

Controlling infectious disease in food animals

A study of two diseases in poultry

Associate Professor Peter Smooker
School of Applied Sciences



www.mit.edu.au



食用動物における感染症のコントロール

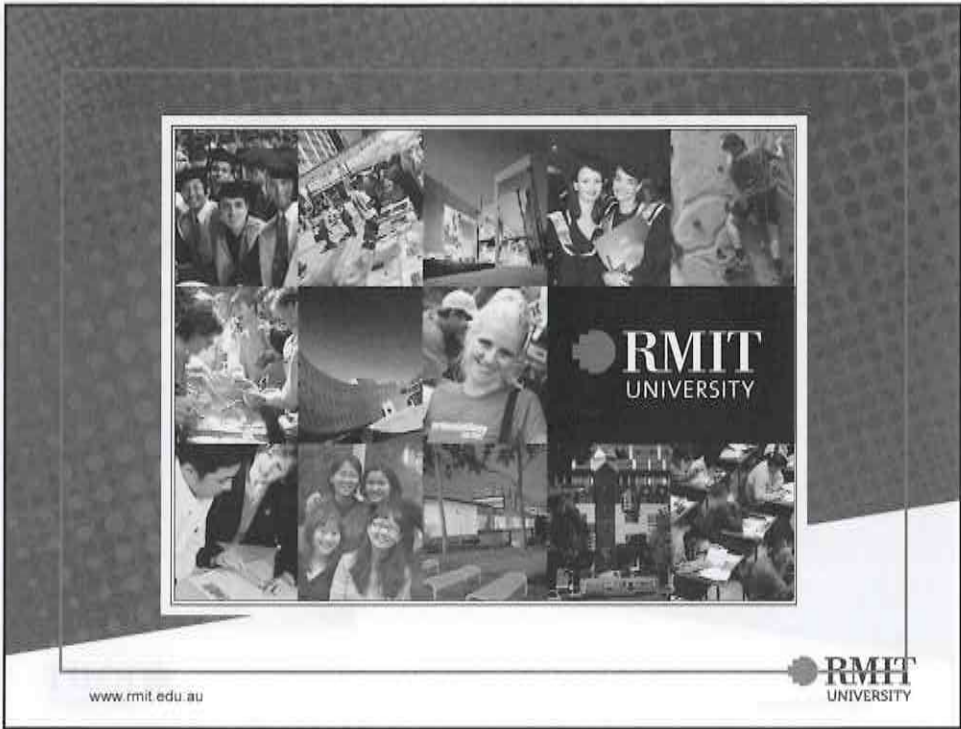
家禽の2つの病気の研究

応用科学部 准教授
ピーター・スモーカー

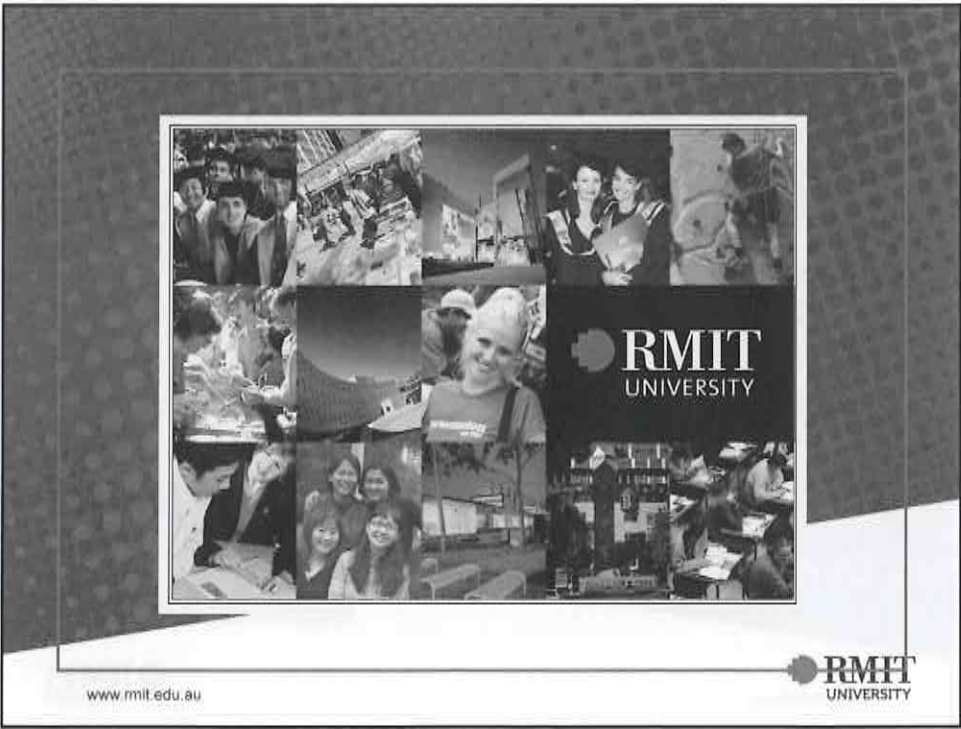


www.mit.edu.au





A collage of black and white photographs showing students in various settings: classrooms, libraries, and social gatherings. The RMIT University logo is prominently displayed in the center-right of the collage. Below the collage, the website address www.rmit.edu.au is printed on the left, and the RMIT University logo is printed on the right.



A collage of black and white photographs showing students in various settings: classrooms, libraries, and social gatherings. The RMIT University logo is prominently displayed in the center-right of the collage. Below the collage, the website address www.rmit.edu.au is printed on the left, and the RMIT University logo is printed on the right.

History

- Over 115 years old (est. 1887)
- Melbourne based, universally placed
- Formerly known as
 - The Working Men's College
 - Royal Melbourne Institute of Technology



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

歴史

- 115年以上の歴史(1887年に設立)
- メルボルンを本拠地として、世界に展開
- 以前の名称
 - ワーキングメンズカレッジ
 - ロイヤルメルボルン工科大学



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

Campus locations

Onshore

- RMIT City campus
- Bundoora campus
- Brunswick campus
- Point Cook
- RMIT Hamilton

