

# Charakterystyka elektroforetyczna białek błony zewnętrznej szczepów *Salmonella Enteritidis* hodowanych w zróżnicowanych warunkach oraz ocena ich właściwości antygenowych

ANDRZEJ PUCHALSKI, AGNIESZKA KOLASA\*, MARTA DEC,  
RENATA URBAN-CHMIEL, DANUTA KOWALCZYK-PECKA\*\*

Zakład Prewencji Weterynaryjnej Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\*Zakład Chorób Ptaków Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głębocka 30, 20-033 Lublin

\*\*Katedra Zoologii Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Akademicka 13, 20-033 Lublin

Puchalski A., Kolasa A., Dec M., Urban-Chmiel R., Kowalczyk-Pecka D.

## Electrophoretic characterization of outer membrane proteins of *Salmonella Enteritidis* strains grown in diversified conditions and the estimation of their antigenic properties

### Summary

The purpose of the study was both to estimate the electrophoretic profiles (SDS-PAGE) of outer membrane proteins among *Salmonella Enteritidis* strains isolated from humans and poultry, as well as to identify the antigens which can induce the appearance of a specific antibody response among vaccinated animals. The densitometry analysis of electrophoregrams showed that a single protein complex of 21 fractions was distinctive for strains grown in standard conditions. Among these fractions those with 20, 22, 35 and 37 kDa characterized by high optical density were found dominant. A single protein profile with 24 fractions was also characteristic of strains grown in conditions with restricted access to iron ions. A high optical density was a feature of proteins with 19, 35, 37, 55 and 74 kDa. Adding of 200  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl to the culture medium caused the expression of proteins and 78 kDa taking part in obtaining and transporting iron through *S. Enteritidis* within a mass range of 19, 55, 70, and 74. Densitometry analysis of electrophoregrams obtained from nitrocellulose membranes for proteins from bacterial strains grown in conditions with restricted access to iron ions indicated the presence of specific, intensive reactions towards the antigens of 35 and 55 kDa. As far as proteins obtained from bacterial culture grown with and without the addition of chelator were concerned, distinctive reactions were found towards antigens of 35 and 58 kDa. The main protein present in electrophoregrams of bacteria grown both with and without a supplement of chelator and in immunoblotting reactions was that of 35 kDa, belonging to porins of OmpA type.

**Keywords:** *Salmonella Enteritidis*, outer membrane proteins, immunogenicity

W Polsce zatrucia pokarmowe i infekcje powodowane przez *Salmonella Enteritidis* stanowią poważny problem od wielu lat. Udział tych drobnoustrojów w zatruciach pokarmowych u ludzi pozostaje w ścisłym związku z powszechnym występowaniem salmonelli wśród ptaków (11, 20, 21). Ograniczenie zakażeń drobiu, a w konsekwencji obniżenie liczby salmonelloz u ludzi, wymaga działań mających na celu uzyskanie wolnych od infekcji stad ptaków oraz objęcie ich programem nadzoru i profilaktyki. Na mocy ustawy z dnia 11 marca 2004 r. „O ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt” salmonelloza

drobiu podlega obowiązkowi rejestracji oraz figuruje w wykazie chorób odzwierzęcych podlegających obowiązkowi monitorowania (24).

W profilaktyce salmonelloz u drobiu dopuszcza się możliwość stosowania szczepień ochronnych przy wykorzystaniu zarówno szczepionek inaktywowanych, jak i atenuowanych. Na podstawie wielu doświadczeń stwierdzono, że ani zabite, ani żywe szczepionki nie zabezpieczają całkowicie przed bakteriami *Salmonella* (5, 14, 26). Istotnym celem jest więc doskonalenie prac nad rozwojem szczepionek podjednostkowych, zawierających nietoksyczne komponenty bakteryjne, indu-

kujące zarówno wysokie miana przeciwciał ochronnych, jak i mechanizmy odporności komórkowej, które odgrywają ważną rolę w eliminacji salmonelli.

