

Kuczkowski M., Wieliczko A., Department of Epizootiology and Clinic of Bird and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences

This article aims at the presentation of a control measures for salmonellosis in fowl. Salmonellosis is among the most prevalent foodborne diseases worldwide. The disease is transmissible to humans and is an important zoonosis with special implications for veterinarians involved in food hygiene. Contaminated poultry products are major source of *Salmonella* organisms. Immunoprophylaxis is currently being used to reduce the level of *Salmonella* infection in poultry flocks. Efficacious vaccine can reduce the number of carrier birds, the colonization of internal organs, with the special emphasis of reproductive tract, thus the fecal shedding and environmental contamination by the organism. This is a very difficult task, since despite numerous efforts that have been undertaken, the safe, well-defined, efficacious *Salmonella* vaccines are not yet available. This review presents and evaluates the different classes of *Salmonella* vaccines that have been tested.

Keywords: poultry, salmonellosis, *Salmonella* vaccines.

Salmonelozy odgrywają nadal istotną rolę w patologii drobiu. Są źródłem zarówno strat ekonomicznych w produkcji drobiarskiej, jak też stanowią zagrożenie epidemiologiczne. Salmoneloza u ludzi stanowi w dalszym ciągu, mimo zmniejszającej się liczby zachorowań, jeden z istotniejszych problemów związanych z zakażeniami pokarmowymi po spożyciu zanieczyszczonej żywności. Ostatni raport Europejskiego Urzędu do spraw Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) na temat chorób odzwierzęcych

Immunoprofilaktyka salmoneloz u drobiu

Maciej Kuczkowski, Alina Wieliczko

z Zakładu Chorób Ptaków, Zwierząt Egzotycznych, Futerkowych i Laboratoryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu

i czynników zoonotycznych w Europie w 2012 r. wskazuje, że obserwowana od 2005 r. tendencja spadkowa liczby zachorowań ludzi na tle pałeczek *Salmonella* utrzymywała się również w 2012 r. (spadek o 4,7% liczby potwierdzonych przypadków w stosunku do 2011 r.), jednak choroba ta była wciąż na drugim miejscu, po karybakteriozie, pod względem liczby przypadków potwierdzonych laboratoryjnie (1). Z kolei dane zamieszczone w tym raporcie dotyczące występowania zakażeń *Salmonella* u drobiu wykazały w Polsce średnie rozprzestrzenienie zakażeń *Salmonella* w stadach reprodukcyjnych brojlerów (monitorowane były *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Hadar*) na poziomie 2,0% (w UE – 0,4%), w stadach kur niosek (monitorowane *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) – średnio 4,3% wyników dodatnich (w UE – 3,2%) oraz w stadach brojlerów kurzych – 0,3% (w UE – 4,6%), zaś brojlerów indyjskich – 2,5% (w UE – 14,5%). Podobnie jak w przypadku salmoneloz ludzi, najczęściej izolowanym serowarem *Salmonella* ze środowiska utrzymywania ptaków były serowary *Enteritidis* oraz *Typhimurium*. Raport uwzględni również wyniki monitoringu żywności, w tym mięsa drobiowego, które jest jednym z głównych źródeł zakażeń pokarmowych ludzi na tle *Salmonella*. Zróżnicowanie w zakresie wyników jest duże, średnio w UE – 4,1% wyników dodatnich

(w Polsce: skóra szyi – 30,0%, zakłady rozbioru – 22,0%).

Uwzględniając te dane, ograniczanie zakażeń stad drobiu pałeczkami *Salmonella*, a w konsekwencji dalsze zmniejszenie liczby zatruc ludzi na tym tle wymaga kontynuowania podjętych wcześniej decyzji o wielokierunkowych działaniach, w tym kontynuacji programów monitorowania zakażeń stad drobiu pałeczkami *Salmonella* na każdym etapie produkcji (zgodnie z dyrektywą 2003/99/EC). Działania te powinny być kontynuowane również ze względu na problem narastającej liczby szczepów bakteryjnych, w tym izolowanych od drobiu pałeczek *Salmonella* opornych na chemioterapeutyki, co czyni antybiotykoterapię mało skuteczną i stwarza zagrożenie pozostałościami leków w tkankach (mięso, jaja), a także w środowisku. Również w tym aspekcie, tak ze względów gospodarczych oraz w aspekcie ochrony zdrowia publicznego, program kontrolowania zakażeń stad drobiu pałeczkami *Salmonella* z wykorzystaniem szczepień ochronnych jest w pełni uzasadniony. Immunoprofilaktyka może również przyczynić się do racjonalnego wykorzystania antybiotyków w produkcji zwierzęcej.