Offshore International Universities

- RMIT Vietnam
 - Ho Chi Minh City
 - Hanoi
 - Saigon South



キャンパスの場所

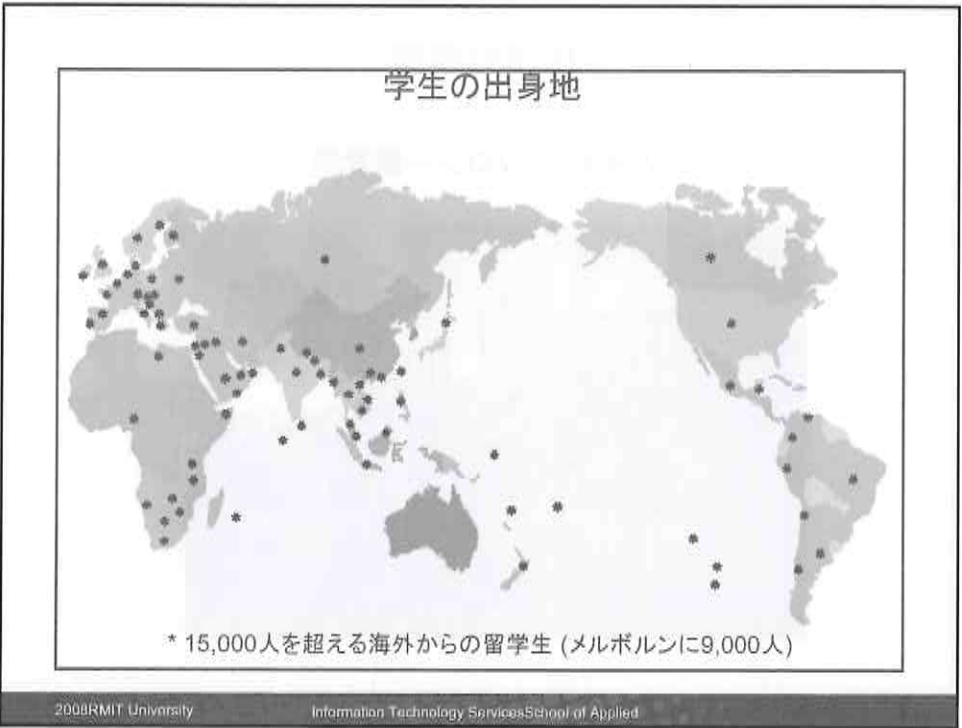
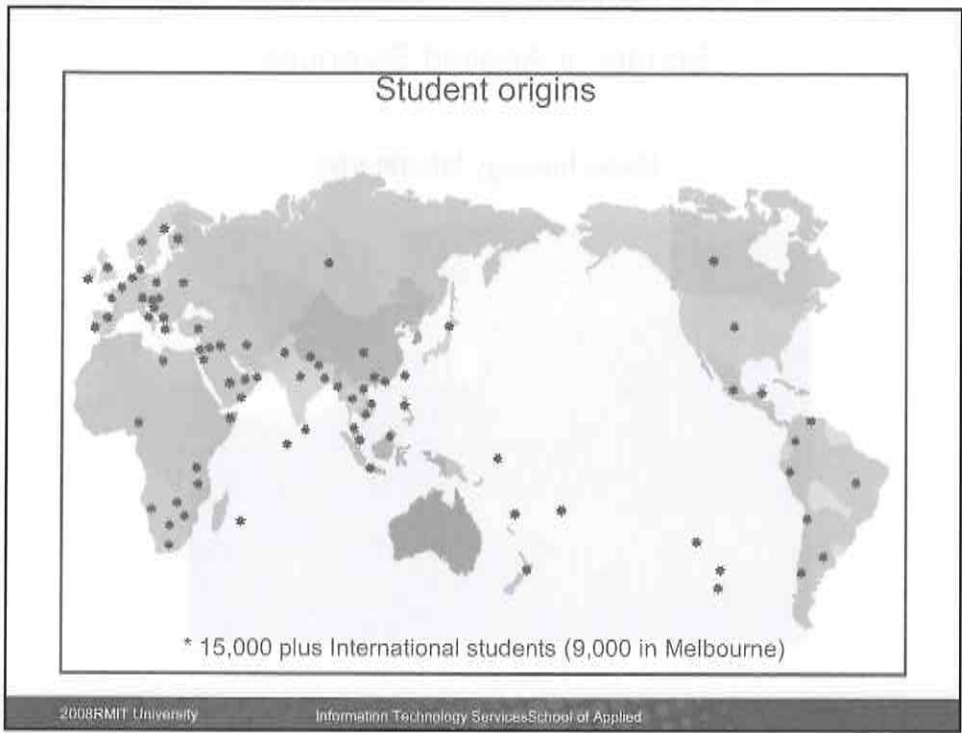
国内

- RMITシティ・キャンパス
- バンドゥーラ・キャンパス
- ブランズウィック・キャンパス
- ポイント・クック
- RMITハミルトン

海外の大学

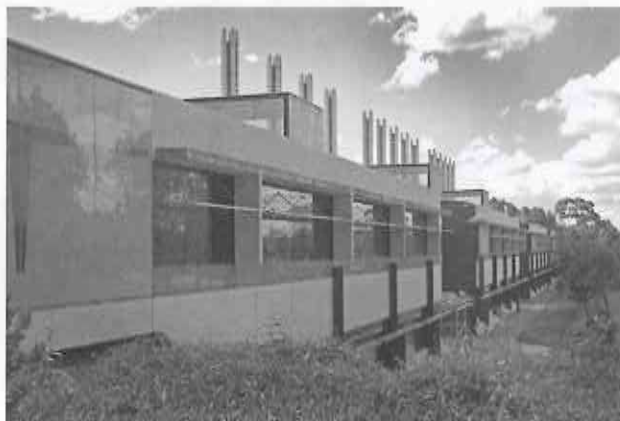
- RMITベトナム
 - ホーチミン市
 - ハノイ
 - サイゴンサウス





School of Applied Sciences

Biotechnology laboratories

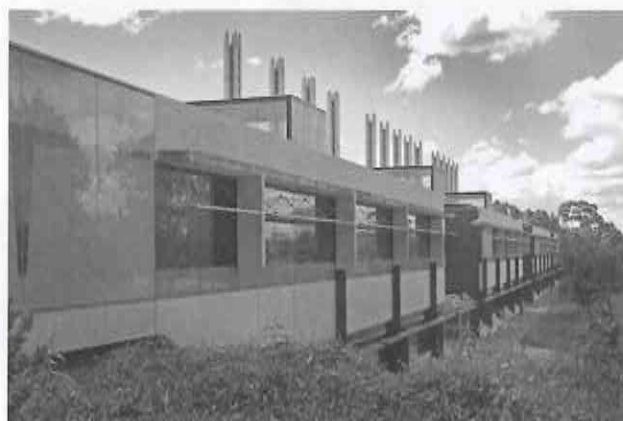


2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

応用科学部

バイオテクノロジー研究所



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

School of Applied Sciences

Fermentation Laboratory



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

応用科学部

発酵研究所



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

Infectious diseases in food production animals

- Disease has two differing effects on farm animals:
 1. Results in lower production, and therefore lower profit margins, or;
 2. Can result in the transmission of disease from the animal to humans (i.e: Zoonotic bacteria)
- In poultry, two major bacterial diseases are Salmonella and Campylobacter
- Both can infect and cause disease in humans

食用動物における感染症

- 家畜へ与える病気の2つの異なる影響:
 1. 生産量の低下、それによる利益率の低下
 2. 動物からヒトへの感染が可能 (つまり、人畜共通細菌)
- 家禽における2つの代表的な細菌性疾患は、サルモネラ菌とカンピロバクターである
- いずれもヒトへ感染し、病気を発症しうる

Salmonella enterica

- Salmonella enterica comprises hundreds of serovars
- Various serovars can infect either humans, chickens, or both
- *Salmonella enterica* Serovar Typhi causes typhoid fever
- *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium causes Salmonellosis
 - Often abbreviated to *S. typhimurium*
- The predominant serovar in chickens is *S. typhimurium*
 - Also *S. sofia* (rarely infects humans)



