



## FUNKČNÍ VZOREK

---

**Vaječná hmota obsahující protilátky  
IgY specifické proti *Clostridium difficile*  
a *Clostridium perfringens***

**MVDr. Josef Krejčí  
Hana Kudláčková  
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.  
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.  
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.  
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

5472  
2017

**Funkční vzorek 5472/2017**

**Vaječná hmota obsahující protilátky IgY specifické proti  
*Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens***

**MVDr. Josef Krejčí  
Hana Kudláčková  
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.  
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.  
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.  
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1510218) a Národního programu udržitelnosti NPU-I (LO1218) a projektu Ministerstva zemědělství ČR RO0517.

**2017**

**ISBN 978-80-88233-13-8**

## OBSAH

<b>1. Úvod</b>	<b>3</b>
<b>2. Cíl metodiky</b>	<b>5</b>
<b>3. Vlastní popis funkčního vzorku</b>	<b>5</b>
3.1. Příprava antigenů pro imunizaci slepic	5
3.2. Zvířata, jejich imunizace	7
3.3. Příprava vodné frakce	6
3.4. ELISA	7
3.5. Westernblotting	9
<b>4. Srovnání „novosti postupů“</b>	<b>10</b>
<b>5. Uplatnění funkčního vzorku</b>	<b>10</b>
<b>6. Ekonomické aspekty</b>	<b>10</b>
<b>7. Seznam použité související literatury</b>	<b>10</b>
<b>8. Dedikace</b>	<b>12</b>

## 1. Úvod

Klostridiové infekce mláďat hospodářských zvířat se v posledních létech stávají častou příčinou závažných ztrát. Ačkoliv tyto infekce mohou postihovat mláďata všech hospodářských zvířat, nejčastěji se jejich obětí stávají mláďata prasat a přežvýkavců. Příčiny zvyšujícího se výskytu těchto onemocnění v našich chovech zatím nejsou zcela jasné. Jedná se o změny v technologii chovů, změny ve výživě odchovávaných zvířat, případně ve způsobech medikace krmiv.

V chovech prasat jsou klostridii postihována nejčastěji novorozená selata. Původci těchto onemocnění projevujících se průjmy jsou zejména druhy *Clostridium perfringens* typy A a C a *Clostridium difficile*. Klostridiové infekce postihují zejména novorozená selata, v případech akutních průběhů již v průběhu několika hodin po narození. Většinou se však jedná o první dny - zhruba od 1. do 7. dne života. Pozdější výskyt již nebývá tak závažný. Infekce se klinicky projevuje profuzním průjmem se stopami krve, rychle vedoucím k dehydrataci, často končící úhynem. Popsané klinické změny jsou výsledkem působení toxinů, které klostridie produkují v širokém spektru a velkém množství. Produkce toxinů je nejvyšší v případech, kdy se klostridie přemnoží a začínají sporulovat. Toxiny klostridií vyvolávají jak zvýšenou sekreci, tak i nekrotické poškození střevní stěny (Uzal a McClane, 2012).

Protože klostridiové infekce postihují zejména kategorii selat bezprostředně po narození, existují dva způsoby prevence. Prvním je vakcinace prasnic s cílem zvýšit úroveň laktogenní imunity, kterou jsou selata zásobována IgA slizničními protilátkami, které chrání střevo selat. Druhým způsobem je zajistit pasivní suplementaci selat obohacením prestarterové krmné směsi pro přikrmování novorozených selat (tzv. creep feeding) specifickými IgY protilátkami získanými z vajec imunizovaných nosnic. Výhodou vaječné hmoty je fakt, že kromě protilátek IgY obsahuje několik dalších biologicky účinných látek, které působí antibakteriálně nebo protizánětlivě (Krejčí a kol., 2017).