Szczepienia drobiu przeciwko salmonelozie mają długą historię, szczególnie przeciwko tyfusowi kur z zastosowaniem szczepionki opartej na szczepie szorstkim *S. Gallinarum*, niemniej dopiero od 2008 r.,

zgodnie z art. 3 ust. 3 rozporządzenia Komisji (WE) nr 1168/2006 z 31 lipca 2006 r., wszystkie stada kur niosek są szczepione przeciwko *Salmonella* Enteritidis.

Stosowane do tej pory w praktyce drobiarskiej szczepionki przeciw salmonelozie drobiu obejmują: szczepionki żywe atenuowane, szczepionki inaktywowane oraz szczepionki nowej generacji. Idealna szczepionka powinna być bezpieczna, mieć dobrze określony szczep szczepionkowy, indukować odpowiedź humoralną i komórkową (w tym również miejscową po podaniu *per os* lub na błony śluzowe) oraz indukować odporność krzyżową. W przypadku masowej produkcji zwierząt zainteresowanie kierowane jest na szczepionki podawane z wodą do picia.

Żywe atenuowane szczepionki przeciwko salmonelozie

Immunizacja niepatogennymi, atenuowanymi szczepami *Salmonella* stymuluje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną, dającą długotrwałą ochronę przed zakażeniami. Ponadto po podaniu szczepionek *per os* lub do worka spojówkowego dochodzi do wzrostu miejscowej odporności błon śluzowych, przede wszystkim przewodu pokarmowego, co wydaje się istotne w aspekcie ochrony przed zasiedleniem jelit przez szczepy terenowe *Salmonella* oraz ograniczenia ich rozprzestrzeniania w środowisku. Siewstwo szczepów szczepionkowych jest krótkie, a ich czas przeżycia w środowisku jest krótki z powodu zwiększonej wrażliwości na czynniki zewnętrzne. Szczepy szczepionkowe różnicuje się od terenowych na podstawie morfologii kolonii bakteryjnych lub markerów metabolicznych. Niestety, ze stosowaniem szczepionek żywych, atenuowanych łączy się ryzyko rewersji szczepu szczepionkowego do postaci wirulentnej. Klasyfikacja sposobu pozbawiania drobnoustrojów chorobotwórczych wirulencji (atenuacja) polega między innymi na ich hodowli (pasażach) w warunkach odbiegających od optymalnych. Sposoby atenuacji objęte są zazwyczaj tajemnicą producenta szczepionek, ale najczęściej szczepy bakteryjne namnażane są np. w podwyższonej temperaturze lub na podłożach o zmienionym składzie (2, 3).

Ostatnio coraz częściej obniżenie zjadliwości salmoneli prowadzi się poprzez celowane wywołanie mutacji genów kodujących czynniki wirulencji lub odpowiedzialnych za procesy regulacyjne metabolizmu komórek bakteryjnych. Żywe, atenuowane szczepy szczepionkowe *Salmonella* posiadające mutację lub delecję genu odpowiedzialnego za istotny proces metaboliczny, wirulencję lub przeżycie w organizmie gospodarza mają wiele

zalet. Są niechorobotwórcze, ale zachowują właściwości indukowania u szczepionych ptaków odporności przeciwwakacyjnej. Można je stosować u drobiu, podając z wodą do picia, co umożliwia szczepienie ptaków w każdym wieku, indukują zarówno komórkową, jak i humoralną odporność poszczepioną. Istotną wadą tej grupy szczepionek jest długa przeżywalność w organizmie ptaków, jak również w środowisku, co może stanowić potencjalne ryzyko dla zdrowia konsumentów (4). Jednak długotrwała przeżywalność i siewstwo żywego szczepu szczepionkowego pozwala na horyzontalne jego rozprzestrzenianie się w stadzie, a tym samym naturalne doszczepianie ptaków. Dyskusyjna pozostaje kwestia ewentualnej rewersji szczepu szczepionkowego do postaci zjadliwej. Szczepy szczepionkowe atenuowane w ten sposób mogą odzyskać wirulencję w wyniku rekombinacji ich genomu z genami szczepów terenowych kodujących właściwości chorobotwórcze. Zjawisko rewersji występuje jednak niezwykle rzadko, dotyczy jedynie szczepionek żywych atenuowanych konwencjonalnymi metodami.

