ředění. Po inkubaci (60 min, 37 °C, vlhká komůrka) se desky opět třikrát promyjí a do jamek se přidá 100 µl roztoku substrátu s chromogenem TMB Complete (Test-line, Brno, Česká republika). Enzymatická reakce se zastaví po 10 minutách 50 µl 2M kyseliny sírové. Výsledná absorbance se odečítá pomocí multikanálového spektrofotometru při vlnové délce 450 nm, v našem případě pomocí Synergy H1 (Bio-tek, USA).

Westernblot

Při použití izolovaného proteinu SipB (Gene ID: 1254408) nebo SipB (Gene ID: 1254406) jako antigenu ve westernblot testu je intenzita proužku po inkubaci se směsným vzorkem séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 3x vyšší než po inkubaci se směsným vzorkem séra prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než se směsným vzorkem séra kontrolních neinfikovaných prasat.

Při použití izolovaného proteinu YfgL (Gene ID: 1254042) jako antigenu ve westernblot testu je intenzita proužku po inkubaci se směsným vzorkem séra prasata vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium minimálně 2x vyšší než po inkubaci se směsným vzorkem séra prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium a než se směsným vzorkem séra kontrolních neinfikovaných prasat.

Výše uvedené westernbloty se připraví rozdělením antigenu (rekombinantní protein SipB nebo YfgL) na 7 cm SDS-PAGE gelu o koncentraci akrylamidu 10 %, za použití aparatury Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, USA) (20 min při konstantním napětí 80 V, poté cca 1 h při konst. napětí 110 V). Proteiny z gelu se pomocí aparatury pro polosuchý westernblot (Omni-Bio, Česká republika) přenesou (75 min při konstantním proudu 340 mA) na PVDF membránu (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, Velká Británie). PVDF membrána se blokuje v 0,5% kaseinovém hydrolyzátu v PBS s obsahem 0,05% Tween 20 (PBS-T, pH 7,2) 16 h při 4 °C. Membrána je poté 1 h inkubována s vyšetřovanými vzorky prasečích sér ve 100násobném ředění ve stejném roztoku – PBS-T/kaseinový hydrolyzáte za současného třepání při laboratorní teplotě s konjugátem značeným křenovou peroxidázou (Goat anti-pig IgG conjugate, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA, 1000x ředěný v PBS-T/kaseinový hydrolyzáte) a následně se opět 5x promyje (PBS-T). Pro vizualizaci antigenu je použit chromogenní substrát diaminobenzidín (13 mg ve 40 ml PBS, po přidání 40 µl peroxidu vodíku). Reakce se zastaví přidáním nadbytku vody. Intenzita zbarvení proužků se měří například na přístroji GelLogic 2200 PRO (Carestream Health, USA). Vyhodnocení intenzity zbarvení proužků lze provést i vizuálně.

Vyhodnocení

Vysoká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL identifikuje zvířata infikovaná *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium nebo i jiným sérovarem *Salmonella enterica ssp. enterica*, v závislosti na antigenní příbuznosti uvedených proteinů. Vysoká hladina protilátek proti proteinu

FliC nebo YfgL a zároveň nízká hladina protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD identifikuje zvířata vakcinovaná vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium. Vysoké hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata infikovaná i vakcinovaná. Nízké nebo žádné hladiny protilátek proti oběma skupinám proteinů identifikuje zvířata, která buď nebyla infikována ani vakcinována, nebo zvířata, u nichž nedošlo k tvorbě protilátek po infekci nebo vakcinaci.

Průmyslová využitelnost

Tvorba detekčních systémů (například ELISA, westernblot) umožňujících sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob sérologického odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica ssp. enterica* sérovar Typhimurium, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se ve vzorku séra stanoví hladina protilátek metodou ELISA nebo westernblot proti alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny SseB, Gene ID: 1252916; SipB, Gene ID: 1254408 a SipD, Gene ID: 1254406 a alespoň jednomu nativnímu nebo rekombinantnímu proteinu vybranému ze skupiny FliC, Gene ID: 1253480 a YfgL, Gene ID: 1254042, kdy infikovaná zvířata se identifikují tak, že mají oproti zvířatům vakcinovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL, naproti tomu zvířata vakcinovaná se identifikují tak, že mají oproti zvířatům infikovaným vyšší hladinu protilátek proti proteinu FliC nebo YfgL a zároveň mají nižší hladinu protilátek proti proteinu SseB nebo SipB nebo SipD.

Konec dokumentu

Příloha E

ELISA test pro sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium

Ján Matiašovic, Jan Gebauer, Hana Kudláčková, Marcel Kosina, Kamil Kovařík,
Radek Tesařík, Alena Osvaldová

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., 2014

Funkční vzorek

**ELISA test pro sérologické odlišení prasat infikovaných
Salmonella enterica subsp. *enterica* sérovar Typhimurium
od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na
inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
sérovar Typhimurium**

Autoři

MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer
Hana Kudláčková
Mgr. Marcel Kosina, Ph.D.
MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
MVDr. Alena Osvaldová

**Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského
výzkumu (QJ1210115) a NPU I (LO 1218)**

ISBN 978-80-86895-45-1

2014

Funkční vzorek

ELISA test pro sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium

Autoři

MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer
Hana Kudláčková
Mgr. Marcel Kosina, Ph.D.
MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
MVDr. Alena Osvaldová

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1210115) a NPU I (LO 1218)

2014

OBSAH

Úvod	4
I. Cíl metodiky	5
II. Vlastní popis metodiky	5
II.1. Metodika ELISA reakce	5
II.2. Vyhodnocení ELISA testu	7
II.3. Validace ELISA reakce	8
III. Srovnání „novosti postupů“	15
IV. Popis uplatnění certifikované metodiky	15
V. Ekonomické aspekty	15
VI. Patentová ochrana	15
VII. Seznam použité související literatury	16
Dedikace	16

Úvod

Pro úspěšné uplatnění jakékoli vakcíny proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica* subsp. *enterica* u prasat je nutné odlišení zvířat vakcinovaných od zvířat infikovaných. Zavedené sérologické metody detekce protilátek proti netyfoidním sérovarům *Salmonella enterica* subsp. *enterica* u prasat jsou založeny na detekci protilátek proti O-antigenům. Vakcína vyvíjená v rámci projektu QJ1210115 obsahuje inaktivovanou kulturu divokého kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium (Matiašovic a kol. 2013) a indukuje tak tvorbu protilátek mimo jiné i proti O-antigenům. Podobně po přirozené infekci prasat netyfoidními sérovary *Salmonella enterica* subsp. *enterica* dochází k produkci protilátek proti těmto antigenům (Nielsen a kol. 1995). Zavedené sérologické metody proto identifikují prasata vakcinovaná stejně jako prasata infikovaná.