サルモネラ菌

- サルモネラ菌は、数百の血清型で構成されている
- 様々な血清型は、ヒト、ニワトリ、または両方に感染する可能性がある
- ネズミチフス菌は、腸チフスを起こす
- ネズミチフス菌は、サルモネラ症を起こす
 - 英語では、*S. typhimurium* と短縮されることが多い
- ニワトリの血清型の主流は、ネズミチフス菌
 - *S. sofia* もある(ヒトへの感染は稀である)



Salmonella enterica Serovar Typhimurium

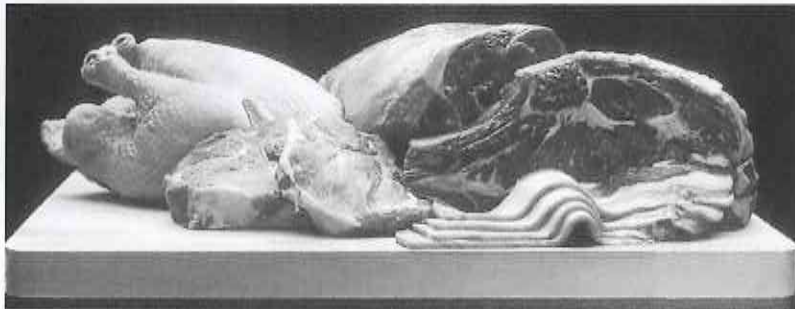
- *S. typhimurium* can chronically infect poultry
- Vertical transmission (via eggs) is common
- Horizontal transmission (bird-to-bird) is very fast within a poultry shed and leads rapidly to the entire flock being infected
- Infection is often asymptomatic in poultry, but can cause disease
- Can be passed to humans causing gastroenteritis

ネズミチフス菌

- ネズミチフス菌は、家禽に慢性的に感染することがある
- 垂直感染(親から子への感染)が一般的である
- 水平感染(鳥から鳥への感染)は、家禽小屋において非常に急速に広まり、群れ全体がすぐに感染する
- 感染は家禽において症状が見られないことが多いが、病気を起こすことがある
- ヒトへ感染して胃腸炎を起こすことがある

S. Typhimurium infections in humans

- Salmonellosis in humans
- Acute gastro-enteritis, usually self-limiting
- Typically contracted through contaminated foods

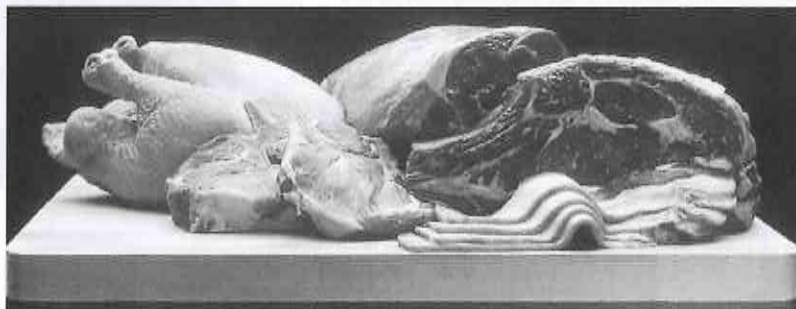


2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

ネズミチフス菌のヒトへの感染

- ヒトにおけるサルモネラ症
- 急性胃腸炎—通常は慢性化しない
- 一般的に、汚染された食物を通して感染する



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

Campylobacter

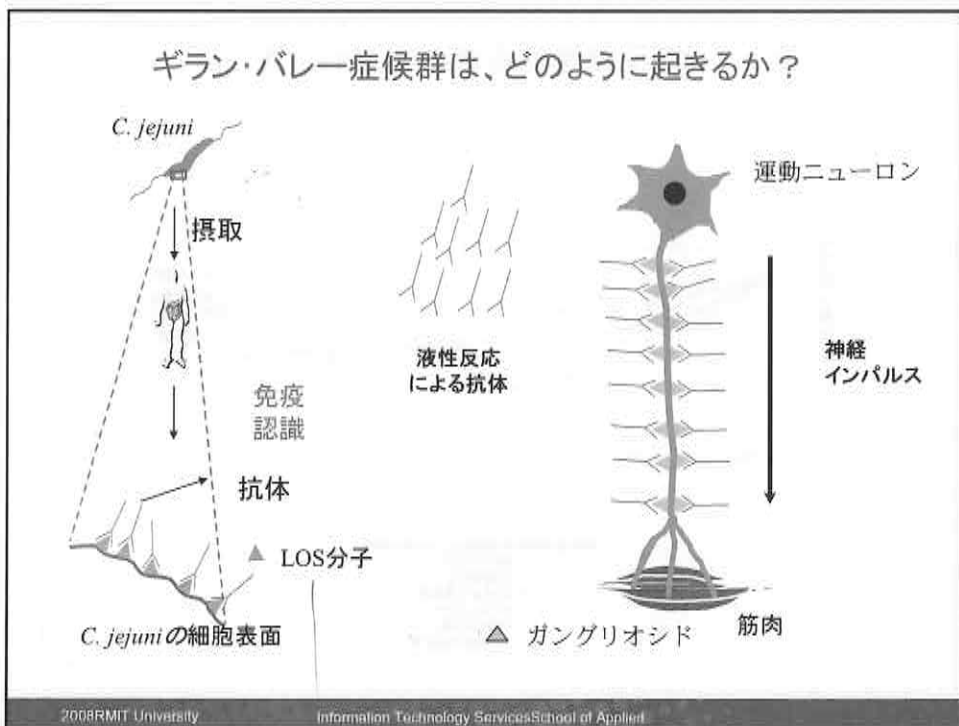
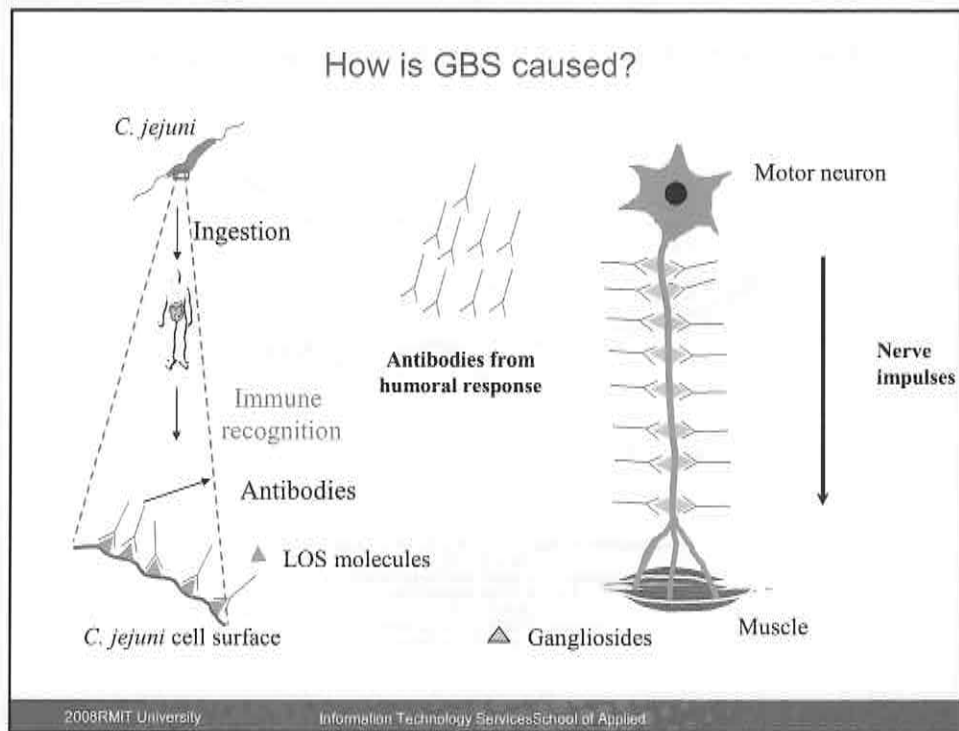
- Almost all chickens will harbour Campylobacter as a commensal
- This causes no ill-effects in poultry
- However, transmission to humans results in gastroenteritis, or Guillian-Bare syndrome (GBS)
- Post- harvesting measures to reduce Campylobacter (chilling, chlorine wash etc) are costly and can degrade the product
- A vaccine to reduce burdens would be the optimal solution