Do tej pory przetestowano wiele szczepionek opartych na zmutowanych szczepach szczepionkowych *Salmonella*. Jedną grupę tych szczepionek stanowią szczepionki oparte o szczepy z mutacją genu *aroA*. Gen *aroA* koduje syntezę jednego z kluczowych enzymów procesu biosyntezy związków aromatycznych u bakterii. U pałeczek *Salmonella* jest to jedyna droga do biosyntezy kilku ważnych metabolitów, włączając kwas para-aminobenzoesowy (PABA). Ponieważ związki te są niezbędne do wzrostu bakterii, mutanty *aroA* są niezdolne do namnażania w tkankach kręgowców. Szczepionki takie były testowane już w latach 90. XX wieku. Z badań Coopera i wsp. (5) wynika, że po jednokrotnym zastosowaniu szczepionki *Salmonella* Enteritidis Δ *aroA* *per os*, 1-dniowym kurczętom uzyskano po zakażeniu kontrolnym redukcję stopnia (o 1–2 log) kolonizacji jelit i narządów wewnętrznych. Inna, komercyjna szczepionka Megan[®] Vac 1 (LAH, Cuxhaven) oparta jest na podwójnym mutancie *Salmonella* Typhimurium Δ *cya/crp*. Gen *cya* koduje cyklazę adenylową, zaś *crp* jest receptorem cAMP. Szczepionka Megan[®] Vac 1 testowana była w stadach reprodukcyjnych kur w warunkach fermowych (6). Autorzy wykazali jej efektywność na podstawie redukcji obecności *Salmonella* w jelitach oraz układzie rozrodczym u ptaków po 3-krotnym podaniu *per os* (1 dzień, 2 i 5 tydzień) i doświadczalnym zakażeniu w warunkach fermowych.

Z innych, żywych atenuowanych różnymi sposobami szczepionek zarejestrowanych i stosowanych w kraju w produkcji

drobiarskiej przeciwko salmonelozie wymienić należy (tab. 1):

- szczepionki oparte na szczepie *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* z naturalnymi mutacjami w genach kodujących enzymy metaboliczne (*Avi Pro Salmonella vac E*, *Avi Pro Salmonella vac T* i *Avi Pro Salmonella Duo* – Lohman Animal Health) stosowane również w naszym kraju w stadach kur w celu zmniejszenia zakażeń kur niosek, w szczególności redukcji zakażenia jajników (7);
 - szczepionka, żywa, atenuowana oparta na szczepie *S. Enteritidis* wykazującym niezdolność do syntetyzowania (aukso-trofię) wobec adeniny-histydyny (*Gallivac Se*, Merial; 8);
 - szczepionka oparta na szczepie szorstkim 9R *S. Gallinarum* szeroko stosowana nie tylko w Europie do ograniczenia zakażeń *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* (ochrona krzyżowa) w stadach towarowych kur niosek. W przypadku szczepu szczepionkowego *S. Gallinarum* mutacja dotyczyła *locus* odpowiedzialnego za odrębną ścieżkę biosyntezy lipopolisacharydów. Mutanty szorstkie R syntetyzują niekompletne lipopolisacharydy. Takie szczepy *S. Gallinarum* okazały się efektywnymi immunogenami, jednak nie utraciły one patogenności w odniesieniu do niektórych rodów kur, np. wywodzących się z rasy leghorn (9). Ostatnio testowane są też inne szczepionki żywe – delecyjne, oparte na mutantach szczepów:
 - *S. Enteritidis* Δ *phoP/flicC* (10). Białko FlicC jest głównym komponentem rzęsek (flagellum), PhoP jest białkiem regulatorowym uczestniczącym w wirulencji. Po podaniu szczepionki kurczętom *per os* w 2 i 21 dniu życia obserwowano redukcję obecności *Salmonella* (szczep użyty do zakażenia kontrolnego) w jelitach i wątrobie. Szczepionka okazała się bezpieczna, a dodatkową jej zaletą jest możliwość odróżnienia ptaków szczepionych od zakażonych szczepem terenowym;
 - *S. Enteritidis* Δ *lon/cpxR*. Białko Lon reguluje ekspresję genów inwazyjności, CpxR reguluje ekspresję czynników wirulencji (11);
 - *S. Gallinarum* Δ *cobS/cbiA*, są to geny odpowiedzialne za ścieżkę biosyntezy wit. B12 (12).
- Prowadzone są również badania nad szczepionkami obejmującymi delecję całych wysp patogenności (*Salmonella* pathogenicity islands, SPI). Czynniki wirulencji pałeczek *Salmonella* zgrupowane są głównie w postaci operonów, w chromosomie lub na plazmidzie, w wyspach patogenności. Przykładem jest szczep szczepionkowy *S. Enteritidis* z delecją SPI-1 i SPI-2 (13).