Skutečnost, že vejce slepic i ostatních ptáků obsahují protilátky, je známa již déle jak 100 let (Klemperer, 1893). Protilátky jsou koncentrovány ve vaječných žloutcích, do nichž přestupují z krevního séra nosnic v průběhu ovogeneze (Mohammed aj., 1998). Tyto protilátky svojí strukturou i biologickou funkcí odpovídají imunoglobulinům savců izotypu IgG. S ohledem na skutečnost, že jsou ve vysoké koncentraci nacházeny ve vaječných žloutcích, bývají obvykle nazývány jako imunoglobuliny IgY (žloutek-angl. yolk). V průběhu embryogeneze pak tyto protilátky pronikají ze žloutkového vaku do postupně se vytvářejícího krevního

oběhu. V něm jsou přítomny i v době vylíhnutí a zajišťují tak novorozentým ptačím mláďatům v prvních dnech života specifickou pasivní imunitu. Tento typ pasivní ochrany novorozentých ptačích mláďat odpovídá pasivní ochraně savců zprostředkované kolostrem. IgY protilátky se svoji stavbou a zejména pak funkcí významně neliší od podobných imunoglobulinů savců včetně člověka. Protilátky izolované z vaječných žloutků cíleně imunizovaných slepic se stávají v posledním desetiletí stále častěji prostředkem v léčbě a prevenci chorob lidí a zvířat (Schade a kol. 2005).

IgY protilátky jsou schopny plnit většinu funkcí, které běžně plní protilátky savčí. V biologických systémech působí jako neutralizační protilátky, které oddělují adhezivní molekuly patogenních mikroorganismů od jejich receptorů na povrchu cílových buněk. Tímto způsobem zabraňují jejich infekci, neboť valná většina patogenního působení bakterií a virů je podmíněna zachycením se na povrchy buněk. Pokud jsou adhezivní molekuly na povrchu patogenních virů a bakterií obaleny specifickými protilátkami, jejich adhezivní schopnost je zablokována. Takto odblokováné - neutralizované mikroorganismy jsou snadno vyloučeny přirozenými bariérovými mechanismy. Tuto funkci plní i natrávené molekuly imunoglobulinů, pokud zůstanou zachována jejich vazebná místa (Akita a Nakai, 1993). Uvedené vlastnosti mohou být využity zejména v případech zevních nebo slizničních aplikací.

Slepičí IgY mají ve srovnání s jinými protilátkami při použití k pasivní imunoterapii řadu výhod:

- obecně je perorální příjem vaječných IgY považován za bezpečný i u lidí a to i autoritami jako je FDA (Rahman a kol., 2013);
- perorální administrace nevede k rozvoji adaptivní imunitní odpovědi proti IgY (Nilsson a kol., 2007);
- struktura IgY není rozpoznána střevními epiteliálními Fc-receptory u savců (Carlander a kol., 2000);
- IgY neaktivují savčí komplement (Kovacs-Nolan a Mine, 2012).

Použití specifických IgY proti rozvoji infekce *Clostridium difficile* bylo již dokumentováno ve velmi recentní vědecké literatuře. Tyto práce potvrzují použitelnost a účinnost pasivní imunizace za použití IgY specifických ke klostridiovým toxinům, vegetativním buňkám i sporám (Mulvey a kol., 2011; Zhang a kol., 2016; Pizarro-Guajardo a kol., 2017).

## 2. Cíl funkčního vzorku

Cílem předloženého funkčního vzorku je příprava sušené vaječné hmoty (melanže) obsahující specifické IgY protilátky proti *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens* podílejícím se na rozvoji průjmových onemocnění selat.

Předložený postup zahrnuje: přípravu antigenů pro imunizaci, postup imunizace a ověření přítomnosti protilátek, způsob sušení vaječné hmoty.

## 3. Vlastní popis funkčního vzorku

### 3.1. Příprava antigenů pro imunizaci slepic

Pro imunizaci slepic byly použity bakteriální kmeny *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile*:

- *Clostridium perfringens* typ A (CAPM 5744), produkující toxin alfa (cpa), původně izolován ze skotu
- *Clostridium perfringens* typ C (CECT 820), produkující toxin alfa a beta (cpa a cpb), izolován z gangrény ovce
- *Clostridium difficile* (DSM 1296), produkující toxin tcdA a tcdB

Kultivace:

- vyočkování klostridií na KA5 (krevní agar s 5 % beraní krve), inkubace 24h 37°C anaerobně
- po kontrole čistoty narostlé kultury byly kolonie klostridií smyty a resuspendovány ve 20 ml PBS (phosphate buffer saline)
- úprava optické density na 5°McF (kultivačně odpovídá asi  $6 \times 10^7$  až  $1 \times 10^8$  CFU/ml)

Inaktivace:

- Inaktivace bakterií v 8% formaldehydu 1 hodinu. Poté 2x promyto v PBS.

