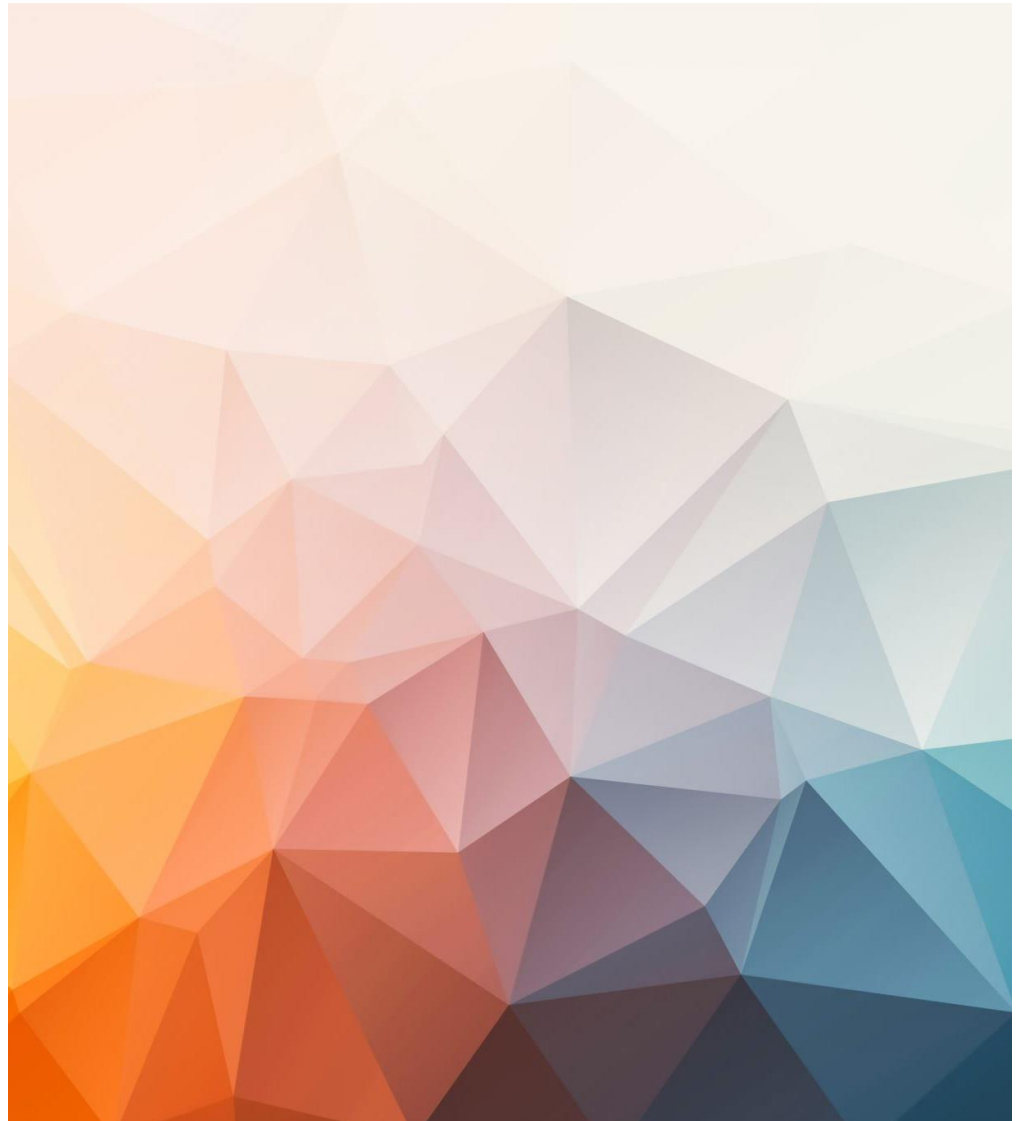


Megváltozott igények,
megváltozott eszközök

–

Milyen új lehetőségeket
nyitott a molekuláris
biológia eszköztára a
baromfi vírusvakcinák
világában?