Inaktywowane szczepionki przeciwko salmonelozie

Inaktywowane szczepionki to biopreparaty zawierające całe komórki bakteryjne, inaktywowane na drodze chemicznej lub fizycznej, np. temperaturą, formaliną lub acetonem. Dobrze indukują produkcję swoistych przeciwciał, ponadto ich zaletą jest brak żywego mikroorganizmu, który mógłby przetrwać w środowisku i stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Niestety, inaktywowany antygen może zostać wyeliminowany zbyt szybko z organizmu i nie indukować odpowiednio silnej humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Ponadto większość z tych szczepionek dla osiągnięcia efektu protekcyjnego musi być podawana domięśniowo lub podskórnie i wymaga minimum 2-krotnego szczepienia. Produkty te wymagają również dodatku adiuwantów, co ogranicza formę podania szczepionki.

Z tej grupy szczepionek u drobiu stosowano Salenvac i Salenvac T (Intervet International B.V.), zawierające szczepy hodowane na podłożu o zmniejszonej zawartości żelaza. Po zastosowaniu tych szczepionek w stadach reprodukcyjnych i towarowych kur niosek (immunizacja podskórna, 2-krotna, czasami 3-krotna) uzyskano

zróżnicowane wyniki w zakresie zmniejszenia stopnia kolonizacji jelit szczepami terenowymi, redukcji siewstwa do środowiska szczepu *Salmonella* użytego do zakażenia kontrolnego oraz zróżnicowany stopień zabezpieczenia potomstwa (14, 15). Inne szczepionki inaktywowane zarejestrowane w Polsce przedstawiono w tabeli 1.

Szczepionki przeciwko salmonelozie nowej generacji

Szczepionki podjednostkowe

W ostatnim czasie coraz większe zainteresowanie zyskują szczepionki nowej generacji. Szczepionki podjednostkowe zawierają wysoce oczyszczone, immunogenne antygeny stanowiące fragmenty patogennych mikroorganizmów. Zaletą tych szczepionek jest dobrze zdefiniowany skład, brak ryzyka rewersji szczepu do patogenności i zakażenia oraz możliwość zastosowania wielu systemów nośnikowych. Odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko wyselekcjonowanym antygenom jest bardzo swoista, niemniej wskutek wyselekcjonowania jednego z wielu antygenów zmniejsza jego aktywność, czyli szczepionki te są słabo immunogenne. Stąd do wzbudzenia długotrwałej ochrony konieczne jest stosowanie

kilku dawek przypominających oraz zastosowanie adiuwantów i nośników wspomagających transport, ekspozycję i trwałość w warunkach *in vivo*, co zalicza się do wad tych szczepionek. Większość szczepionek podjednostkowych jest podawana drogą domięśniową lub podskórna, chyba że są one odpowiednio skonstruowane, tak by po podaniu *per os* nie ulegały degradacji antygeny białkowe. Szczepionki podjednostkowe są najczęściej oparte na białkach, peptydach lub polisacharydach zawierających immunogenne epitopy bakterii, wzbudzające odpowiedź układu immunologicznego. Znalezienie efektywnego antygeny do szczepionki podjednostkowej nie jest proste, niemniej zastosowanie metod biologii molekularnej, technologii rekombinacji DNA, biochemii białek, a także mikrobiologii i immunologii daje coraz lepsze rezultaty w konstrukcji swoistych szczepionek podjednostkowych. Szczepionki podjednostkowe mogą być mono- lub poliwalentne, zawierające np. kilka białek danego patogenu.

Niewiele jest szczepionek podjednostkowych przeciw chorobom bakteryjnym zwierząt, w tym przeciw salmonelozie ptaków. Testowane były szczepionki (z różnymi efektami), oparte na białkach błony zewnętrznej (OMP) *S. Enteritidis*,

Tabela 1. Wykaz szczepionek przeciwko salmonelozie drobiu dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej

Nazwa	Postać	Charakterystyka szczepu szczepionkowego	Podmiot odpowiedzialny
Szczepionki żywe, atenuowane			
AviPro Salmonella Duo	szczepionka przeciwko zakażeniom <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i> , żywa, liofilizat do sporządzania zawiesiny, do immunizacji kaczek i kur	szczepy <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i> z naturalnymi mutacjami w genach kodujących enzymy metaboliczne, w odróżnieniu od szczepów terenowych wrażliwe na erytromycynę (15–30 µg/ml) oraz oporne na kwas nalidyksowy (20 µg/ml) i rifampicynę (200 µg/ml)	Lohmann Animal Health GmbH
AviPro Salmonella Vac E	szczepionka przeciwko zakażeniom <i>S. Enteritidis</i> , żywa liofilizat do podawania w wodzie do picia dla kur		
AviPro Salmonella Vac T	szczepionka przeciwko zakażeniom <i>S. Typhimurium</i> , żywa liofilizat do podawania w wodzie do picia dla kur		
Gallivac SE	szczepionka przeciwko zakażeniom wywołanym przez <i>S. Enteritidis</i> liofilizat do sporządzania zawiesiny doustnej	szczep <i>S. Enteritidis</i> auksotroficzny wobec adeniny-histydyny	Merial
Nobilis SG 9R	szczepionka przeciw zakażeniom <i>S. Gallinarum</i> , żywa liofilizat i rozpuszczalnik do sporządzania zawiesiny do wstrzykiwań dla kur	szczep szorstki R <i>S. Gallinarum</i> syntetyzujący niekompletne lipopolisacharydy	Intervet International B.V.
Szczepionki inaktywowane			
Gallimune Se + St	szczepionka przeciwko zakażeniom wywołanym przez <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i> , wodno-olejowa emulsja do wstrzykiwań	inaktywowany szczep <i>S. Enteritidis</i> typ fagowy PT4, inaktywowany szczep <i>S. Typhimurium</i> typ fagowy DT104	Merial
Hipratifus-AV2	szczepionka przeciw salmonelozie drobiu, inaktywowana emulsja do wstrzykiwań dla kur	inaktywowany szczep <i>S. Enteritidis</i> typ fagowy PT4 i inaktywowany szczep <i>S. Typhimurium</i> typ fagowy DT104	Laboratorios Hipra, S.A.
Nobilis Salenvac T	szczepionka przeciwko zakażeniom <i>S. Enteritidis</i> i <i>S. Typhimurium</i> , inaktywowana zawiesina do wstrzykiwań dla kur	inaktywowane szczepy <i>S. Enteritidis</i> typ fagowy PT4 i <i>S. Typhimurium</i> typ fagowy DT104 hodowane na podłożu o zredukowanej zawartości żelaza	Intervet International B.V.
Nobilis Salenvac	szczepionka przeciwko zakażeniom <i>S. Enteritidis</i> , inaktywowana zawiesina do wstrzykiwań dla kur	inaktywowany szczep <i>S. Enteritidis</i> typ fagowy PT4 hodowany na podłożu o zredukowanej zawartości żelaza	

Opracowano na podstawie obwieszczenia prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z 18 marca 2014 r. w sprawie ogłoszenia Urzędowego Wykazu Produktów Leczniczych Dopuszczonych do Obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej (Dz. Urz. Min. Zdrowia z 2014 r., poz. 45)

S. Gallinarum oraz na białku rzęskowym FliC *S. Enteritidis*. Białka OMP są silnie immunogenne i zdolne do pobudzania wytwarzania swoistych przeciwciał i stymulacji limfocytów T (16, 17). Inne szczepionki podjednostkowe konstruowano w oparciu o białka fimbrialne (fimbrie typu 1). Fimbrie są jednym z najbardziej poznanych organelli pośredniczących w adhezji pałeczek *Salmonella* do komórek gospodarza, stanowią doskonały cel dla układu immunologicznego gospodarza, dlatego są wykorzystane do produkcji szczepionek, w tym jako antygeny do opracowania szczepionki podjednostkowej. Testowana szczepionka okazała się bardziej efektywna w zakresie redukcji *Salmonella* w jajniku, natomiast w mniejszym zakresie rejestrowano zmniejszenie kolonizacji jelit (18). W badaniach własnych autorów prowadzonych w Zakładzie Chorób Ptaków wykazano efektywną odpowiedź humoralną po 2-krotnej immunizacji kur niosek preparatem rekombinowanego białka fimbrialnego SefA *Salmonella* Enteritidis z adiuwantem olejowym. Ponadto wykazano, że zarówno białka SefA i FimA *S. Enteritidis* indukowały również komórkową odpowiedź immunologiczną. Obserwowano zwiększoną liczbę komórek T CD4+ w śledzionie (wyraźna reakcja w obrębie populacji splenocytów CD4⁺). Niemniej immunizacja ptaków wpłynęła nieznacznie na redukcję zasiedlenia narządów wewnętrznych przez szczep *S. Enteritidis* użyty do zakażenia (19).

Należy podkreślić, że na tym etapie badań i eksperymentów tylko w warunkach laboratoryjnych (nie testowane w warunkach fermowych) trudno jest powiedzieć, czy szczepionki podjednostkowe będą miały szersze zastosowanie w zwalczaniu salmonelozy w stadach drobiu.

