



FUNKČNÍ VZOREK

**Zkřížená protektivita trivalentní
salmonelové vakcíny drůbeže při ochraně
proti infekci serovary
Salmonella Agona, Dublin a Hadar**

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

**1571
2016**

Funkční vzorek 1571/2016

**ZKŘÍŽENÁ PROTEKTIVITA TRIVALENTNÍ SALMONELOVÉ VAKCÍNY
DRŮBEŽE PŘI OCHRANĚ PROTI INFEKCI SEROVARY *SALMONELLA* AGONA,
DUBLIN A HADAR**

Autoři

**doc. RNDr. Ivan Rychlík, 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

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.

2016

ISBN 978-80-86895-85-7

1.	Úvod	3
2.	Předmět funkčního vzorku	4
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.	Stimulace specifické imunitní odpovědi	4
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 serovary (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 serovary 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. V předcházejících výstupech jsme sledovali chráněnost proti infekci divokými kmeny serovarů, které jsou ve vakcíně obsaženy. V práci, která je předmětem tohoto funkčního vzoru, jsme ověřili chráněnost drůbeže proti infekci serovary, které ve vakcíně zastoupeny nejsou, tedy serovary *Agona*, *Dublin* a *Hadar*.

Výběr serovarů, které jsou obsaženy ve vakcíně, odpovídá frekvenci výskytu nejběžnějších serovarů jak v chovech drůbeže, tak v lidské populaci. Současně (a záměrně) ale zahrnuje i serovary náležící do 3 odlišných serologických skupin dle O antigenu. Somatický O antigen je terminální částí molekuly lipopolysacharidu (LPS), který je součástí vnější membrány gramnegativních bakterií. Imunitní systém vyšších organismů rozpoznává molekuly LPS jako silný indikátor přítomnosti bakterií (pathogen associated molecular patterns, PAMP), který vede k indukci zánětlivé imunitní odpovědi a tvorby protilátek proti struktuře LPS včetně O antigenu. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* patří do 3 různých séroskupin (*S. Enteritidis* patří do séroskupiny 9, *S. Typhimurium* do séroskupiny 4 a *S. Infantis* do séroskupiny 7), vakcinační směsí těchto 3 serovarů by mohla být kuřata chráněna i před infekcí serovary, které nejsou součástí připravené vakcíny. Najít další serovar-specifické antigeny (mimo O antigeny), které by se vyskytovaly u všech izolátů daného serovaru a ne u izolátů náležících k jiným serovarům, není snadné. Indukce imunitní odpovědi proti klíčovým O antigenům a proti ostatním antigenům, které se nachází u *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* nebo *S. Infantis* by mohlo vést k vakcíně s širokým účinkem, chránícím drůbež i před infekcí heterologními serovary neobsaženými ve vakcíně.

Proto jsme pro potřeby tohoto funkčního vzorku ověřili protektivní efekt trivalentní salmonelové vakcíny sestávající se ze serovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* k ochraně drůbeže před infekcí kmeny serovarů náležících k seroskupinám O4 (*S. Agona*), O9 (*S. Dublin*) a O8 (*S. Hadar*).

2. Předmět funkčního vzorku

Předmětem tohoto funkčního vzorku je funkční trivalentní salmonelová vakcína pro orální podání drůbeží sestávající se ze serovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* a protektivním efektem proti serovarům salmonel, které nejsou ve vakcíně obsaženy.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