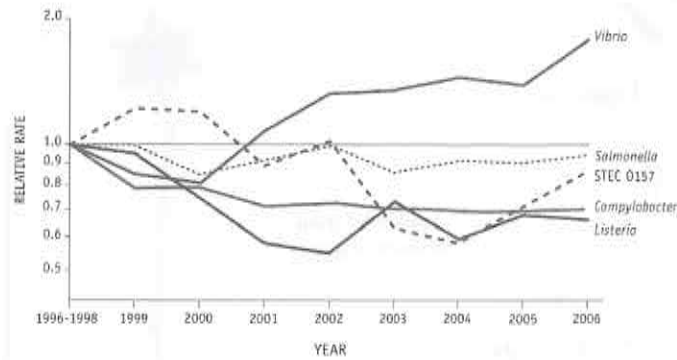
カンピロバクター

- ほとんどすべての家禽は、片利共生生物としてカンピロバクターを宿す
- これにより、家禽に悪影響は生じない
- ただし、ヒトへ感染すると、胃腸炎またはギラン・バレー症候群 (GBS) を起こす
- カンピロバクターを減らすための屠畜後の対策 (冷蔵、塩素消毒など) は、コストがかかり、製品の品質を低下させる可能性がある
- 負荷を抑えるためのワクチンは、最適な解決方法である





Relative incidences of bacterial disease in humans

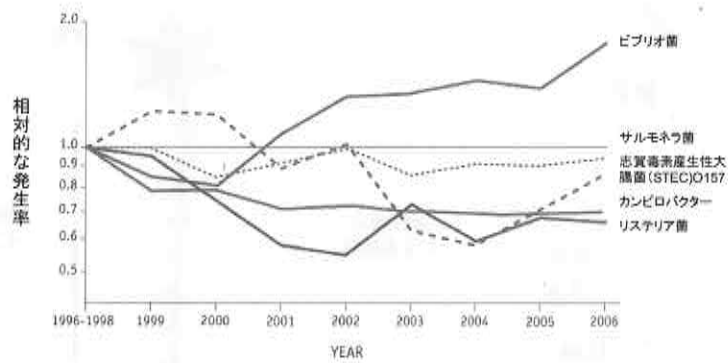


An integrated strategy for protecting the nation's food supply
 November 2007
 Department of Health and Human Services
 Food and Drug Administration
 Michael O. Leavitt
 Secretary of Health and Human Services
 U.S. Department of Health and Human Services

2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

ヒトにおける細菌性疾患の相対的な発生率

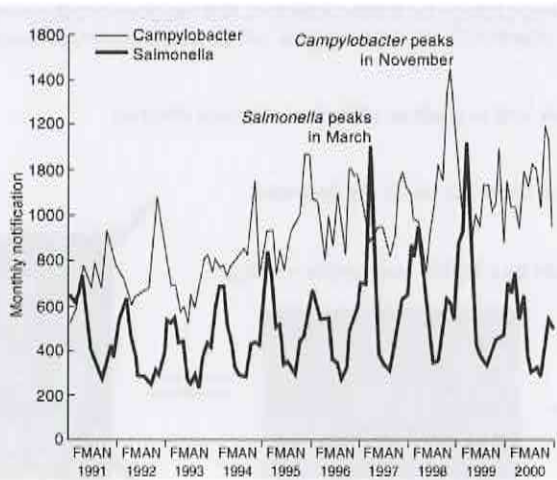


国の食品供給を保護するための統合戦略
 2007年11月
 保健福祉省
 アメリカ食品医薬品局
 マイケル・レビット
 保健福祉長官
 アメリカ保健社会福祉省

2008RMIT University

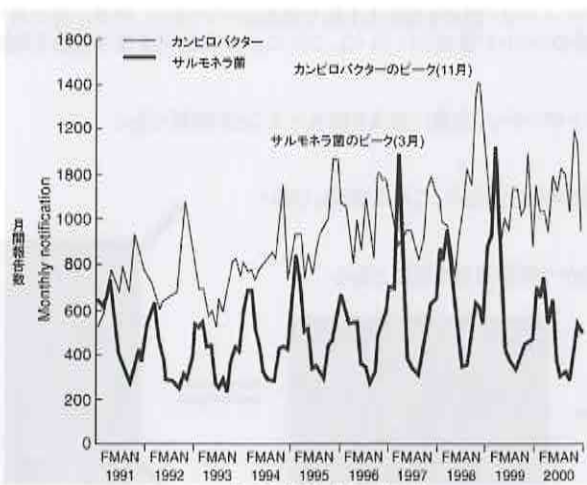
Information Technology Services School of Applied

Infection rates in Australia



MJA 2002 177 (11/12): 614-618

オーストラリアにおける感染率

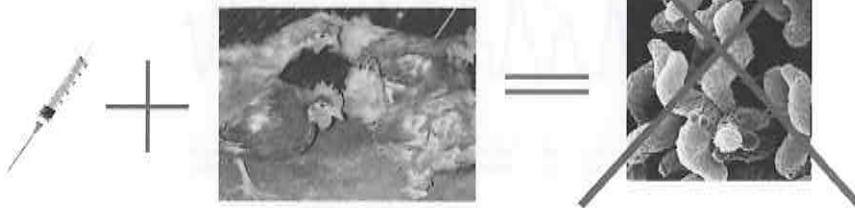


F=2月 M=5月 A=8月 N=11月

MJA 2002 177 (11/12): 614-618

Prevention of bacterial infection in poultry

- Biosecurity is a key strategy for limiting infection. Nothing goes into the poultry sheds that is not tested for infection. It also limits insects, which can also carry disease
- This is expensive, and in practice, difficult to eliminate infection
- Antibiotics can be used, but this is not desirable
- Vaccination would be a viable, sustainable strategy

