

nébih

termőföldről
az asztalig

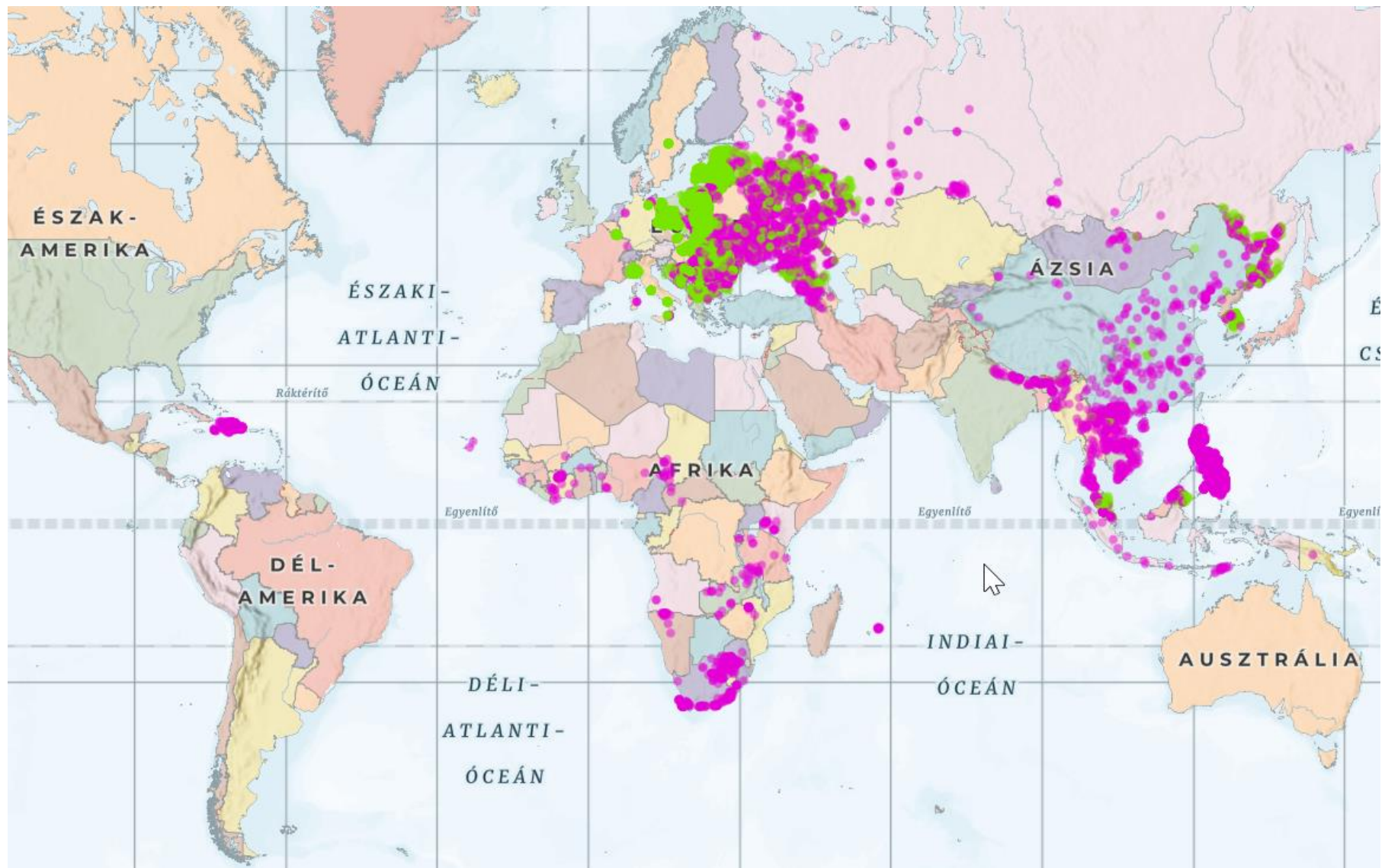
Vakcinák használata az afrikai sertéspestis elleni védekezésben

Dr. Bálint Ádám

2024. 05. 16. Zalakaros



**ASP helyzet
2018-2024**



***Kínában
alkalmazott ASP
vakcinák***

- Úgynevezett ASP kísérleti vakcinák,
- Házi készítésű vakcinák
- ASP „vakcina”: NDV, interferon
- Csempészett spanyol/portugál vagy vietnámi vakcinák



Ideális vakcina

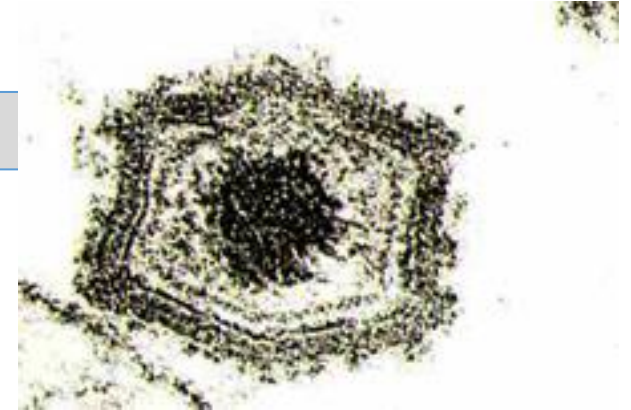
- Ártalmatlan
 - Virémia
 - Vírusürítés
 - Klinikai tünetek (vemhes kocák)
 - Virulencia visszanyerése
 - Rekombináció
 - Genetikai stabilitás (in vitro, in vivo)
- Hatékony
 - Humorális és celluláris immunválasz
 - Sterilizáló immunitás
 - Homológ és heterológ törzsek
 - Vaddisznó, házisertés
- DIVA



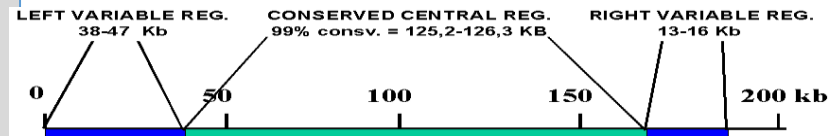
ASPV
tulajdonságai

Komplex virus, nagy méretű, hosszú genom: 170-190 kb (**170 gén**)

Komplex molekuláris struktúra, **ismeretek hiánya**



**Nagy genetikai
variabilitás, 24 genotípus**



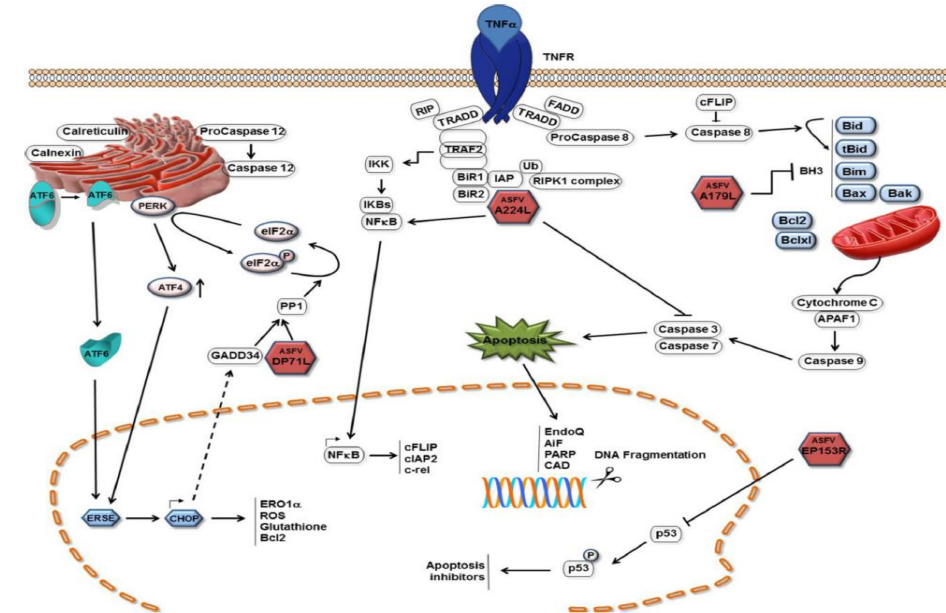
200 nm
**Több mint 100 struktúrális
fehérje**

Nem termelődnek **megfelelő neutralizáló antitestek**

Keresztvédettség laboratóriumi módszerekkel nem detektálható: **állatkísérletek**

Kórfejlődés

- Veleszületett immunválasz gátlása (50 gén)
 - I-es típusú interferonok, gyulladásos citokinek, apoptózis blokkolása
- MPS sejtek
 - Apoptózis (gyulladásos mediátorok)
- Lymphopénia
 - Bystander apoptózis
- Trombocitopénia
 - Megakariociták apoptózisa
- Vérzések
 - Endotelsejtek károsodása/fagocita aktivitása, DIC
- Lépfarktus
 - Makrofágok lízise, bazális membrán szabaddá válása, vérkeringés leállása



ASP vakcinák

Vakcina típus	Ártalmatlanság	Hatékonyság	DIVA
<u>Inaktivált</u>	Ártalmatlan	Részleges védelem	Nem
<u>Alegység</u> DNS RNS Rekombináns fehérje Vírus vektor	Ártalmatlan	Részleges védelem	Igen
<u>Élő attenuált vírus</u> Természetes Szövetpasszázs Célzott módosítások	Nem megfelelő „Túl jó” Változó	Hosszú ideig tartó celluláris és humorális immunitás, Magas fokú hatékonyság, keresztvédelem	?

