



FUNKČNÍ VZOREK

TRIVALENTNÍ SALMONELOVÁ VAKCÍNA PRO ORÁLNÍ VAKCINACI DRŮBEŽE

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
Mgr. Marta Matulová, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.
Mgr. Alena Šebková
MVDr. František Šišák, CSc.
Ing. Hana Havlíčková

**4109
2015**

Funkční vzorek

4109/2015

TRIVALENTNÍ SALMONELOVÁ VAKCÍNA PRO ORÁLNÍ VAKCINACI DRŮBEŽE

Autoři

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.¹
Mgr. Marta Matulová, Ph.D.¹
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.¹
Mgr. Alena Šebková¹
MVDr. František Šišák, CSc.¹
Ing. Hana Havlíčková¹

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

ISBN 978-80-86895-77-2

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1310019 a s podporou projektu AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01.

2015

1.	Úvod	3
2.	Cíl metodiky	3
3.	Vlastní popis funkčního vzorku	4
3.1.	Příprava atenuovaných kmenů <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> a <i>S. Infantis</i>	4
3.2.	Perzistence jednotlivých kmenů trivalentní vakcíny ve slepém střevě a játrech imunizovaných kuřat	4
3.3.	Test pasivní chráněnosti	5
3.4.	Stimulace specifické imunitní odpovědi	6
4.	Srovnání „novosti postupů“	7
5.	Uplatnění funkčního vzorku	7
6.	Ekonomické aspekty	7
7.	Seznam použité související literatury	8
8.	Dedikace	8

1. Úvod

V České republice patří mezi nejvýznamnější původce gastrointestinálních zoonóz u lidí bakterie rodu *Salmonella* a *Campylobacter*. K hlavním rezervoárům *Salmonella enterica* pro lidi patří drůbež a drůbeží produkty. Proto byl v členských zemích EU zaveden program zaměřený na snížení prevalence *S. enterica* u drůbeže (směrnice EU 2160/2003). K opatřením uplatňovaným v rámci tohoto programu patří zlepšení biologické bezpečnosti v produkci drůbeže, kontrola krmiv na přítomnost *S. enterica* a vakcinace.

Vakcinaci drůbeže lze provádět inaktivovanými vakcínami nebo živými vakcínami. Vzhledem k patogenezi infekce *S. enterica* jsou však živé oslabené vakcíny účinnější než inaktivované (Papezova et al, 2008, Robertsson et al, 1983). V současnosti jsou komerčně dostupné vakcíny, které obsahují atenuované kmeny sérovarů Enteritidis a Typhimurium. Experimentální data však ukazují, že existuje poměrně nízká zkřížená ochrana a kuřata vakcinovaná vakcínou obsahující *S. Enteritidis* nebo *S. Typhimurium* jsou jen slabě chráněna proti infekci jinými sérovary (Cooper et al., 1994; Dueger et al., 2001). Existují proto obavy, že vakcinace drůbeže vakcínami založenými na sérovarech *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium* povede ke snížení výskytu těchto sérovarů v chovech drůbeže, ale současně toto prostředí může být osídleno v současné době méně častými sérovary jako jsou *S. Infantis*, *Hadar* nebo *Agona*. Z toho důvodu se hledají způsoby ochrany drůbeže i proti infekci sérovarů odlišných od Typhimurium a Enteritidis.

Proto jsme připravili trivalentní vakcínu obsahující oslabené kmeny sérovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* a použili ji pro orální vakcinaci drůbeže. Po vakcinaci jsme ověřili schopnost současné kolonizace střevního traktu drůbeže všemi sérovary, které vakcínu tvoří. Následně jsme ověřili protektivní efekt trivalentní salmonelové vakcíny čelení kuřat divokými kmeny *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*. Vakcína vykazala protektivní efekt a protože *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* patří do 3 různých séro skupin (*S. Enteritidis* patří do séro skupiny 9, *S. Typhimurium* do séro skupiny 4 a *S. Infantis* do séro skupiny 7), vakcinační směsí těchto 3 sérovarů by mohla být kuřata chráněna i před infekcí sérovary, které nejsou součástí připravené vakcíny, ale patří do uvedených séro skupin.