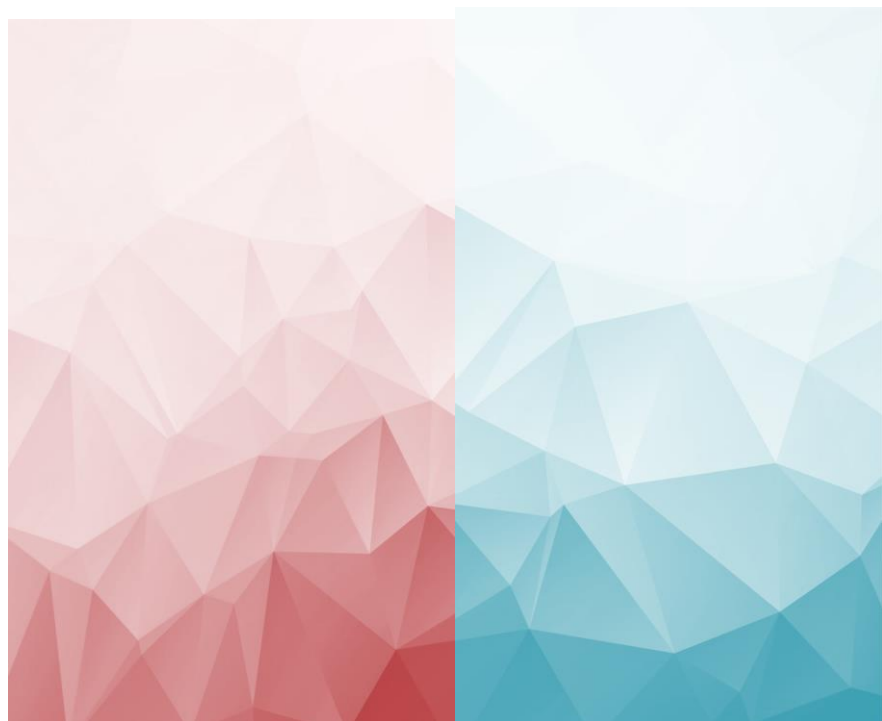
Tatár-Kis Tímea



Megváltozott
eszköztár

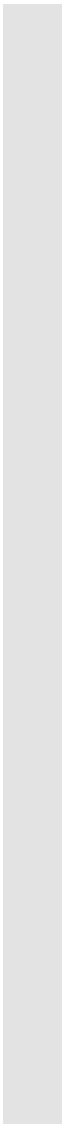

Új generációs baromfivakcinák

Molekuláris biológiai módszertannal jól
vizsgálható vakcina hatékonysági
aspektusok



2000-es évek eleje

Napjainkban



„Új generációs”
baromfi
vírusvakcinák

Baromfi- vakcinák főbb csoportjai

„Klasszikus”

Teljes vírust
tartalmazó

- Attenuált, élő
- Immunkomplex

- Inaktivált

„Új generációs”

Kulcs immunogén
fehérjéjét (1 v több) / ezt
kódoló gént tartalmazó

- Vektorvakcinák
- SRV (self-replicating RNA; replicon)
- DNA

- Alegység (subunit)
- Vírus-szerű részecske (VLP)

Baromfi- vakcinák főbb csoportjai

Erős sejtes, humorális
és nyálkahártya
immunitás

- Attenuált, élő
- Immunkomplex

Erős sejtes immunitás,
gyengébb humorális
immunitás; nyh.
Immunitás gyenge

- Vektorvakcinák
- SRV (self-replicating
RNA; replicon)
- DNA

- Inaktivált

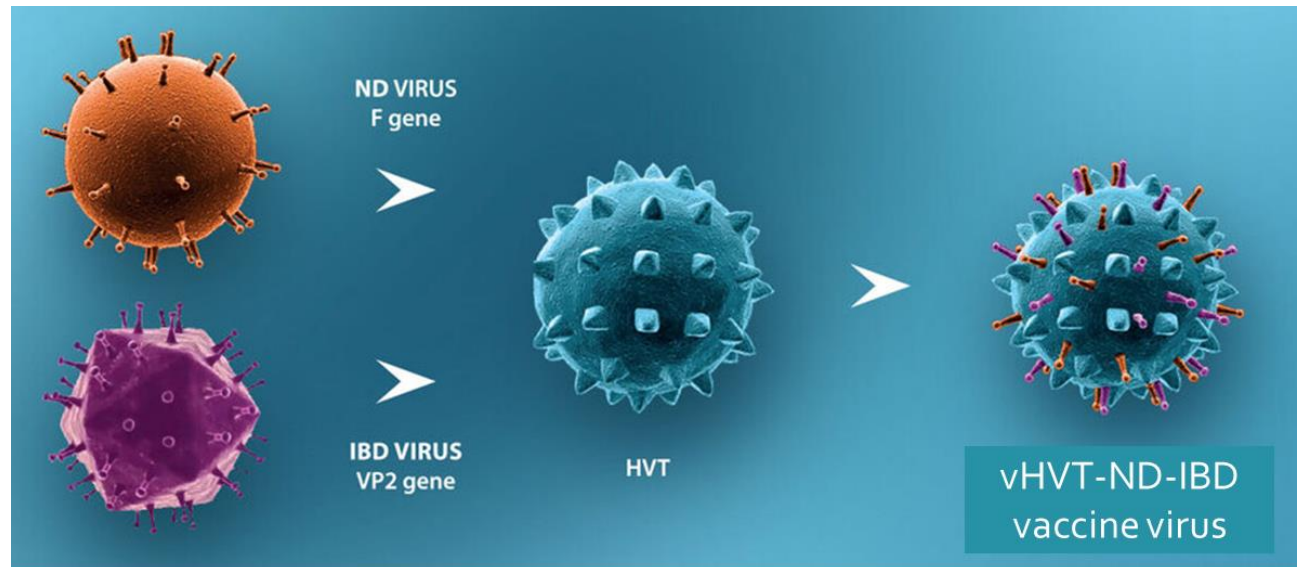
Humorális
immunitás dominálja

- Alegység (subunit)
- Vírus-szerű
részecske (VLP)