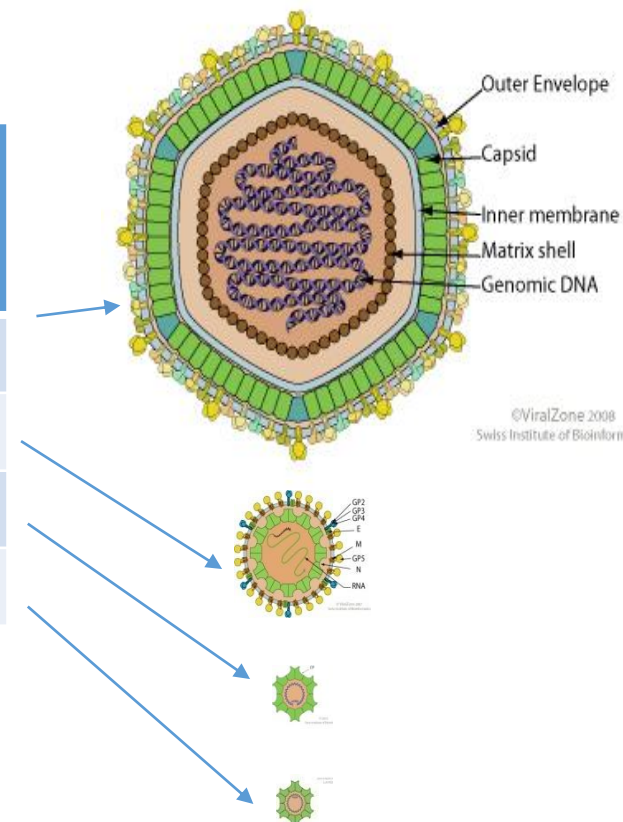


**ASPV genetikai
módosításának
nehézségei**

- Komplexitás

	Gének száma	Genom mérete (kilobázis)	Virion mérete (nanométer)	Fehérjék száma a virionban
ASPV	200	180	200	>50
PRRSV	10	15	60	8
Parvo	2	5	22	2
PCV2	2	2	17	1

- Megfelelő gének kiválasztása (attenuálás, DIVA)
- Fertőző klón nem áll rendelkezésre
- Sejtvonalak
- Tiszta mutáns vírus stock kialakítása bonyolult



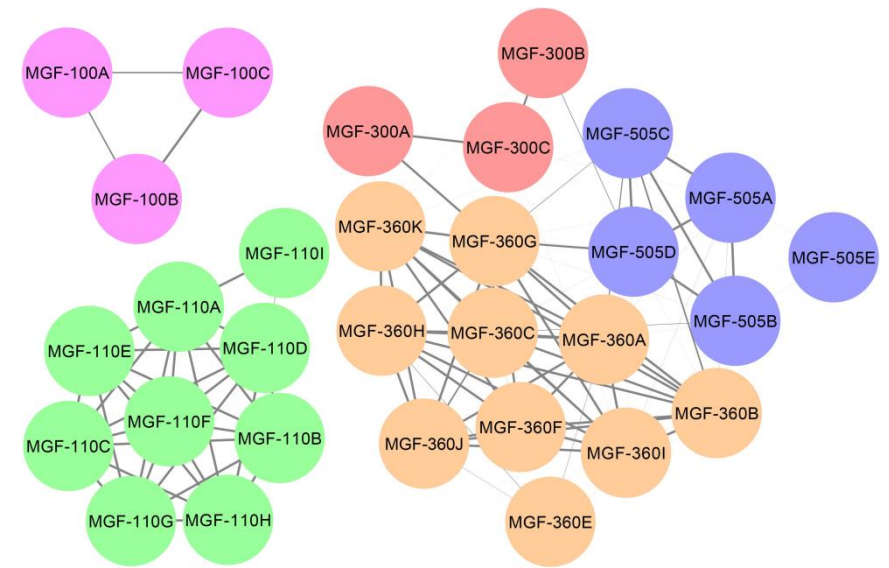
***Géndelégiós
mutáns törzsek***

- Vírus replikációért felelős gének
 - Makrofág
 - Nem osztódó sejt, oxidatív környezet: DNS károsodás
 - ASPV: replikációért, DNS javításért felelős gének, fehérjék
 - Timidin kináz, helikáz, (NTPáz), hiszton-like protein

Vakcina	Vírusterzs	Gén	Ártalmatlanság	Hatékonyság	DIVA
ASFV-g/VΔTK	II (Georgia 2010)	1 (TK)	X	✓	X
ASFV-ΔQP509L/ QP383R	II (CN/GS/2018)	2 (QP509L/ QP383R)	✓	X	X
ASFV-G-ΔA104R	II (Georgia 2010)	1 (A104R)	X	?	X

Géndelégiós mutáns törzsek

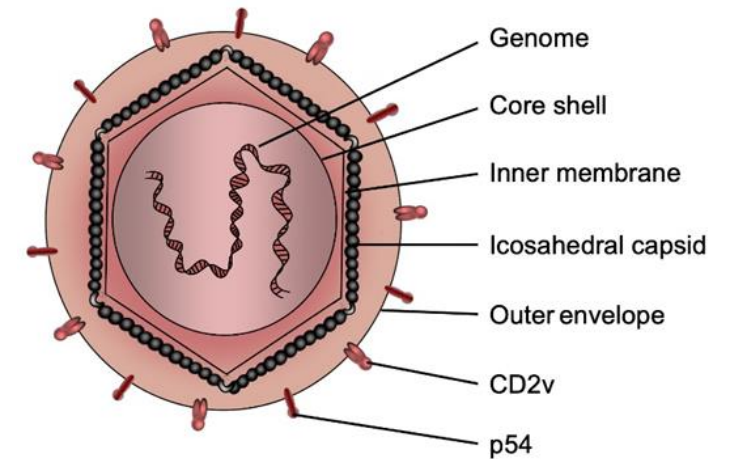
- Multigene family (MGF) gének
 - Genom 5', 3' végén (~40)
 - Virulens ASFV: nagyobb kópiaszám
 - Makrofág tropizmus
 - Veleszületett immunválasz gátlása



Vakcina	Vírustörzs	Gén	Ártalmatlanság	Hatékonyság	DIVA
ASFV-G-ΔMGF	II (Georgia 2007/1)	6 (MGF 360/505)	✓ (vaddisznó)	✓	✗
HLJ/18-6GD	HLJ/2018	6 (MGF 360/505)	✗	✓	✗
Benin-ΔMGF	I (Benin 97)	10 (MGF 360/505/530)	✓	✓	✗
Georgia-ΔMGF	II (Georgia 2007/1)	10 (MGF 360/505/530)	✓	✗	✗
SY18ΔL7-11	II (SY18)	5 (L7L-L11L)	✗	✓	✗
ASFV-Δ9L7R	II (CN/GS/2018)	2 (360-9L, 505-7R)	✓	✗	✗
ASFV-ΔH240R-Δ7R	II (HLJ18)	2 (H240R, MGF505-7R)	✓	✓	✗

Gédeléciós mutáns törzsek

- Sejthez kötődésért, hemadszorpcióért felelős gének
 - Virulens törzsek hemadszorpciót okoznak
 - Természetesen attenuálódott ASFV: deléció
 - CD2V, limfocita proliferáció gátlása
 - pE153R, programozott sejthalál gátlása
 - DIVA



Vakcina	Vírustörzs	Gén	Ártalmatlanság	Hatékonyság	DIVA
BA71ΔCD2	I (BA71)	1 (CD2v)	✓	✓	X
SY18-ΔCD2v-ΔUK	II (SY18)	2 (UK, CD2v)	✓	✓	X
ASFV-ΔECM3	II (GZ201801)	5 (MGF360-12L, -13L, -14L, EP153R, CD2v)	✓	✓	X
HLJ/18-7GD	II (HLJ/2018)	7 (MGF 360/505, CD2v)	✓	✓	✓

**Géndelációs
mutáns törzsek**

- Újonnan felfedezett gének ismeretlen funkcióval
 - 9GL (morfogenezis), UK (interferon inhibitor)
 - DP148R, I226R, A137R, E184R, I177L