Kontrola sterility:

- po inaktivaci bakterií bylo provedeno kontrolní vyočkování 250  $\mu$ l suspenze na KA5 pro aerobní i anaerobní kultivaci
- kontrola nárůstu bakterií po 48 hod. a po 72 hod.

### 3.2. Zvířata a jejich imunizace

Slepice byly rozděleny do 6 skupin po 2 zvířatech podle toho, kterým antigenem byly imunizovány:

1. skupina: imunizována celým CPA v dávce  $2,7 \times 10^9$  CFU na jedno zvíře
2. skupina: imunizována sonikovaným CPA v dávce  $2,7 \times 10^9$  CFU na jedno zvíře
3. skupina: imunizována celým CPC v dávce  $2,9 \times 10^9$  CFU na jedno zvíře
4. skupina: imunizována sonikovaným CPC v dávce  $2,9 \times 10^9$  CFU na jedno zvíře
5. skupina: imunizována celým CD v dávce  $4,5 \times 10^8$  CFU na jedno zvíře
6. skupina: imunizována sonikovaným CD v dávce  $4,5 \times 10^8$  CFU na jedno zvíře

Celobuněčný lyzát bakterií *C. difficile*, *C. perfringens* typ A a *C. perfringens* typ C byl připraven sonikací při 90% amplitudě pulzně po dobu 12 minut na ledu na přístroji Sonopuls HD 3100 (Bandelin, Německo).

časový harmonogram:

den 0	imunizace antigeny + 50 % FCA (Freundovo kompletní adjuvans) + odběr séra
den 28	reimunizace s 50 % FIA (Freundovo inkompletní adjuvans) + odběr séra
den 56	reimunizace s 50 % FIA + odběr séra
den 86	reimunizace s 50 % FIA + odběr séra

Imunizace byla provedena intramuskulární aplikací. Od 60. do 120. dne byla sbírána vejce.

Výskyt specifických protilátek proti příslušným antigenům byl sledován po 120 dní. Během tohoto časového intervalu proběhlo několik dílčích stanovení protilátek metodou ELISA. Konkrétně v den 0, 56 a 80 v séru a ve směsném vzorku žloutků sbíraných mezi 60 - 120, dnem po imunizaci a 60. den také Westernblotting.

### 3.3. Příprava vodné frakce

Z vajec byly odděleny žloutky a ty byly smíchány s destilovanou vodou v poměru 1 g žloutku + 10 g destilované vody. Po zhomogenizování důkladným protřepáním a stání noc lednice bylo centrifugací (40 min, 3500 ot.) získán supernatant, který byl použit pro další testování.

### 3.4. ELISA

Přítomnost protilátek metodou ELISA byla stanovena pomocí celých bakterií CPA, CPC a CD, které byly získány podle následujícího postupu. Byla také otestována vhodná koncentrace bakterií v rozsahu  $1 \times 10^8$  až  $1 \times 10^2$ .