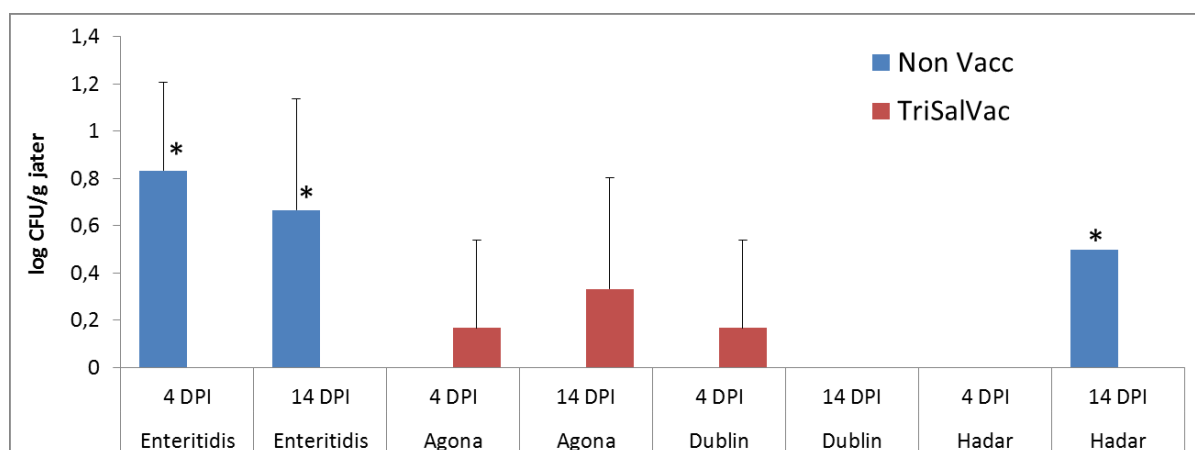
3.1. Příprava atenuovaných kmenů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*

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 bičků (*fliC* a *fliB* v závislosti na sérovaru). V konečném důsledku tedy byly odstraněny geny SPI1-*fliC-lon* u *S. Enteritidis* (Matulova et al., 2013) a SPI1-*fliC-fliB-lon* u *S. Typhimurium* a *S. Infantis*. Všechny mutace byly připraveny pomocí „overlap PCR“, klonováním delečního PCR produktu do plazmidu pDM4 a generováním 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. Stimulace specifické imunitní odpovědi

Do pokusu zaměřeného na protektivitu trivalentní vakcíny proti heterologním kuřatům bylo zařazeno celkem 96 kuřat. Polovina kuřat byla orálně imunizována trivalentní vakcínou obsahující oslabené kmeny *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* a čelenžována divokými kmeny sérovarů *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Dublin* a *S. Hadar* 21 dní po vakcinaci. Druhá polovina kuřat byla čelenžována bez předchozí vakcinace. Dávka čelenžních kmenů byla 10^7 CFU. Celkem 48 kuřat bylo utráceno vždy 4 a 14 dní po čelenži a byly stanoveny počty salmonel v játrech a slepém střevě, a znaky zánětlivé imunitní reakce ve slepém střevě.

Při porovnání počtů salmonel v játrech, experiment potvrdil chráněnost proti čelenži serovarem *Enteritidis*, který je součástí vakcíny, a to jak 4 tak i 14 dní po vakcinaci. Po čelenži serovary *S. Agona*, *S. Dublin* a *S. Hadar* byl signifikantní protektivní efekt pozorován pouze po čelenži *S. Hadar* a to 14 dní po vakcinaci (Obr. 1). Po infekci ostatními serovary nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly v počtech salmonel v játrech vakcinovaných a nevakcinovaných kuřat. Tento závěr však byl výrazně ovlivněn skutečností, že po infekci 21 denních nevakcinovaných kuřat jsme ani jednou nezaznamenali šíření *S. Agona* a *S. Dublin* do jater. Nízké počty pozitivních nálezů u vakcinovaných kuřat pak mohly být reisoláty vakcinačních kmenů, které mohou u vakcinovaných kuřat perzistovat i 3 týdny po vakcinaci. Bohužel v tomto případě jsme další došetření izolovaných kolonií neprovedli.