Vakcina	Vírustörzs	Gén	Ártalmatlanság	Hatékonyság	DIVA
ASFV-G-Δ9GL	II (Georgia 2007/1)	1 (9GL)	X	✓	X
ASFV-G-Δ9GL/ΔUK	II (Georgia 2007/1)	2(9GL,UK)	✓	✓	X
HLJ/18-Δ9GL/ΔUK	II (HLJ/2018)	2(9GL,UK)	✓	X	X
BeninΔDP148R	I (Benin 97)	2 (DP148R)	✓	✓	X
SY18-ΔI226R	II (SY18)	1 (I226R)	✓	✓	X
ASFV-G-ΔA137R	II (Georgia 2007/1)	2 (A137R)	✓	✓	X
ASFV-G-ΔE184L	II (Georgia 2010)	1 (E184L)	X	✓	✓
ASFV-G-ΔI177 L	II (Georgia 2007/1)	1 (I177 L)	✓	✓	X
ASFV-G-ΔI177 L- ΔLVR	II (Georgia 2007/1)	1 (I177 L)	✓	✓	X

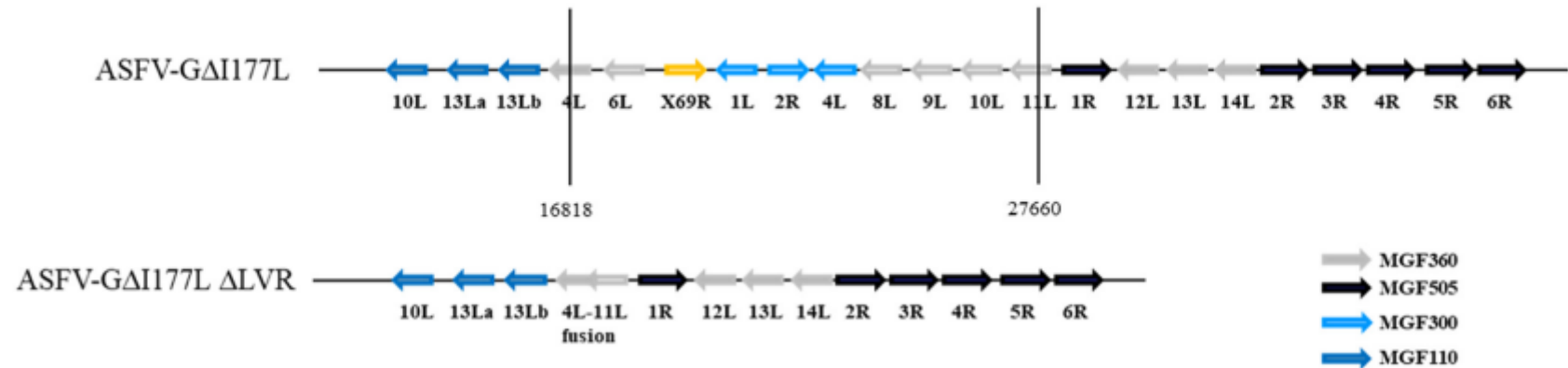
***Első ASP vakcina
(NAVET-ASFVAC) a
piacon
Vietnámban***

- Közös fejlesztés USDA-val
- korlátozott piaci engedélyezés, 2022 március
 - 600,000 dózis, 12 régió
 - Vietnámi hatóságok, monitorozás
 - Nem hivatalos hírek elhullásokról és vetélésekről
 - **Vakcinázás felfüggesztése 3/12 régióban elhullások miatt**
- Vakcinázás folytatása további 9 régióban
- Engedélyezés 2023 július
- Illegális kópiák megjelenése Kínában
- Vakcina formula: liofilizált
- Vakcinatörzs: ASFV-G Δ I177L
- Vakcina dózis: $10^{2,6}$ HAD₅₀
- Alkalmazás: i.m. 8-10 hetes kor (booster 3–4 hét múlva)
- **Termelés PBMC sejteken**



**ASP vakcina
(DACOVAC AFS2)
fejlesztése
Vietnámban**

- Közös fejlesztés USDA-val
- Engedélyezés 2024 III. negyedév
- In vivo kísérletek Vietnámban és Dominikai köztársaságban

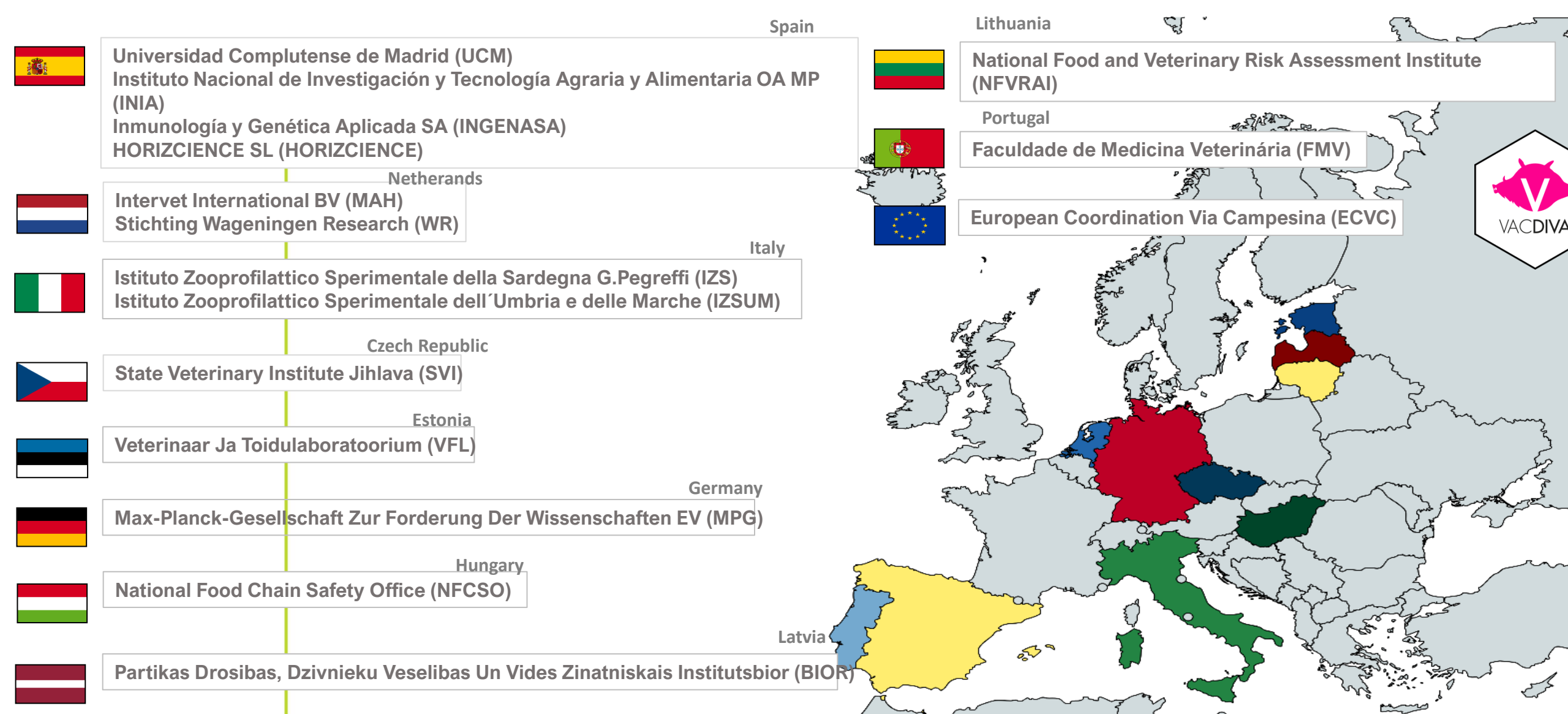


- Vakcina formula: liofilizált
- Vakcinatörzs: ASFV-G ΔI177L/ ΔLVR
- Vakcina dózis: ?
- Alkalmazás: i.m. tesztelés 4, 8, 12 hetes kor
- Termelés PIPEC sejtvonalon

**Második ASP
vakcina (AVAC ASF
LIVE) a piacon
Vietnámban**

- Közös fejlesztés USDA-val
- Engedélyezés 2023 július
- Használat 17 régióban
- Fülöp-szigetek: 300 000 adag kipróbálása, lehetséges export (5 millió adag)
- **Virulens revertálódott törzs klinikai mintából**
- WOAHA
 - Megosztott adatok hiányosak
 - Globális ASP vakcina értékelési szabványok 2024 május
- Vakcina formula: liofilizált
- Vakcinatörzs: ASFV-G Δ MGF
- Vakcina dózis: $10^{3,5}$ HAD₅₀
- Alkalmazás: i.m. 4 hetes kor
- **Termelés DMAC sejtvonalon**





13 partner, 2 ipari cég az EU-ból

Élő attenuált prototípusok

Prototípus	Genotípus	Eredet	Ártalmatlanság/hatékonyság
Lv17/WB/Rie1	GII	Természetes módon attenuált, Lettország, 2017	VD: 100% /92% (Arm07 GII) HS: 100 %/60-100% (Arm07 GII, Lv17/DP/Zieme/3 G II)
NH/P68	GI	Természetes módon attenuált, Portugália, 1968	HS: 100% /100% (Arm07 GII) és (L60 GI)

Safety of African Swine Fever Vaccine Candidate Lv17/WB/Rie1 in Wild Boar: Overdose and Repeated Doses

