

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
MGR KATARZYNY PASIK,
PT. **ZASTOSOWANIE**
WYSOKOPRZEPUSTOWEGO SEKWENCJONOWANIA
DO KONTROLI JAKOŚCI
WYBRANYCH SZCZEPIONEK DLA DROBIU

Promotor: **prof. dr hab. Katarzyna Domańska - Blicharz**
Promotor pomocniczy: **dr Joanna Sajewicz - Krukowska**



STRESZCZENIE

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach jest jedynym w Polsce weterynaryjnym laboratorium europejskim o randze OMCL. Zgodnie ze swoim statusem przynależności do sieci GEON, PIWet-PIB wykonuje szereg badań z zakresu urzędowej kontroli jakości immunologicznych weterynaryjnych produktów leczniczych, na podstawie wymogów Farmakopei Europejskiej. Kontrola ta obejmuje zarówno badania fizykochemiczne jak i biologiczne, natomiast nadal brak jest wytycznych dotyczących kontroli genomowej szczepionek weterynaryjnych. Pierwsze kroki w celu wdrożenia nowatorskich metod wysokoprzepustowego sekwencjonowania HTS w kontroli jakości szczepionek postawiła już farmacja dla ludzi, natomiast niniejsza praca jest pierwszą w Polsce i jedną z nielicznych na świecie, dotyczącą takich badań w farmacji weterynaryjnej.

Pierwszym zadaniem pracy była analiza unikatowej bazy danych kontroli seryjnej wstępnej IWPL. Analiza ta pozwoliła na wynotowanie liczby dawek wszystkich szczepionek dla drobiu wprowadzanych do obrotu w Polsce na przełomie lat 2018-2020, a przez to wybór najczęściej wprowadzanych do obrotu szczepionek do kolejnego etapu badań – analiz

laboratoryjnych. Odnotowano 19 jednostek chorobowych drobiu, dla których w wyżej wymienionych latach prowadzona była immunoprofilaktyka w Polsce. Większość stanowiły szczepionki wiusowe (96,8%) a wśród nich IWPL przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli kur, natomiast pozostałe to szczepionki bakteryjne (1,9%) z dominującymi preparatami przeciwko salmonellozie oraz szczepionki pasożytnicze (1,3%). Analiza elektronicznej bazy danych pozwoliła na wynotowanie typów oraz szczepów szczepionkowych poszczególnych IWPL na polskim rynku przeciwko IB (typy: Mass, 793B, QX, Var2) oraz *Salmonella* (serowary: Enteritidis; Gallinarum, Pullorum; Typhimurium).

Kolejnym celem pracy było wdrożenie metody HTS do kontroli jakości wirusowych oraz bakteryjnych szczepionek dedykowanych dla drobiu, począwszy od etapu ekstrakcji materiału genetycznego aż po stwierdzenie zgodności serowaru/serotypu szczepionkowego z deklaracją podaną przez producenta. Do badań wykorzystano po trzy serie szczepionek wirusowych (V-01: szczep 4/91, typ 793B; V-02: szczep Ma5, typ Mass; V-03: szczep D388, typ QX) oraz bakteryjnych (B-01: szczep 441/014 *S. Enteritidis*; B-05: szczep Sm24/Rif12/Ssq *S. Enteritidis*; B-07: CAL10 Sm+/Rif+/Ssq *S. Enteritidis*). Wszystkie badane próbki spełniały standardy jakości w zakresie stężenia materiału genetycznego oraz stopnia integralności. W następstwie analiz wysokoprzepustowego sekwencjonowania, badania prowadzone z użyciem narzędzi bioinformatycznych wykazały, że metoda HTS jest skuteczna w analizie składu genetycznego, analizie filogenetycznej a także analizie serotypu/serowaru i szczepu szczepionkowego zarówno szczepionek wirusowych jak i bakteryjnych.