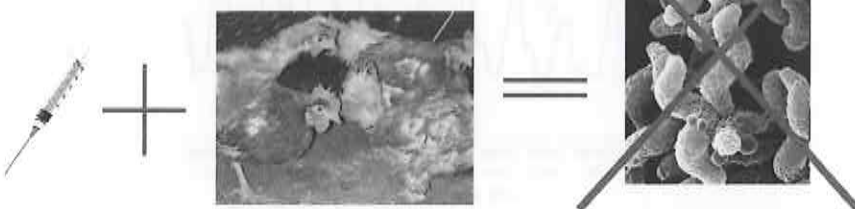


2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

家禽における細菌感染の防止

- バイオセキュリティは、感染を抑える主要な戦略の一つである。家禽小屋に持ち込まれるものは、すべて感染のテストが実施されている。これにより、病原菌を運ぶ昆虫も制限される
- この方法は、コストがかかり、実際に感染を除去することが困難である
- 抗生物質の使用も可能であるが、これは望ましくない
- ワクチンは、有効かつ持続可能な戦略である



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

Vaccination against Salmonella in poultry

- Vaccines have been developed that can protect poultry against infection by Salmonella
- This reduces disease in chickens, and also reduces transmission to humans
- One such vaccine is STM-1 (*Salmonella typhimurium* mutant 1)
- This vaccine was developed at RMIT by Professor Peter Coloe and colleagues
- After vaccination, chickens are significantly protected against colonisation

サルモネラ菌に対する家禽のワクチン接種

- 家禽をサルモネラ菌の感染から守るワクチンは既に開発されている
- これにより、ニワトリの病気が減り、ヒトへの感染も減る
- ワクチンの1つがSTM-1 (*Salmonella typhimurium* mutant 1)である
- このワクチンは、ピーター・コロエらによりRMITにおいて開発された
- ワクチン接種後、ニワトリは細菌の感染から強かに保護される

Why is a *Salmonella* vaccine needed for food animals?

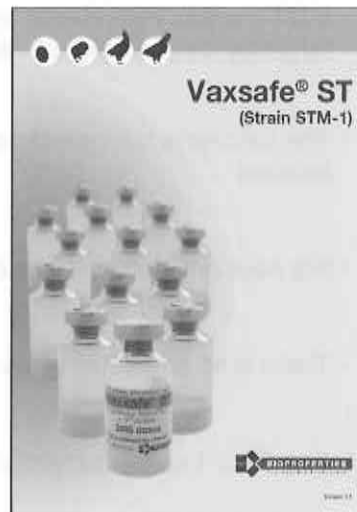
- Protection of flock, stock or herd against economic loss
- To stop transfer of disease
- To ensure product quality

なぜ、サルモネラ菌のワクチンは食用動物で必要か？

- 家畜を経済的な損失から保護する
- 病気の感染を止める
- 製品の品質を確保する

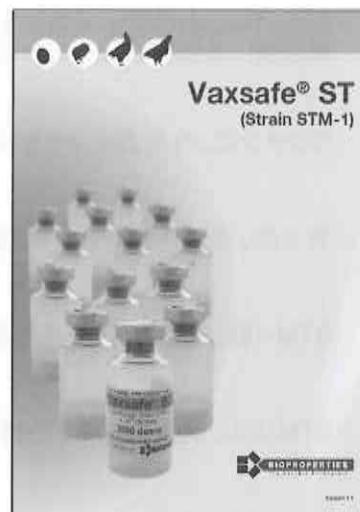
Vaxsafe[®] ST

- STM-1 is an attenuated, live vaccine
- It is administered to day-old chickens
- It is administered in drinking water
- STM-1 infects chicks, induces immune responses, but then dies
- The immune responses prevent infection by wild-type Salmonella



Vaxsafe[®] ST

- STM-1は、弱毒化した生ワクチンである
- 生後1日のニワトリに投与される
- 飲料水で投与される
- STM-1は、ヒヨコに感染し、免疫反応を誘導し、死滅する
- 免疫反応は野生型のサルモネラ菌による感染を防止する



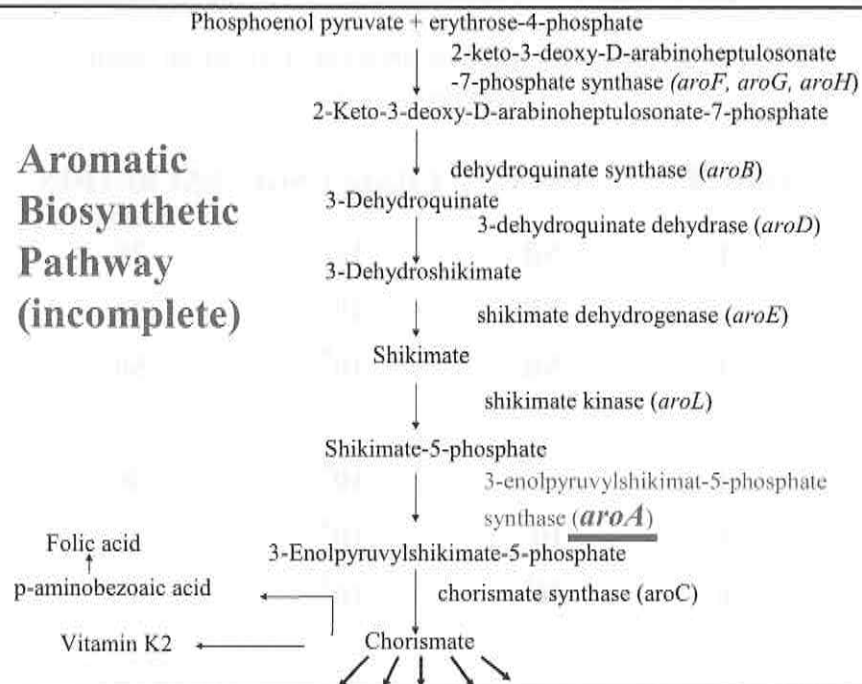
Vaxsafe[®] ST

- STM-1 is was constructed by transposon– mediated mutagenesis targeting the *aroA* gene region. This results in attenuation
- The vaccine is not considered a GMO, as no foreign genes have been inserted
- We have characterised the chromosomal architecture
- There is no possibility of reversion of the STM-1 strain
- Can STM-1 deliver antigens from other pathogens?