Jose A. Barasona^{1,2*}, Estefanía Cadenas-Fernández^{1,2*}, Aleksandra Kosowska^{1,2},
Sandra Barroso-Arévalo^{1,2}, Belén Rivera^{1,2}, Rocío Sánchez^{1,2}, Néstor Domínguez^{1,2},
Carmina Gallardo³ and Jose M. Sánchez-Vizcaino^{1,2}

First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II

Jose A. Barasona^{1*}, Carmina Gallardo^{2*}, Estefanía Cadenas-Fernández¹,
Cristina Jurado¹, Belén Rivera¹, Antonio Rodríguez-Bertos^{1,3}, Marisa Arias² and
Jose M. Sánchez-Vizcaino¹

African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and
NH/P68 recombinant live-attenuated viruses

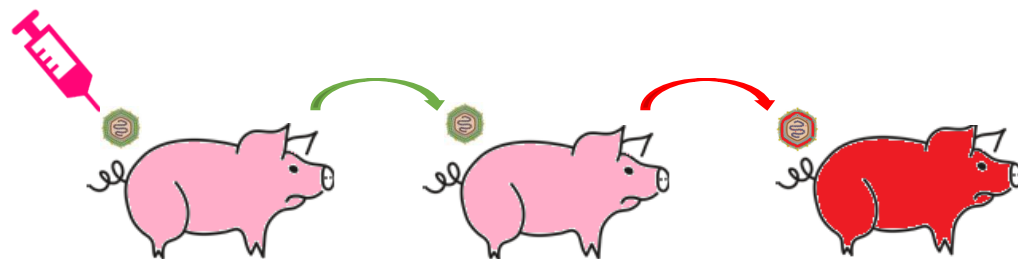
Carmina Gallardo^{1,2}, Elena G. Sánchez^{2,1}, Daniel Pérez-Núñez², Marisa Nogal², Patricia de León²,
Ángel L. Carrascosa², Raquel Nieto², Alejandro Soler², María Luisa Arias², Yolanda Revilla^{2,3*}

The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68)
induces enhanced expression and production of relevant
regulatory cytokines (IFN γ , TNF α and IL12p40) on porcine
macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60

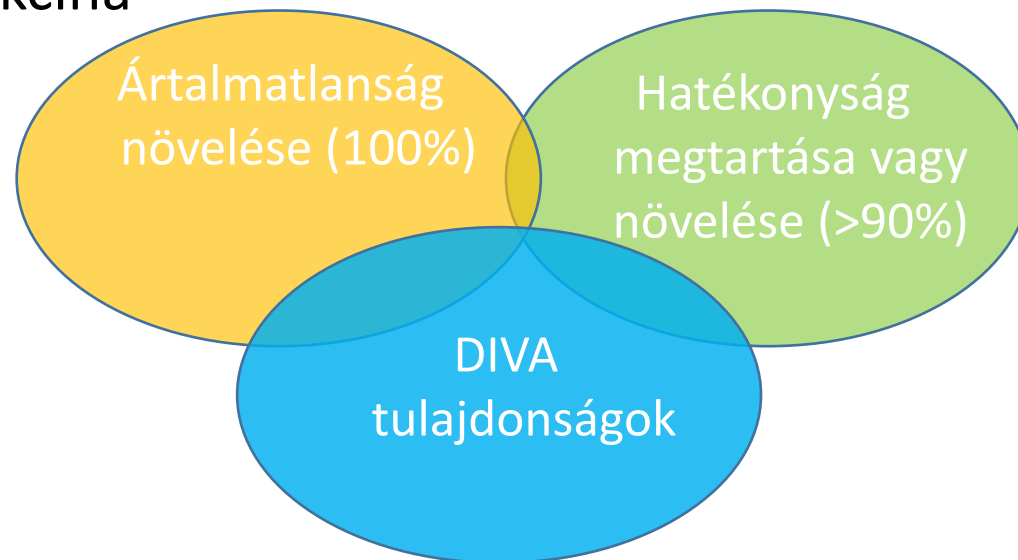
S. Gil · N. Sepúlveda · E. Albina · A. Leitão ·
C. Martins

Ártalmatlansági kockázatok

- Virulencia visszanyerése
- Krónikus ASP



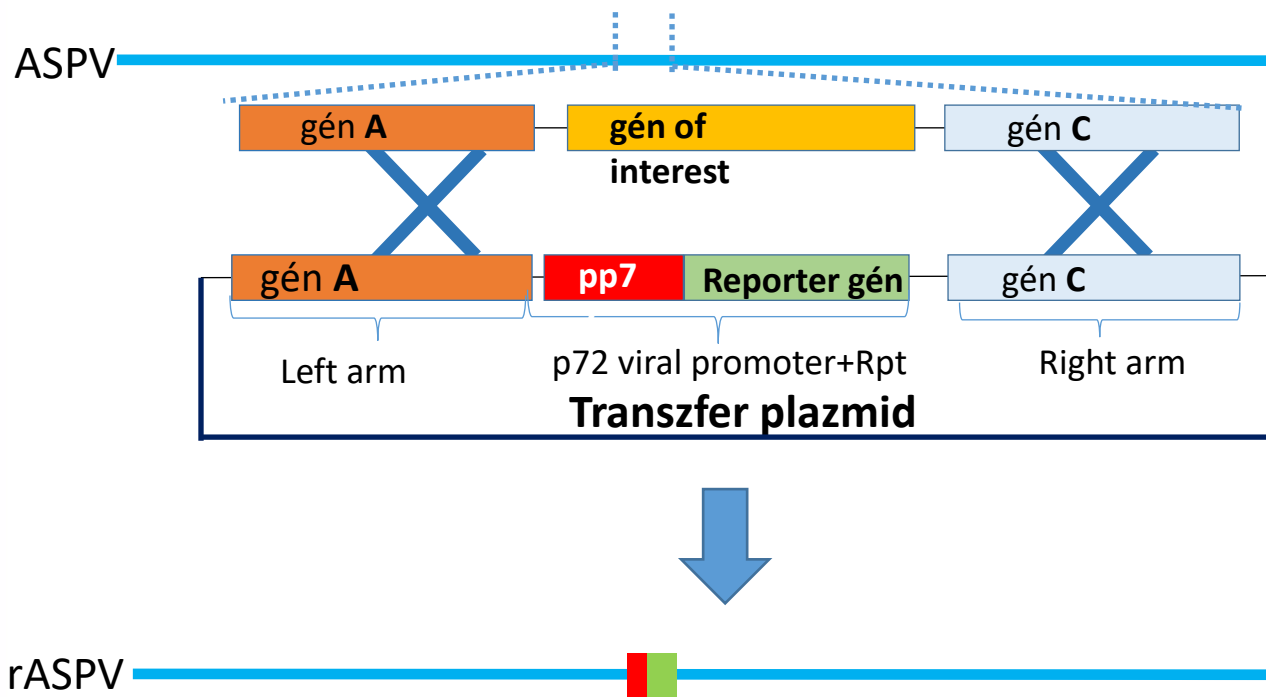
- Természetes attenuált vírusból módosított élő vakcina



- Az eszköz: célzott genetikai módosítások

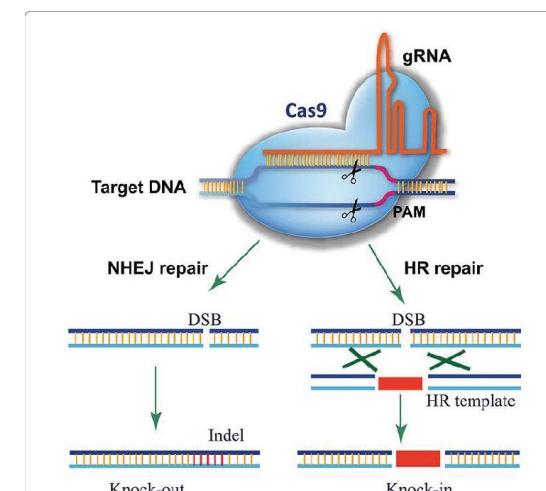
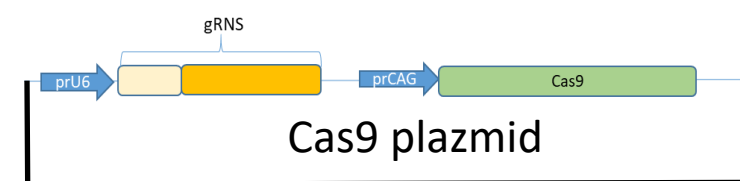
Mutáns ASPV vakcinajelöltek előállítás