2. Cíl metodiky

Předmětem tohoto funkčního vzorku je funkční trivalentní salmonelová vakcína s protektivním efektem pro orální podání drůbeži, která obsahuje oslabené kmeny sérovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

3.1. Příprava atenuovaných kmenů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*

Experimentální vakcína obsahuje oslabené kmeny sérovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*. Oslabení bylo provedeno odstraněním ostrova patogenity SPI1, genu *lon*, a genů pro tvorbu bičíků (*fljC* a *fljB* v závislosti na sérovaru). V konečném důsledku tedy byly odstraněny geny SPI1-*fljC-lon* u *S. Enteritidis* (Matulova et al., 2013) a SPI1-*fljC-fljB-lon* u *S. Typhimurium* a *S. Infantis*. Všechny mutace byly připraveny pomocí „overlap PCR“, klonováním delečního PCR produktu do plazmidu pDM4 a generování delece v cílovém kmeni dočasnou integrací rekombinantního plazmidu pDM4 do chromozomu hostitele a jeho následnou eliminaci v prostředí s 5% sacharózou spojenou s tvorbou delece (Ho et al., 1989; Milton et al., 1996). Po tomto způsobu delece nezůstávají v modifikovaném bakteriálním kmeni žádné cizorodé sekvence. Po přípravě všech mutací byly všechny kmeny kompletně sekvenovány. Pro tvorbu vakcinačních kmenů byly použity kmeny citlivé k antibiotikům a i závěrečné oslabené vakcinační kmeny byly citlivé k účinku antibiotik.

3.2. Perzistence jednotlivých kmenů trivalentní vakcíny ve slepém střevě a játrech imunizovaných kuřat

Cílem prvního pokusu bylo otestovat chování jednotlivých vakcinačních kmenů sérovarů *S. Enteritidis*, *Typhimurium* a *Infantis* v časném období po vakcinaci živou vakcínou. Za tímto účelem bylo orálně vakcinováno 18 kuřat v den líhnutí. Vakcinace byla prováděna orálně první den života kuřat. Vakcinační dávka obsahovala 10^7 CFU salmonel, přičemž každý ze tří sérovarů byl ve vakcíně zastoupen ve stejném množství. Pro potřeby stanovení kolonizace slepého střeva a jater jednotlivými kmeny obsaženými ve vakcíně byla kuřata utracena 3, 7 a 20 dnů po inokulaci. Z orgánů (játra, slepé střevo) byly následně izolovány vakcinační kmeny salmonel a sérologicky rozlišeny jednotlivé kolonie. Nejvíce bylo ze slepých střev detekováno salmonel náležících sérovaru *Infantis* a to během celého testovaného období. *S. Enteritidis* perzistovala v orgánech nejméně, případně stejně jako *S. Typhimurium* (7 dní po imunizaci). Nejlepší schopnost kolonizovat a perzistovat ve slepém střevě během prvních 3 týdnů života kuřete vykazoval oslabený kmen *S. Infantis*, výrazně nižší záchyt byl zaznamenán u sérotypu *S. Typhimurium* a nejméně bylo detekováno kolonií *S. Enteritidis*.

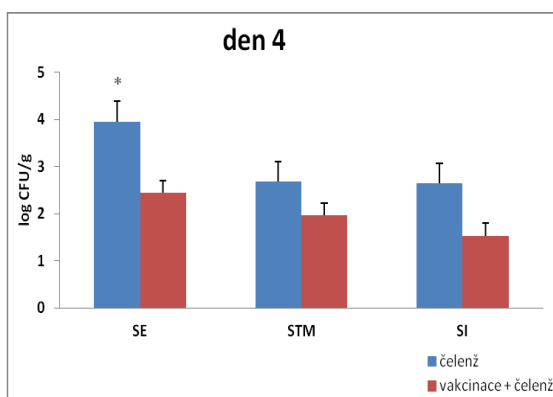


Obr. 1. Schopnost oslabených kmenů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* kolonizovat slepé střevo kuřat. Kuřata byla orálně imunizována první den života a 3, 7 a 20 dní po imunizaci byly stanoveny počty salmonel v orgánech následované serologickou diferenciací jednotlivých kolonií. Modrá barva - kolonie *S. Enteritidis*, červená barva - kolonie *S. Typhimurium*, zelená barva - kolonie *S. Infantis*.