Szczepionki DNA

Firmy farmaceutyczne w odpowiedzi na zapotrzebowanie na bezpieczne i stabilne szczepionki do zwalczania salmoneloz drobiu zwracają się w kierunku alternatywnych technologii. Testuje się szczepionki DNA, które zbudowane są z bakteryjnego plazmidu kodującego szczepionkowy antygen, którego ekspresja indukowana jest przez silny promotor eukariotyczny. Technologia ta pozwala na zachowanie konformacji antygeny, lepszą prezentację antygeny przez komórki posiadające MHC klas I i II, podawanie wielu antygenów szczepionkowych w tej samej konstrukcji. Plazmidowe DNA jest bezpośrednio wstrzykiwane domięśniowo, podskórnie, podawane na błony śluzowe lub w przypadku drobiu *in ovo*. Szczepionki DNA są też stabilne w wysokiej temperaturze, a w miejscu podania występuje łagodna reakcja. Do tej pory potwierdzono

skuteczność szczepionki DNA (SopB DNA, *Salmonella* SPI-1 effector protein) zastosowanej u myszy. Uzyskany efekt ochronny po 2-krotnym szczepieniu myszy szczepionką SopB DNA, zakażonych szczepem *S. Typhimurium*, był porównywalny z uzyskanym u myszy szczepionych żywą, atenuowaną szczepionką *S. Typhimurium*, wykazano znaczną redukcję liczby pałeczek *Salmonella* w śledzionie i wątrobie w 4 i 8 dniu po zakażeniu (20).

Wiele szczepionek DNA przeznaczonych zarówno do stosowania u ludzi, jak i zwierząt jest nadal w fazie eksperymentów lub badań klinicznych. W fazie badań eksperymentalnych są szczepionki DNA z przeznaczeniem dla drobiu, z możliwością podawania *in ovo*, np. przeciwko IB.

Szczepionki wektorowe

Prowadzone są zaawansowane badania nad zastosowaniem awirulentnych szczepów *Salmonella* (głównie *S. Typhimurium*) jako nośnika (wektora) heterologicznych antygenów szczepionkowych w konstrukcji szczepionek podjednostkowych, np. jako nośnika szczepionek DNA przeciwko chorobom wirusowym, jak i bakteryjnym. W przypadku konstrukcji tego typu szczepionek heterologiczny gen musi znajdować się na plazmidzie (ostatnio również w chromosomalnym DNA) pod kontrolą promotora funkcjonalnego w komórkach eukariotycznych (np. promotora wirusa cytomegalii), a rolą pałeczek *Salmonella* jest jedynie dostarczenie DNA plazmidowego do komórek prezentujących antygen (APC). Wektory te dają znaczne korzyści, przede wszystkim zdolność do indukowania silnej odpowiedzi immunologicznej humoralnej, komórkowej i miejscowej na błonach śluzowych oraz łatwość i możliwość podania *per os* lub donosowo. Testowano szczepionki wektorowe (z przeznaczeniem dla ludzi i zwierząt) na bazie atenuowanych szczepów *Salmonella* do immunizacji przeciw różnym patogenom bakteryjnym, np. *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae* czy wirusowym: AI oraz HIV (21, 22). Podkreśla się, że zaletą zastosowania pałeczek *Salmonella* jako wektora jest dodatkowa protekcja przed zakażeniem salmonelami. Natomiast wadą może być utrudnienie diagnostyki, zarówno badań bakteriologicznych, serologicznych, jak i PCR. W zastosowaniu szczepionek wektorowych pokłada się nadzieję na masowe szczepienia drobiu metodą *in ovo*, np. przeciwko grypie ptaków i wielu innym patogenom (23).

W badaniach własnych kurcząt rzeźne immunizowano doustnie szczepem *Salmonella* Typhimurium χ 9718 ekspresjonującym

antygen CjaA *Campylobacter jejuni*. U immunizowanych ptaków obserwowano wysokie poziomy przeciwciał anti-CjaA, zarówno klasy IgY w surowicy oraz IgA w śluzie jelit, jednak w zakresie protekcji uzyskano redukcję kolonizacji jelit przez szczep *Campylobacter jejuni* użyty do zakażenia kontrolnego na poziomie 1–2 stopnie log (24).

