



Élő metapneumovírus vakcina fejlesztése tojóállományok részére: ártalmatlansági és hatékonysági vizsgálatok

Dr. Kollár Anna, Dr. Soós Pál, Antalné Szalkai Teodóra, Dr. Tóth
Ádám, Dr. Nagy Zoltán, Gubucz-Sombor Erzsébet, Dr. Pénzes Zoltán

Biológiai Kutatás-Fejlesztés
Ceva-Phylaxia Zrt., Budapest



Hajdúszoboszló, 2016. június 2-3.

- **A baromfi metapneumovírus és az általa okozott kórkép**
- **Az élő baromfi metapneumovírus vakcina általános jellemzése**
- **Ártalmatlansági vizsgálatok az európai regisztrációhoz**
- **Hatékonysági vizsgálatok az európai regisztrációhoz**
- **Összefoglalás**

Baromfi metapneumovírus: a kórokozó

A kórokozó

- **Paramyxoviridae család, metapneumovirus nemzetség**
- **A, B, C és D szubtypusok a nukleotid szekvencia alapján**
 - Világszerte: „A” és „B” (keresztvédelem!)
 - É-Amerika: csak „C”
- **burkos vírus**
- **-ss RNS genom, nem szegmentált (~14 kb)**



Baromfi metapneumovírus: a betegség

A betegség

- Különböző elnevezések: pulyka rhinotracheitise (TRT)
csirke duzzadtfej betegsége (SHS)
baromfi rhinotracheitise
- Fogékony állatfajok: pulyka
csirke
kacsa
fácán
gyöngytyúk
víziszárnyasok
- Nagyon ragályos
- Súlyos gazdasági veszteségeket okoz, különösen egyéb szekunder bakteriális fertőzésekkel társulva

Baromfi metapneumovírus: a betegség

A betegség

- **Pulykákban:** a légzőszervi forma bármely életkorban előfordul
 - » tüsszögés, zihálás, orr- és szemváladékozás, duzzadt infraorbitális sinusok, conjunctivitis**súlyosfokú tojástermelés csökkenés**
- **Csirkékben:** elsősorban felső légúti tünetek, de tenyészállományokban tojáscsökkenés is lehetséges
- **Önálló fertőzés** esetében a gyógyulás rövid időn belül bekövetkezik (napok-1-2 hét)



Élő és inaktivált vakcinák

Vakcina	Törzs	Faj
Élő	Clone K	csirke/pulyka
	11/ 94	csirke
	PL 21	csirke
	1062	csirke/pulyka
Inaktivált		csirke

Vakcinafejlesztés a Ceva-Phylaxiában

- **A Ceva-Phylaxia Biológiai Kutatás Fejlesztési Igazgatóságán az aMPV vakcinatörzs termelését optimalizáltuk**
- **A vivőanyag összetételét úgy alakítottuk ki, hogy a liofilizált késztermék megfelelően magas titerének fenntartását biztosítsa**
- **A késztermék első gyártási tételeit az Európai Gyógyszerkönyv előírásainak megfelelő ártalmatlansági- és hatékonysági kísérletekben vizsgáltuk**

Metapneumovírus vakcinánk általános jellemzése

- **Monovalens, élő vakcina tojótyúkók számára**
- **Aktív hatóanyag: élő, attenuált baromfi metapneumovírus, B szubtípus**
- **VERO sejtvonalon termelt**
- **Liofilizált vakcina: desztillált vízben vagy klórmentes vízben hígítható**
- **Alkalmazás:**
 - Szemcsepp: 1 napos kortól
 - Spray: 5 hetes kortól
 - A primer vakcinázás után 2 héttel ismételhető az oltás
- **Dózis: min. 2,5 max. 3,8 Ig TCID50**



Ártalmatlansági vizsgálatok

Európai Gyógyszerkönyv követelményei szerint:

- **Vírusterjedés** terjedése, szervezetben belüli eloszlása SPF csirkében
- **Vírusterjedés** virulencia-fokozódása
- **Vakcina** ártalmatlansági vizsgálata SPF csirkében

Laboratóriumi ártalmatlansági vizsgálatok

Vizsgálataink az Európai Gyógyszerkönyv előírásai szerint

SPF (tojó típusú) csirkéken	dózis	életkor	alkalmazási mód	eredmények
Vírus terjedésének vizsgálata	1 max.	1 nap	szemcsepp+ orrcsepp	Terjed a kontakt csirkékre
Vírus eloszlása a különböző szervekben				szájgarat és kloákatamponokat, szerveket (tüdő, vese, lép, caecal tonsil) vizsgáltunk→a vírus kimutatható ezekben



Laboratóriumi ártalmatlansági vizsgálatok

Vizsgálataink az Európai Gyógyszerkönyv előírásai szerint

SPF (tojó típusú) csirkéken	dózis	életkor	alk. mód	eredmények
Virulenciafokozódás	1 max	10-13 nap	szem+ orrcsepp	A vírus az 5. passzázból is visszanyerhető volt, a kiindulási és a passzált vírus is ártalmatlan volt, nem volt virulencia-fokozódás.