Vaxsafe[®] ST

- STM-1は、*aroA*遺伝子領域を標的としたトランスポゾンを用いた突然変異誘発により作られた。これにより弱毒性が得られる
- ワクチンは、外来遺伝子が組み込まれておらず、GMO とはみなされない
- 我々は、染色体構造の特徴付けを行った
- STM-1株が復帰突然変異する可能性はない
- STM-1は、他の病原体から抗原を運搬することができるか？

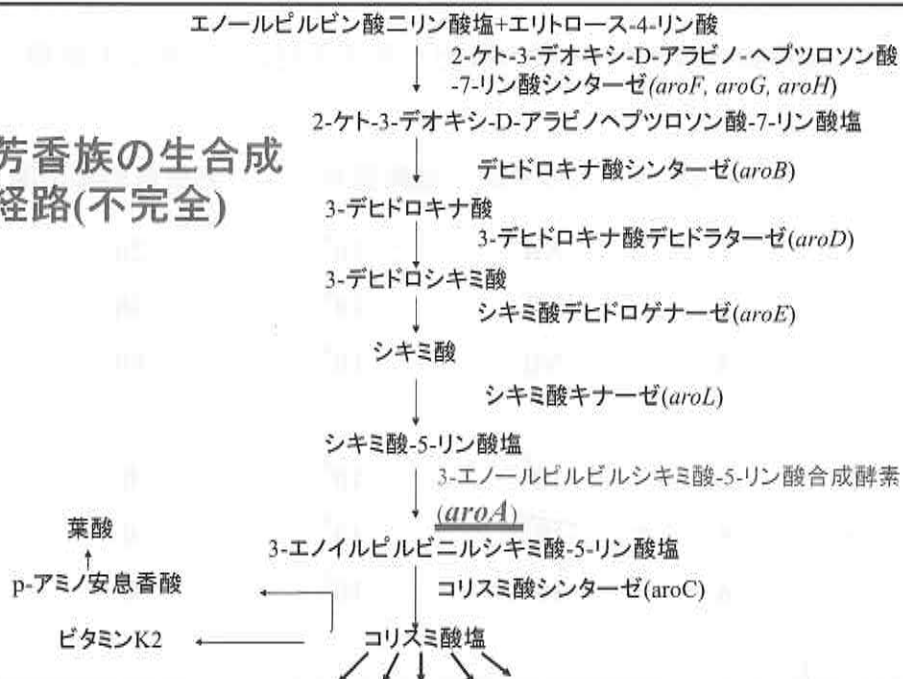
Aromatic Biosynthetic Pathway (incomplete)



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

芳香族の生合成経路(不完全)



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

Effects of oral vaccination on excretion of virulent *S. typhimurium*

GROUP	VACC.	CHALLENGE	EXCRETION at 35 days (%)
1	Nil	10^4	20
2	Nil	10^6	30
3	Nil	10^8	50
4	10^8	10^4	0
5	10^8	10^6	0
6	10^8	10^8	0

有毒なネズミチフス菌の排出へ与える経口ワクチンの効果

グループ	ワクチン	抗原投与	35日目の排出率 (%)
1	Nil	10^4	20
2	Nil	10^6	30
3	Nil	10^8	50
4	未接種 10^8	10^4	0
5	経口 10^8	10^6	0
6	10^8	10^8	0

この7
 12/10/4/6
 1/3/2
 1/10/2/3/8
 3/4/9
 3/4/9
 ↓
 1/10/2/3/8
 1/10/2/3/8
 1/10/2/3/8

A Universal Vaccine Delivery System?

- As in laboratory strains of *E. coli*, *Salmonella* can be “tricked” into expressing genes from other species
- These genes produce protein
- The protein will be recognised by the host as foreign (as all *Salmonella* antigens are) and immune responses to it will be induced
- These may be able to protect against the pathogen
- Therefore, vaccination with recombinant STM-1 will protect against **both** *Salmonella* and the pathogen from where the heterologous gene was derived

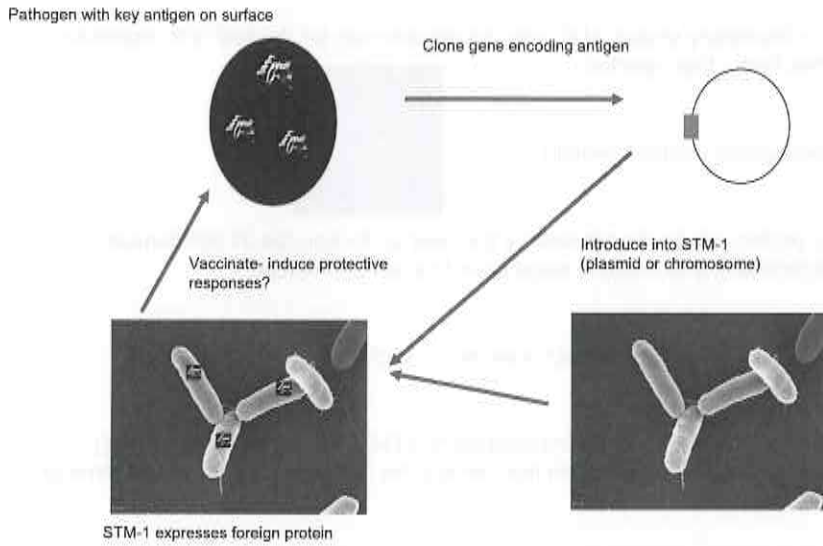


共通のワクチン供給システム？

- 大腸菌の実験室株と同様に、他の種から遺伝子を発現するようにサルモネラ菌を「だます」ことができる
- これらの遺伝子はタンパク質を生成する
- タンパク質は、宿主により異物として認識され(すべてのサルモネラ菌の抗原と同様)、それに対する免疫反応が誘導される
- これらは 病原体から保護できる場合がある
- したがって、組み換えSTM-1を用いたワクチンは、サルモネラ菌および異種遺伝子に由来する病原体の両方から保護することができる



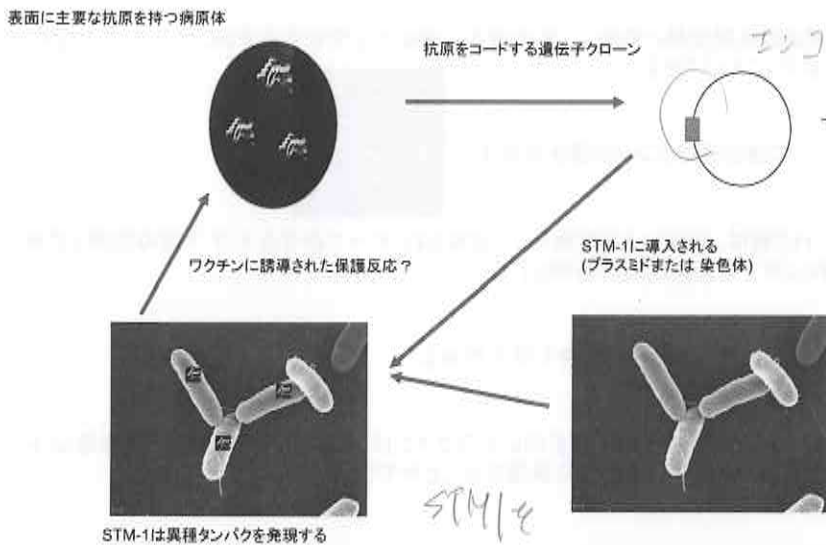
Heterologous Expression



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

異種タンパク質の発現



2008RMIT University

Information Technology Services School of Applied

Handwritten notes at the bottom of the page:

エンコナ9
2007

STM-1

ワクチンに誘導された保護反応?