- Intracelluláris homológ rekombináció



ASFV knock-out mutánsok, riporter gén
nem-esszenciális gének

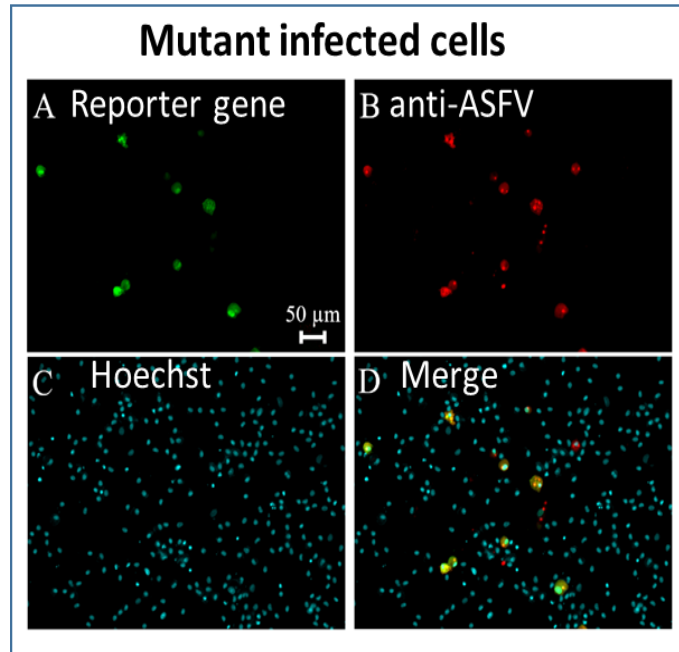
- CRISPR/Cas9 módszer



100-1000x jobb rekombinációs arány

ASPV mutánsok validálása

- Vizuális validálás

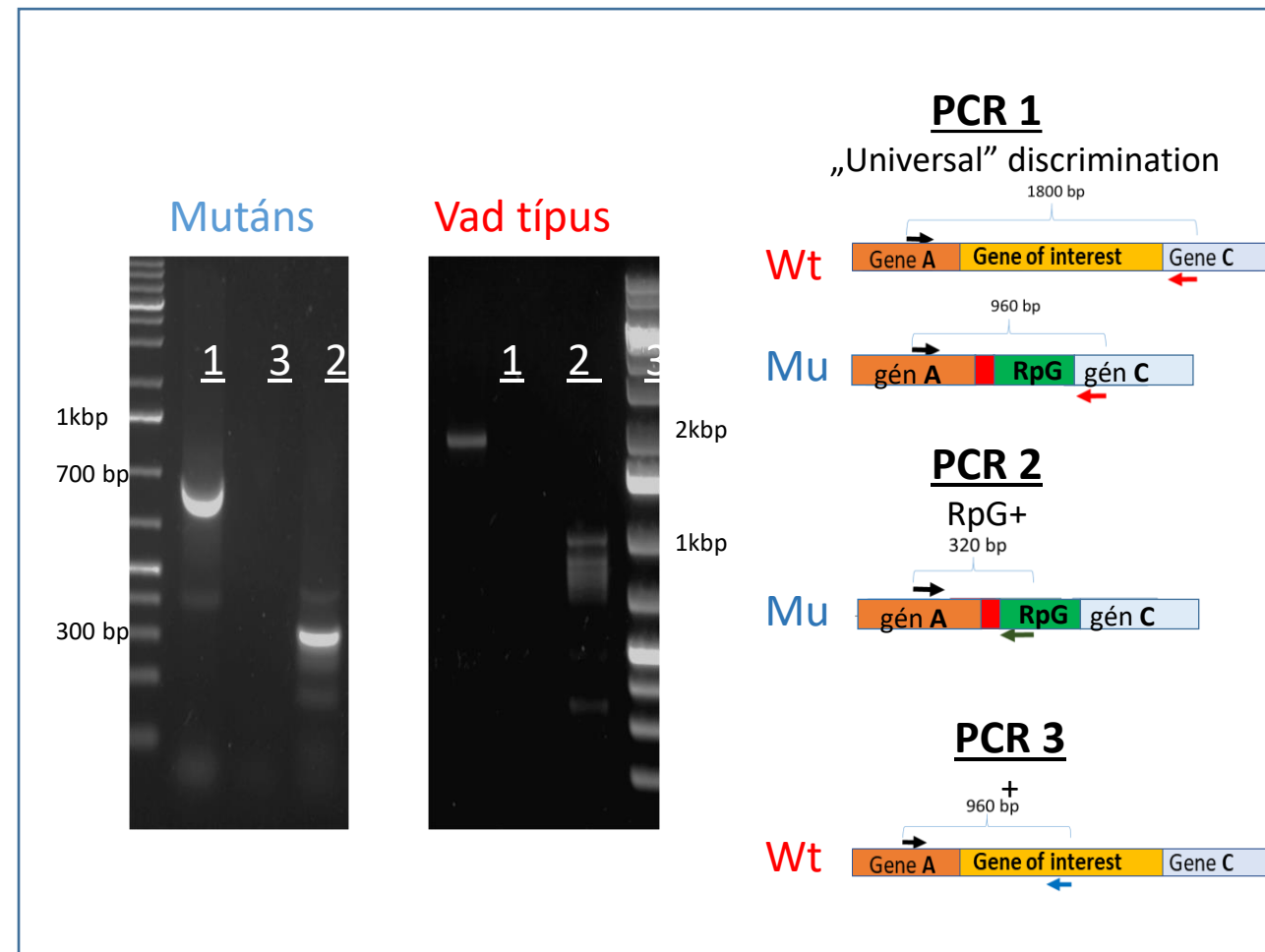


- Szekvenálás

A Simple Method for Sample Preparation to Facilitate Efficient Whole-Genome Sequencing of African Swine Fever Virus

Ferenc Olasz ^{1,*}, István Mészáros ¹, Szilvia Marton ¹, Győző L. Kaján ¹, Vivien Tamás ¹, Gabriella Locsmándi ², Tibor Magyar ¹, Ádám Bálint ², Krisztián Bányai ¹ and Zoltán Zádori ¹

- Validálás PCR-rel



ASPV vakcinajelöltek

- 11 deléciós mutáns
- Lv17/WB/Rie1
 - 9 célzott mutáns
 - 1 vagy 2 riporter gén
 - 1, 2, 3, vagy 7 deletált gén
 - 5 DIVA markerrel
- NH/P68 (NHV)
 - 2 célzott mutáns
 - 1-1 riporter gén
 - 1-1 deletált gén
 - 1 DIVA markerrel
- 7 in vivo teszt

Lv17/WB/Rie1/ mutánsok

Név	Deletált gén	Riporter gén(RtG)	DIVA	In vivo teszt
ΔAB	dupla gén (A-B)	RtG1	Igen	Igen
ΔA	szimpla gén (A)	RtG1	Igen	Igen
ΔC	szimpla gén (C)	RtG2	Nem	Nem
ΔD	szimpla gén (D)	RtG3	Nem	Igen
ΔE	szimpla gén (E)	RtG1	Nem	Igen
ΔABC	hármás gén (A-C)	RtG1, RtG3	Igen	Igen
ΔABD	hármás gén (A-B, D)	RtG1, RtG3	Igen	Igen
ΔCE	dupla gén (C-E)	RtG1, RtG3	Nem	Nem
ΔAJ	7 gén (A-B, F-J)	RtG1, RtG3	Igen	Nem

NHV mutánsok

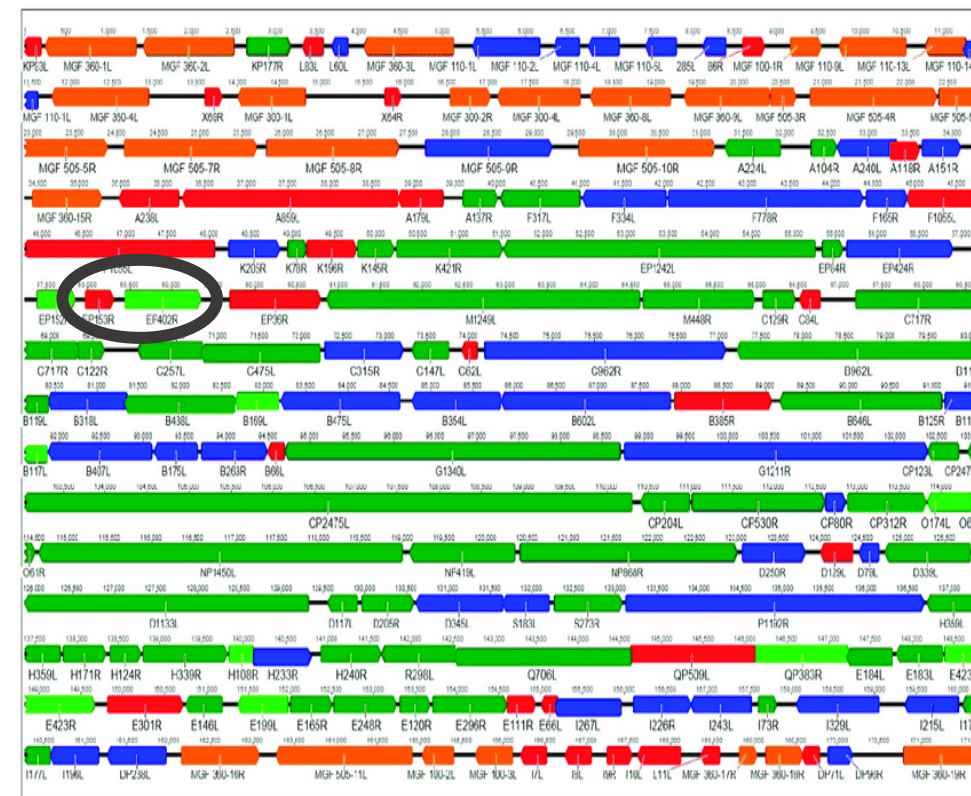
Név	Deletált gén	Riporter gén(RtG)	DIVA	In vivo teszt
ΔK	szimpla gén (K)	RtG3	Nem	Nem
ΔA	szimpla gén (A)	RtG1	Igen	Nem