Wśród czynników wirulencji *S. Enteritidis*, które są potencjalnymi immunogenami, istotną rolę jako komponenty szczepionek podjednostkowych mogą odgrywać białka błony zewnętrznej (outer membrane proteins – OMPs). Pełnią one główną rolę w adaptacji bakterii do niesprzyjającego dla nich środowiska gospodarza (13).

Próby wykorzystania białek błony zewnętrznej do produkcji szczepionek idą w kilku kierunkach. Prowadzone są intensywne prace mające na celu stworzenie szczepionek wykorzystujących białka uczestniczące w transporcie żelaza oraz proteiny typu OmpA, które są antygenowo spokrewnione u wielu bakterii Gram-ujemnych (15, 22). Zaawansowane są też próby opracowania i wykorzystania szczepionek zawierających białka błony zewnętrznej, które uczestniczą w procesie przylegania *S. Enteritidis* do nabłonka jelitowego (4, 25).

Należy jednak pamiętać, że niektóre białka błony wewnętrznej *Salmonella* mogą być odpowiedzialne za hamowanie biologicznej aktywności komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. W badaniach Chander i wsp. (2) wykazano, że białko *S. Typhi* o masie 55 kDa, którego ekspresja wzrasta w pod wpływem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych obecnych w jelitach gospodarza, indukuje apoptozę makrofagów. W innych badaniach zidentyfikowano białka błony wewnętrznej *S. Typhimurium* uczestniczące w ochronie tych patogennych mikroorganizmów przed działaniem peptydów przeciwbakteryjnych w organizmie gospodarza (6). Identyfikacja czynników, które osłabiają odpowiedź immunologiczną, może pozwolić na ich wyeliminowanie ze szczepionek w celu uzyskania lepszej odporności.

Z uwagi na brak w warunkach krajowych badań obejmujących charakterystykę profili białek błony zewnętrznej wśród izolowanych od ludzi i drobiu szczepów *S. Enteritidis* oraz nieliczne publikacje z tego zakresu za granicą, celem badań było określenie profili elektroforetycznych (SDS-PAGE) białek błony zewnętrznej szczepów *S. Enteritidis* oraz identyfikacja tych antygenów, które indukują pojawienie się swoistych przeciwciał u szczepionych zwierząt. Uzyskane wyniki powinny umożliwić wyselekcjonowanie białek, które ewentualnie mogłyby znaleźć zastosowanie w przygotowaniu szczepionki podjednostkowej.

### Materiał i metody

W badaniach wykorzystano różniące się pod względem typu bakteriofagowego, 4 szczepy *S. Enteritidis* izolowane od ludzi i drobiu, pochodzące z kolekcji Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt w Lublinie.

Do momentu rozpoczęcia badań wszystkie szczepy przechowywane były na bulionie tryptozowo-sojowym z dodatkiem 30% glicerolu, w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Przynależność szczepów do serowaru *S. Enteritidis* potwierdzona została w badaniu mikrobiologicznym, biochemicznym i serologicznym (17).

Białka błony zewnętrznej otrzymano wg metody zaproponowanej przez Morton i wsp. (16). Wykorzystane w doświadczeniu szczepy bakteryjne hodowane były zarówno w warunkach standardowych, jak i przy ograniczonym dostępie do jonów żelaza, na bulionie tryptozowo-sojowym przez 14 godzin w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . W celu wywołania ekspresji białek biorących udział w pozyskiwaniu i transporcie żelaza przez komórki bakteryjne, do podłoża wzrostowego dodawano  $200\ \mu\text{M}$  2,2-dipirydyli (Sigma) jako chelatora. Komórki bakteryjne, po przepłukaniu w PBS, wirowano przez 20 min. w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  ( $20\ 000 \times g$ ), a uzyskany osad zawieszano w 25 ml 0,01 M buforu HEPES (Sigma) o pH 7,4 z dodatkiem 20% sacharozy. Schłodzone w łaźni lodowej komórki bakteryjne rozbijano ultradźwiękami w pięciu 30-sekundowych cyklach, przy maksymalnej mocy urządzenia (Ultrasonic desintegrator type UD-20, Techpan). Komórki, które nie zostały rozbite, usuwano poprzez wirowanie (20 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $5000 \times g$ ), a powstały supernatant ponownie wirowano przy  $50\ 000 \times g$  przez 4 godz. w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . W dalszej procedurze pozyskiwania OMPs osad zawieszano w 1% roztworze Sarkosylu (sól sodowa N-laurylo-sarkozyny, Sigma) i ostrożnie mieszano przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Nie rozpuszczone, zewnętrzne membrany były zbierane przez wirowanie ( $50\ 000 \times g$  przez 12 godz. w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ ). Uzyskany osad przepłukiwano i zawieszano w 1 ml w sterylnej wody dejonizowanej.

