



FUNKČNÍ VZOREK

**Experimentální vakcína proti infekci
Streptococcus suis u prasat**

**Mgr. Natálie Králová
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Adam Norek, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.**

**5077
2021**

FUNKČNÍ VZOREK 5077/2021

Experimentální vakcína proti infekci *Streptococcus suis* u prasat

Autoři

Mgr. Natálie Králová
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Adam Norek, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

**Funkční vzorek byl vytvořen v rámci programu
Národní agentury zemědělského výzkumu
(QK1810193) a MZe RO-0518**

2021

ISBN 978-80-7672-019-0

Obsah

Obsah	3
1 Úvod	4
2 Cíl	4
3 Výroba vakcíny	4
4 Indikace s upřesněním pro cílový druh zvířat	6
5 Vakcinační schéma	6
6 Ověření účinnosti na cílovém druhu zvířete	6
7 Reference	8
8 Dedikace	9

1 Úvod

Streptococcus suis je v současné době považován za jednoho z nejzávažnějších bakteriálních patogenů prasat a je rozšířen celosvětově (Goyette-Desjardins a kol. 2014). Je popsáno 29 různých sérotypů *S. suis* (Tien a kol. 2013), ale za klinicky a hospodářsky nejvýznamnější jsou považovány sérotypy 1/2, 2, 3, 7 a 9. Zvláště sérotypy 2 a 14 mají značný zoonotický potenciál, nejvíce případů infekce lidí se vyskytuje v jihovýchodní Asii (Goyette-Desjardins a kol. 2014). Přes značný ekonomický a klinický význam *S. suis* není dosud komerčně dostupná vakcína pro prevenci onemocnění u prasat, používají se pouze autogenní vakcíny (Segura a kol. 2020). Přesto bylo na poli výzkumu vakcinace proti *S. suis* dosaženo významných úspěchů pomocí experimentálních konjugovaných vakcín (Goyette-Desjardins a kol. 2016). Předložený funkční vzorek porovnává účinnost vakcinace prasat dvěma různými experimentálními konjugovanými vakcínami, z nichž by vakcína založená na konjugátu CPS-OVA mohla být ekonomicky dostupná pro komerční použití v chovech prasat.

Obě varianty obsahují izolovaný kapsulární polysacharid (CPS) vybraného „wild-type” kmenu bakterie *Streptococcus suis* sérotypu 2, chemicky konjugovaný na proteinové nosiče ovalbumin (OVA) nebo cross-reacting material 197 (CRM197). Účinek vakcíny je zesilován olejovým adjuvans.

2 Cíl

Cílem předkládaného Funkčního vzorku bylo vyvinout a v laboratorním měřítku vyrobit bezpečnou a účinnou experimentální vakcínu pro prasata vedoucí k tlumení výskytu streptokokových infekcí v chovech prasat.

3 Výroba vakcíny

3.1 Výrobní kmeny

Pro výrobu experimentálních konjugovaných antigenů je používán *S. suis* „wild-type” kmen 10/18/Ji/830, dodaný Státním veterinárním ústavem Jihlava, izolovaný z plic selete z chovu v Třebíči. Tento kmen byl uložen na bovinním fetálním séru (BOFES) při -80°C. Pro daný kmen bylo založeno matečné inokulum a jeho alikvoty se využily jako pracovní inokula. Systém jednotné inokulace umožňuje bezpečné uložení dostatečného množství matečné a pracovní kultury pro výrobní účely tak, aby byla zachována stabilita kmenů nezbytná pro jednotnost výrobních šarží.

Výrobní kmeny:

***Streptococcus suis* sérotyp 2** je uložen ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. (dále jen VÚVeL) pod označením 10/18/Ji/830. Pro výrobu jsou používána příslušná pracovní WSLB inokula. Kmen je „wild-type“, rozlišitelný na základě metody PCR-RFLP („Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism“) jako sérotyp 2 (Matiašovic a kol. 2020).

Morfologie kmenů: Kmeny *S. suis* se řadí mezi grampozitivní fakultativně anaerobní koky. Po 24 hodinové inkubaci při 37°C tvoří na krevním agaru šedé malé kolonie, často produkují zónu

alfa-hemolýzy. Vyskytují se v párech a řetízích. Na základě rozdílných kapsulárních polysacharidů rozlišujeme více než 29 sérotypů s rozdíly v patogenitě.

3.2 Výrobní suroviny

Agarová živná média: Krevní agar s 6 % beraní krvi (KA).

Tekutá živná média: Brain Heart Infusion (BHI) (příprava dle výrobce Thermo Fisher). Todd-Hewitt Broth (THB) (kaseinhydrolyzát 10,00 g; kvasnicový extrakt 10,00 g; Brain Heart Infusion 3,10 g; uhličitan sodný 2,50 g; Dextrosa (glukosa) 2,00 g; chlorid sodný 2,00 g; hydrogenfosforečnan sodný 0,40 g; čištěná voda ad 1000,00 ml)

Ostatní: DPBS, 1M NaOH, 1M HCl, glycin, krystalický lysozym (SIGMA, Lysozyme From chicken egg white, 70.000 units/mg solid, EC 3.2.1.17), 10% NaN₃, fenol (Thermo Fisher, UltraPure BufferSaturated Phenol), chloroform, ethanol, NaIO₄, triethylenglykol, NaHCO₃, NaBH₃CN, NaBH₄, adjuvant Montanide ISA 50 V2 (Seppic).

3.3 Pomůcky a výrobní zařízení

Základní pomůcky: Jednorázové bakteriologické kličky, sterilní injekční jehly a stříkačky, sterilní 0,22 µm filtr, sterilní plastové zkumavky, Erlenmeyerovy baňky a kádinky, denzitometr, pH metr, navážky, analytické váhy.

Zařízení: Spektrofotometr; box s laminárním prouděním vzduchu; temperovaná třepačka; magnetická míchačka; sonikátor; centrifuga (chlazená, výměnný rotor); vakuová centrifuga; lyofilizátor.

3.4 Postup výroby

3.4.1 Izolace kapsulárního polysacharidu

Příslušný kmen *S. suis* sérotypu 2 je bakteriologickou kličkou zaočkován na KA křížovým roztěrem. Misky inkubujeme při 37 °C po dobu 18 – 24 h. Z čisté kultury na KA se 1 klička rozsuspenduje v 10 ml THB médiu a nechá se na třepačce inkubovat při 37°C zhruba 5 hodin. Optická hustota dosahuje okolo 6 McF (~1,8 x 10⁹ buněk/ml). Tato buněčná kultura je přidána do 2 l nově připraveného THB média v Erlenmeyerově baňce. Buněčná kultura se kultivuje na třepačce (180 rcf) 18 hodin při 37°C. Kultura dosahuje denzity okolo 5 McF (~1,5 x 10⁹ buněk/ml). Takto narostlá kultura je přečištěna promytím DPBS. Peleta je poté rozsuspendována ve 100 ml 0,1M glycinového pufru (pH9,2) 30 mg krystalického lysozymu, 200µl 10% NaN₃ a ponechána přes noc na třepačce při 37°C. Po inkubaci je suspenze centrifugována a supernatant je společně s fenol:chloroformem (1:1) 30 minut promícháván na magnetické míchačce v digestoři. Po centrifugaci (4°C; nízké akcelerace 3; 1290 rcf) je vodná fáze, obsahující kapsulární polysacharid, smíchána s 0,1M CaCl₂ v ethanolu (25% v/v). Po vysrážení DNA a centrifugaci je ze supernatantu kapsulární polysacharid izolován zvýšením obsahu ethanolu na 80% v/v. Suspenze je ponechána přes noc při 4°C, poté je centrifugována při 4°C. Následně je peleta obsahující CPS rozsuspendována v DPBS a dána na dialýzu (MWCO 3500). CPS je sterilizován filtrací přes 0,22 µm filtr.