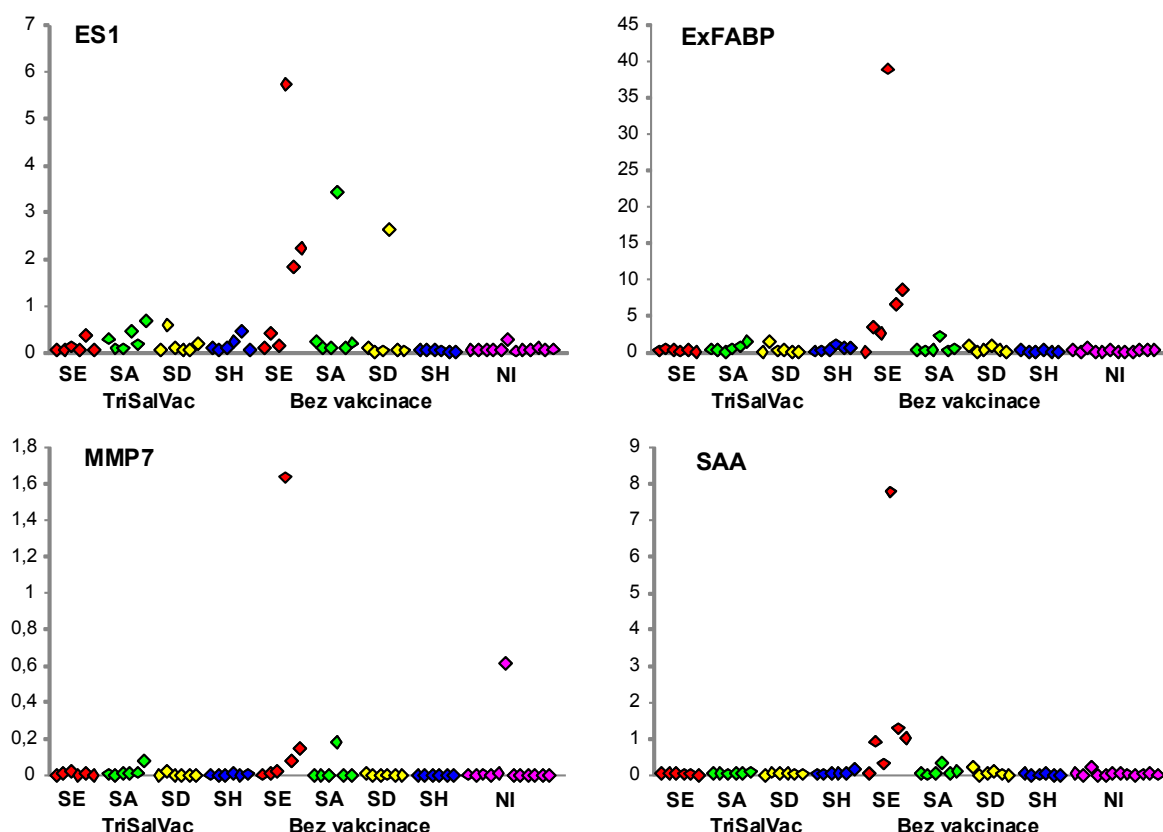
Obr. 1. Protektivní účinek vakcinace proti heterologním serovarům salmonel. Kuřata byla první den života orálně vakcinována trivalentní salmonelovou vakcínou, která obsahuje oslabené kmeny serovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*. Ve věku 21 dní byla provedena čelenž plně virulentními kmeny sérovarů *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Dublin* a *S. Hadar*. Počty salmonel v játrech byly stanoveny 4 a 14 dnů po infekci (DPI). Vakcína signifikantně chránila před kolonizací jater v případě čelenže *S. Enteritidis* a *S. Hadar*. Po čelenži serovary *S. Agona* a *S. Dublin* nebyl pozorován signifikantní protektivní účinek. Tento závěr však byl ovlivněn absencí kolonizace jater těmito serovary po čelenži nevakcinovaných kuřat. Modré sloupce - počty salmonel u nevakcinovaných kuřat, červené sloupce - počty salmonel u vakcinovaných kuřat. * - statisticky signifikantně rozdílné počty salmonel v orgánech kuřat s a bez předchozí vakcinace stanovené t-testem.