W przypadku szczepionek wirusowych, łączne wykorzystanie dwóch narzędzi: Kraken2 oraz BWA, pozwoliło na identyfikację Avian coronavirus w każdej próbce badanej jako odczytów dominujących (V-01: 70-75%; V-02: 81-83%; V-03: 43-63%). Zadeklarowane przez producenta szczepy szczepionkowe zostały potwierdzone zarówno przy pomocy narzędzia BLAST: 4/91 (V-01), Ma5 (V-02), QX (V-03), jak i z wykorzystaniem wyników analizy filogenetycznej regionu kodującego S1 oraz WGS, które potwierdziły najwyższe podobieństwo szczepu: V-01 do 4/91, V-02 do Ma5 oraz V-03 do 1148-A QX. Ponadto metoda HTS okazała się być skuteczna w ocenie homogenności subpopulacji wirusa szczepionkowego, poprzez kontrolę występowania wariantów. Największą zmienność odnotowano dla V-01 (17 SNP), średnią dla V-02 (4 SNP), natomiast najbardziej stabilna genetycznie była V-03 (3 SNP). W przypadku szczepionek bakteryjnych, wykazano, iż serowar Enteritidis może być potwierdzony za pomocą następujących narzędzi: Kraken2 (99,5% odczytów *Salmonella enterica*), SeqSero2, JSpeciesWS oraz SISTR. Ostatnie z wymienionych narzędzi, SISTR,

pozwoili dodatkowo na identyfikacj szczepów szczepionkowych. Wykonane analizy potwierdziły bliskie pokrewieństwo szczepów B-05 oraz B-07. Analiza SISTR potwierdziła, że obie szczepionki zawierają ten sam szczep szczepionkowy CHS44. Analiza filogenetyczna wykazała, iż oba wymienione preparaty znajdują się w jednym klastrze drzewa filogenetycznego. Ponadto analiza cgMLST potwierdziła, że cgST było identyczne dla wszystkich serii B-05 oraz B-07 i wynosiło 81326. Wykazano brak jakichkolwiek różnic pomiędzy allelami w genomie obu szczepionek, podczas gdy pomiędzy B-05 i B-07 a B-01, wykazano różnice w liczbie 162 alleli. Metoda HTS pozwoliła również na detekcj genów oporności na środki przeciwbakteryjne w szczepionkach bakteryjnych. Dwa z trzech użytych narzędzi bioinformatycznych (AMRfinder_2 oraz CARD) zidentyfikowały geny kodujące podjednostki pomp efluksowych RND, charakterystycznych m.in. dla rifampicyny, czyli tego antybiotyku na który oporność szczepów bakteryjnych deklarował producent. Wykazano także, że metoda HTS z zastosowaniem narzędzia PlasmidFinder 2.1 jest skuteczna w detekcji replikonów plazmidowych w szczepionkach bakteryjnych. Przeprowadzone analizy pozwoliły na potwierdzenie, że we wszystkich seriach preparatów B-05 oraz B-07, występują geny replikonów plazmidowych, co wskazuje nie tylko na obecność plazmidu ale także na konieczność prowadzenia tego typu badań monitoringowych z uwagi na możliwość horyzontalnego transferu genów. Ponadto gen replikonu plazmidowego IncFIB(S)_1 oraz IncFII(S) znajdowały się na tym samym kontigu, co świadczy o obecności plazmidu multireplikacyjnego.

Przeprowadzone badania są dowodem na zasadność technologii HTS w kontroli jakości szczepionek weterynaryjnych dedykowanych dla drobiu, a tym samym stanowią fundament analiz kolejnych grup szczepionek. Ponadto, wyniki badań, takie jak identyfikacja genów kodujących podjednostki pomp efluksowych oraz genów replikonów plazmidowych w szczepionkach *Salmonella* czy też identyfikacja wariantów unikatowych w szczepionkach IB, są dowodem na konieczność wzmożenia prac nad wdrażaniem wytycznych badań genomicznych przez organizacje takie jak EDQM we współpracy z laboratoriami OMCL oraz producentami szczepionek.

SUMMARY

The National Veterinary Research Institute in Puławy is the only European veterinary laboratory in Poland with the status of OMCL. In accordance with this status of belonging to the GEON network, NVRI performs a number of tests in the field of official quality control of immunological veterinary medicinal products, in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia. This control includes both physico-chemical and biological tests, but there is still no guidance on the genomic control of veterinary vaccines. The first steps to implement innovative methods of high-throughput sequencing HTS in the quality control of vaccines have already been taken by human pharmacy, while this work is the first in Poland and one of the few in the world concerning such research in veterinary pharmacy.