Koncentrację białka w poszczególnych ekstraktach określano metodą Bradforda (1), wykorzystując odczynnik wskaźnikowy Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Pomiaru dokonano przy użyciu czytnika Multiskan Plus (Labsystem), stosując filtr o długości fali 595 nm.

Analizę białek błony zewnętrznej przeprowadzono z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE wg Laemmli (12). Rozdział prowadzono w 12% żelu rozdzielającym (Tris-HCl, pH 8,8). Jako żel wprowadzający zastosowano 4% poliakrylamid w buforze Tris-HCl o pH 6,8. Elektroforezę prowadzono w standardowym buforze komorowym Tris-Glicyna przy stałym napięciu 100 V. Jako wzorzec masowy zastosowano PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas), z zakresem mas od 11 do 170 kDa. Żele barwione błękitem kumazyny R-250 (Sigma), po odbarwieniu tła, analizowano densytometrycznie przy pomocy systemu do dokumentacji żeli Gel-Doc (Bio-Rad) i programu komputerowego Quantity One (Bio-Rad). W analizie uwzględniono masę cząsteczkową i gęstość optyczną frakcji białkowych badanej próbki.

Właściwości antygenowe poszczególnych frakcji białkowych oceniono na podstawie reakcji immunoblotingu wg procedury Towbin i wsp. (23). Frakcje białkowe uzyskane w rozdziale elektroforetycznym przenoszono na błonę nitrocelulozową (Supported Nitrocellulose Membrane;  $0,2\ \mu\text{m}$ ; Bio-Rad), przy użyciu aparatu (Gibco, Mino V 8x10), przy stałym napięciu 100 V, przez 1 godz. w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . Jako wzorzec masowy zastosowano PageRuler™ Prestained Protein Ladder z zakresem mas od 11 do 170 kDa. W etapie pierwszego przeciwciała zastosowano rozcieńczoną 1 : 100, natywną surowicę królika immunizowanego pełnymi komórkami *S. Enteritidis* (Immunolab). W etapie drugiego przeciwciała zastosowano surowicę kozią, zawierającą skoniugowane z peroksydazą chrzanową przeciwciała przeciwko IgG królika, w rozcieńczeniu 1 : 5000 (Bio-Kom). W celu wywołania reakcji barwnej, jako substrat wykorzystano 1,4 chloronaftol (Bio-Rad). Analizę densytometryczną uzyskanych obrazów przeprowadzono z pomocą systemu do dokumentacji żeli Gel Doc 2000 (Bio-Rad) i programu komputerowego Quantity One.