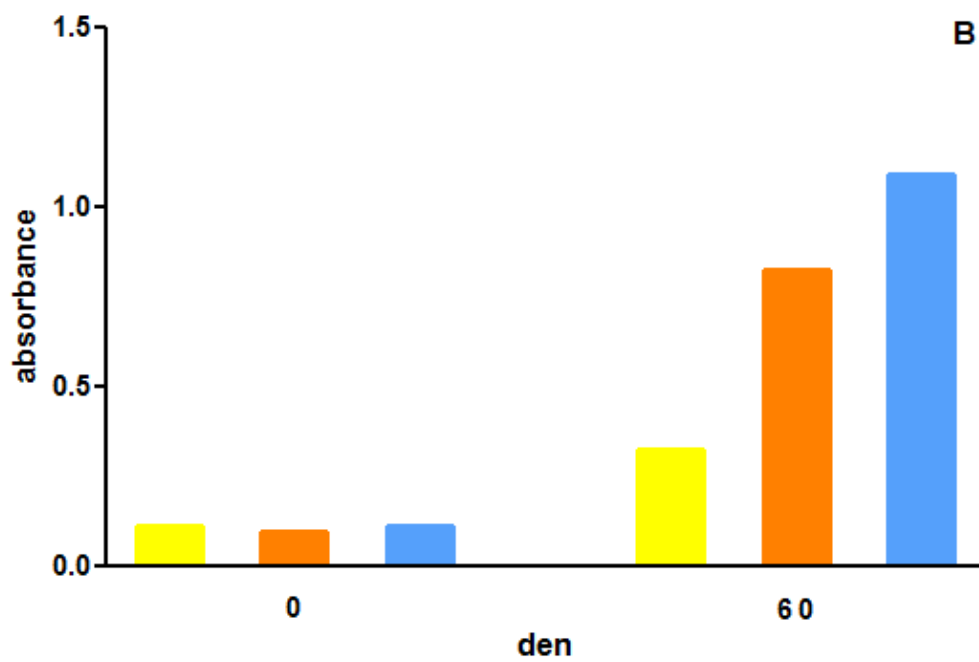
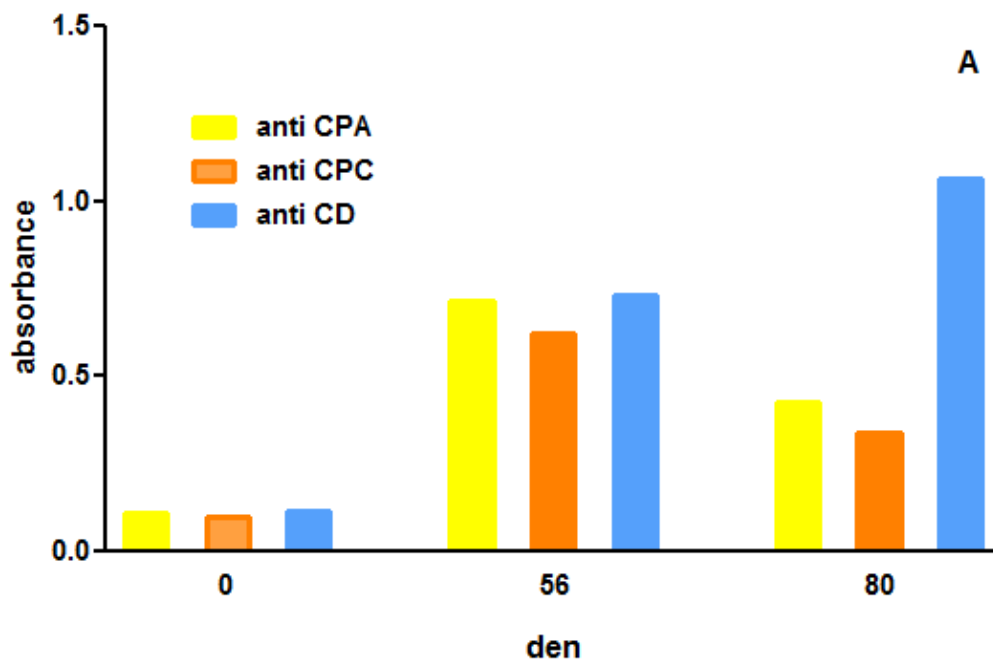
#### Postup:

- *vazba antigenu*  
bakterie v koncentraci  $1 \times 10^6$  CFU /ml ve vazném karbonátovém pufru pH 9,6; 100  $\mu$ l / jamku, vazba přes noc lednice desky Maxisorp (Nunc)
- *5x promytí* PBS + 0,05% Tween 20
- *blokace* 60 min 0,5% kasein + 10% sacharóza
- *vyředění kontrol a sér*  
vyšetřované vzorky a kontroly ředěny 100x a dále 3kově v ředícím roztoku – PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát, inkubace 60 min, pokojová teplota
- *5x promýt* PBS + 0,05% Tween 20
- *konjugát* anti-chicken IgY s křenovou peroxidázou (Bethyl) ředěný 60 000 $\times$  (v PBS+Tween 20 + kaseinový hydrolyzát) 100  $\mu$ l /jamka, 60 min, pokojová teplota
- *5x promýt* PBS + 0,05% Tween 20
- *aplikace substrátu* – TMB Test-line, 100  $\mu$ l /jamka, doba působení 10 - 30 min.
- *stop* 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l/jamka
- *měření při 450 nm*

#### Výsledky ELISA:

U všech testovaných skupin bylo možno detekovat zvýšené hladiny specifických protilátek již 56. den po imunizaci zvířat v séru (obr. 1A) a 60. den ve vejcích (obr. 1B).