Lv17/WB/Rie1-ΔCD

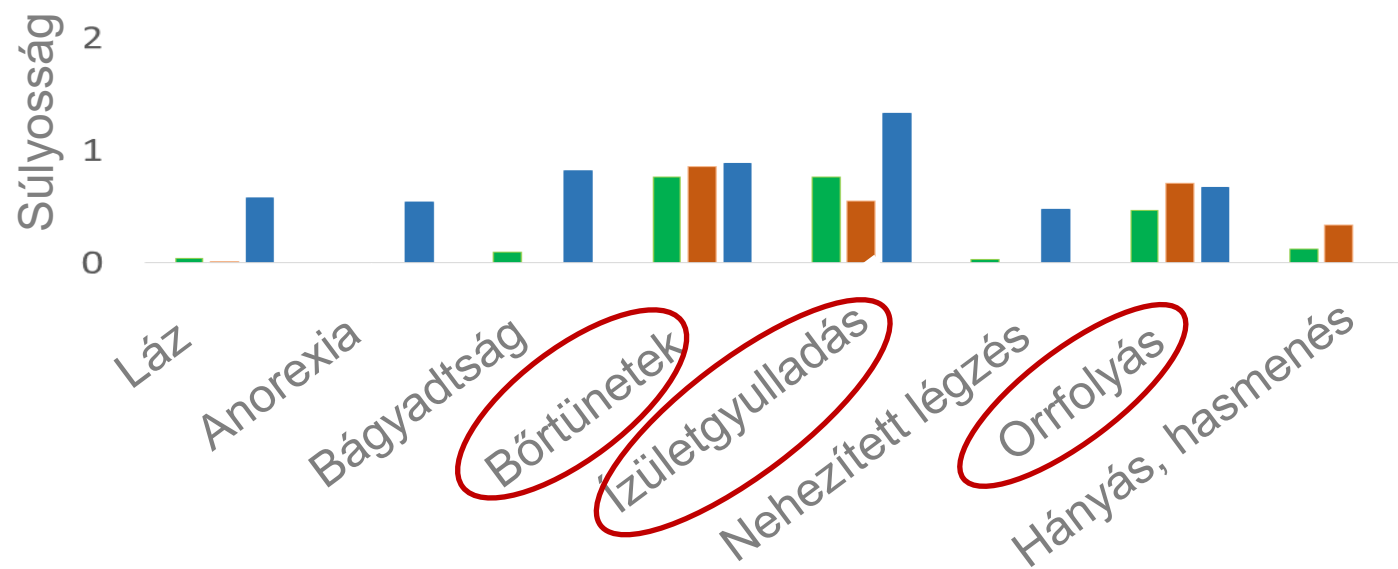
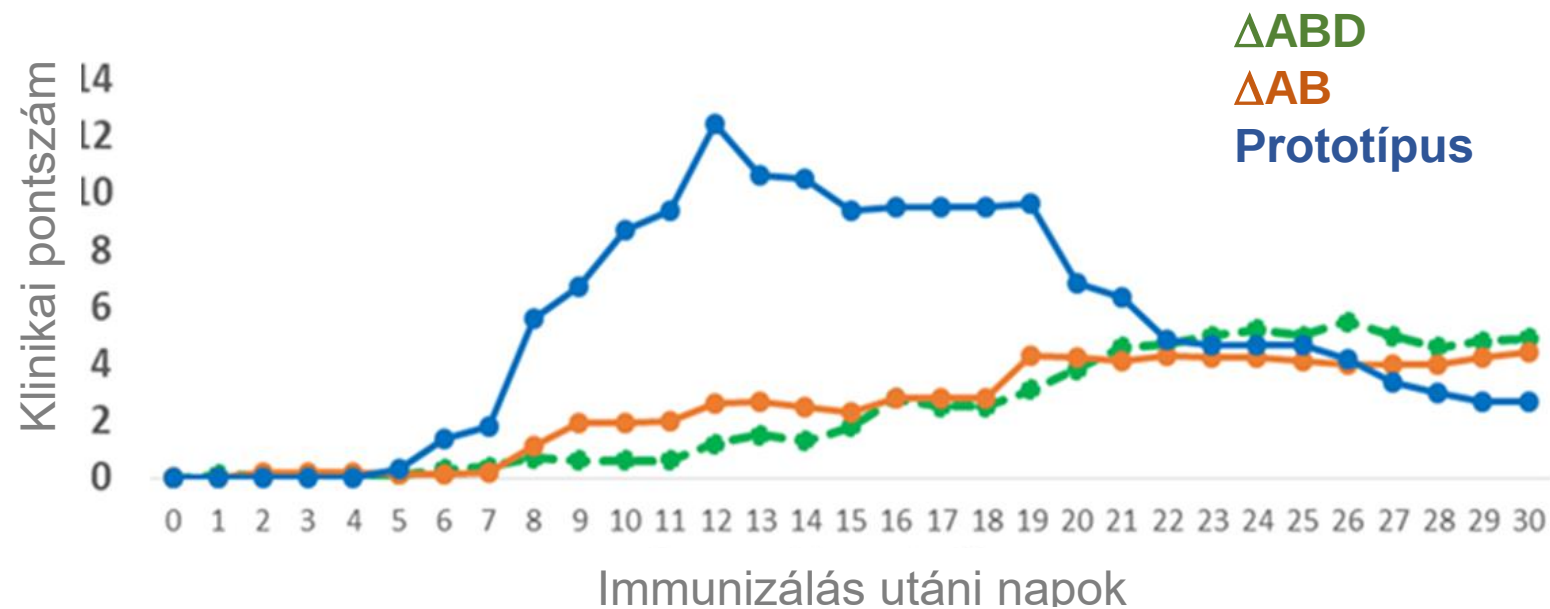
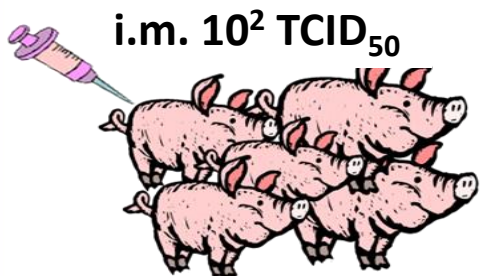
- Vad típusú Lv17/WB/Rie1 (genotípus II)
 - Biztonságos vaddisznóban,
 - Akár 40%-os mortalitás házisertésben
 - Alacsony vírusátvitel vaddisznóról házisertésre