## Wyniki i omówienie

Analiza densytometryczna rozdziału elektroforetycznego wykazała, że dla szczepów hodowanych w warunkach standardowych charakterystyczny był jeden profil białkowy z 21 frakcjami o masie 15, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 31, 32, 33, 35, 37, 40, 42, 45, 48, 53, 58, 66, 90 kDa (ryc. 1; ścieżki 2, 4, 6 i 8). Frakcje o masie 20, 22, 35 i 37 kDa, charakteryzujące się wysoką gęstością optyczną ( $OD \geq 0,3$ ) określono jako główne. Dla szczepów hodowanych w warunkach z ograniczonym dostępem do jonów żelaza charakterystyczny był również jeden profil białkowy z obecnością 24 frakcji (ryc. 1; ścieżki 1, 3, 5 i 7). Zidentyfikowano białka o masie 15, 17, 18, 19, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 35, 37, 40, 44, 46, 51, 55, 62, 66, 70, 74, 78, 90 kDa. Najwyższą gęstością optyczną ( $OD \geq 0,3$ ) charakteryzowały się białka o masie 19, 35, 37, 55 i 74 kDa. W opinii Poppe i wsp. (19), wysoka homologia w zakresie ilości uzyskanych frakcji, ich masy cząsteczkowej i gęstości optycznej zarówno dla szczepów hodowanych z, jak i bez dodatku chelatora może świadczyć o bliskim pokrewieństwie użytych w badaniach szczepów *S. Enteritidis*.

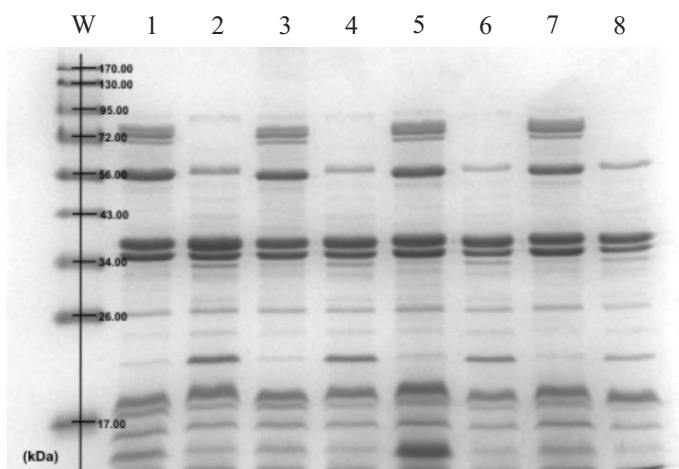
Dodatek do podłoża wzrostowego 200  $\mu$ M 2,2-dipirydylu spowodował ekspresję białek biorących udział w pozyskiwaniu i transporcie żelaza przez *S. Enteritidis*. Były to dobrze widoczne w żelu proteiny o masie 19, 55, 70, 74 i 78 kDa oraz słabiej widoczne prążki o masie 30, 51 oraz 62 kDa. Dla bakterii hodowanych bez dodatku chelatora charakterystyczna była ekspresja białek o masie 20, 31, 42, 45, 48, 53 i 58 kDa. Niektóre białka błony zewnętrznej szczepów *S. Enteritidis* hodowanych w tych warunkach ulegały większej ekspresji niż w warunkach z ograniczonym dostępem jonów żelaza. Były to proteiny o masie 22 i 33 kDa.

W dostępnym piśmiennictwie, w którym analizowano profile białek błony zewnętrznej *S. Enteritidis*, starano się wyodrębnić białka charakterystyczne dla po-