Cílem bylo vypracování metody sérologického odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium. Toho bylo dosaženo použitím vybraných proteinů *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium jako antigenů v ELISA metodě. Byly identifikovány dva proteiny, z nichž jeden indukuje vysokou protilátkovou odpověď po vakcinaci a nízkou po infekci a druhý protein naopak indukuje vysokou protilátkovou odpověď po infekci, ale nízkou po vakcinaci vyvíjenou vakcínou.

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky bylo zavést a validovat ELISA metodu sérologického odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium. Taková metoda není komerčně dostupná.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. Metodika ELISA reakce

V testu byla individuálně vyšetřena séra tří skupin prasat: skupiny kontrolní, t.j. neinfikované a nevakcinované; skupiny infikované *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium a skupiny vakcinované vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium. Séra byla získána z krve odebrané 28 dní po infekci nebo 28 dní po vakcinaci. V každé skupině bylo individuálně vyšetřeno 12 jedinců. Statistická významnost rozdílu hladin protilátek mezi skupinami byla testována metodou ANOVA s následným Tukey post-testem.

V ELISA testu byly porovnány hladiny protilátek proti proteinu SipB, Gene ID: 1254408 a proteinu FliC (GeneID:1253480). Tyto proteiny byly exprimovány v *Escherichia coli* jako rekombinantní proteiny s His-Tag.

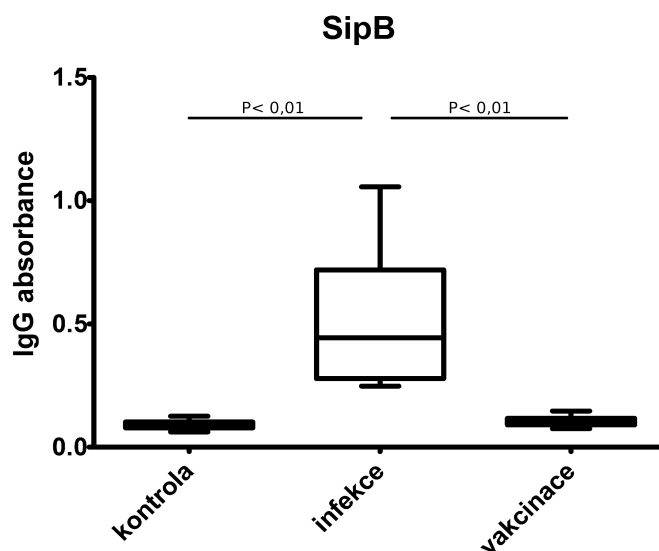
ELISA test se připravil potažením jamek jedné mikrotitrační desky rekombinantním proteinem SipB a druhé mikrotitrační desky rekombinantním proteinem FliC, oba v pracovním ředění 1 µg/ml v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 µl na jamku (inkubace 16 hodin, 4°C). Následně se desky třikrát promyly PBS s obsahem 0,05% Tween 20 (PBS-T, pH 7,2) a blokovaly roztokem 0,5% kaseinového hydrolyzátu v 10% sacharóze (inkubace 30 minut při laboratorní teplotě). Vyšetřované vzorky prasečího séra nebo plazmy se ředily 100x v PBS-T s přídatkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 µl se aplikovaly do jamek mikrotitrační desky. Po inkubaci (1h, laboratorní teplota, vlhká komůrka) se desky třikrát promyly roztokem PBS-T a do jamek se přidalo

100 μ l konjugátu značeného křenovou peroxidázou (Goat anti-pig IgG conjugate, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) v příslušném pracovním ředění. Po inkubaci (60 min, laboratorní teplota, vlhká komůrka) se desky opět třikrát promyly a do jamek se přidalo 100 μ l roztoku substrátu s chromogenem TMB Complete (Test-line, Brno, Česká republika). Enzymatická reakce se zastavila po 10 minutách 50 μ l 2M kyseliny sírové. Výsledná absorbance se odečetla pomocí multikanálového spektrofotometru Synergy H1 (Biotek, USA) při vlnové délce 450 nm.

Výsledky ELISA testu s antigeny SipB a FliC

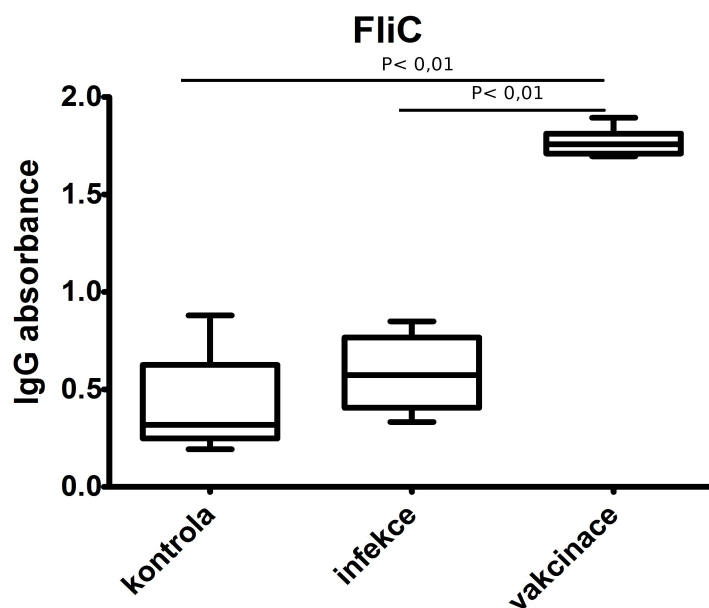
Hladiny protilátek proti proteinu SipB byly v sérech kontrolních zvířat v hodnotách absorbance 0,062 - 0,126; v sérech vakcinovaných zvířat v hodnotách absorbance 0,075 - 0,147. Hladiny protilátek u těchto dvou skupin se statisticky významně nelišily ($P > 0,05$). V sérech infikovaných zvířat byly hladiny protilátek v hodnotách absorbance 0,248 - 1,056. Tyto hodnoty byly statisticky významně vyšší jak ve srovnání s hodnotami absorbance u kontrolní, tak i vakcinované skupiny ($P < 0,01$) (Obr. 1).

Obr. 1: Hladiny protilátek v sérech prasat proti proteinu SipB



Hladiny protilátek proti proteinu FliC byly v sérech kontrolních zvířat v hodnotách absorbance 0,194 - 0,880. V sérech infikovaných zvířat v hodnotách absorbance 0,333 - 0,850. V sérech vakcinovaných zvířat v hodnotách absorbance 1,695 - 1,894. Hodnoty absorbance u vakcinované skupiny byly statisticky významně rozdílné ($P < 0,01$) od hodnot absorbance u infikované i kontrolní skupiny (Obr. 2).