Lv17/WB/Rie1-ΔAB

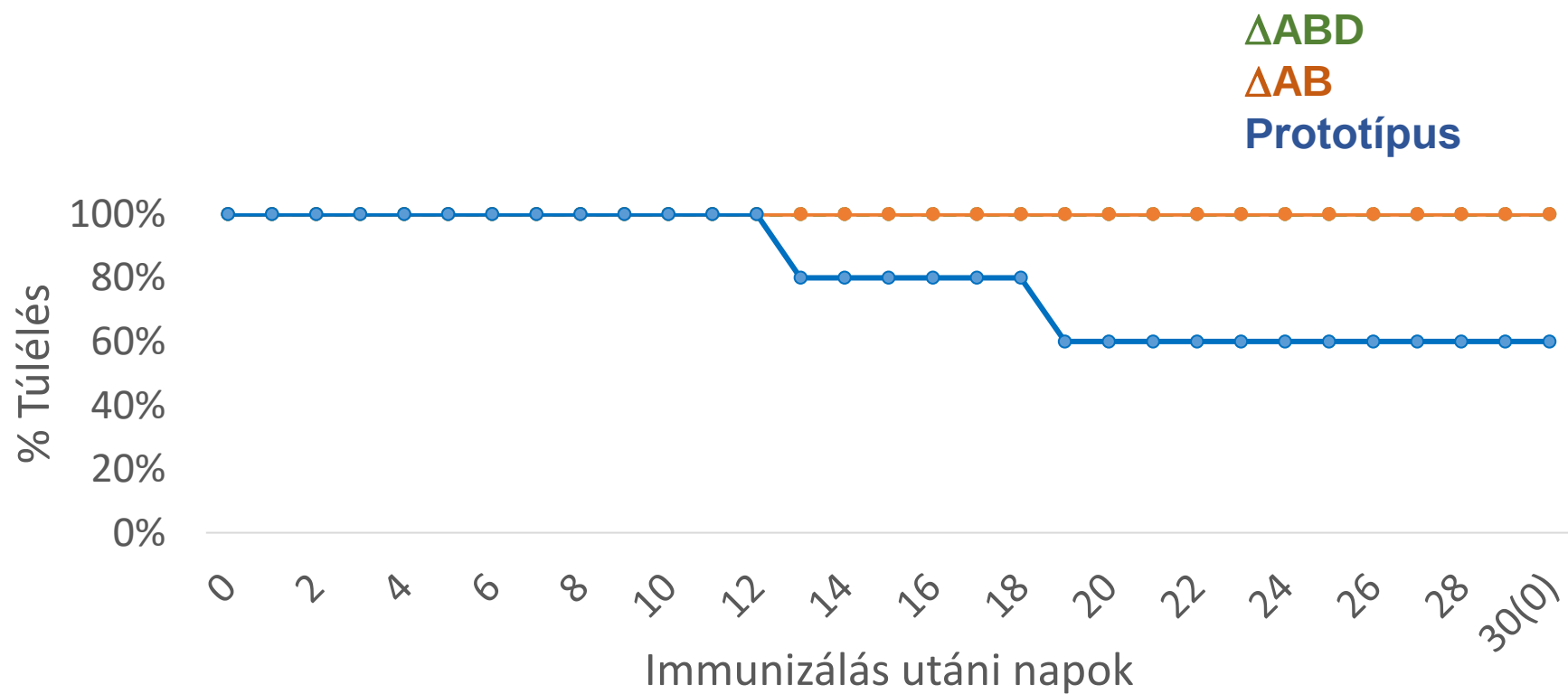
- Lv17/WB/Rie1 rekombináns változata
- 2 gén deléciója (CD2V, 153R)
- Marker vakcina (EP153R deléció)
- Genetikailag stabil
- Szabadalmaztatott



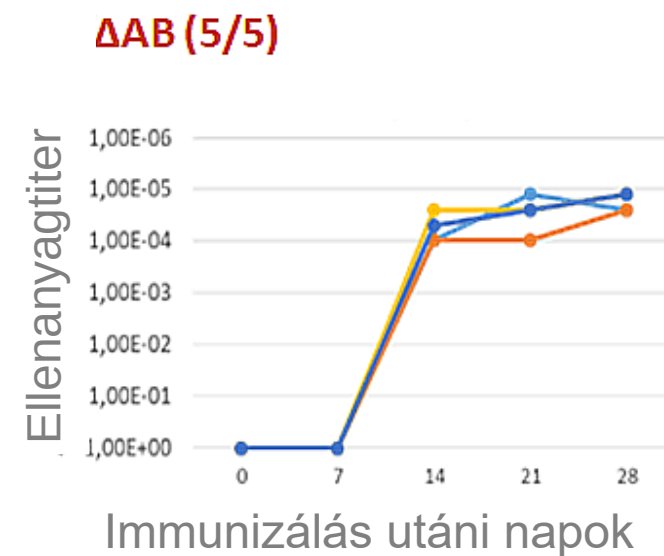
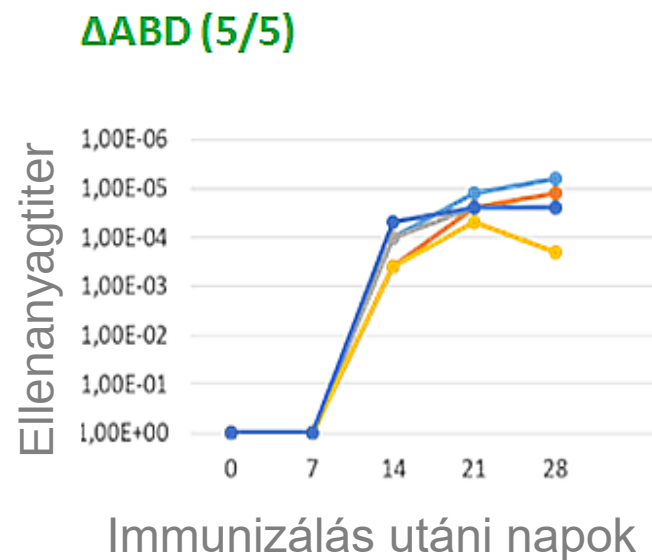
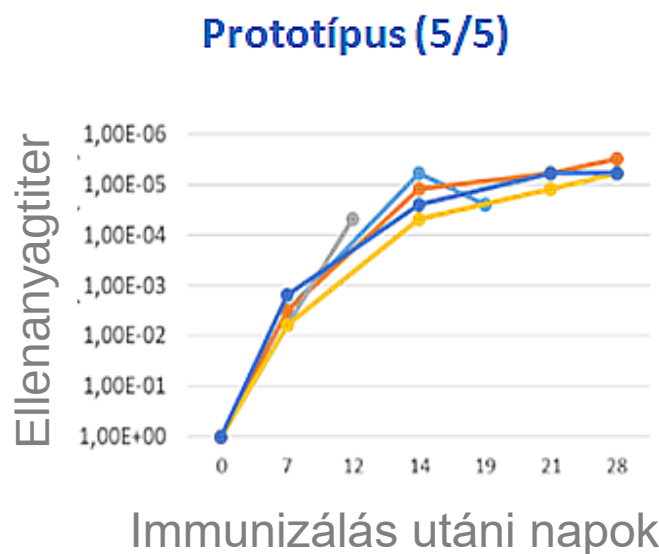
**Ártalmatlansági
vizsgálatok,
klinikai tünetek**