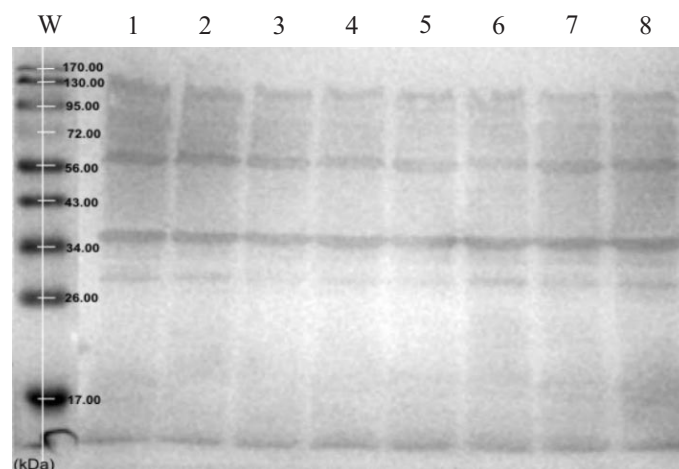
szczególnych izolatów. İçgen i wsp. (7, 8) przebadali szczepy *S. Enteritidis* wyizolowane od ludzi, kurcząt i z jaj, oceniając ich antybiotykooporność, profile plazmidowe, typy fagowe oraz profile elektroforetyczne lipopolisacharydów i OMPs. Wśród nich 64,6% zawierały główne białka o masie 30,6 i 34,6 kDa., a 32,9% charakteryzowały się obecnością protein o masie 27,2; 30,6 i 34,6 kDa. Dwa szczepy izolowane od kurcząt miały inny profil elektroforetyczny, dla którego charakterystyczne było występowanie białek o masie 25,6; 27,2; 30,6 i 34,6 kDa. W badaniach przeprowadzonych przez Poppe i wsp. (19) określono profile elektroforetyczne białek błony zewnętrznej 318 szczepów *S. Enteritidis* wyizolowanych od drobiu, dla których charakterystyczne były główne frakcje o masie 37, 40 i 42 kDa. Niewielkie różnice w ilości oraz rozmieszczeniu frakcji białkowych występujące w cytowanych eksperymentach i badaniach własnych, mogą być wynikiem odmiennych warunków hodowli, procedur ekstrakcji białek oraz gęstości żelu.

Bakterie jelitowe, w tym pałeczki *Salmonella*, zaspokajają swoje zapotrzebowanie na jony żelaza głównie wykorzystując siderofory. Kompleks żelaza z sideroforem jest wiązany ze specyficznym błonowym receptorem białkowym IROMPs (iron – repressible outer membrane proteins). Większość sideroforów *Salmonella* należy do klasy katecholowej – enterobaktyny. Niektóre szczepy wytwarzają aerobaktyny – siderofory klasy hydroksamowej. U wielu bezwzględnie i warunkowo chorobotwórczych bakterii zaobserwowano wyraźną zbieżność chorobotwórczości z wytwarzaniem sideroforów. Wprowadzenie egzogennych sideroforów do organizmu zwierząt doświadczalnie zakażonych szczepami rodzaju *Salmonella* znacznie zwiększało zjadliwość tych bakterii (10).

W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano obecność IROMPs o masie 19, 55, 70, 74 i 78 kDa. Jest to zgodne z wynikami badań przeprowadzonych przez



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny (SDS-PAGE) białek błony zewnętrznej *Salmonella Enteritidis*



Ryc. 2. Obraz reakcji immunoblottingu natywnej surowicy królika immunizowanego pełnymi komórkami *Salmonella Enteritidis* z białkami błony zewnętrznej

Objaśnienia do ryc. 1 i 2: W – wzorzec masowy (11-170 kDa); 1, 3 – *Salmonella Enteritidis* izolowana od drobiu, hodowana na podłożu z chelatorem; 2, 4 – szczepy izolowane od drobiu, hodowane na podłożu standardowym; 5, 6 – szczepy izolowane od człowieka, hodowane na podłożu z chelatorem; 6, 8 – szczepy izolowane od człowieka, hodowane na podłożu standardowym

Chart i wsp. (3). W badaniach wykonanych przez Kingsley i wsp. (9) zidentyfikowano frakcję o masie 74 kDa jako receptor aerobakty (IutA) oraz frakcję o masie 78 kDa jako receptor enterobakty (FhuA). Według tych autorów, białka te należy brać pod uwagę w konstruowaniu szczepionek wykorzystywanych w swoistej immunoprofilaktyce zakażeń *S. Enteritidis*.