The first task of the thesis was to analyze the unique IVMP batch control database. This analysis made it possible to record the number of doses of all poultry vaccines marketed in Poland at the turn of 2018-2020, and thus select the most frequently marketed vaccines for the next stage of research - laboratory analyses. There were 19 diseases of poultry recorded, for which immunoprophylaxis was carried out in Poland in the above-mentioned years. Most of them were viral vaccines (96.8%), among them IVMPs against infectious bronchitis of chickens, while the rest were bacterial vaccines (1.9%) with dominant preparations against salmonellosis and parasitic vaccines (1.3%). The analysis of the electronic database made it possible to list the types and strains of individual IVMPs on the Polish market against IB (type Mass, 793B, QX, Var2) and *Salmonella* (serovar Enteritidis; Gallinarum, Pullorum; Typhimurium).

Another aim of the work was to implement the HTS method for quality control of viral and bacterial vaccines dedicated to poultry, starting from the optimization of genetic material extraction to confirming the compliance of the vaccine serovar/serotype with the declaration provided by the manufacturer. Three batches of viral vaccines (V-01: strain 4/91, type 793B; V-02: strain Ma5, type Mass; V-03: strain D388, type QX) and bacterial vaccines (B-01: strain 441/014 *S. Enteritidis*; B-05: strain Sm24/Rif12/Ssq *S. Enteritidis*; B-07: CAL10 Sm+/Rif+/Ssq *S. Enteritidis*) were used for the study. All tested samples met the quality standards in terms of the concentration of genetic material and the degree of integrity. Following high-throughput sequencing analyses, studies conducted using bioinformatics tools have shown that the HTS method is effective in genetic composition analysis, phylogenetic analysis as well as serotype/serovar and vaccine strain analysis of both viral and bacterial vaccines.

In the case of viral vaccines, the combined use of two tools: Kraken2 and BWA allowed the identification of Avian coronavirus in each sample tested as dominant readings (V-01: 70-75%; V-02: 81-83%; V-03: 43-63%). The vaccine strains declared by the manufacturer were confirmed both with the BLAST tool: 4/91 (V-01), Ma5 (V-02), QX (V-03), and with the use of the results of the phylogenetic analysis of the S1 coding region and WGS, which confirmed highest strain similarity: V-01 to 4/91, V-02 to Ma5 and V-03 to 1148-A QX. In addition, the HTS method proved to be effective in evaluating the homogeneity of the vaccine virus subpopulation by identifying the occurrence of variants. The highest variability was noted for V-01 (17 SNPs), the average for V-02 (4 SNPs), while the most genetically stable was V-03 (3 SNPs). For bacterial vaccines, it has been shown that Enteritidis serovar can be confirmed with the following tools: Kraken2 (99.5% of *Salmonella enterica* reads), SeqSero2, JSpeciesWS and SISTR. The last of these tools, SISTR, additionally enabled the identification of vaccine strains. The performed analyzes confirmed the close relationship of the B-05 and B-07 strains. SISTR analysis confirmed that both vaccines contain the same CHS44 vaccine strain. The phylogenetic analysis showed that both of these preparations are in one cluster of the phylogenetic tree. In addition, cgMLST analysis confirmed that the cgST was identical for all B-05 and B-07 batches and was 81326. No differences were found between alleles in the genome of both vaccines, while between B-05/B-07 and B-01, differences in the number of 162 alleles. The HTS method also allowed for the monitoring of antimicrobial resistance genes in bacterial vaccines. Two of the three bioinformatics tools used (AMRfinder_2 and CARD) identified genes encoding subunits of RND efflux pumps, characteristic of e.g. for rifampicin, i.e. the antibiotic to which the manufacturer declared the resistance of bacterial strains. It was also shown that the HTS method using the PlasmidFinder 2.1 tool is effective in the detection of plasmid replicons in bacterial vaccines. The analyzes carried out allowed to confirm that all batches of B-05 and B-07 preparations contain genes of plasmid replicons, which indicates not only the presence of the plasmid, but also the need to conduct this type of monitoring studies due to the possibility of horizontal gene transfer. In addition, the IncFIB(S)_1 and IncFII(S) plasmid replicon genes were on the same contig, indicating the presence of a multi-replication plasmid.

The research carried out proves the legitimacy of the HTS technology in quality control of veterinary vaccines dedicated to poultry, and thus constitutes the foundation for the analysis of subsequent groups of vaccines. In addition, the results of research, such as the identification of genes encoding efflux pump subunits and plasmid replicon genes in *Salmonella* vaccines or

the identification of unique variants in IB vaccines, prove the need to intensify work on the implementation of genomic testing guidelines by organizations such as EDQM in cooperation with OMCL laboratories and manufacturers vaccines.