Obr. 2: Hladiny protilátek v sérech prasat proti proteinu FliC



II.2. Vyhodnocení ELISA testu

Zvířata infikovaná měla hladinu protilátek proti proteinu SipB alespoň 1,5 x vyšší než zvířata kontrolní a zvířata vakcinovaná a zároveň měla alespoň 1,5 x nižší hladinu protilátek proti proteinu FliC než zvířata vakcinovaná. Zvířata vakcinovaná měla hladinu protilátek proti proteinu FliC alespoň 1,5 x vyšší než zvířata kontrolní a zvířata infikovaná a zároveň měla alespoň 1,5 x nižší hladinu protilátek proti proteinu SipB než zvířata infikovaná.

Závěr: Porovnáním hladin protilátek proti SipB a FliC u vyšetřovaných sér lze uvedeným postupem zjistit, zda zvíře bylo infikované *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium nebo vakcinované vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium nebo bylo infikované a zároveň vakcinované nebo si nevytvořilo protilátky proti proteinům SipB a FliC. Jistotu správného vyhodnocení dalších vzorků lze zvýšit porovnáním s panelem sér kontrolních, infikovaných a vakcinovaných zvířat.

II.3. Validace ELISA reakce

II.3.1. Validace ELISA reakce s antigenem SipB

a) Homogenita potažení mikrotitrační desky antigenem SipB:

Test byl proveden na jedné 96 jamkové desce dané výrobní šarže s jedním vzorkem séra. Byl proveden standardní ELISA test dle pracovního postupu uvedeného výše. Výsledek testu je vyjádřen pomocí průměrné hodnoty absorbancí vyšetřovaného vzorku séra a variačního koeficientu (CV). Vzhledem k okrajovému efektu nejsou do výpočtu hodnoty absorbancí krajních jamek desky (šedá barva). Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Výsledky testu homogenity potažení mikrotitrační desky antigenem SipB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,213	0,177	0,193	0,186	0,191	0,202	0,202	0,203	0,21	0,215	0,206	0,22
B	0,208	0,196	0,201	0,196	0,199	0,201	0,201	0,203	0,199	0,202	0,213	0,205
C	0,207	0,204	0,2	0,198	0,196	0,182	0,197	0,195	0,204	0,21	0,196	0,203
D	0,199	0,208	0,205	0,205	0,201	0,194	0,204	0,209	0,211	0,211	0,21	0,203
E	0,21	0,208	0,203	0,211	0,202	0,215	0,2	0,205	0,214	0,214	0,209	0,201
F	0,215	0,207	0,211	0,207	0,205	0,203	0,209	0,204	0,21	0,217	0,216	0,21
G	0,215	0,208	0,206	0,211	0,213	0,206	0,213	0,203	0,202	0,211	0,219	0,211
H	0,231	0,212	0,215	0,213	0,207	0,213	0,22	0,214	0,218	0,219	0,239	0,216

průměrná hodnota absorbance: 0,205

směrodatná odchylka výběrová: 0,007

variační koeficient (%): 3,301

b) Opakovatelnost (intra-assay variability) pro antigen SipB:

Tento test byl proveden v jedné výrobní šarži mikrotitračních desek se dvěma negativními (N1 a N2) a dvěma pozitivními (P1 a P2) vzorky séra v šestnácti replikacích od každého vzorku dle standardního pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočítána průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběrová a variační koeficient (Tabulka 2). Výsledkem testu je variační koeficient pro celý rozsah měření.

Tabulka 2: Výsledky testu opakovatelnosti (intra-assay variability) pro antigen SipB:

číslo měření	N 1	N 2	P 1	P 2
1	0,117	0,347	0,606	1,542
2	0,103	0,340	0,640	1,554
3	0,105	0,335	0,643	1,599
4	0,110	0,333	0,644	1,565
5	0,112	0,311	0,628	1,500
6	0,108	0,289	0,606	1,512
7	0,115	0,285	0,598	1,490
8	0,110	0,280	0,597	1,513
9	0,137	0,336	0,650	1,551
10	0,148	0,330	0,628	1,493
11	0,150	0,408	0,652	1,518
12	0,146	0,330	0,647	1,485
13	0,148	0,353	0,627	1,469
14	0,141	0,286	0,610	1,398
15	0,143	0,378	0,602	1,474
16	0,142	0,300	0,580	1,434
průměrná hodnota absorbance:	0,127	0,328	0,622	1,506
směrodatná odchylka výběrová:	0,018	0,035	0,023	0,050
variační koeficient (%):	14,378	10,774	3,634	3,348
směrodatná odchylka výběrová pro celý rozsah:	0,034			
variační koeficient pro celý rozsah (%):	9,317			

c) Opakovatelnost (inter-assay variability) pro antigen SipB:

Zkouška byla provedena na deskách pocházejících z jedné výrobní šarže. Testování bylo provedeno jako deset samostatných analýz. Byly testovány dva negativní (N1 a N2) a dva pozitivní (P1 a P2) vzorky sér, každý vzorek v kvadruplikátu dle standardního pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočítána průměrná hodnota absorbance ze všech testů, dále směrodatná odchylka výběrová a variační koeficient pro celý rozsah měření (Tabulka 3).

Tabulka 3: Výsledky testu opakovatelnosti (inter-assay variability) pro antigen SipB

číslo měření	N 1	N 2	P 1	P 2
1	0,149	0,258	0,692	1,255
2	0,135	0,236	0,641	1,202
3	0,145	0,212	0,623	1,239
4	0,132	0,262	0,653	1,327
5	0,130	0,233	0,558	1,219
6	0,129	0,223	0,557	1,179
7	0,128	0,226	0,550	1,121
8	0,129	0,225	0,539	1,235
9	0,129	0,238	0,570	1,119
10	0,128	0,250	0,568	1,091
11	0,124	0,252	0,528	1,100
12	0,126	0,271	0,531	1,163
13	0,130	0,245	0,569	1,093
14	0,135	0,256	0,547	1,157
15	0,130	0,253	0,520	1,149
16	0,126	0,260	0,538	1,151
17	0,141	0,255	0,608	1,295
18	0,133	0,226	0,569	1,261
19	0,144	0,216	0,591	1,312
20	0,137	0,270	0,626	1,361
21	0,139	0,254	0,596	1,387
22	0,142	0,318	0,605	1,317
23	0,141	0,230	0,612	1,234
24	0,141	0,259	0,587	1,334