エンコナ9

24

Why use Salmonella as a vaccine vector for antigens?

- It will induce both cellular and humoral responses
- It can be given orally
- The antigen when expressed in Salmonella can be produced cheaply
- Salmonella *aro* mutants are safe and cannot revert to virulence
- The vaccine could be produced for incorporation into chicken and duck feed
- The vaccine strain does not persist in the environment

なぜ、抗原に対するワクチンの運搬体として、サルモネラ菌を使用するのか？

- 細胞反応および液性反応を両方誘導する
- 経口投与できる
- サルモネラ菌で発現した抗原は、安価に生産することができる
- サルモネラ菌 *aro* 変異体は、安全であり毒性が復帰しない
- このワクチンは、ニワトリおよびカモに餌に配合するために生産することができる
- このワクチンの株は、環境に残らない

Possible limitations of the use of Salmonella as a vector?

- The glycosylation of the antigen will have to be manipulated
- The vaccine may not take if antibiotics are present
- The vaccine may not induce a strong antibody response against the heterologous antigen
- Insertion of foreign genes requires regulatory approval

運搬体としてサルモネラ菌を使用する上での制約事項は？

- 抗原のグリコシル化は、巧みな操作が必要である
- ワクチンは、抗生物質が存在する場合に有効でないことがある
- ワクチンは、異種抗原に対して強い抗体反応を誘導しない可能性がある
- 外来遺伝子の組み込みには、規制許可を得る必要がある

Preliminary studies (model antigens)



FEMS Microbiology Letters 227 (2004) 211–217



www.fems-microbiology.org

Delivery of a heterologous antigen by a registered *Salmonella* vaccine (STM)

Endang W. Bachtiar ^a, Kuo-Ching Sheng ^{a,b}, Theodora Fife ^b, Anna Gamvrellis ^b,
Magdalena Plebanski ^a, Peter J. Coloe ^a, Peter M. Smooker ^{a,c}

^a Department of Biotechnology and Environmental Biotechnology, RMIT University, P.O. Box 71, Bundoora, Vic. 3083, Australia

^b Faculty and Infectious Diseases Unit, Health Research Institute, Biola Park, Vic., Australia

Received 25 June 2003; received in revised form 11 August 2003; accepted 29 August 2003

First published online 19 September 2003

Cellulose and Vaccine Immunization, Jan. 2004, p. 78–87.
ISSN 0924-6460/04/0000-0000/\$30.00
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 18, No. 1

Influence of Promoter, Gene Copy Number, and Preexisting Immunity on Humoral and Cellular Responses to a Vected Antigen Delivered by a *Salmonella enterica* Vaccine^V

Manvendra Saxena, Peter J. Coloe, and Peter M. Smooker^{*}

^{*}School of Applied Sciences, RMIT University, Bundoora, Victoria, Australia

Received 12 July 2000; Returned for modification 6 October 2000; Accepted 20 October 2000

予備研究(モデル抗原)



FEMS Microbiology Letters 227 (2004) 211–217



www.fems-microbiology.org

Delivery of a heterologous antigen by a registered *Salmonella* vaccine (STM)

Endang W. Bachtiar ^a, Kuo-Ching Sheng ^{a,b}, Theodora Fife ^b, Anita Gamvrellis ^b,
Magdalena Plebanski ^a, Peter J. Coloe ^a, Peter M. Smooker ^{a,c}

^a Department of Biotechnology and Environmental Biotechnology, RMIT University, P.O. Box 71, Bundoora, Vic. 3083, Australia

^b Faculty and Infectious Diseases Unit, Health Research Institute, Biola Park, Vic., Australia

Received 25 June 2003; received in revised form 11 August 2003; accepted 29 August 2003

First published online 19 September 2003

Cellulose and Vaccine Immunization, Jan. 2004, p. 78–87.
ISSN 0924-6460/04/0000-0000/\$30.00
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 18, No. 1

Influence of Promoter, Gene Copy Number, and Preexisting Immunity on Humoral and Cellular Responses to a Vected Antigen Delivered by a *Salmonella enterica* Vaccine^V

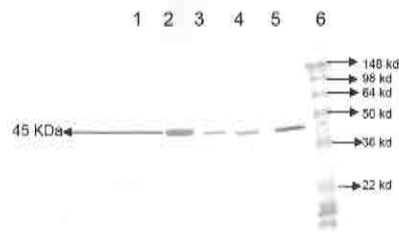
Manvendra Saxena, Peter J. Coloe, and Peter M. Smooker^{*}

^{*}School of Applied Sciences, RMIT University, Bundoora, Victoria, Australia

Received 12 July 2000; Returned for modification 6 October 2000; Accepted 20 October 2000

What have we found?

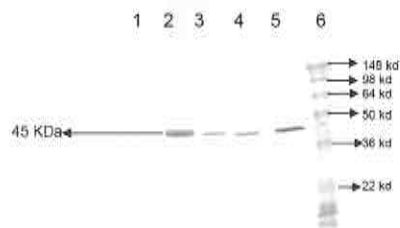
- The foreign gene can be expressed from either a plasmid (medium copy-number), or inserted into the chromosome. Both result in immune response induction to the recombinant protein
- Both humoral and cellular responses are induced
- Various promoters can be utilised
- Pre-existing immunity does not hinder responses to vaccination



Expression of a *Campylobacter* antigen visualised by western blotting. Lanes:
 1, STM-1 without plasmid vector;
 2, nirB promoter, chromosome;
 3, nirB promoter, plasmid;
 4, pagC promoter, chromosome;
 5, pagC promoter plasmid;
 6, Protein marker. Molecular mass is indicated

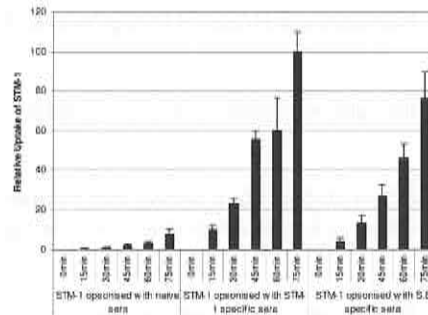
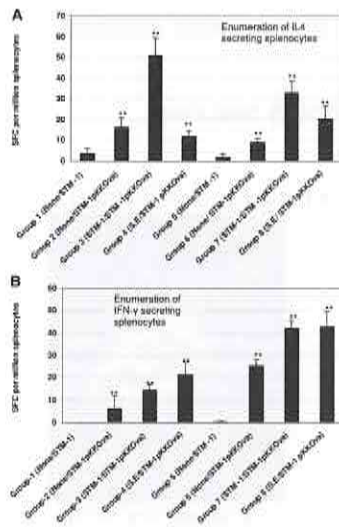
研究結果

- 外来遺伝子は、プラスミド(中程度のコピー数のプラスミド)から発現したり、染色体へ組み込むことができる。いずれも組み換えタンパクを誘導する免疫反応をもたらす
- 液性反応および細胞反応が誘導される
- さまざまなプロモーターを使用することができる
- 既存の免疫性は、ワクチン接種に対する反応を阻害しない



