

## UITNODIGING

### OPENBARE VERDEDIGING

Novel Insights into Factors Associated to the  
Pathogenesis of Broiler Necrotic Enteritis

Ir. Evelien Dierick

19 mei 2021

## PROMOTOREN

Prof. dr. Ir. Filip Van Immerseel

Prof. Dr. Richard Ducatelle

Dr. Evy Goossens

Faculteit Diergeneeskunde - UGent

## Curriculum Vitae

---

Evelien Dierick werd geboren op 26 augustus 1993 te Beveren-Waas. In 2011 behaalde zij het diploma Wetenschappen-Wiskunde aan de Sint-Maarten Bovenschool. Daarna startten haar universitaire studies aan de faculteit Bio-ingenieurswetenschappen van de Universiteit Gent. In 2016 behaalde ze het diploma van Bio-ingenieur in de biomedische cel- en genbiotechnologie met grote onderscheiding. Geboeid door het wetenschappelijk onderzoek, startte zij eind 2016 haar doctoraatsstudie bij de vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten (Livestock Gut Health Team) aan de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Gent, dewelke initieel werd gefinancierd door het Europese SAPHIR project. In 2018 verkreeg zij een persoonlijke beurs aan het Fons Wetenschappelijk Onderzoek (FWO) – Strategisch basisonderzoek. Tevens behaalde zij in 2021 het diploma van de Doctoraatsopleiding in de Diergeneeskundige Wetenschappen. Evelien Dierick is auteur en medeauteur van verschillende wetenschappelijke publicaties en nam actief deel aan internationale congressen rond necrotische enteritis en darmgezondheid.

## Waar?

---

De verdediging vindt plaats op woensdag 19 mei 2021 om 16 uur.

Wegens de Covid-19 maatregelen zal de verdediging enkel toegankelijk zijn via livestream.

De verdediging zal gehouden worden in het Nederlands.

## Inschrijven

---

Indien u wenst deel te nemen aan de videoconferentie, gelieve voor 18 mei een e-mail te sturen naar [evelienb.dierick@ugent.be](mailto:evelienb.dierick@ugent.be) om hiervoor een persoonlijke uitnodiging te ontvangen.

## Leden examencommissie

---

Prof. dr. Dominiek Maes  
Voorzitter van de examencommissie

Prof. dr. Ir. Herman Favoreel  
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Dr. Leen Timbermont  
Medische microbiologie, Universiteit Antwerpen

Dhr. Johan Van Erum  
Galluvet

Prof. dr. Kurt Houf  
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

## Samenvatting proefschrift

---

Niet-hemorragische necrotische enteritis (NE) is een van de belangrijkste darmaandoeningen die de pluimvee industrie teistert. De ziekte wordt gekenmerkt door necrose en inflammatie van de dunne darm wat resulteert in zowel een verlaagd dierwelzijn alsook grote economische verliezen. Het globale verlies ten gevolge van de ziekte wordt geschat op ruim \$6 miljoen per jaar, wat neerkomt op \$0.0625 per dier. NE in vleeskippen wordt veroorzaakt door *Clostridium perfringens* type G, een darmpathogeen die in staat is het NetB toxine te produceren. Tot op heden blijven vele aspecten van de pathogenese van NE in vleeskippen onbekend. De nood aan bijkomend onderzoek naar NE is daardoor hoog, zowel om dit proces te ontrafelen alsook om deze te implementeren in toepasbare preventie strategieën.

NE is multifactorieel waarbij enkel de aanwezigheid van pathogeen *C. perfringens* niet volstaat om de ziekte te induceren. Predisponerende factoren werken in op de gastro-intestinale omgeving wat leidt tot kolonisatie en groei van de bacterie. Deze factoren kunnen zowel gerelateerd zijn aan de voeder samenstelling, stress factoren uit de omgeving, een verzwakt immuunsysteem ten gevolge van virale infecties of co-infectie met de *Eimeria* parasiet (coccidiose). Vele van deze factoren werden eerst gerapporteerd in het veld, waarna hun impact experimenteel werd geverifieerd. Darmaandoeningen gerelateerd aan *C. perfringens* worden in het veld vaak benoemd als 'overeating disease' doordat dieren die meer eten en beter groeien vaker aan deze ziekten lijden. Gedurende dit doctoraat werd bevestigd dat snelle groei een predisponerende factor is voor NE aangezien dieren met een hoger lichaamsgewicht en groeisnelheid voor *C. perfringens* infectie ernstigere NE-letsels ontwikkelden. Het groeivoordeel voor infectie van de dieren die later gematigde tot ernstige NE ontwikkelden ging verloren na infectie. Dit leidt tot de vraag of het economische voordeel van een verbeterde groei opweegt tegen de kosten die worden veroorzaakt door het toenemend aantal darmaandoeningen.

Het genoom van pathogene *C. perfringens* stammen codeert voor vele pathogeen-specifieke virulentie factoren, dewelke van belang kunnen zijn gedurende de pathogenese. Verschillende technieken kunnen gebruikt worden bij het bestuderen van deze factoren zoals een *in vivo* infectie model en het ontwikkelen van knock-out mutanten. Vele varianten op het NE infectie model werden reeds beschreven waarbij verschillende combinaties aan predisponerende factoren werden geïmplementeerd. Dit bemoeilijkt het onderling vergelijken van resultaten uit verschillende studies. Twee in de literatuur beschreven modellen werden in dit doctoraat onderling vergeleken met betrekking tot hun capaciteit om NE te induceren en de ernst van de geïnduceerde ziekte. De modellen verschilden in timing en frequentie van de *Eimeria* toediening. Het model waarbij *Eimeria* tweemaal en vroegtijdig werd toegediend resulteerde in een hoger aantal NE-positieve dieren en een meer verspreide verdeling van de letselscores waardoor dit model kan beschouwd worden als het optimale model. Ook knock-out mutanten worden vaak gebruikt om pathogenese te bestuderen. Het ClosTron mutagenese systeem kan gebruikt worden om knock-out mutanten te construeren waarbij een gen naar keuze wordt onderbroken. In dit doctoraat werd het gebruik van digitale PCR geëvalueerd als techniek om mutanten te selecteren. Zowel het geoptimaliseerde infectie model als de knock-out mutanten werden gebruikt in verdergaand onderzoek.

Tot op heden blijven vele aspecten van het kolonisatieproces van *C. perfringens* in de darm ongekend. Een cruciale stap gedurende dit proces is het initiële contact van de pathogeen met de mucuslaag. Deze laag vormt een barrière die het onderliggende weefsel beschermt tegen zowel voedselpartikels, commensale microbiota als pathogenen. Vele darmpathogenen zoals *C. perfringens* zijn in staat om deze mucuslaag af te breken gebruik makend van mucus-degraderende enzymen. Dit resulteert in de vrijstelling van nieuwe bindingsplaatsen voor *C. perfringens*, nieuwe regio's waarop de toxines en andere virulentie factoren kunnen inwerken of de vrijstelling van metaboliseerbare oligomeren die kunnen dienen als voedingsbron. Twee chitinase enzymen ChiA en ChiB werden geïdentificeerd als pathogeen-specifieke virulentie factoren van *C. perfringens* type G. Aangezien hun productie verhoogd is gedurende het begin van de pathogenese kunnen deze enzymen potentieel van belang zijn gedurende kolonisatie. Dit onderzoek is het eerste dat de functionaliteit en de potentiële rol van deze chitinasen gedurende de pathogenese nagaat. Beide chitinasen zijn inderdaad enzymatisch actief en in staat meerdere substraten te knippen. Ook bij een temperatuur van 42°C en pH5, de condities die overeenstemmen met deze in de darm van de kip, kan enzymactiviteit worden waargenomen. Beide chitinasen hebben een andere substraatvoorkeur. ChiB bindt en knipt voornamelijk chitine, een lineair substraat terwijl ChiA eerder de voorkeur heeft voor grotere, meer vertakte substraten zoals mucus. Deze bevindingen zijn tevens in overeenstemming met de voorspelde structuur van het katalytisch domein waarbij ChiA en ChiB respectievelijk een wijde en smalle bindingsgroeve bezitten. *C. perfringens* mutanten dewelke niet in staat zijn tot het produceren van ChiA of ChiB groeiden trager in media gecomplementeerd met mucus in vergelijking met de originele wildtype stam. Aangezien mutanten niet in staat zijn om mucus als bijkomende voedingsbron te gebruiken worden chitinasen aanzien als cruciale factoren in kolonisatie van *C. perfringens*.