Interesujące informacje na temat udziału białek błony zewnętrznej w patogenezie zakażeń powodowanych przez *S. Enteritidis* u drobiu podaje Fadl i wsp. (4). Przy użyciu linii komórek Int-407 nabłonka jelita ludzkiego embrionu zidentyfikowali oni białka błony zewnętrznej, które ulegają ekspresji w trakcie przylegania bakterii do komórek nabłonka jelitowego. Scharakteryzowano szereg białek ekstrahowanych z *S. Enteritidis* hodowanych w tych warunkach. Były to proteiny o masie 19,3; 31,2; 35,5; 49,2; 75,6 i 82,3 kDa. Białka te nie były rozpoznawane w komórkach *S. Enteritidis* hodowanych w bulionie LB. Białka o masie 75,6 i 82,3 kDa dawały wyraźne prążki w reakcji immunoblottingu z poliklonalnymi przeciwciałami przeciwko *Salmonella Enteritidis*. Białka te zostały uznane za bardzo immunogenne. Szczepienie tymi białkami w kombinacji z odpowiednim adiuwantem może zabezpieczyć ptaki przed kolonizacją jelit pałeczkami *S. Enteritidis*.

Analiza densytometryczna obrazów uzyskanych na błonach nitrocelulozowych w reakcji immunoblottingu wykazała dla białek ekstrahowanych z bakterii hodowanych w warunkach ograniczonego dostępu do jonów żelaza obecność swoistych reakcji w stosunku do antygenów o masie 18, 28, 32, 35, 55, 62, 66, 72, 90 i 100 kDa (ryc. 2; ścieżki 1, 3, 5 i 7). Najbardziej intensywne reakcje dotyczyły antygenów o masie 35 i 55 kDa. W odniesieniu do białek ekstrahowanych z bakterii hodowanych na podłożu bez dodatku chelatora stwierdzono wyraźne reakcje w stosunku do antygenów o masie 35 i 58 kDa i słabsze dla białek o masie 18, 28, 32, 37, 63, 66, 72, 90 i 100 kDa (ryc. 2; ścieżki 2, 4, 6 i 8). Białka o masie 63, 72 i 100 kDa były niewidoczne w obrazie elektroforetycznym. Rozbieżności w uzyskanych obrazach mogą sugerować zbyt niską czułość użytej techniki barwienia żeli, natomiast wysoką antygenowość białek niewidocznych w rozdzielach elektroforetycznych.

Analiza porównawcza wyników immunoblottingu oraz rozdzielów elektroforetycznych (SDS-PAGE) pozwala stwierdzić, że w badanej surowicy nieobecne były przeciwciała dla większości frakcji białkowych widocznych na żelach poliakrylamidowych. Może to, z jednej strony, świadczyć o braku lub słabej immunogenności tych frakcji. Z drugiej strony, może to być wynikiem tego, że surowica użyta w immunoblottingu pochodziła od królika immunizowanego pełnymi komórkami *S. Enteritidis*, u których dostępność układu immunologicznego do białek błony zewnętrznej była utrudniona.

Białkiem głównym, obecnym w obrazach elektroforetycznych bakterii hodowanych z dodatkiem i bez chelatora, a także w obrazie reakcji immunoblottingu była proteina o masie 35 kDa. W opinii Ochoa-Repáraz i wsp. (17), należy ją zaliczyć do termolabilnych poryn typu

OmpA. Białka OmpA nadające stabilność błonie zewnętrznej bakterii, stanowią ważną barierę chroniącą bakterie przed działaniem dopełniacza. Przemawia to za możliwością ich wykorzystania jako immunogenu w szczepionkach stosowanych w immunoprofilaktyce zakażeń *S. Enteritidis*.