Stanovení počtu salmonel ve slepém střevě bylo negativně ovlivněno přítomností jiných bakterií střevní mikroflóry, které byly rezistentní ke kyselině nalidixové a přerůstaly kolonie salmonel. Proto jsme se při kultivačním průkazu omezili jen na kvalitativní průkaz salmonel ve slepém střevě, který jsme doplnili o sledování znaků zánětu. Kultivační průkaz salmonel ve slepém střevě potvrdil nálezy z jater a to ve smyslu ochrany kuřat trivalentní vakcínou proti čelenži serovarem *S. Hadar*. Dílčí ochrana po vakcinaci byla zaznamenána i u kuřat po čelenži *S. Dublin* a to 14 dní po infekci (Tab. 1).

Tab. 1. Počet *Salmonella* pozitivních kuřat ve slepém střevě 4 a 14 dní po čelenži serovary *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Dublin* a *S. Hadar*. Žlutě jsou zvýraněny rozdíly v pozitivitě mezi vakcinovanými a nevakcinovanými kuřaty.

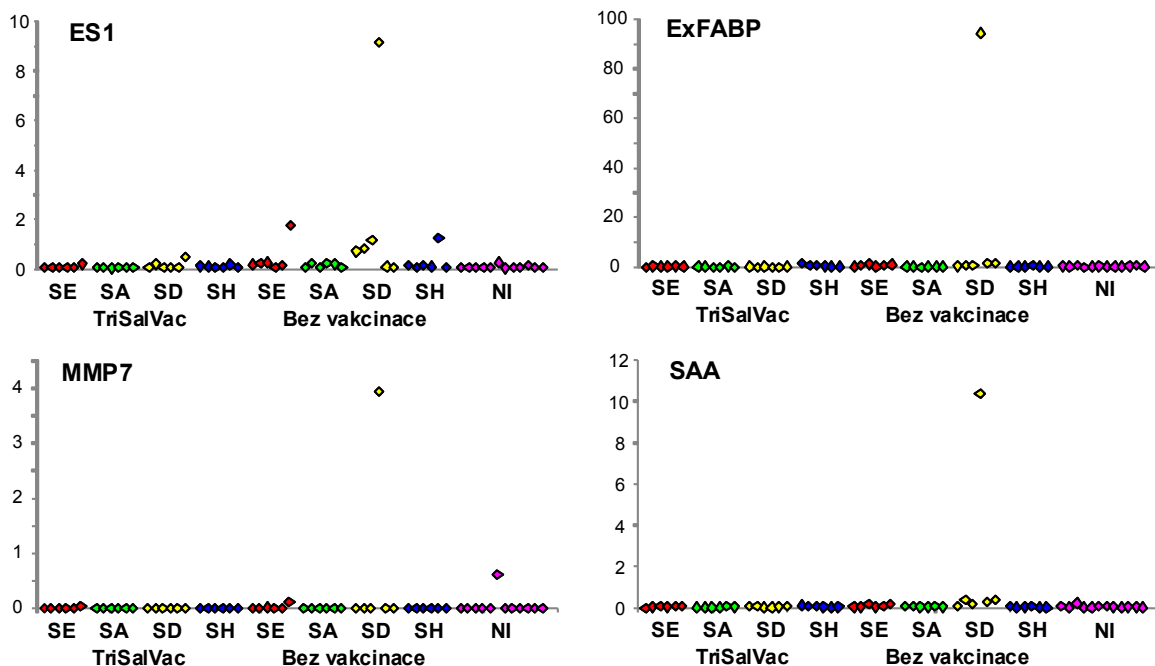
	Non Vacc	TriSalVac	Non Vacc	TriSalVac
	4 dny po infekci		14 dní po infekci	
Enteritidis	6/6	6/6	6/6	5/6
Agona	6/6	6/6	6/6	6/6
Dublin	3/6	5/6	6/6	2/6
Hadar	4/6	1/6	6/6	0/6

Zánětlivá odpověď ve slepém střevě kuřat na čelenž serovary *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Dublin* a *S. Hadar* byla stanovena pomocí real time PCR exprese 4 genů, které jsme v předchozích studiích vytipovali jako nejvíce reagujících na infekci *S. Enteritidis*, a to ES1, ExFABP, MMP7 a SAA. Čtyři dny po čelenži byl pozorován signifikantní rozdíl v expresi genů ES1, ExFABP a SAA genů pouze při srovnání nevakcinovaných a neinfikovaných kuřat s kuřaty čelenžovanými *S. Enteritidis* bez předchozí vakcinace (Obr. 2). Protože však nebyl pozorován signifikantní rozdíl v expresi zánětlivých genů u neinfikovaných kuřat a kuřat po vakcinaci a čelenži *S. Enteritidis*, považujeme tento výsledek za pozitivní vliv vakcinace proti infekci *S. Enteritidis*.