3.3. Test pasivní chráněnosti

Pokus s trivalentní vakcínou jsme využili i k testu indukce okamžité pasivní protekce před čelenží 24 hodin po vakcinaci. U tohoto typu protekce jde zejména o časnou aktivaci vrozené imunity aplikací živé vakcíny a současně kompetici vakcíny a čelenžního kmene o životní prostor ve střevě. Proto bylo 18 kuřat vakcinováno v den vylíhnutí a čelenžováno divokými kmeny jednotlivých sérovarů 24 hodin po vakcinaci. Po dalších 3 dnech byla kuřata utracena a byly stanoveny počty salmonel v játrech a slepém střevě.

Imunizace částečně chránila kuřata již 24 hodin po aplikaci, protože u všech vakcinovaných kuřat byly asi 10x nižší počty salmonel v játrech než u skupiny kuřat, která nebyla vakcinována (obr. 2). Trivalentní vakcína tak snižovala kolonizaci kuřat divokými kmeny všech tří sérovarů salmonel již 24 hodin po aplikaci.

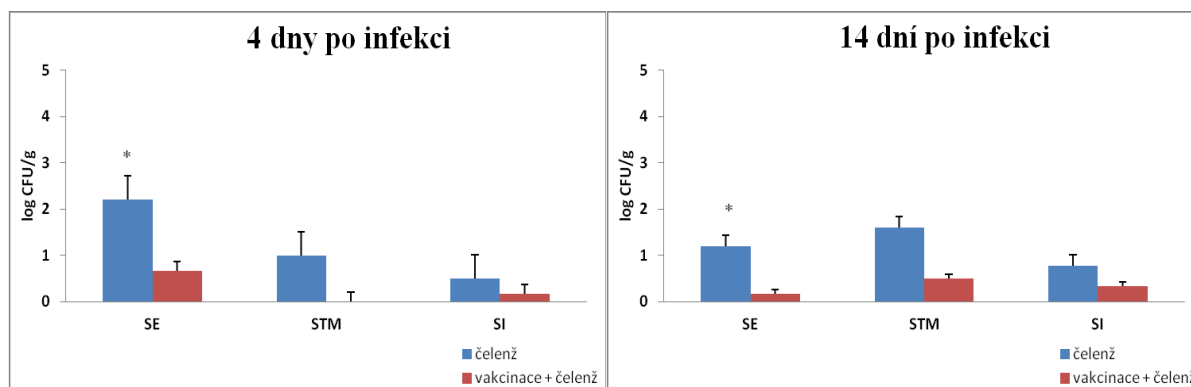


Obr. 2. Stimulace nespecifické imunitní odpovědi kuřat trivalentní salmonelovou vakcínou. Kuřata byla vakcinována trivalentní vakcínou první den života s následnou infekcí plně virulentních kmenů sérovarů Enteritidis, Typhimurium a Infantis hned 24 hodin po imunizaci a stanovením počtů salmonel v játrech 3 dny po infekci. Modré sloupce - počty salmonel u nevakuinovaných kuřat, červené sloupce - počty salmonel u vakcinovaných kuřat. * - signifikantně vyšší počet bakterií u nevakuinované skupiny v porovnání s vakcinovanou a infikovanou ($p < 0,05$, ANOVA test).

3.4. Stimulace specifické imunitní odpovědi

Poslední pokus byl zaměřen na indukci specifické imunitní odpovědi. Kuřata byla orálně imunizována trivalentní vakcínou a čelenžována divokými kmeny všech 3 sérovarů 21 dní po vakcinaci. Dávka čelenžních kmenů byla 10^7 CFU. Celkem 36 kuřat bylo utráceno 4 a 14 dní po infekci virulentními kmeny *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* a byly stanoveny počty salmonel v játrech a slepém střevě.