## Piśmiennictwo

- Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- Chander H., Majumdar S., Sapru S., Rishi P.: 55 kDa outer-membrane protein from short-chain fatty acids exposed *Salmonella enterica* serovar Typhi induces apoptosis in macrophages. *Antonie van Leeuwenhoek* 2006, 89, 317-323.
- Chart H., Rowe B.: Iron restriction and the growth of *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* 1993, 110, 41-47.
- Fadl A. A., Venkitaanareyanan K. S., Khan M. I.: Identification of *Salmonella Enteritidis* outer membrane proteins expressed during attachment to human intestinal epithelial cells. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92, 180-186.
- Głońska R., Dziadziuszko H., Kunikowska D., Lis M., Wicha M., Heleski M., Tokarska-Pietrzak E., Strzałkowski L., Bugajak P.: Immunovac – poliwalentna szczepionka przeciw salmonellozom kur. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 1105-1109.
- Guina T., Yi E. C., Wang H., Hackett M., Miller S. I.: A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha helical antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 4077-4086.
- İçgen B., Gürakan G. C., Özcengiz G.: Characterization of *Salmonella Enteritidis* isolates of chicken, egg and human origin from Turkey. *Food Microbiol.* 2002, 19, 375-382.
- İçgen B., Gürakan G. C., Özcengiz G.: Effects of plasmid curing on antibiotic susceptibility, phage type, lipopolysaccharide and outer membrane protein profiles in local *Salmonella* isolates. *Food Microbiol.* 2001, 18, 631-635.
- Kingsley R., Rabach W., Stephens P., Roberts M., Reissbrodt R., Williams P. H.: Iron supplying systems of *Salmonella* in diagnostics, epidemiology and infection. *Immunol. Med. Microbiol.* 1995, 11, 257-264.
- Kochan I., Wagner S. K., Wasynczuk J.: Effect of iron on antibacterial immunity in vaccinated mice. *Infect. Immun.* 1984, 43, 543-548.
- Kowalczyk-Pecka D., Wernicki A., Puchalski A.: Lekowrażliwość oraz typy bakteriofagów szczepów *Salmonella Enteritidis* izolowanych na terenie makroregionu lubelskiego. *Przegl. Epidemiol.* 2003, 57, 201-209.
- Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- Lin J., Huang S., Zhang Q.: Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect.* 2002, 4, 325-331.
- Mastroeni P., Chabalgoity J. A., Dunstan S. J., Maskell D. J., Dougan G.: *Salmonella*: immune response and vaccines. *Vet. J.* 2000, 161, 132-164.
- Meenakshi M., Bakshi C. S., Butchiahai G., Bansal M. P., Siddiqui M. Z., Singh V. P.: Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella enteritidis*. *Vet. Res. Commun.* 1999, 23, 81-90.
- Morton R. J., Simons K. R., Confer A. W.: Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. *Vet. Microbiol.* 1996, 51, 319-330.
- Ochoa-Repáraz J., Sesma B., Álvarez M., Renedo M. J., Irache J. M., Gamazo C.: Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella Enteritidis* against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet. Res.* 2004, 35, 291-298.
- Polska Norma PN ISO 6579:2003: Mikrobiologia – ogólne zasady metod wykrywania pałeczek *Salmonella*.
- Poppe C., McFadden K. A., Brouwer A. M., Demczuk W.: Characterization of *Salmonella enteritidis* strains. *Can. J. Vet. Res.* 1993, 57, 176-184.
- Przybylska A.: Zatrucia i zakażenia pokarmowe w 2000 roku. *Przegl. Epidemiol.* 2002, 56, 293-304.
- Rose N., Beaudreau F., Drouin P., Toux J. Y., Rose V., Colin P.: Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Vet. Med.* 1999, 39, 265-277.
- Tabaraie B., Sharma B. K., Sharma P. R., Sehgal R., Ganguly N. K.: Evaluation of *Salmonella* porins as a broad spectrum vaccine candidate. *Microb. Immunol.* 1994, 38, 553-559.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4350-4354.
- Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. O ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. *Dz. U.* Nr 69, poz. 625.
- Wizemann T., Adamou J., Langermann S.: Adhesins as targets for vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5, 395-403.
- Zhang-Barber L., Turner A. K., Barrow P. A.: Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine* 1999, 17, 2538-2545.

Adres autora: dr Andrzej Puchalski, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: andrzej.puchalski@ar.lublin.pl