Omawiając immunoprofilaktykę, nie sposób pominąć roli adiuwantów, ponieważ niektóre szczepionki, również podjednostkowe, są mniej immunogenne niż żywe, atenuowane czy inaktywowane. Stąd też stosuje się już znane adiuwanty (np. wodorotlenek glinu) lub poszukuje się nowych, które są w stanie stymulować humoralną i komórkową odpowiedź poszczepienną. To zagadnienie wymaga oddzielnego opracowania, bowiem obecnie prowadzone są intensywne badania nad adiuwantami nowej generacji, np. oligodeoksynukleotydami (ODNs) zawierającymi niemetylowane motywy CpG (CpG – ODN). Już w latach 90. ubiegłego wieku wykazano, że bakteryjne DNA (bDNA) posiada właściwości immunostymulujące (25). U ptaków prowadzono badania nad możliwością wykorzystania ODN CpG w celu ochrony kurcząt przed zakażeniem *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* (26, 27). Prowadzone są także badania nad możliwością wykorzystania oligodeoksynukleotydów zawierających motywy CpG jako adiuwantów szczepionek przeciwko ptasiej grypie H5N1. Wyniki wskazują, że równoczesne podanie CpG ODN wraz ze szczepionką powoduje wzrost poziomów IgY w surowicy i IFN- γ oraz wyższe miano przeciwciał określane testem hamowania hemaglutynacji (HI). Świadczy to o zaangażowaniu humoralnej i Th1-zależnej odpowiedzi immunologicznej oraz zwiększeniu ochronnego działania użytej szczepionki (28). Badania z tego zakresu były ostatnio realizowane w naszej katedrze. W tym zakresie oceniano odpowiedź immunologiczną kurcząt po podaniu oligodeoksynukleotydów zawierających motywy CpG oraz badano wpływ działania ODN CpG jako immunomodulatora na czas antybiotykoterapii u kurcząt (29).

Reasumując, stosowanie szczepień ochronnych to jedna z istotnych strategii zwalczania chorób zakaźnych, w tym salmonelozy u drobiu. Obecność na rynku coraz efektywniejszych i bezpieczniejszych szczepionek nowej generacji należy ściśle łączyć z rozwojem nowoczesnych technik biologii molekularnej, inżynierii genetycznej oraz immunologii i biologii patogenów.

Piśmiennictwo

- Osek J., Wieczorek K.: Choroby odzwierzęce i czynniki zoonotyczne w Europie w 20102 r. – raport Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). *Życie Wet.* 2014, 89, 472–478.