25	0,151	0,212	0,525	1,313
26	0,138	0,243	0,555	1,260
27	0,141	0,248	0,599	1,122
28	0,139	0,263	0,592	1,311
29	0,122	0,275	0,622	1,276
30	0,136	0,246	0,640	1,259
31	0,135	0,224	0,576	1,194
32	0,132	0,265	0,584	1,281
33	0,140	0,271	0,636	1,346
34	0,143	0,384	0,636	1,374
35	0,138	0,260	0,624	1,282
36	0,137	0,249	0,648	1,394
37	0,146	0,273	0,665	1,288
38	0,149	0,268	0,629	1,304
39	0,134	0,260	0,618	1,310
40	0,134	0,279	0,609	1,376
	N 1	N 2	P 1	P 2
průměrná hodnota absorbance:	0,136	0,254	0,593	1,250
směrodatná odchylka výběrová:	0,007	0,030	0,043	0,088
variační koeficient (%):	5,283	11,818	7,199	7,078
směrodatná odchylka výběrová pro celý rozsah:	0,051			
variační koeficient pro celý rozsah (%):	8,208			

II.2.2. Validace ELISA reakce s antigenem FliC

a) Homogenita potažení mikrotitrační desky antigenem FliC:

Test byl proveden na jedné 96 jamkové desce dané výrobní šarže s jedním vzorkem séra. Byl proveden standardní ELISA test dle pracovního postupu uvedeného výše. Výsledek testu je vyjádřen pomocí průměrné hodnoty absorbancí vyšetřovaného vzorku séra a variačního koeficientu (CV). Vzhledem k okrajovému efektu nejsou do výpočtu hodnoty absorbancí krajních jamek desky (šedá barva). Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Výsledky testu homogenity potažení mikrotitrační desky antigenem FliC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,802	0,800	0,774	0,783	0,806	0,840	0,791	0,890	0,793	0,776	0,813	0,826
B	0,845	0,893	0,841	0,857	0,879	0,836	0,848	0,859	0,862	0,831	0,828	0,854
C	0,810	0,871	0,886	0,849	0,869	0,812	0,833	0,882	0,893	0,815	0,829	0,834
D	0,809	0,870	0,869	0,888	0,872	0,830	0,830	0,900	0,857	0,880	0,823	0,829
E	0,848	0,898	0,870	0,879	0,832	0,822	0,832	0,843	0,854	0,866	0,814	0,838
F	0,854	0,916	0,901	0,903	0,858	0,864	0,874	0,829	0,844	0,861	0,835	0,844
G	0,865	0,892	0,886	0,886	0,839	0,807	0,860	0,807	0,825	0,809	0,837	0,872
H	0,882	0,867	0,868	0,843	0,812	0,826	0,866	0,844	0,810	0,859	0,859	0,906

průměrná hodnota absorbance: 0,865

směrodatná odchylka výběrová: 0,028

variační koeficient (%): 3,300

b) Opakovatelnost (intra-assay variability) pro antigen FliC:

Tento test byl proveden v jedné výrobní šarži mikrotitračních desek se dvěma negativními (N1 a N2) a dvěma pozitivními (P1 a P2) vzorky séra v šestnácti replikacích od každého vzorku dle standardního pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočítána průměrná hodnota absorbance, směrodatná odchylka výběrová a variační koeficient (Tabulka 5). Výsledkem testu je variační koeficient pro celý rozsah měření.

Tabulka 5: Výsledky testu opakovatelnosti (intra-assay variability) pro antigen FliC:

číslo měření	N 1	N 2	P 1	P 2
1	0,096	0,119	0,662	0,814
2	0,087	0,110	0,632	0,742
3	0,087	0,107	0,596	0,685
4	0,084	0,103	0,535	0,680
5	0,082	0,101	0,541	0,555
6	0,081	0,102	0,606	0,704

7	0,082	0,103	0,637	0,738
8	0,081	0,106	0,617	0,650
9	0,094	0,120	0,654	0,824
10	0,085	0,108	0,612	0,778
11	0,087	0,106	0,580	0,735
12	0,082	0,103	0,574	0,697
13	0,079	0,098	0,547	0,687
14	0,081	0,100	0,589	0,716
15	0,079	0,105	0,621	0,760
16	0,078	0,101	0,609	0,728
průměrná hodnota absorbance:	0,084	0,106	0,601	0,718
směrodatná odchylka výběrová:	0,005	0,006	0,038	0,065
variační koeficient (%):	6,119	5,875	6,355	8,987
směrodatná odchylka výběrová pro celý rozsah:	0,038			
variační koeficient pro celý rozsah (%):	6,950			

c) Opakovatelnost (inter-assay variability) pro antigen FliC:

Zkouška byla provedena na deskách pocházejících z jedné výrobní šarže. Testování bylo provedeno jako deset samostatných analýz. Byly testovány dva negativní (N1 a N2) a dva pozitivní (P1 a P2) vzorky sér, každý vzorek v kvadruplikátu dle standardního pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočítána průměrná hodnota absorbance ze všech testů, dále směrodatná odchylka výběrová a variační koeficient pro celý rozsah měření (Tabulka 6).

Tabulka 6: Výsledky testu opakovatelnosti (inter-assay variability) pro antigen FliC

číslo měření	N 1	N 2	P 1	P 2
1	0,080	0,104	0,557	0,693
2	0,076	0,094	0,587	0,711
3	0,074	0,093	0,583	0,780
4	0,075	0,093	0,539	0,711
5	0,088	0,132	0,569	0,703
6	0,083	0,115	0,586	0,732
7	0,081	0,107	0,626	0,761

8	0,078	0,100	0,575	0,787
9	0,083	0,123	0,490	0,675
10	0,079	0,103	0,496	0,589
11	0,077	0,098	0,556	0,727
12	0,077	0,098	0,544	0,541
13	0,078	0,096	0,560	0,636
14	0,075	0,093	0,583	0,682
15	0,074	0,099	0,482	0,704
16	0,081	0,097	0,553	0,738
17	0,080	0,101	0,527	0,711
18	0,078	0,093	0,450	0,663
19	0,079	0,094	0,439	0,589
20	0,077	0,094	0,480	0,603
21	0,083	0,099	0,562	0,696
22	0,075	0,097	0,545	0,684
23	0,078	0,091	0,499	0,666
24	0,068	0,094	0,439	0,625
25	0,077	0,106	0,461	0,699
26	0,076	0,100	0,442	0,680
27	0,078	0,094	0,441	0,725
28	0,076	0,092	0,507	0,664
29	0,091	0,114	0,740	0,890
30	0,096	0,110	0,612	0,923
31	0,081	0,107	0,678	0,916
32	0,079	0,113	0,682	1,009
33	0,084	0,107	0,699	0,851
34	0,084	0,121	0,717	0,841
35	0,090	0,119	0,736	0,843
36	0,087	0,123	0,677	0,856
37	0,094	0,120	0,662	0,824
38	0,085	0,108	0,632	0,778
39	0,087	0,106	0,596	0,735
40	0,082	0,103	0,535	0,697
	N 1	N 2	P 1	P 2
průměrná hodnota absorpance:	0,081	0,104	0,566	0,733
směrodatná odchylka výběrová:	0,006	0,010	0,085	0,100
variační koeficient (%):	7,190	10,103	15,102	13,631
směrodatná odchylka výběrová pro celý rozsah:	0,066			
variační koeficient pro celý rozsah (%):	11,913			

III. Srovnání „novosti postupů“

ELISA metoda sérologického odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium není v současné době komerčně dostupná.