Obr. 2. Zánětlivá odpověď kuřat 4 dny po čelení. Na ose Y je uvedena exprese genů u jednotlivých kuřat normalizovaná na expresi 3 kontrolních genů (GAPDH, UB a TBP). U nevakcinovaných kuřat je typická přítomnost nereagujících kuřat a jednotlivých kuřat s extrémní odpovědí. Vakcinace vede k ochraně, která se projevuje kombinací žádné odpovědi anebo jen mírné odpovědi jednotlivých kuřat. Signifikantě odlišná tak byla pouze exprese genů ES1, ExFABP a SAA u nevakcinovaných kuřat po čelení *S. Enteritidis* ve srovnání s nevakcinovanými a neinfikovanými kuřaty (skupina NI). SE a červená barva – exprese u kuřat po čelení *S. Enteritidis*. SA a zelená barva – exprese u kuřat po čelení *S. Agona*. SD a žlutá barva – exprese u kuřat po čelení *S. Dublin*. SH a modrá barva – exprese u kuřat po čelení *S. Hadar*.

U kuřat 14 dní po orální čelení byly zaznamenány odpovědi jednotlivých kuřat ve skupinách bez vakcinace a to po infekci *S. Enteritidis*, *S. Hadar* a *S. Dublin* (Obr. 3). Vzhledem k velmi odlišné odpovědi jednotlivých kuřat ve skupinách však žádná z těchto odpovědí již nedosáhla statistické významnosti. I přes nízkou zánětlivou odpověď spojenou s absencí statistické významnosti však považujeme tyto výsledky za potvrzující chráněnost kuřat proti infekci heterologními serovary, zejména pokud se analyzují společně s ostatními sledovanými parametry jsou např. počty *S. Enteritidis* pozitivních kuřat ve slepém střevě (Tab. 1). Trivalentní salmonelová vakcína obsahující serovary *Enteritidis*, *Typhimurium* a *Infantis* tak částečně chrání i před kolonizací a následnou zánětlivou reakcí vyvolanou *S. Hadar* a *S. Dublin*.



Obr. 3. Zánětlivá odpověď kuřat 14 dní po čelení. Na ose Y je uvedena exprese genů u jednotlivých kuřat normalizovaná na expresi 3 kontrolních genů (GAPDH, UB a TBP). U nevakcinovaných kuřat je typická přítomnost nereagujících kuřat a jednotlivých kuřat s extrémní odpovědí. NI a fialová barva – exprese u nevakcinovaných a neinfikovaných kuřat. SE a červená barva – exprese u kuřat po čelení *S. Enteritidis*. SA a zelená barva – exprese u kuřat po čelení *S. Agona*. SD a žlutá barva – exprese u kuřat po čelení *S. Dublin*. SH a modrá barva – exprese u kuřat po čelení *S. Hadar*.

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 nevyskytuje žádná podobná vakcína, která by prokazatelně a specificky chránila proti infekci serovary, které jsou součástí vakcíny, a která by současně prokazatelně chránila i proti infekci heterologními serovary, a to i přesto, že proti některým serovarům (*S. Agona*) jsme protektivní účinek vakcinace vakcínou TriSalVac neprokázali.

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

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 (2013) Vaccination of Chickens with SPI1-lon and SPI1-lon-fliC 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: ZKŘÍŽENÁ PROTEKTIVITA TRIVALENTNÍ SALMONELOVÉ VAKCÍNY
DRŮBEŽE PŘI OCHRANĚ PROTI INFEKCI SEROVARY *SALMONELLA*
AGONA, DUBLIN A HADAR

Autoři: doc. RNDr. Ivan Rychlík, 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