Vírus 1 max.
dózis



1 2 3 4 5

Orr + sinus infraorbitalis mucosa szuszpenzió továbbpasszálása 5X

eredeti



5x passzált

Összehasonlító kísérlet

Laboratóriumi ártalmatlansági vizsgálatok

Alkalmazott állatfajta	Általános ártalmatlansági vizsgálat (Ph Eur 5.2.6)			Ismételt alkalmazás ártalmatlansági vizsgálata a légző- és ivarszervrendszerre		
	dózis	életkor	alk. mód	dózis	életkor	alk. mód
SPF Tojó típusú csirke	10x	1 nap	szem+ orrcsepp	-	-	-
	-	-	-	1x	1 naposan+ 14 naposan	szem+ orrcsepp
	10x	1 nap	spray	-	-	-
	10x	1 nap	szem+ orrcsepp			



Terjedési vizsgálat egyéb fogékony állatfajra

Terjedési vizsgálat pulykára

Vaksinázott állat/ kontakt állat	dózis	életkor	alk. mód	Eredmény
SPF tojótípusú csirke/ pulyka*	1 max.	1 nap	Szem+ orrcsepp	10. naptól kimutatható volt pulykákban a vírus, de nem okozott súlyos klinikai tüneteket a kontakt állatokban.

*4 hetes baromfi pneumovírus elleni ellenanyagtól mentes pulykák






A laboratóriumi vizsgálatok igazolták a vakcina ártalmatlanságát.



Hatékonysági vizsgálatok




Immunmegeredési és immuntartóssági vizsgálatok **szemcseppes** alkalmazással

SPF/ kommersz napos tojógyúkokon

Napok	1. csoport	2. csoport
1. nap  	Vakcinázott (n= ~20)	Kontroll (n= ~20)
21. nap (megeredési vizsg.) vagy 63. nap (immuntartóssági vizsg.) 	Ráfertőzés virulens metapneumovírussal (szemcsepp)	
21-26. nap (megeredési vizsg.) vagy 63-68. nap (immuntartóssági vizsg.)	Egyedi klinikai szkórozás garattampon mintavétel kvantitatív PCR-re	

Immunmegeredési és immuntartóssági vizsgálatok **spray** alkalmazással

Kommersz 5 hetes tojótyúkokon

Állatok kora	Napok	1. csoport	2. csoport
5 hetes	1. nap  	Vakcinázott (n= ~20)	Kontroll (n= ~20)
8 hetes/ 14 hetes	21. nap (megeredési vizsg.)  vagy 63. nap (immuntartóssági vizsg.)	Ráfertőzés virulens metapneumovírussal (szemcsepp)	
	21-26. nap (megeredési vizsg.) vagy 63-68. nap (immuntartóssági vizsg.)	Egyedi klinikai szkórozás garattampon mintavétel kvantitatív PCR-re	

Klinikai pontozási rendszer:

0: nincsen tünet

1: tiszta orrfolyás

2: zavaros orrfolyás

3: habos szemek és/vagy

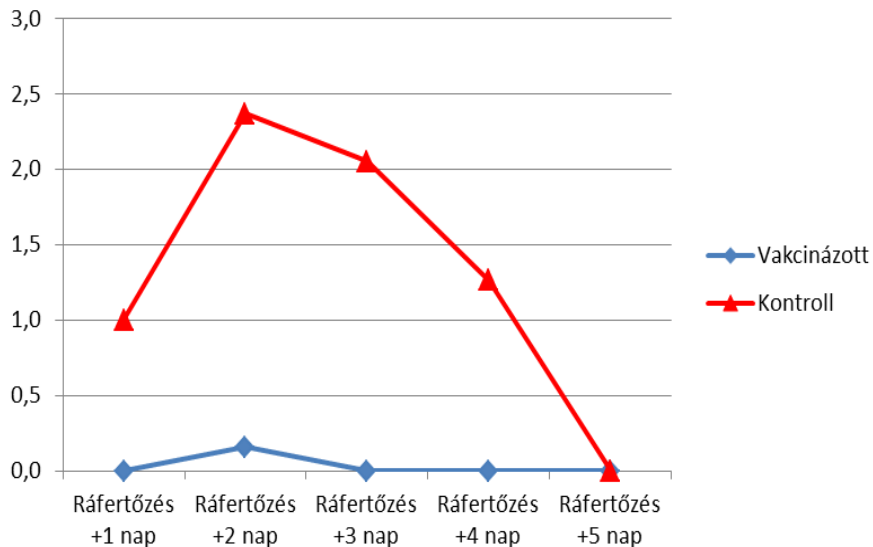
duzzadt infraorbitális sinusok orrfolyással



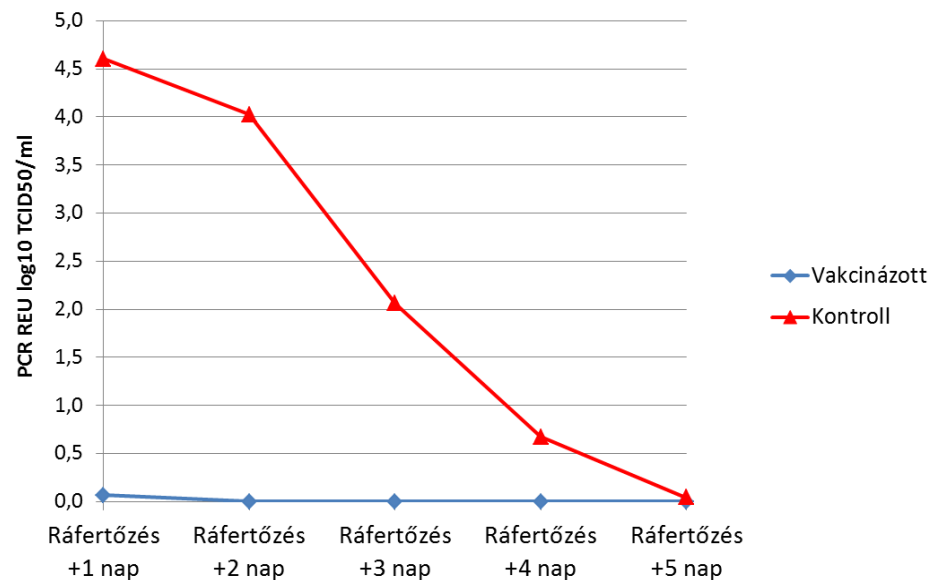
Kvantitatív PCR:

- Garattampon mintákból
- Validált módszer
- Korreláció a klinikai szkórokkal

Klinikai szkórok



qPCR eredmény



Hatékonysági vizsgálatok eredmények

A légzőszervi klinikai pontszámok valamint a vírus mennyisége a garattamponokban kvantitatív PCR-rel szignifikánsan alacsonyabb volt a vakcinázott állatokban a kontrollokhoz képest (min. 80%-os védetség)

A laboratóriumi vizsgálatok igazolták a vakcina hatékonyságát szemcsepp és spray alkalmazási móddal.

- Széleskörűen igazoltuk a vakcina ártalmatlanságát
- Már napos korban is alkalmazható szemcsepp formában
- 5 hetes kortól spray alkalmazás szintén lehetséges

- A baromfi metapneumovírus okozta betegség tüneteit kivédi
- A vakcina képes csökkenteni a vírus ürülését
- Már egy alkalmazással is igen hosszú immunitás váltható ki
- Élő primer vakcinaként alkalmazható a későbbi, inaktivált aMPV, oltást megelőzően



Bio R&D

Egg-Cell Platform



Racz Anikó



Novák Edina



Gubucz-Sombor Erzsébet



Miskai István



Dr. Pénzes Zoltán



Sándor Andrea



Dr. Makranszki Levente



Bio R&D

Biomolecular Methods Platform



Dr. Czegledi Aliz



Dr. Nagy Zoltán



Petrovszki Enikő



Bio R&D

Viral Integrated Development Unit



Dr. Nagy Miklós



Dr. Kollár Anna



Dr. Tóth Ádám



Dr. Soós Pál



Zsófia Kovács Andrea



Antalné Székely Teodóra

Köszönöm a figyelmet!