Vakcinace chránila kuřata před infekcí všemi 3 sérovary a to jak 4 tak 14 dní po čelenži (obr. 3), protože ve všech kombinacích byly zaznamenány vždy nižší počty salmonel u vakcinovaných než u nevakcinovaných kuřat. Skutečnost, že v některých případech nebylo dosaženo statistické významnosti byla ze všeho nejvíce ovlivněna malými počty kuřat ve skupině a zvyšující se přirozené odolnosti kuřat k infekci salmonelami (Beal et al., 2004; Matulova et al., 2012).



Obr. 3. Stimulace specifické imunitní odpovědi kuřat trivalentní salmonelovou vakcínou. Kuřata byla vakcinována trivalentní vakcínou první den života s následnou infekcí plně virulentních kmenů sérovarů Enteritidis, Typhimurium a Infantis ve věku 21 dní. Počty salmonel v játrech byly stanoveny 4 a 14 dnů po infekci. Modré sloupce-počty salmonel u nevakcinovaných kuřat, červené sloupce-počty salmonel u vakcinovaných kuřat.

4. Srovnání „novosti postupů“

Využití kombinace více sérovarů v jedné vakcíně je jednou z cest, jak zvýšit chráněnost chovů drůbeže před infekcí divokými kmeny salmonel náležícími k různým sérovarům. Na trhu se žádná podobná vakcína nevyskytuje.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Tento funkční vzorek slouží jako základ pro skutečnou živou atenuovanou salmonelovou vakcínu, na které pracujeme ve spolupráci se společností Bioveta a.s. Všechny tři kmeny tvořící vakcínu jsou uloženy na pracovištích autorů i v Biovetě a.s. V současné době je vakcína dále testována podle požadavků lékopisu na schválení živé atenuované salmonelové vakcíny pro orální užití u drůbeže.

6. Ekonomické aspekty

Funkční vzorek je na pracovišti autorů zaveden. Jeho další případné komerční využití závisí na dokončení všech testů požadovaných pro registraci vakcíny. Potenciální ekonomické dopady pro VÚVeL jsou ošetřeny rámcovou smlouvou s možným uživatelem Bioveta a.s.

7. Seznam použité literatury

Beal RK, Wigley P, Powers C, Hulme SD, Barrow PA, Smith AL (2004) Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 100:151–64.

Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE (1994) Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis* aroA live oral vaccine candidate. *Infect Immun* 62:4747–54.

Dueger EL, House JK, Heithoff DM, Mahan MJ (2001) *Salmonella* DNA adenine methylase mutants elicit protective immune responses to homologous and heterologous serovars in chickens. *Infect Immun* 69:7950–4.

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.

Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2012) Vaccination of chickens with *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 and SPI2 defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine* 30:2090–7.

Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2013) Vaccination of Chickens with SPI1-lon and SPI1-lon-flhC Mutant of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *PLoS One* 8:e66172.

Milton DL, O'Toole R., Horstedt P., Wolf-Watz H (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* 178, 1310–1319.

Papezova K, Havlickova H, Sisak F, Kummer V, Faldyna M, Rychlik I (2008) Comparison of live and inactivated *Salmonella* Typhimurium vaccines containing different combinations of SPI-2 antigens in poultry. *Vet Med Czech* 53, 315-23.

Robertsson JA, Lindberg AA, Hoiseth S, Stocker BA (1983) *Salmonella* Typhimurium infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. *Infect Immun* 41, 742-50.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1310019 a s podporou projektu AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01.

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

Název: TRIVALENTNÍ SALMONELOVÁ VAKCÍNA PRO ORÁLNÍ VAKCINACI
DRŮBEŽE

Autoři: doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
Mgr. Marta Matulová, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.
Mgr. Alena Šebková
MVDr. František Šišák, CSc.
Ing. Hana Havlíčková



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

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz