

# Pseudotuberkulóza ve stádech ovcí: Výzkumný projekt nakažlivých zoonóz a jeho zjištění vzhledem k možnostem šlechtění na genetickou odolnost

Dr. Ing. Jitka Kyselová

Laboratoř molekulární genetiky, oddělení genetiky a šlechtění, VÚŽV, v.v.i.

## Úvod

Pseudotuberkulóza neboli kaseózní lymfadenitida (CLA) je nakažlivé infekční onemocnění, které primárně postihuje ovce a kozy a může způsobit chovateli významné ekonomické ztráty. CLA se vyznačuje výskytem abscesů v lymfatických uzlinách infikovaných zvířat a jejím etiologickým agens je fakultativně intracelulární, pleomorfní bakterie *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cps). Onemocnění se v nakažených stádech poměrně snadno rozšiřuje a je považováno za nevléčitelné. V České republice a ani jinde v Evropě prozatím není běžné použití komerčních vakcín, které mají profylaktickou úlohu, onemocnění sice nevléčí, ale mohou bránit v nakažení dalších jedinců. Zasahují do životního cyklu původce v buňkách hostitele, brání jeho šíření v těle a omezují tvorbu abscesů, při jejichž prasknutí by se nakažlivý obsah dále šířil do vnějšího prostředí. Profylaxe je určitým způsobem kontroly a prevence, ale v současnosti není k dispozici žádná vakcína, která by poskytovala úplnou ochranu proti CLA ovcí a koz. Podobně lokální aplikace antibiotik spolu s chirurgickým odstraňováním abscesů se ukazuje jako poměrně nepraktická a neefektivní cesta k léčení, především v případě extenzivních chovů s vyšším výskytem nemocných jedinců. Během řešení výzkumného projektu „Řešení problematiky výskytu bakteriálních, protozoárních a virových agens v chovech malých přežvýkavců“ v letech 2019-2023, se jako funkční způsob boje s nákazou prokázala strategie monitoringu stád na výskyt specifických protilátek proti typickému antigenu bakterie Cps spolu se separací nemocných zvířat a odděleným managementem skupin ovcí. I když tento přístup představuje v našich podmínkách jednoznačně krok správným směrem, je jak časově, tak ekonomicky poměrně náročný a bohužel nemusí vést k úplné eradikaci onemocnění.

## Význam šlechtění na infekční odolnost a patogeneze CLA

Šlechtění na žádoucí zdravotní znaky je jedním z řešení nepříznivé nakažové situace, od kterého chovatelé očekávají přirozené zlepšení odolnosti zvířat. Zdravotní znaky zahrnují především celkový stav tělesné konstituce a orgánů, citlivost ke specifickému onemocnění a imunitní systém. Výběr jedinců s příznivými zdravotními znaky, které jsou u zvířat velmi komplexními vlastnostmi, ovlivněnými celou řadou genů a vnějším prostředím, je efektivním prostředkem pro potlačení vzniku onemocnění i jeho nepříznivých následků. Genetické založení hostitele je přitom významným faktorem pro úroveň zdravotního statusu každého jedince v konkrétním vnějším prostředí. V porovnání s klasickými metodami vakcinační profylaxe a aplikace antibiotik je šlechtění na rezistenci,



Autor obrázku Jitka Kyselová

toleranci nebo efektivní imunitní odpověď sice dlouhodobějším, ale stabilnějším řešením. Zlepšování úrovně zdraví šlechtěním je spojeno také se zvyšováním produkce, omezením veterinárních nákladů, zlepšením reprodukčních ukazatelů a welfare zvířat. V případě nakažlivých bakteriálních zoonóz se zmírňuje potenciál přenosu na člověka vedoucí k ochraně veřejného zdraví.

Mnohé studie prokázaly, že imunitní odpověď na nákazu Cps zahrnuje jak vrozené, tak adaptivní složky imunity, včetně aktivace zánětlivých cytokininů a aktivní přesun dalších imunokompetentních buněk na místo infekce v těle. Během prvotního kontaktu s patogenem se u ovce aktivují geny vrozeného imunitního systému, především buněčná imunita, která zprostředkuje rozpoznání cizorodého mikroorganismu a iniciaci kaskád fyziologických dějů, které vedou k pohlcení bakterie makrofágy a snahu ji zneškodnit. V průběhu pěti až 14 dní po průniku nákazy do organismu se pak složitými ději aktivují geny adaptivní imunity, řídící tvorbu specifických protilátek – imunoglobulinů, které lze prokazatelně detekovat v krvi metodou ELISA. Ačkoliv bylo experimentálně prokázáno, že při opakované naze je klinická odpověď jedince mírnější, a syntéza specifických protilátek bývá nižší, celkové uzdravení je pravděpodobně pouze velmi sporadické a nemoc přechází do svého chronického stádia. Bakterie Cps totiž disponuje silnými patogenními rysy, především ochrannou komplexní buněčnou stěnou, kterou enzymatický aparát ovce a makrofágy nedokáží pravděpodobně efektivně narušit a bakterii tak účinně eliminovat a produkcí exotoxinu, který je svou chemickou strukturou blízký jednomu z nejsilnějších pavoučích jedů a který poškozuje zasažené tkáně zvířete.

### Metodika genomické asoiační studie

V průběhu řešení Projektu problematiky výskytu nakažlivých zoonotických agens zjišťoval řešitelský tým VÚVeL, v.v.i. ve spolupráci s VÚŽV, v.v.i. hladiny protilátek proti Cps v krevním séru ovcí.

Pravidelný roční monitoring zasažených stád umožnil také vyhodnotit opatření, která chovatelé



Autor obrázku umělá inteligence Midjourney Bot

aplikovali ve snaze zabránit nekontrolovanému šíření onemocnění. Přehledné výsledky kolísání protilátek proti CLA v několika sledovaných stádech plemene suffolk byly již podrobně referovány na 26. mezinárodní konferenci SCHOK v Koutech (Zpravodaj SCHOK 1/2024) a jsou popsány také v publikaci MVDr. Jiřiny Markové: „*Příručka pro chovatele ovcí a koz: Co bychom měli vědět o kaseózní lymfadenitidě*“. Tým molekulární genetiky z VÚŽV, v.v.i. se v průběhu řešení Projektu zaměřil na posouzení asociace mezi různým obsahem protilátek CLA v krevním

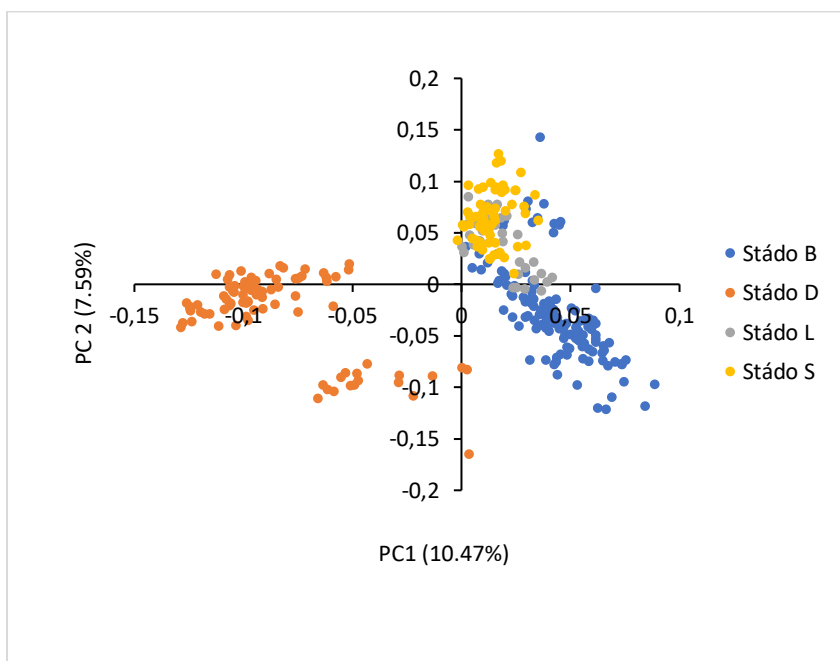
séru ovcí a jejich genomem. Nejprve byl na více než 40 registrovaných farmách malých přeživkavců v České republice proveden screening a hodnocení výskytu CLA pomocí laboratorních metod ELISA (komerční testy ELITEST CLA od Hyphen Biomed a ELISA ID Screen CLA od ID vet) spočívajících na principu detekce protilátek vůči CLA pomocí enzymatické reakce. Následně byly zjišťovány hladiny protilátek opakovaně po dobu 4 let pravidelně jednou ročně u vybraných celých stád ze spolupracujících farem zasažených CLA. Do asoiační genomové studie bylo poté zařazeno 321 ovcí plemene suffolk ve věku od dvou do osmi let ze čtyř farem, které měly minimálně 3 výsledky měření protilátek. Ovce byly klasifikovány do dvou fenotypových skupin: zdravé, neinfikované ovce bez

viditelných abscesů, které byly během sledovaných let konzistentně negativní ve všech ELISA testech (178 jedinců) a nemocné, infikované ovce (143 jedinců), které byly naopak vždy pozitivní. V naší studii jsme předpokládali, že dlouhodobě sérologicky negativní, zdravé ovce by mohly být k nákaze odolnější, zatímco pozitivní, nemocné ovce by mohly být naopak citlivější nebo méně tolerantní k infekci v postižených stádech. Genotypování DNA (deoxyribonukleová kyselina) bylo provedeno u všech ovcí pomocí genomického čipu GeneSeek® Genomic Profiler™ Ovine 50K v laboratoři NEOGEN® Genomics Europe Ltd. ve Skotsku. Po kontrole kvality genotypů jsme pro následný odhad asociace genomu ovcí s fenotypem protilátek mohli použít celkem 41 301 genetických markerů SNP (jednobodový polymorfismus, mutace neboli záměna v sekvenci DNA) lokalizovaných napříč všemi chromozómy v genomu. Asociace byla kalkulována smíšeným lineárním modelem pomocí software GCTA, na základě genomické matice příbuznosti a při zohlednění stáda a věku jedinců.

### Nejdůležitější výsledky a dosažené poznatky o odolnosti ovcí

Výsledky studie a prvotní poznatky poukázaly na průměrně 18,9% promořenost nákazou CLA u přibližně 30 testovaných stád ovcí různých plemen. U čtyř farem zařazených do asociační studie se počet testovaných ovcí a průměrný podíl séropozitivních jedinců mírně lišil. Na farmě B bylo chováno téměř 370 ovcí, z nichž až 26 % bylo pozitivních; farma D měla 200 ovcí, z nichž 24 % bylo pozitivních; farma L měla 150 zvířat (31 % pozitivních); a farma S měla 265 zvířat (29 % pozitivních). Pro vizualizaci genetického pozadí zkoumaných ovcí a genetické struktury populací byla použita analýza hlavních principiálních komponent PC; viz obrázek. Každý jedinec je reprezentován jedním bodem, graf složitými metodami výpočtu umožňuje dvourozměrné zobrazení genetické podobnosti mezi jedinci a jednotlivé klastry bodů reprezentují analyzované populace a jejich genetickou variabilitu.

Obrázek: Analýza hlavních principiálních komponent (PC) genetické struktury a variability populací ovcí suffolk ze čtyř farem v ČR.



Genomová asociační studie prokázala pouze 2 SNP markery, potencionálně asociované s produkcí protilátek proti Cps u ovcí při nastaveném prahu pravděpodobnosti asociace  $P < 2,45 \times 10^{-5}$ .

Nejvýznamnější SNP marker rs41700265 (identifikační kód v databázi SNP) identifikovaný na chromozómu 11 se nachází v genu TRIM16, který kóduje aktivní enzym ubiquitin ligázu. Tento SNP polymorfismus způsobuje významnou změnu v trojrozměrné struktuře a správném fungování ligázy. Další významný SNP se nachází mezi geny na chromozómu 20, v současnosti nejlépe popsáným genem je v této oblasti gen pro dlouhou nekódující molekulu lncRNA (ribonukleová kyselina), která se zapojuje do regulace genové aktivity – přepisování genu do jeho aktivní formy a následně do výsledného proteinu. Její přesná regulační úloha v metabolismu ovce však zatím známa není.

TRIM16 patří do rozsáhlé rodiny vzájemně příbuzných proteinů, které se zúčastňují procesů vrozené imunity a obrany proti infekčním nemocem. Jedna ze studií provedených na myších prokázala vliv těchto proteinů na omezení množení bakterie Cps a další studie zaznamenala zvýšený obsah TRIM45 v krvi ovcí, které byly vystavené nákaze, ale nebyly sérologicky pozitivní vůči CLA. Bylo také prokázáno, že TRIM16 je významně nápomocen při pohlcování a likvidaci patogenů buňkami uvnitř hostitele nebo ve spolupráci s dalšími regulátory přímo chrání buňky před invazí mykobakteriemi. Tyto poznatky ve spojení s našimi výsledky asociační studie zdůrazňují význam vrozených, buněčných imunitních procesů pro efektivní obranu a pro vznik odolnosti vůči onemocnění CLA. Navazující funkční anotace u několika desítek dalších genů, potenciálně asociovaných s citlivostí k CLA, které jsme během našeho výzkumu detailně analyzovali, zjistila jejich významné zapojení především do metabolické dráhy regulující bakteriální invazi do epitelálních buněk (prostřednictvím mezinárodní databáze metabolických a signálních drah Kyoto Encyklopedie genů a genomů). Podle dosavadních zjištění v literatuře mohou různé kmeny Cps kolonizovat buňky hostitele odlišnými mechanismy, které jsou ale dosud málo prozkoumány. Na základě našich výsledků se domníváme, že pokud patogen dokáže proniknout přes epitelální a buněčné membrány exponovaného jedince, CLA se pravděpodobně postupně rozvíjí do dalších, dobře známých stádií patogenního vývoje včetně posledního, perzistujícího chronického stádia nemoci (viz článek autorů MVDr. Soňa Šlosárková a MVDr. Petr Fleischer: *Kaseózní lymfadenitida, Co o ní víme*. Zpravodaj SCHOK 2/2019). Tyto mechanismy by také mohly být příčinou individuální specifity imunitní reakce a rozdílné genetické predispozice k citlivosti zvířete na CLA.

## **Závěr**

Studie genetických základů infekční rezistence k CLA u ovcí ve faremních podmínkách přinesla první poznatky o vztahu genomu zvířat k produkci protilátek během několika let monitorovaného období. Ačkoliv tato původní zjištění jsou cenná, je třeba je považovat za předběžná a měla by být rozšířena dalším vědeckým výzkumem. V případných navazujících projektech je třeba sledovat hladinu protilátek v kratších intervalech a větším pokusném souboru jedinců, validovat je také jinými citlivými laboratorními metodami, pravidelně zaznamenávat zdravotní stav a klinický obraz onemocnění a monitorovat biomarkery různých stádií onemocnění. Pro jakékoliv další genetické a genomické analýzy bude nezbytné spoléhat se na správné stanovení paternity, plemene a evidence dalších zdravotních a zootechnických informací o zvířeti. Identifikace genetických markerů SNP a genů zapojených v procesech vrozené imunitní ochrany přispěla k našemu chápání interakce mezi genomem ovce a patogenem Cps a je příslibem pro šlechtění na zdraví a infekční odolnost.

## **Poděkování**

Výzkumný tým VÚŽV, v.v.i. děkuje za vstřícnost a ochotu farmářům, kteří během řešení projektu spolupracovali při organizování odběrů vzorků a sdílení informací o svých ovcích. Bez jejich podpory by tento výzkum nebyl vůbec možný. Oceňujeme také vzájemnou spolupráci se všemi dalšími řešitelskými organizacemi a SCHOK. Především tým VÚVeL, v.v.i. nám umožnil sdílení sérologických dat a získání fenotypů protilátek u všech analyzovaných zvířat. Finanční podpora pro řešení projektu byla poskytnuta MZE ČR, granty NAZV QK1910082 a MZE-RO0723. Výsledky analýz a dostupná literatura jsou k dispozici u autora článku.