IV. Uplatnění funkčního vzoru

ELISA metoda sérologického odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium je nezbytně nutná pro zavedení vakcinace prasat v chovech.

V. Ekonomické aspekty

Metoda je na pracovišti autorů zavedena a používána. Komerční využití závisí na zavedení vakcinace prasat proti netyphoidním sérovarům *Salmonella enterica*.

VI. Patentová ochrana

Metoda sérologického odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium prezentovaná v tomto funkčním vzorku je předmětem patentové přihlášky PV2013-1048 "Použití antigenů *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium pro sérologické odlišení infikovaných a vakcinovaných prasat."

VII. Seznam použité a související literatury

1. Matiasovic, J., Kudlackova, H., Babickova, K., Stepanova, H., Volf, J., Rychlik, I., Babak, V., Faldyna, M. Impact of maternally-derived antibodies against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *Veterinary Journal*, 2013, 196: 114-115.
2. 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. *Veterinary Microbiology*, 1995, 47: 205-18.

Dedikace

Funkční vzorek ELISA test pro sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1210115) a NPU I (LO 1218).

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70, 621 00 Brno

Název: ELISA test pro sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium

Autoři: MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer
Hana Kudláčková
Mgr. Marcel Kosina, Ph.D.
MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
MVDr. Alena Osvaldová

Funkční vzorek ELISA test pro sérologické odlišení prasat infikovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium od prasat vakcinovaných vakcínou založenou na inaktivované kultuře *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1210115) a NPU I (LO 1218).

Příloha F

Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů *Salmonella* Derby, *Salmonella* Infantis a *Salmonella* Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat

Marcel Kosina, Ján Matiašovic, Jan Gebauer, Hana Kudláčková, Lenka Levá, Hana Havlíčková, Vladimír Vrzal, František Šišák

Bioveta, a.s., 2015



BIOVETA, a.s.,
Komenského 212/12,
683 23 Ivanovice na Hané,
CZECH REPUBLIC
www.bioveta.cz, comm@bioveta.cz,

FUNKČNÍ VZOREK

Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů *Salmonella* Derby, *Salmonella* Infantis a *Salmonella* Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat

Autoři

Mgr. Marcel Kosina, Ph.D. ¹
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D. ²
Mgr. Jan Gebauer ²
Hana Kudláčková ²
Ing. Lenka Levá ²
Ing. Hana Havlíčková ²
MVDr. Vladimír Vrzal, CSc. ¹
MVDr. František Šišák, CSc. ²

¹ Bioveta, a.s.

² Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

**Funkční vzorek byl vytvořen v rámci programu
Národní agentury zemědělského výzkumu
(QJ1210115) a programu NPU I (LO 1218)**

2015



BIOVETA, a.s.,
Komenského 212/12,
683 23 Ivanovice na Hané,
CZECH REPUBLIC
www.bioveta.cz, comm@bioveta.cz,

FUNKČNÍ VZOREK

Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů *Salmonella* Derby, *Salmonella* Infantis a *Salmonella* Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat

Autoři

Mgr. Marcel Kosina, Ph.D. ¹
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D. ²
Mgr. Jan Gebauer ²
Hana Kudláčková ²
Ing. Lenka Levá ²
Ing. Hana Havlíčková ²
MVDr. Vladimír Vrzal, CSc. ¹
MVDr. František Šišák, CSc. ²

¹ Bioveta, a.s.

² Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

**Funkční vzorek byl vytvořen v rámci programu
Národní agentury zemědělského výzkumu
(QJ1210115) a programu NPU I (LO 1218)**

2015

Obsah

Obsah	3
1 Úvod	4
2 Cíl	4
3 Výroba vakcíny	4
4 Závazné parametry vakcíny	7
5 Indikace s upřesněním pro cílový druh zvířat	7
6 Vakcinační schéma	7
7 Ověření bezpečnosti na cílovém druhu zvířete	8
8 Ověření účinnosti na cílovém druhu zvířete	8
9 Reference	9

1 Úvod

Předmětem předkládaného Funkčního vzorku je inaktivovaná trivalentní vakcína pro prasata obsahující celobuněčné antigeny vybraných „wild-type“ kmenů bakterií *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Derby, *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Infantis a *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium. Účinek vakcíny je zesilován olejovým adjuvans vhodným pro cílovou skupinu zvířat, tedy prasničky a prasnice. Prostřednictvím vakcinace matek je navozena kolostrální imunita sajících selat a tak zvýšen tlak proti salmonelovým infekcím zmíněných sérovarů v chovech prasat. Imunizací touto vakcínou je očekáváno také snížení výskytu salmonel v jatečním materiálu. Po imunizaci lze rovněž rozlišit protilátky postvakcinační od postinfekčních, jedná se tedy o DIVA vakcínu (z angl. „Differentiating Infected from Vaccinated Animals“).

2 Cíl

Cílem předkládaného Funkčního vzorku bylo vyvinout a v laboratorním měřítku vyrobit bezpečnou a účinnou DIVA vakcínu pro prasata vedoucí k tlumení výskytu salmonel v chovech prasat.

3 Výroba vakcíny

3.1 Výrobní kmeny

Pro výrobu inaktivovaných celobuněčných antigenů jsou používány kmeny salmonel dodané z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství na základě spolupráce v projektu QJ1210115. Tyto kmeny byly uloženy podle pravidel systému jednotné inokulace („Seed lot system“) ve sbírce bakteriálních kultur Biovety, a.s., který se řídí příslušným platným Standardním operačním postupem. Pro každý kmen bylo založeno matečné inokulum („MSLB“) a pracovní inokulum („WSLB“). Systém jednotné inokulace umožňuje bezpečné uložení dostatečného množství matečné a pracovní kultury pro výrobní účely tak, aby stabilita kmenů nezbytná pro jednotnost výrobních šarží, byla zachována. Lyofilizované kultury MSLB a WSLB jsou uloženy při 2 – 8 °C.