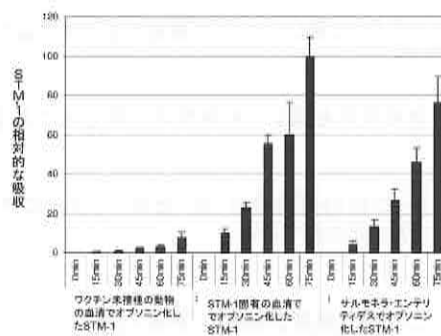
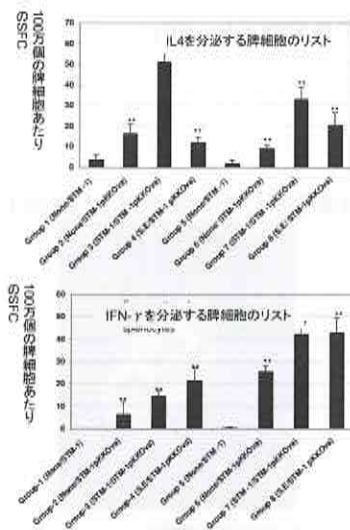
ウェスタンブロッティングにより視覚化したカンピロバクター抗原の発現
 ライン:
 1, STM-1(プラスミドベクターなし)
 2, nirBプロモーター、染色体
 3, nirBプロモーター、プラスミド
 4, pagCプロモーター、染色体
 5, pagCプロモーター、プラスミド
 6, タンパク質マーカー 分子量が示されている

Examples of Responses



How can we apply this ability to "vector" antigens?

反応の例



どのようにして、この能力を抗原の「運搬」に応用するか？

An Example- can we vaccinate against Campylobacter?

- Can colonise chickens to high levels (10^9 per gram intestinal contents)
- Immune responses are weak. Limited inflammatory responses
- Some studies have shown that components of the outer membrane of Campylobacter kill chicken immune cells
- Not known what these components are



C. jejuni (Fry, 1997)

例ーカンピロバクターに対するワクチン予防は可能か？

- ニワトリに高いレベルで感染する(1グラムの腸の内容物あたり 10^9)
- 免疫反応が弱い。炎症反応が限定的である
- いくつかの研究では、カンピロバクターの外膜の成分がニワトリの免疫細胞を殺すことが示されている
- この構成要素が何かは不明である



C. jejuni (Fry:1997年)

Vaccination

- Many vaccine trials performed over the years
- Most strategies DO NOT reduce subsequent colonisation of *Campylobacter*
- Vaccination requires two complementary facets:
 1. The choice of antigen
 2. How the antigen is delivered- must induce *appropriate* immune responses

ワクチン投与

- 多くのワクチン試験は、長年に亘り実施されている
- ほとんどの戦略では、カンピロバクターのその後の感染を減らすことができない
- ワクチン投与には、下記の2つの補完的な側面を考慮しなければならない:
 1. 抗原の選択
 2. 抗原の運搬方法 - 適切な免疫反応を誘導しなければならない

Choice of antigen

- This was traditionally done empirically- e.g. take sera from infected animals, identify recognised antigen. Often does not lead to good antigen selection
- However, there are well recognised virulence antigens in most pathogens
- Every organism has a set of genes encoding proteins specific for that organism (orphan genes)
- It is proposed that these proteins are primarily responsible for the niche the organism can occupy
- Some of these may be promising vaccine targets

抗原の選択

- 従来は経験に基づいて行われていた。例えば、感染した動物から血清を取り、抗原を特定する方法である。抗原の良い選択につながらないことが多い
- しかし、ほとんどの病原体には、十分に認められた毒性抗原がある
- 各有機体は、固有のタンパク質をコードする一連の遺伝子を持っている(種特異的な遺伝子)
- これらのタンパク質は、主に有機体が専有できるニッチの原因であると考えられている
- これらの一部は、将来性のあるワクチン標的の可能性がある

Analysis of Campylobacter genome and proteome

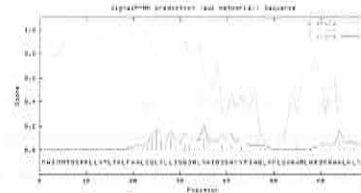
- Genome is small- 1.64 Mbp. Very tightly packed with genes
- Encodes approximately 1600 proteins
- How many of these are on the cell membrane or secreted (and can therefore interact with host cells)?
- We can use Bioinformatics to predict this:
 - SignalP to see which proteins carry traditional signal peptides
 - SecretomeP to see which proteins might be secreted non-classically
 - Hydrophobicity plots to search for transmembrane regions

カンピロバクターのゲノムおよびプロテオームの分析

- ゲノムは小さく(1.64 Mbp)、遺伝子が詰まっている
- 約1600個のタンパク質をコードする
- その何個が細胞膜の上にあるか、または分泌されるか(したがって、宿主と情報交換できるか)?
- バイオインフォマティクスを使用して予測することができる
 - SignalP—どのタンパク質が従来のシグナル・ペプチドを運搬するか判断するため
 - SecretomeP—どのタンパク質が従来と異なる形で分泌されるかを判断するため
 - 疎水性プロット—膜透過の部位を探すため

Secreted proteins

- It is predicted that there are almost 400 proteins that are either transmembrane proteins or secreted
- Some of these may be potential vaccine candidates
- Selected genes will be inserted into STM-1, and used in vaccine trials
- This research is ongoing



```

# 0000
SignalP-NH2予測 (auKネットワーク-レンジス)
Length = 70
# Position Position Delta Output Signal p-value?
max C 45 0.578 0.13 80
max F 45 0.518 0.12 80
max R 44 0.499 0.07 188
max D 1-14 0.491 0.48 188
C 1-14 0.330 0.41 188
# Best likely cleavage site between pos. 39 and 41: 39L-41A
    
```

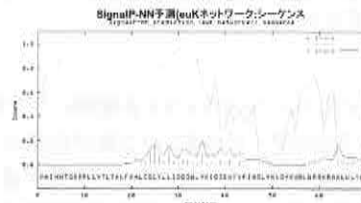
分泌されるタンパク質

- 膜透過性のタンパク質または分泌されるタンパク質は、約400個あると予測されている
- この一部は、ワクチン候補となる可能性がある
- 選抜した遺伝子をSTM-1へ組み込み、ワクチン試験で使用する
- この研究は継続中である

入力タンパク質は348個のアミノ酸を持っている—下記のプロットを参照



アミノ酸の幅(ウィンドウサイズ=20)



```

# 0000
SignalP-NH2予測 (auKネットワーク-レンジス)
Length = 70
# Position Position Delta Output Signal p-value?
max C 23 0.578 0.12 200
max F 43 0.513 0.13 200
max R 22 0.460 0.01 188
max D 1-14 0.401 0.08 188
C 1-14 0.363 0.13 188
# Best likely cleavage site between pos. 24 and 25: 24E-25A
    
```