Voorspelde verdere restricties in het gebruik van antimicrobiële middelen en het toenemende bewustzijn van de consument rond dierwelzijn resulteert in een toenemende vraag aan alternatieve methodes om NE tegen te gaan. Aangezien *C. perfringens* een toxine-producerende bacterie is, werd vaccinatie snel aanzien als de optimale strategie. Tot op heden werd voornamelijk gefocust op het beschermend potentieel van alpha toxine en NetB. Subcutane vaccinatie hiermee resulteerde echter enkel in gedeeltelijke bescherming tegen NE. Aangezien deze toxines pas in een

later stadium van de ziekte tot expressie komen, zou het kunnen dat de geïnduceerde antilichaamrespons te laat optreedt en de verdere ontwikkeling van de ziekte niet meer kan inhiberen. Het induceren van een antilichaamrespons tegen een antigeen dat vroeger in de pathogenese van belang is, zoals de chitinases, is veelbelovend. In dit proefschrift werd aangetoond dat de chitinases die geproduceerd worden door *C. perfringens* type G immunogeen zijn. Hierdoor kunnen chitinases aanzien worden als potentiële kandidaat immunogenen die van belang zijn in verdere vaccinatie ontwikkeling.

De ontwikkeling van een oraal vaccin kent vele voordelen zoals hun makkelijke implementatie in het veld en hun potentieel om zowel een systemische als mucosale immuun response te induceren. Niet-pathogene *B. subtilis* kan gebruikt worden als een levende vaccin vector om een heteroloog antigeen aan het mucosale immuunsysteem te presenteren. De bacterie kan zowel voorkomen onder de vorm van vegetatieve cellen als spores. De interactie tussen beiden vormen met immuuncellen van de kip was bij aanvang van dit project nog onbekend, waardoor de keuze welke vorm het antigeen tot expressie moet brengen werd bemoeilijkt. Gedurende dit doctoraat werden meerdere *in vitro* studies uitgevoerd waarbij de fagocytose en activatie van kipmacrofagen door beide vormen van *B. subtilis* werd onderzocht. Vegetatieve cellen werden in hogere mate opgenomen door de macrofagen in vergelijking met spores. Daarnaast moeten sporen germineren in het fagolysosoom om afgebroken te worden. Enkel vegetatieve cellen waren in staat om de macrofagen te activeren. Hierdoor werden de vegetatieve cellen dan ook verkozen als optimale plaats om het antigeen tot expressie te brengen. Aangezien de chitinases immunogeen zijn en vegetatieve cellen de optimale plaats zijn om een heteroloog antigeen te presenteren, werden *B. subtilis* stammen ontwikkeld dewelke in staat zijn een van de chitinases tot expressie te brengen in het cytoplasma van de vegetatieve cel.

We kunnen concluderen dat gedurende dit doctoraatsproefschrift meerdere aspecten van de vroege pathogenese van *C. perfringens* werden onderzocht, die ofwel invloed hebben op de gevoeligheid van de gastheer ofwel een cruciale virulentie factor zijn gedurende kolonisatie. We zijn de eersten die hebben aangetoond dat de chitinases ChiA en ChiB geproduceerd door *C. perfringens* type G functionele enzymen zijn die interageren met de intestinale mucuslaag wat leidt tot een verhoogde bacteriële groei. Doelbewust deze chitinases inhiberen is een veelbelovende strategie in de ontwikkeling van controle strategieën tegen NE in vleeskippen.