Výrobní kmeny:

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Derby** je uložen v Biovetě, a.s. (dále jen Bioveta) pod označením MSLB 3097. Pro výrobu jsou užívána příslušná pracovní WSLB inokula. Kmen je „wild-type“, rozlišitelný na základě metody PFGE („Pulsed-field gel electrophoresis“) jako PFGE typ De1 (Volf a kol. 2010).

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Infantis** je uložen v Biovetě pod označením MSLB 3098. Pro výrobu jsou užívány příslušná pracovní WSLB inokula.

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium** je uložen v Biovetě pod označením MSLB 3099. Pro výrobu jsou užívány příslušná pracovní WSLB inokula. Jedná se o fagotyp DT104.

Morfologie kmenů: Po inkubaci 18 – 24 hodin a při teplotě 37 °C tvoří čistá kultura výrobních kmenů na TSA hladké, lesklé, krémové kolonie s mírně vyvýšeným středem a se souvislým okrajem mající průměr 1 – 3 mm. Na KA jsou kolonie hladké, lesklé, šedavé se zahuštěným a mírně vyvýšeným středem. Okraj kolonií je souvislý. Kolonie dosahují průměru 1 – 3 mm. Kultura nevykazuje hemolýzu. Při kultivaci nad 24 hodin jsou vzhledem k pohyblivosti buněk okraje nesouvislé a kolonie se rozrůstají do stran. Při kultivaci na XLD agarů tvoří kmeny typické kolonie s černým středem a světlým okrajem, o velikosti 1 – 3 mm.

Na preparátu barveného dle Grama představují buňky všech sérovarů typické krátké negativně zbarvené tyčky bez náznaku tvorby pouzder.

3.2 Výrobní suroviny

Agarová živná média: Trypton soya agar (TSA), Krevní agar s 6 % beraní krví (KA), Xylosa-lysin-deoxycholátový agar (XLD agar).

Tekutá živná média: Minimální růstové médium se stopovými prvky (základ: KH_2PO_4 1,40 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 10,10 g; kyselý kaseinhydrolyzát 1,00 g; roztok stopových prvků 1,00 ml; čištěná voda ad 1000,00 ml; roztok stopových prvků: $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10,00 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1,00 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,14 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,40 g; čištěná voda ad 1000,00 ml; úprava pH pomocí 20 % NaOH do rozmezí hodnot 7,3-7,8), sterilní roztok glukózy (40 %); Trypton Soya Broth (příprava dle výrobce: Oxoid, UK), Thioglykolátová půda (Thioglycollate Medium, USP; příprava dle výrobce Oxoid).

Ostatní: Protipěnicí složka, 30 % NaOH, sterilní fyziologický roztok (NaCl 0,9 g; voda pro injekce 100 ml), adjuvans W/O/W Montanide ISA 206 VG (Seppic), merthiolát sodný, formaldehyd (35 %).

3.3 Pomůcky a výrobní zařízení

Základní pomůcky: Jednorázové bakteriologické kličky, sterilní injekční jehly a stříkačky, sterilní plastové nebo skleněné zkumavky, kahan, přístroj na měření zákalu popř. zákalová řada v jednotkách McF, kyvety (500 ml), přístroj pro stanovení endotoxinů, pH metr.

Zařízení: Spektrofotometr ($\lambda=605 \text{ nm}$); box s laminárním prouděním vzduchu (třída čistoty „A“); třepačka; prostory s definovanou třídou čistoty (A, B, C); bioreaktor o využitelném objemu 15 l (s přívodem vzduchu a sondami pro detekci pH, teploty a rozpuštěného kyslíku); peristaltické čerpadlo; ultrafiltrační zařízení (300 kDa kazety); magnetická míchačka (s trojúhelníkovým magnetickým míchadlem).

3.4 Postup výroby

3.4.1 Výroba bakterinu

Příslušný lyofilizovaný WSLB kmen sérovaru *Salmonella enterica* subsp. *enterica* je rehydratován pomocí 500 µl sterilního fyziologického roztoku a bakteriologickou kličkou je zaočkován na TSA křížovým roztěrem. Pro kompletní ověření čistoty kmenů je také zaočkována 1 miska KA a 1 miska XLD agarů. Misky inkubujeme aerobně při 37 °C po dobu 18 – 24 h. Z čisté kultury na TSA je ve fyziologickém roztoku připraveno přibližně 3 ml suspenze o zákalu 4 McF. Z této suspenze jsou připraveny násady zaočkováním 2 x 1 ml suspenze do 2 x 400 ml vytemperovaného Minimálního růstového média na 37 °C. Do obou

násad jsou přidány 2 ml 40 % roztoku glukózy. Násady jsou inkubovány 18 – 24 h při 37 °C. Na konci doby této statické kultivace dosahuje kultura zákalu min. 2,5 McF. U násad je ověřena čistota kultury. Do ověření čistoty lze násady ponechat při teplotě 2 - 8°C po dobu 24 hodin. Před kultivací v bioreaktoru jej vysterilizujeme s předváženým množstvím Minimálního média a příslušného objemu čištěné vody (8 l). Před sterilizací (121 °C, 20 min) je upraveno pH a přidána protipěnicí složka. Po sterilizaci a vytemperování na 37 °C jsou do kultivační nádoby pomocí peristaltického čerpadla za sterilních podmínek přečerpány obě násady a 40 ml 40 % roztoku glukózy. V průběhu kultivace je nastaveno automatické udržování hodnoty rozpuštěného kyslíku min. 40 % prostřednictvím spřažení aerace s mícháním. Teplota uvnitř nádoby bioreaktoru je udržována na hodnotě 37 °C. V průběhu růstu kultury dochází ke snižování pH pod hodnotu 7,0. Kultivaci ukončíme po 6 – 7 hodinách na konci exponenciální fáze růstu. Kultura dosahuje denzity min. 2,5 McF. Takto narostlá kultura je inaktivována přidáním 35 % formaldehydu na výslednou koncentraci 0,5 % přímo do nádoby bioreaktoru. Teplota v nádobě je nastavena na 22 °C a kultura je inaktivována po dobu 18 – 24 h.

Pro kontrolu inaktivace je používáno 9 ml média „Trypton Soya Broth“ (TSB), které je inokulováno 1 ml inaktivované kultury a následně inkubováno při teplotě 37 °C po dobu 2 dnů. Poté je půda přeočkována v poměru 1 ml do 9 ml čerstvého TSB a opět inkubována aerobně při 37 °C po 2 dny. Inaktivovaná kultura nesmí způsobit zákal v kultivačním médiu.

Inaktivovaná kultura (bakterin) je alespoň 10 x zakoncentrována pomocí ultrafiltračního zařízení se třemi zapojenými kazetami o porozitě 300 kDa. Po vhodném naředění je změřena a zaznamenána denzita koncentráту. U bakterinu je upraveno pH 30 % roztokem NaOH na hodnotu 7,0 – 7,5. Takto připravený bakterin je skladován při teplotě 2 – 8 °C po dobu max. 6 měsíců.

Kontrola sterility je prováděna u bakterinů před homogenizací zaočkováním 1 ml bakterinu do 9 ml TSB a 9 ml TGP (Thioglykolátová půda). Inkubace inokulovaného média TGP je 14 dní při 37 °C a inkubace TSB 14 dní při 22 °C. Po dobu testování nesmí dojít k zakalení médií.

3.4.2 Homogenizace vakcíny

Před homogenizací je nutné antigenové složky a adjuvans Montanide ISA 206 VG (Seppic, France) vytemperovat na 31 °C (± 1°C). Bakterinová složka zaujímá 44,5 % a adjuvans 55,5 % celkového objemu vakcíny. Pro přípravu vakcíny o celkové denzitě antigenů 6 McF (3,40 x 10⁹ CFU/ml) jsou jednotlivé koncentráty antigenů vhodně naředěny sterilním fyziologickým roztokem tak, aby byl zachován poměr bakterinů ve vakcíně 1:1:1. Příklad podílu jednotlivých složek 250 ml vakcíny je uveden v **Tabulce 1**.

Při samotné homogenizaci je postupováno tak, že do vytemperovaného adjuvans je pomalu za stálého míchání přidána bakterinová složka. Následně je přidáno 1 % celk. objemu konzervans 1 % roztoku merthiolátu sodného.

Homogenizace 250 ml vakcíny lze provádět za sterilních podmínek v uzavíratelné 500 ml láhvi. Míchání je uskutečněno pomocí magnetického míchadla a magnetické míchačky

temperované na 32 °C. Rychlost míchání je navolena na 350 rpm. Po ukončení homogenizace je upraveno pH pomocí 30 % NaOH na rozmezí hodnot 7,0 – 7,5.

Tabulka 1 Příklad přípravy 250 ml vakcíny

Bakterin	Koncentrát (McF)	Konc. bakterinu ve vakcíně (McF)	Koncentrace v alikvotě pro vakcínu (McF) SI+SD+STM	Příprava alikvoty		Objem bakterinů ve vakcíně (ml) SI+SD+STM (44,5%)	Adjuvans (ml) (55,5%)	Celkový objem vakcíny (ml)	Thiomersal sodný - 1% roztok (ml)
				Bakterin (ml)	Fyz. roztok (ml)				
SI	56,21	4,49	13,5	8,895	78,38	111,25	138,80	250,00	2,50
SD	43,39	4,49		11,523					
STM	50,24	4,49		9,952					

3.4.3 Plnění a skladování

Vakcína je sterilně plněna do skleněných lékovek o objemu 10,0 ml, uzavřena pryžovou propichovací zátkou a hliníkovou pertlí. Ověřená stabilita emulze W/O/W („water/oil/water“) je v těchto lékovkách při skladování mezi 2 – 8 °C po dobu 1 měsíce.

4 Závazné parametry vakcíny

Parametr	Limit při propouštění
Vzhled	Bílá mléčná tekutina s malým množstvím sedimentu, který se po roztrpání homogenně rozptýlí.
Využitelný objem balení	Min. 10 ml
Sterilita	Přípravek musí být sterilní
Kvantita antigenů	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhimurium: ($1,13 \times 10^9$ – $3,40 \times 10^9$ CFU/ml) <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Derby: ($1,13 \times 10^9$ – $3,40 \times 10^9$ CFU/ml) <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Infantis: ($1,13 \times 10^9$ – $3,40 \times 10^9$ CFU/ml)
Obsah endotoxinů	$4,30 \times 10^5$ EU/ml
pH	6,7 - 7,5
Obsah merthiolátu sodného	0,1 mg/ml (0,085 - 0,115 mg/ml)
Obsah formaldehydu	Max. 0,55 mg/ml

5 Indikace s upřesněním pro cílový druh zvířat

K imunizaci březích prasnic a prasniček za účelem vyvolání kolostrální imunity vedoucí k následnému zvýšení odolnosti sajících selat proti bakteriálním infekcím kmenů *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Derby a *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Infantis.

6 Vakcinační schéma

Vakcinační dávka: 1 ml

Vakcína je aplikována intramuskulárně (i.m.) v paraaurikulární krajině. Před použitím je potřeba obsah lékovky vytemperovat na 15-20 °C a řádně protřepat. Pro aplikaci použijte sterilní injekční jehlu a stříkačku. Místo vpichu by mělo být suché, čisté a asepticky ošetřené.

První dávku aplikujeme 4 týdny před očekávaným porodem s následným podáním druhé dávky o dva týdny později. Revakcinujeme 2 týdny před každým dalším očekávaným porodem.

7 Ověření bezpečnosti na cílovém druhu zvířete

Bezpečnost vakcíny byla ověřena na 5 selatech ve věku 4 týdny. Pro ověření bezpečnosti byla použita šarže vakcíny s maximálním celkovým obsahem antigenů $1,02 \times 10^{10}$ CFU/ml a obsahem endotoxinů $4,30 \times 10^5$ EU/ml. Zvířata byla vakcinována 1ml i.m. do paraaurikulární krajiny podle vakcinačního schématu: vakcinace, 14. den revakcinace do protější strany krku. Bezpečnost podání 3. „boostrové“ dávky byla ověřena v samostatné terénní studii na cílové kategorii.

Byla sledována teplota (rektální měření) před aplikací vakcíny, 4 h po aplikaci, a následně denně po dobu 4 dnů od vakcinace. Rovněž byly sledovány lokální a systémové reakce denně od zahájení vakcinace po dobu 14 dnů a stejným způsobem i po revakcinaci.