3.4.2 Konjugace kapsulárního polysacharidu na dva nosičové proteiny

Izolovaný kapsulární polysacharid je depolymerován na sonikátoru. “Phenol-sulphuric acid” metodou se změří koncentrace polysacharidů. Kapsulární polysacharid se připraví ke konjugaci

mírnou perjodátovou oxidací, která musí probíhat za tmy: 1mM perjodát sodný oxiduje kyselinu sialovou depolymerovaného CPS (1-10 mg/ml). Po 1 hodině se reakce zastaví přidáním 2 ekvivalentů triethylenglykolu a následně se nechá mírně oxidovaný CPS dialyzovat. Redukční amination se v přítomnosti NaBH₃CN kapsulární polysacharid po mírné oxidaci nakonjuguje na nosičový protein OVA nebo CRM197. Konjugace probíhá za tmy při 37°C. Reakce se ukončí po 2 dnech přidáním NaBH₄. Po dvou denní dialýze (MWCO 3500) se kapsulární polysacharid nakonjugovaný na nosičový protein přečistí pomocí FPLC.

3.4.3 Homogenizace vakcíny

Před homogenizací je nutné antigenové složky a adjuvans Montanide ISA 50 V2 (Seppic, France) vytemperovat na laboratorní teplotu. V den aplikace je kapsulární polysacharid nakonjugovaný na nosičový protein smíchán s adjuvans v poměru 1:1. Pro přípravu vakcíny je koncentrát antigenů naředěn sterilním fyziologickým roztokem na výslednou koncentraci 0,25 mg/ml.

Při samotné homogenizaci je postupováno tak, že do vytemperovaného konjugátu je injekční stříkačkou přidáno adjuvans a následně je natahováním a vypouštěním z injekční stříkačky vytvořena homogenní emulze.

4 Indikace s upřesněním pro cílový druh zvířat

K imunizaci selat po odstavu za účelem vyvolání imunity vedoucí k následnému zvýšení odolnosti selat proti bakteriálním infekcím kmenu *Streptococcus suis* sérotypu 2.

5 Vakcinační schéma

Vakcinační dávka: 2 ml

Vakcína je aplikována intramuskulárně (i.m.) v paraaurikulární krajině. Bezprostředně před použitím je potřeba vakcínu homogenizovat natažením do injekční stříkačky a vypuštěním zpět do zkumavky. Pro aplikaci použijte sterilní injekční jehlu a stříkačku. Místo vpichu by mělo být suché, čisté a asepticky ošetřené.

Tři týdny po aplikaci první dávky je podána druhá dávka.

6 Ověření účinnosti na cílovém druhu zvířete

Účinnost vakcíny byla testována v infekčním experimentu na odstavených selatech. Experiment byl uskutečněn na základě projektu pokusu VÚVeL 13/2021 schváleným Ministerstvem zemědělství, odborem environmentálním a ekologického zemědělství pod pořadovým číslem MZe 2254. Do pokusu bylo zařazeno třicet selat. Deset selat bylo vakcinováno experimentální vakcínou CPS-OVA, deset selat bylo vakcinováno experimentální vakcínou CPS-CRM197 a deset selat nebylo vakcinováno. Selata byla infikována čtrnáct dní po druhé vakcinační dávce *S. suis* sérotypem 2, a to stejným kmenem, ze kterého byl izolován kapsulární polysacharid. Infekční dávka byla 1×10^9 CFU/ml v objemu 2 ml. Sedmý den po infekci byla selata utracena a byly odebrány vzorky orgánů pro stanovení počtu streptokoků na gram tkáň. Pro stanovení hladin protilátek v sérech selat byla odebrána krev před první dávkou vakcíny, před druhou dávkou vakcíny, před infekcí a při utrácení selat. Mezi skupinami selat vakcinovaných a nevakcinovaných skupiny byl sledován rozdíl ve výši hladin specifických protilátek a rozdíl v kolonizaci orgánů čelenžním kmenem.

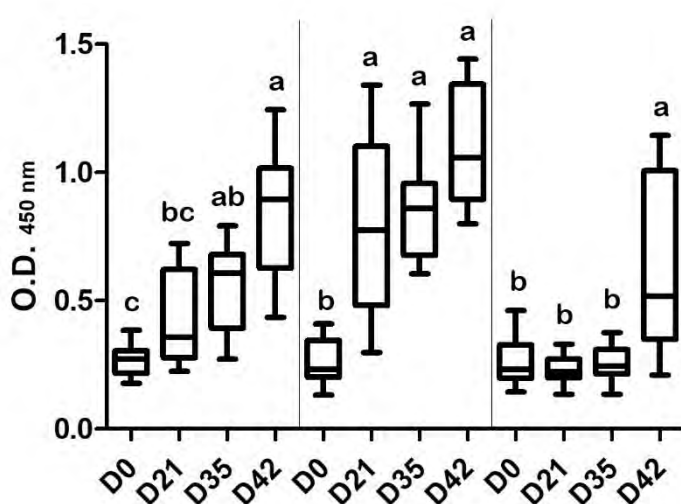
6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Hladina protilátek v sérech selat byla stanovena metodou ELISA pomocí antigenu crude CPS izolovaného z čelenžního kmenu *S. suis* sérotyp 2.

Vlastní postup ELISA testu:

Do mikrotitrační desky Maxisorp je napipetováno 100 μ l/jamku antigenu o koncentraci 3 μ l/ml ve vazném karbonátovém pufru (pH9,2). Antigen necháme navázat v lednici přes noc na Maxisorp desku. Další den po promytí destičky v poloautomatické promývačce promývacím roztokem (PBS + 0,05% Tween 20) je antigen 30 minut blokován 150 μ l/jamku blokovacím roztokem. Po vyklepnutí blokovacího roztoku jsou do Mikrotitrační desky napipetována 100x naředěná séra (100 μ l/jamku). Inkubujeme 60 minut při laboratorní teplotě a poté promyjeme promývacím roztokem. Do desky napipetujeme 100 μ l 30.000x ředěného konjugátu anti-pig IgG s křenovou peroxidázou a necháme 60 min při laboratorní teplotě. Séra a konjugáty jsou ředěné ředicím roztokem PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát. Po promytí promývacím roztokem se do desky přidá 100 μ l/jamku TMB+substrátu. Doba působení 5-10 minut, poté je přidáno 50 μ l/jamku 1M H₂SO₄. Absorbance je měřena při 450 nm.

Hladiny protilátek proti crude CPS v sérech selat vakcinovaných experimentální konjugovanou vakcínou CPS-CRM197 byly před imunizací významně nižší než po druhé imunizační dávce ($P < 0,05$) a vysoce významně nižší než po infekci ($P < 0,001$). Po první imunizační dávce byly hladiny protilátek významně nižší než po infekci. V rámci skupiny CPS-OVA byla hladina protilátek proti crude CPS významně vyšší po první a druhé imunizaci ($P < 0,05$) a vysoce významně vyšší po infekci ($P < 0,001$) než před imunizací. V sérech selat kontrolní skupiny byly hladiny protilátek proti crude CPS po infekci významně vyšší než hladiny protilátek před infekcí ($P < 0,05$) (Graf 1).



Graf 1 Celkové hladiny protilátek proti crude CPS u selat, imunizovaných experimentální konjugovanou vakcínou CPS-CRM197, CPS-OVA a u kontrolní skupiny selat. Odběry: D0 – před imunizací; D21 – 21 den po 1. imunizaci; D35 – 14 den po 2. imunizaci; D42 – 7 den po infekci.

Rozdíly mezi skupinami v ELISA stanovení byly vyhodnoceny v GraphPad Prism s využitím jednofaktorové ANOVA (Dunn's Multiple Comparison Test).

6.2 Bakteriologické stanovení

Pro bakteriologické stanovení *S. suis* byly odebrány vzorky z plic, mozku, sleziny a stěry z karpálního kloubu a perikardu. Do 1 ml PBS s 10 homogenizačními kuličkami byly přidány vzorky, vážené s přesností na tři desetinná místa a následně byly homogenizovány na MagNA Lyseru po dobu 30 s. Pro zhomogenizované vzorky byla připravena ředící řada. 100 µl bylo rozetřeno na KA a necháno inkubovat přes noc při 37°C. Narostlé kolonie byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS. *Streptococcus suis* sérotyp 2 byl potvrzen PCR:

Jak je shrnuto v Tabulce 1, u kontrolní skupiny byla u 4 selat potvrzena infekce *S. suis* sérotyp 2. U skupiny imunizované konjugátem CPS-OVA byl *S. suis* sérotyp 2 identifikován u dvou selat. Pro skupinu CPS-OVA není statisticky významný rozdíl v počtu *S. suis* pozitivních a *S. suis* negativních vzorků, testovaných Chi2 testem. U skupiny imunizované konjugovanou vakcínou CPS-CRM197 nebyl potvrzen *S. suis* sérotyp 2 s výjimkou u stěru perikardu; jedná se o statisticky významný rozdíl mezi *S. suis* pozitivními a negativními vzorky ve srovnání s kontrolní skupinou, s výjimkou stěru z perikardu.

Tabulka 1 Počet kolonií *S. suis* sérotyp 2 na gram tkáň v orgánech selat

skupina	číslo selete	plíce	perikard stěr	mozek	slezina	karpální kloub stěr
kontrola	1	0	0	0	0	0
	2	$1,4 \times 10^3$	0	$3,6 \times 10^4$	$6,6 \times 10^2$	0
	3	0	0	0	0	0
	4	$1,8 \times 10^3$	0	0	0	0
	5	$4,7 \times 10^5$	0	$5,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^7$	2×10^7
	6	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	4
	8	$6,0 \times 10^3$	0	$1,6 \times 10^2$	$8,7 \times 10^2$	0
	9	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	$1,6 \times 10^2$	0
CPS-OVA	11	0	0	0	0	0
	12	$2,1 \times 10^3$	2×10	$1,5 \times 10^3$	$9,5 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$
	13	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	2
	15	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0
	17	$7,8 \times 10$	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0
	19	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0
CPS-CRM197	21	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0
	24	0	5	0	0	0
	25	0	0	0	0	0
	26	0	0	0	0	0
	27	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0
	29	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0

7 Reference

Goyette-Desjardins, G.; Auger, J.P.; Xu, J.; Segura, M.; Gottschalk, M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg. Microb. Infect.* 2014,3, e45. <https://doi.org/10.1038/emi.214>.

Goyette-Desjardins. G.; Calzas. C.; Shiao, TC.; Neubauer, A.; Kempker, J.; Roy, R.; Gottschalk, M.; Segura, M. Protection against *Streptococcus suis* Serotype 2 Infection Using a Capsular Polysaccharide Glycoconjugate Vaccine. *Infect Immun.* 2016 Jun 23;84(7):2059-2075. doi: 10.1128/IAI.00139-16. PMID: 27113360; PMCID: PMC4936365.

Okura, M.; Lachance, C.; Osaki, M.; Sekizaki, T.; Maruyama, F.; Nozawa, T.; Nakagawa, I.; Hamada, S.; Rossignol, C.; Gottschalk, M.; et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52, 1714–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.03411-13>.

Matiasovic. J.; Zouharova, M.; Nedbalcova, K.; Kralova, N.; Matiaszkova, K.; Simek, B.; Kucharovicova, I.; Gottschalk, M. 2020. Resolution of *Streptococcus suis* serotypes 1/2 versus 2 and 1 versus 14 by PCR-Restriction fragment length polymorphism method. *J Clin Microbiol* 58:e00480-20.

Segura, M.; Aragon, V.; Brockmeier, S.L.; Gebhart, C.; de Greeff, A.; Kerdsin, A.; O'Dea, M.A.; Okura, M.; Saléry, M.; Schultsz, C.; et al. Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. suis*. *Pathogens* 2020, 9, 374. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050374>.

Tien, H.T.; Nishibori, T.; Nishitani, Y.; Nomoto, R.; Osawa, R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and *sodA* and *recN* phylogenies. *Vet. Microbiol.* 2013, 162, 842–849. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.001>.

8 Dedikace

Funkční vzorek “Experimentální vakcína proti infekci *Streptococcus suis* u prasat” byl vytvořen v rámci programu Národní agentury zemědělského výzkumu (QK1810193) a MZe RO-0518.

Vydal:

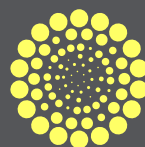
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70, 621 00 Brno

Název: Experimentální vakcína proti infekci *Streptococcus suis* u prasat

Autoři: Mgr. Natálie Králová
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Adam Norek, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D..

Funkční vzorek “Experimentální vakcína proti infekci *Streptococcus suis* u prasat” byl vytvořen v rámci programu Národní agentury zemědělského výzkumu (QK1810193) a MZe RO-0518.

VÚVeL



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