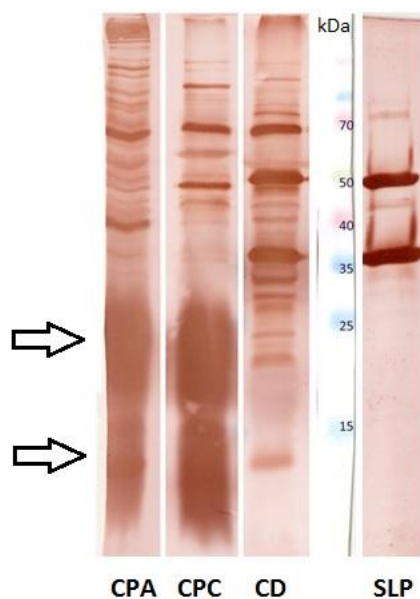




Obrázek 1. Hladiny specifických protilátek po imunizaci a reimunizaci v séru (A) a vejcích (B) imunizovaných nosnic.

### 3.5. Westernblotting

Celobuněčný lyzát bakterií *C. difficile*, *C. perfringens* typ A a *C. perfringens* typ C byl připraven sonikací při 75% amplitudě ve 4 cyklech po 30 s na ledu na přístroji Sonopuls HD 3100 (Bandelin, Německo). Takto připravené antigeny byly separovány na 12 % SDS-PAGE gelu při konstantním napětí (80 V 20 min, poté 130 V 60 min) a rozdělené proteiny transferovány na PVDF membránu při konstantním proudu 350 mA 1 hodinu. PVDF membrána byla přes noc blokována v 0,5% kaseinovém hydrolyzátu (+ 0,05 % Tween 20 v PBS) při 4°C. Jednotlivé proužky membrány byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě se 100x ředěnými vodnou frakcí ze žloutků slepic imunizovaných příslušným antigenem. Po promytí byla membrána inkubována s 1000x ředěnou sekundární protilátkou králičí anti-chicken IgY konjugovanou s křenovou peroxidázou (Thermo Scientific, USA) 1 hod, při pokojové teplotě. Proteiny na PVDF membráně byly detekovány vizualizací chromogenním substrátem 3,3' diaminobenzidinem (Lachema, ČR) v přítomnosti peroxidu vodíku.



Obr. 2: Westernblot celobuněčných antigenů *C. perfringens* typ A (CPA), *C. perfringens* typ C (CPC) a *C. difficile* (CD) s homologními protilátkami (slepice imunizované CPA, CPC, resp. CD). SLP - izolovaný povrchový S-layer protein *C. difficile*. Šipky naznačují oblast silných antigenních struktur specifických pro *C. perfringens*.

Obrázek 2 dokazuje přítomnost specifických protilátek proti proteinům klostridií ve vaječných žloutcích imunizovaných slepic. Antigenní proteiny se navíc mezi jednotlivými kmeny liší. Z povrchu buněk *C. difficile* byl izolován S-layer protein (SlpA), dominantní protein buněčné stěny, důležitý pro integritu buňky a interakcí s epiteliálními buňkami také spoluzodpovědný za patogenitu kmene *C. difficile*. Dokázali jsme, že i proti těmto proteinům (High-molecular weight a Low-molecular weight SLP proteins - 50 a 35 kDa) se u slepic po imunizaci tvoří vysoká hladina IgY protilátek.