Vakcína splňuje požadavky Evropského lékopisu (EP) na bezpečnost, tj. žádné zvíře nevykazovalo abnormální lokální nebo systémové reakce nebo příznaky onemocnění, které by mohlo být přisuzováno zkoušenému přípravku. Kritérium pro zvýšení teploty stanovené Biovetou na základě obdobných monografií (EP) pro vakcíny pro prasata nebylo rovněž překročeno. Průměrná teplota tedy nepřesáhla rozdíl 1,5 °C pro všechna testovaná zvířata a u žádného zvířete nedošlo ke zvýšení teploty o více než o 2 °C od průměru naměřeného z teplot před vakcinací. Výsledky měření jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

Tabulka 2 Záznam změny teplot po vakcinaci a revakcinaci

Zvíře č.	MĚŘENÍ TEPLOTY										
	Den po vakcinaci (čas)										
	DEN 0 (0h)	DEN 0 (4h)	Δ (4h-0h)	DEN 1	Δ (DEN 1-0h)	DEN 2	Δ (DEN 2-0h)	DEN 3	Δ (DEN 3-0h)	DEN 4	Δ (DEN 4-0h)
292	39,26	40,68	1,42	39,63	0,37	39,50	0,24	39,72	0,46	39,46	0,20
296	39,46	40,60	1,14	40,13	0,67	39,60	0,14	39,68	0,22	39,80	0,34
290	39,28	41,20	1,92	40,50	1,22	39,84	0,56	39,91	0,63	39,24	-0,04
300	39,68	40,94	1,26	40,14	0,46	39,76	0,08	39,70	0,02	38,98	-0,70
294	39,72	39,80	0,08	39,28	-0,44	39,96	0,24	39,30	-0,42	39,08	-0,64
Skupinový průměr:			1,16		0,46		0,25		0,18		-0,17
Zvíře č.	MĚŘENÍ TEPLOTY										
	Den po revakcinaci (čas)										
	DEN 0 (0h)	DEN 0 (4h)	Δ (4h-0h)	DEN 1	Δ (DEN 1-0h)	DEN 2	Δ (DEN 2-0h)	DEN 3	Δ (DEN 3-0h)	DEN 4	Δ (DEN 4-0h)
292	39,54	40,23	0,69	40,06	0,52	39,86	0,32	39,80	0,26	39,86	0,32
296	39,41	40,08	0,67	40,16	0,75	39,25	-0,16	39,25	-0,16	39,30	-0,11
290	40,62	41,24	0,62	39,86	-0,76	39,63	-0,99	39,60	-1,02	39,40	-1,22
300	40,04	40,70	0,66	39,80	-0,24	39,00	-1,04	39,50	-0,54	39,80	-0,24
294	39,16	40,23	1,07	39,60	0,44	39,32	0,16	39,70	0,54	39,65	0,49
Skupinový průměr:			0,74		0,14		-0,34		-0,18		-0,15

8 Ověření účinnosti na cílovém druhu zvířete

Účinnost vakcíny byla testována v infekčním experimentu na sajících selatech. Do pokusu bylo zařazeno šest březích prasnic bez protilátek proti *Salmonella* spp.. Tři prasnice byly vakcinovány. Selata jedné vakcinované prasnice a jedné nevakcinované prasnice byla infikována čtvrtý den po porodu *S. Typhimurium*, podobně selata dalších prasnic byla infikována *S. Derby* a *S. Infantis*. Infekční dávka byla $1 - 4 \times 10^7$ CFU/ml. Třetí den po infekci byla selata utrácena a byly odebrány vzorky orgánů pro stanovení počtu salmonel na gram tkáně a pro kvalitativní vyšetření metodou ISO 6579. Pro každý sérovar byl sledován rozdíl v kolonizaci orgánů mezi selaty vakcinované a nevakcinované prasnice. Nejdůležitějším místem přechodu salmonel z trávicího traktu do organismu je ileum. Množství salmonel v ileocékální mízní uzlině drénující ileum tak nejlépe odpovídá o množství salmonel pronikajících do organismu.

Ve srovnání se selaty nevakcinované prasnice (N=9) měla selata vakcinované prasnice (N=10) statisticky významně nižší množství *S. Typhimurium* v ileocékální mízní uzlině, stěně a obsahu ilea, stěně céka a kolonu, a v submandibulární mízní uzlině. Podobně měla selata vakcinované prasnice (N=12) statisticky významně nižší množství *S. Derby* v ileocékální mízní uzlině, stěně ilea a v tonzile než selata nevakcinované prasnice (N=10). Selata vakcinované prasnice (N=13) měla statisticky významně nižší množství *S. Infantis* v ileocékální mízní uzlině, stěně ilea a kolonu než selata nevakcinované prasnice (N=8). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími výsledky získanými na základě vakcinace podobnou variantou vakcíny (Matiasovic a kol. 2013). Výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 3**.

Tabulka 3 Logaritmy CFU na gram tkáně v orgánech selat vakcinovaných a nevakcinovaných prasnic

	Ileocékální mízní uzlina			Stěna ilea			Stěna kolonu		
	STM	SD	SI	STM	SD	SI	STM	SD	SI
Selata vakcinované prasnice	0,20*	0,71*	0,85*	1,73*	1,18*	P=7 N=6 Chi2*	1,60*	1,07	1,10*
Selata nevakcinované prasnice	4,84	3,98	4,87	6,03	4,07	P=8 N=0	4,33	2,08	4,56

Vysvětlivky: „*“ = statisticky významný ($P < 0,05$) rozdíl v počtu CFU/g testovaný t-testem,
„Chi2*“ = statisticky významný ($P < 0,05$) rozdíl v počtu salmonela pozitivních (P) a salmonela negativních (N) vzorcích po vyšetření metodou ISO 6579 testovaný Chi2 testem

9 Reference

Volf J., Havlickova H., Hradecka H., Ondrackova P., Matiasovic J., Faldyna M., Rychlík I. (2010) Epidemiology and interaction of *Salmonella enterica* serovar Derby, Infantis and Typhimurium with porcine alveolar macrophages. Vet. Microbiol. 146:105-110

Matiasovic J., Kudlackova H., Babickova K., Stepanova H., Volf J., Rychlík I., Babak V., Faldyna M. (2013) Impact of maternally-derived antibodies against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. Vet J. 196:114-115

10 Dedikace

Funkční vzorek „Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů *Salmonella* Derby, *Salmonella* Infantis a *Salmonella* Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat“ byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1210115) a NPU I (LO 1218).

Vydal: Bioveta, a.s.
Komenského 212/12, 683 23 Ivanovice na Hané

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70, 621 00 Brno

Název: Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů *Salmonella* Derby, *Salmonella* Infantis a *Salmonella* Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat

Autoři: Mgr. Marcel Kosina, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer
Hana Kudláčková
Ing. Lenka Levá
Ing. Hana Havlíčková
MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.
MVDr. František Šišák, CSc.

Funkční vzorek „Inaktivovaná vakcína pro prasata s obsahem antigenů *Salmonella* Derby, *Salmonella* Infantis a *Salmonella* Typhimurium vedoucí k ochraně sajících selat a tlumení salmonel v chovech prasat“ byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1210115) a NPU I (LO 1218).