*Ártalmatlansági
vizsgálatok,
túlélési arány*

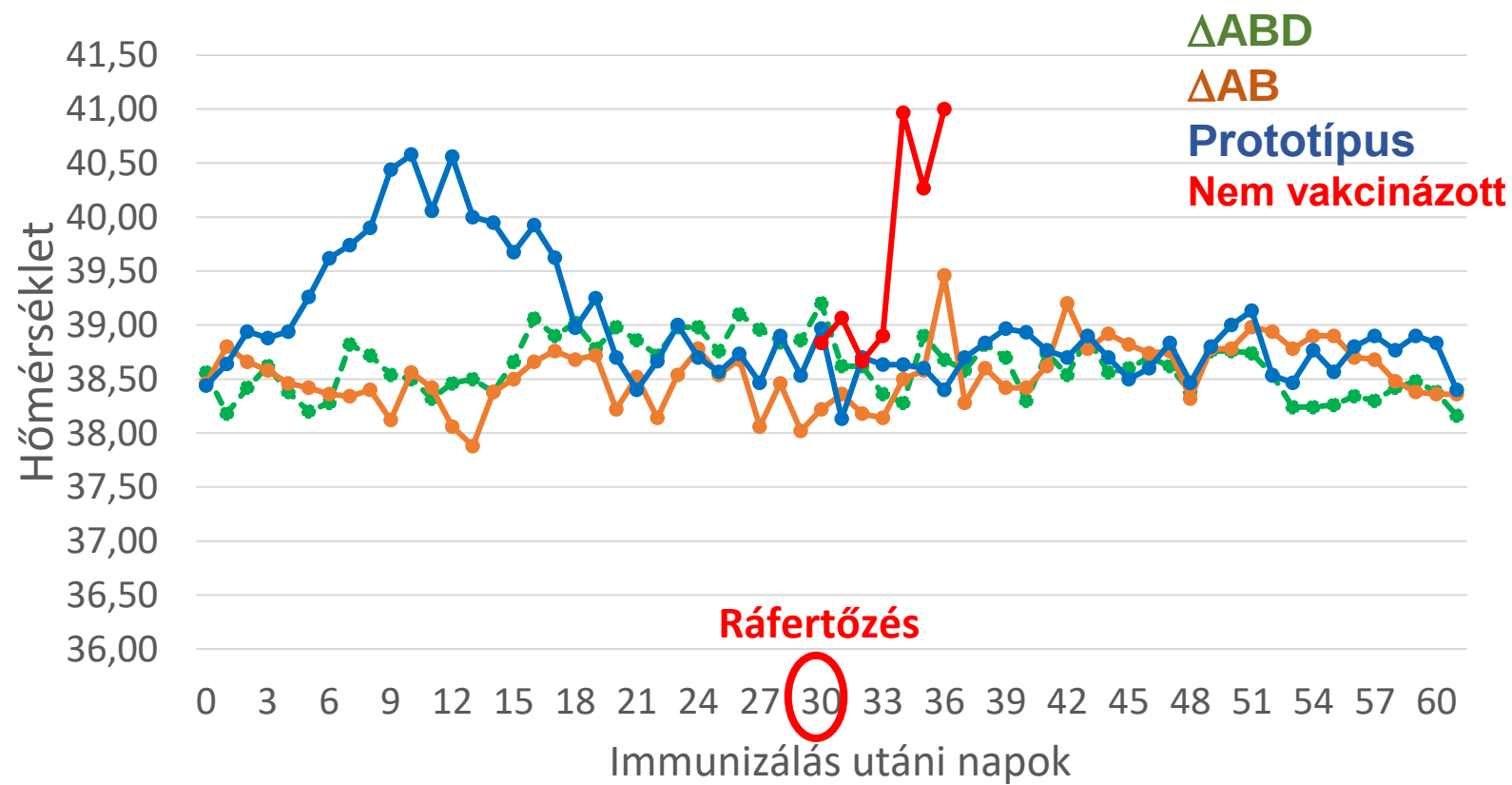


Ártalmatlansági
vizsgálatok,
immunválasz

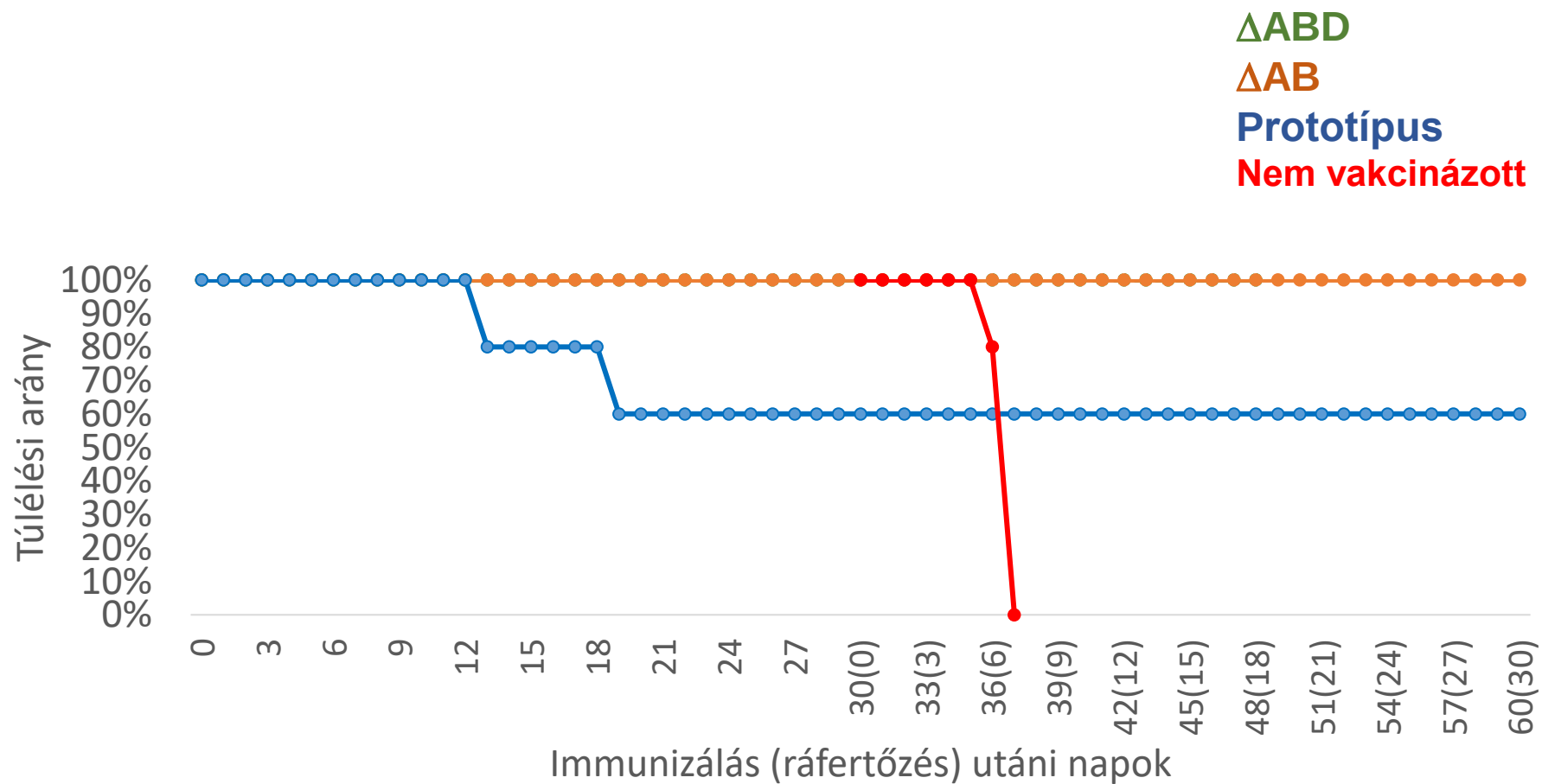


- Szerológiai áthangolódás
 - 7. nap (**Prototípus**)
 - 14. nap (**Δ ABD, Δ AB**)
- Magas szintű immunválasz

***Hatékonysági
vizsgálatok,
klinikai tünetek***



**Hatékonysági
vizsgálatok,
túlélési arány**



- Ártalmatlanság: ~100%
- Hatékonyság: 100%

Vaddisznó in vivo kísérletek



- Orális és I.M. immunizálás
- ~100% ártalmatlanság
- 100% hatékonyság
- Terepi vizsgálatok engedélyezés alatt



Vakcina formula vaddisznók részére

- Kísérletek csali kifejlesztésére és korcsoportok általi felvételére



- Vadasparkokban és vadászterületen



- Vaddisznó csali tesztelése

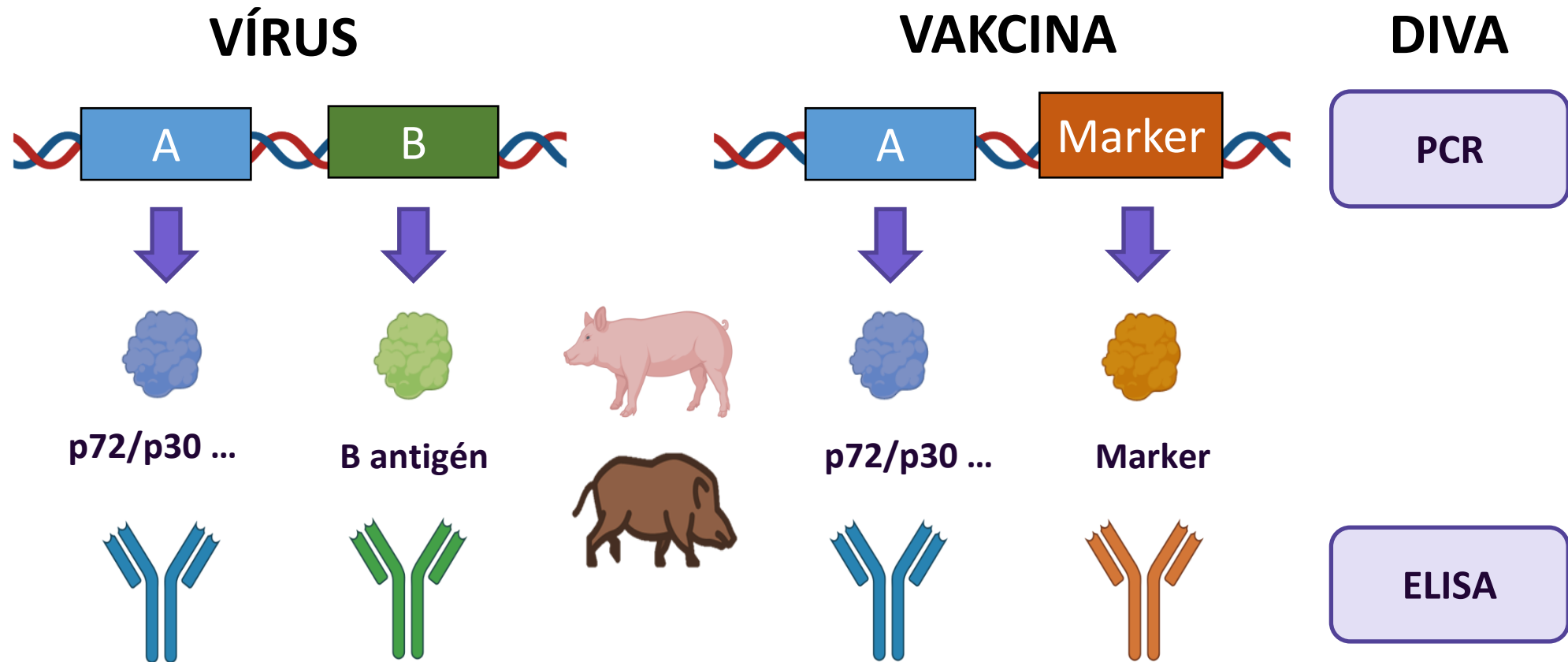




- Paraffin, szacharóz, fahéj-szarvasgomba por



DIVA tesztek



DIVA teszt eredmények értékelése

	A/ p72	B	Riporter fehérje/gén
Genotípus II ASPV fertőzött állatok	+	+	-
Egyéb genotípusokkal fertőzött állatok	+	-	-
Vakcinázott állatok	+	-	+
Nem fertőzött/nem vakcinázott állatok	-	-	-

Köszönöm a figyelmet!