Dále, šipky na obrázku 2 znázorňují oblasti silných antigenů specifických pro oba typy *C. perfringens*, které však zřejmě nejsou proteinové povahy. Na základě výsledků dalších analýz (barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue, barvení stříbrem a Schiffovým činidlem) lze konstatovat, že se jedná o molekuly sacharidové povahy a pravděpodobně tak jde o kapsulární polysacharid *C. perfringens*.

Specifické IgY protilátky proti klostridiím obecně jsou ve vaječných žloutcích imunizovaných slepic ve vysokém titru a navíc jsou přítomny protilátky proti významným imunogenním strukturám jak *C. difficile*, tak *C. perfringens*.

#### **4. Srovnání „novosti postupů“**

Hledání možnosti pasivní suplementace selat proti různým patogenům střevního traktu je studovaným přístupem ke zlepšení zdravotního stavu zvířat, snížení přímých i nepřímých ztrát a v širším kontextu také ke snížení potřeby antibiotické terapie v agrárním sektoru. Využití sušené vaječné hmoty s obsahem specifických protilátek je jednou z cest, jak tohoto cíle dosáhnout.

#### **5. Uplatnění funkčního vzorku**

Sušená vaječná hmota obsahující protilátky IgY specifické proti *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens* bude na pracovištích autorů sloužit dále testování pro jeho použitelnosti jako krmného doplňku pro selata.

#### **6. Ekonomické aspekty**

Funkční vzorek je na pracovištích autorů zaveden. Jeho další případné komerční využití závisí na zájmu terénu. Podle současného stupně poznání není možné ekonomické aspekty určit.

#### **7. Seznam použité literatury**

Akita, E.M., Nakai, S.: Production and purification of Fab fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). J. Immunol. Methods, 1993, 162:155-164.

- Carlander, D., Kollberg, H., Wejåker, P.E., Larsson, A.: Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol. Res.* 2000; 21:1-6.
- Klemperer, F.: Über natürliche immunität und ihre verwertung für die immunisierungstherapie. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1893, 31:356-382.
- Kovacs-Nolan, J., Mine, Y.: Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3:163-182.
- Krejčí, J., Bernardy, J., Macečková, M., Faldyna, M.: IgY protilátky v prevenci a léčbě infekčních onemocnění mláďat - review. *Veterinářství* 2017; 67:312-316.
- Mohammed, S.M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K.R., Wildeman, A.G., Bonselaar, J., Etches, R.J. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*, 1998, 4:115-125.
- Mulvey, G.L., Dingle, T.C., Fang, L., Strecker, J., Armstrong, G.D.: Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60:1181-1187.
- Nilsson, E., Kollberg, H., Johannesson, M., Wejåker, P.E., Carlander, D., Larsson, A.: More than 10 years' continuous oral treatment with specific immunoglobulin Y for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a case report. *J. Med. Food.* 2007; 10:375-378.
- Pizarro-Guajardo, M., Díaz-González, F., Álvarez-Lobos, M., Paredes-Sabja, D.: Characterization of chicken IgY specific to *Clostridium difficile* R20291 spores and the effect of oral administration in mouse models of initiation and recurrent disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:365.
- Rahman, S., Van Nguyen, S., Icatlo, F.C. Jr., Umeda, K., Kodama, Y.: Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013; 9:1039-1048.
- Schade, R., Calzado, E.G., Sarmiento, R., Chacana, P.A., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H.R.: Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern. Lab. Anim.*, 2005, 33:129-154.
- Uzal, F.A., McClane, B.A.: Animal models to study the pathogenesis of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infections. *Microbes Infect.* 2012; 14:1009-1016.

Zhang, S., Xing, P., Guo, G., Liu, H., Lin, D., Dong, C., Li, M., Feng, D.: Development of microbeads of chicken yolk antibodies against *Clostridium difficile* toxin A for colonic-specific delivery. Drug Deliv. 2016; 23:1940-1947.

## **8. Dedikace**

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1510218) a Národního programu udržitelnosti NPU-I (LO1218) a projektu Ministerstva zemědělství ČR RO0517.

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Název: **Vaječná hmota obsahující protilátky IgY specifické proti *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens***

Autoři: MVDr. Josef Krejčí  
Hana Kudláčková  
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.  
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.  
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.  
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

VU<sup>Ve</sup>L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)