2. Barrow P.A.: *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol.* 2007, **36**, 1–13.
3. Gast R.K.: Serotype-specific and serotype independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis.* 2007, **51**, 817–828.
4. Tan S., Gyles C.L., Wilkie B.N.: Evaluation of an aroA mutant *Salmonella typhimurium* vaccine in chickens using modified semisolid Rappaport Vassiliadis medium to monitor faecal shedding. *Vet. Microbiol.* 1997, **54**, 247–254.
5. Cooper G.L., Venables L.M., Woodward M.J., Hormaeche C.E.: Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis* aroA live oral vaccine candidate. *Infect. Immun.* 1994, **62**, 4747–4754.
6. Dórea F.C., Cole D.J., Hofacre C., Zamperini K., Mathis D., Doyle M.P., Lee M.D., Maurer J.J.: Effect of *Salmonella* vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, **76**, 7820–7825.
7. Gantois I., Ducatelle R., Timbermont L., Boyen F., Bohez L., Haesebrouck F., Pasmans F., Van Immerseel F.: Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac E and TAD *Salmonella* vac T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine.* 2006, **24**, 6250–6255.
8. Springer S., Lindner T., Ahrens M., Woitow G., Prandini F., Selbitz H.J.: Duration of immunity induced in chickens by an attenuated live *Salmonella* Enteritidis vaccine and an inactivated *Salmonella* Enteritidis/Typhimurium vaccine. *Berl.Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2011, **124**, 89–93.
9. Silva E.N., Snoeyenbos G.H., Weinack O.M., Smyser C.E.: Studies on the use of 9R strain of *Salmonella* Gallinarum as a vaccine in chickens. *Avian Dis.* 1981, **25**, 38–52.
10. Methner U., Barrow P.A., Berndt A., Rychlik I. *Salmonella enteritidis* with double deletion in phoPflC – a potential live *Salmonella* vaccine candidate with novel characteristics for use in chickens. *Vaccine*, 2011, **29**, 3248–3253.
11. Nandre R.M., Matsuda K., Chaudhari A.A., Kim B., Lee J.H.: A genetically engineered derivative of *Salmonella* Enteritidis as novel live vaccine candidate for salmonellosis in chickens. *Res. Vet. Sci.* 2012, **93**, 596–603.
12. Penha Filho R.A., de Paiva J.B., da Silva M.D., de Almeida A.M., Berchieri A. Jr: Control of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in birds by using live vaccine candidate containing attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strain. *Vaccine.* 2010, **28**, 2853–2859.
13. Matulova M., Havlickova H., Sisak F., Rychlik I.: Vaccination of chickens with *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 and SPI2 defective mutants of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *Vaccine.* 2012, **30**, 2090–2097.
14. Clifton-Hadley F.A., Breslin M., Venables L.M., Spriggins K.A., Cooles S.W., Houghton S., Woodward M.J.: A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Vet. Microbiol.* 2002, **89**, 167–179.
15. Woodward M.J., Gettinby G., Breslin M.F., Corkish J.D., Houghton S.: The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol.* 2002, **31**, 383–392.
16. Bouzoubaa K., Nagaraja K.V., Newman J.A., Pomeroy B.S.: Use of membrane proteins from *Salmonella* gallinarum for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.* 1987, **31**, 699–704.
17. Khan M.L., Fadl A.A.: Venkitanarayanan K.S.: Reducing colonization of *Salmonella* enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins. *J. Appl. Microbiol.* 2003, **95**, 142–145.
18. De Buck J., Van Immerseel F., Haesebrouck F., Ducatelle R.: Protection of laying hens against *Salmonella enteritidis* by immunization with type 1 fimbriae. *Vet. Microbiol.* 2005, **105**, 93–101.
19. Kuczowski M., Wieliczko A., Kisiela D., Mazurkiewicz M., Ugorski M.: Cellular response and protective effect in hens immunised with *Salmonella* Enteritidis recombinant fimbrial SefA, FimA and AgfA protein. *Bull Vet Inst. Pulawy.* 2004, **48**, 375–382.
20. Nagarajan A.G., Balasundaram S.V., Janice J., Karnam G., Eswarappa S.M., Chakravorty D.: SopB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a potential DNA vaccine candidate in conjugation with live attenuated bacteria. *Vaccine.* 2009, **27**, 2804–2811.
21. Buckley A.M., Wang J., Hudson D.L., Grant A.J., Jones M.A., Maskell D.J., Stevens M.P.: Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine.* 2010, **28**, 1094–1105.
22. Layton S.L., Morgan M.J., Cole K., Kwon Y.M., Donoghue D.J., Hargis B.M., Pumford N.R.: Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Clin Vaccine Immunol.* 2011, **18**, 449–454.
23. Avakian A.P., Poston R.M., Kong F.K., Van Kampen K.R., Tang D.C.: Automated mass immunization of poultry: the prospect for nonreplicating human adenovirus-vectored in ovo vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2007, **6**, 457–465.
24. Łaniewski P., Kuczowski M., Chrzęstek K., Woźniak A., Wysznińska A., Wieliczko A., Jagustyn-Krynicka E.K.: Evaluation of the immunogenicity of *Campylobacter jejuni* CjaA protein delivered by *Salmonella* enterica sv. Typhimurium strain with regulated delayed attenuation in chickens. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014, **30**, 281–292.
25. Krieg A., Yi A., Matson S., Waldschmidt T., Bishop G., Teasdale R., Koretzky G., Klinman D.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995, **374**, 546–549.
26. Mackinnon K.M., He H., Swaggerty C.L., McReynolds J.L., Genovese K.J., Duke S.E., Nerren J.R., Kogut M.H.: *In ovo* treatment with CpG oligodeoxynucleotides decreases colonization of *Salmonella enteritidis* in broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, **127**, 371–375.
27. Taghavi A., Allan B., Mutwiri G., Van Kessel A., Willson P., Babiuk L., Potter A., Gomis S.: Protection of neonatal broiler chicks against *Salmonella* Typhimurium septicaemia by DNA containing CpG motifs. *Avian Dis.* 2008, **52**, 398–406.
28. Wang Y., Shan C., Ming S., Liu Y., Du Y., Jiang G.: Immunoadjuvant effects of bacterial genomic DNA and CpG oligodeoxynucleotides on avian influenza virus subtype H5N1 inactivated oil emulsion vaccine in chicken. *Res Vet Sci.* 2009, **86**, 399–405.
29. Chrzęstek K., Wieliczko A.: Impact of CpG oligodeoxynucleotide stimulation on percentage of T and B cells in chicken. *PJVetSci.* 2013, **16**, 551–554.

Dr Maciej Kuczowski, Zakład Chorób Ptaków, Zwierząt Egzotycznych, Futerkowych i Laboratoryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław, e-mail: maciej.kuczowski@up.wroc.pl