Baromfi- vakcinák főbb csoportjai

- Attenuált, élő
 - Vektorvakcinák
 - SRV (self-replicating RNA; replicon)
 - DNA
 - Immunkomplex
 - Inaktivált
 - Alegység (subunit)
 - Vírus-szerű részecske (VLP)
-

Vektor- vakcinák



- Védettség a vektorral és az insert donor vírussal szemben egyaránt
- FPV (fowl pox virus)
 - Zömmel szárnyredő oltás
- HVT (herpesvirus of turkeys)
 - Különösen elterjedt baromfi esetében
 - Egy, illetve két inserttel bíró termékek is

HVT vektor-vakcinák

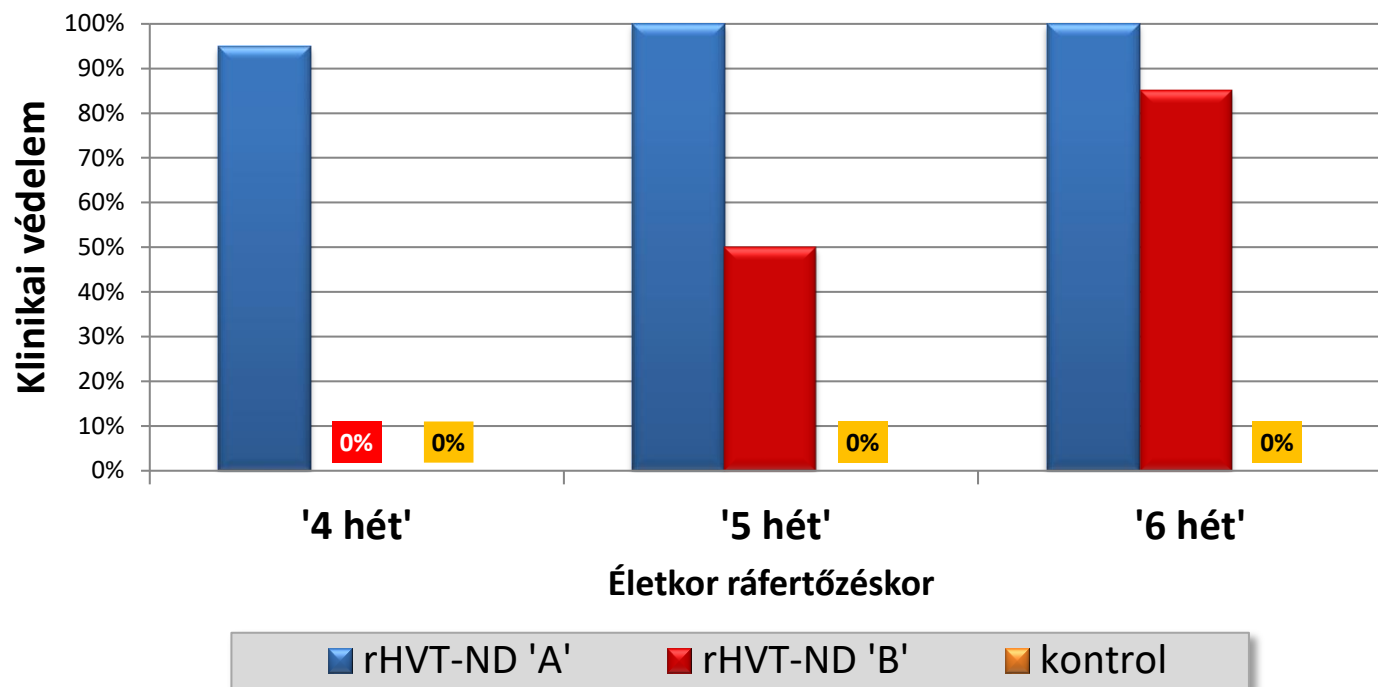
Beépített gének áttekintés (vakcinák törzskönyvi engedéllyel 2007-től; AI 2012-től)

Betegség	Beépített gén (ek)
ND	F
IBD	VP ₂
ILT	gB / gD és gI / gD
AI	HA

- Legtöbb kórokozó esetén ugyanaz a gén
- Donor törzsek tekintetében eltérések
- Gén beépítésének helye, promoterek... terén különbségek a vakcinák között

HVT vektor-vakcinák

Minden konstrukció kicsit más

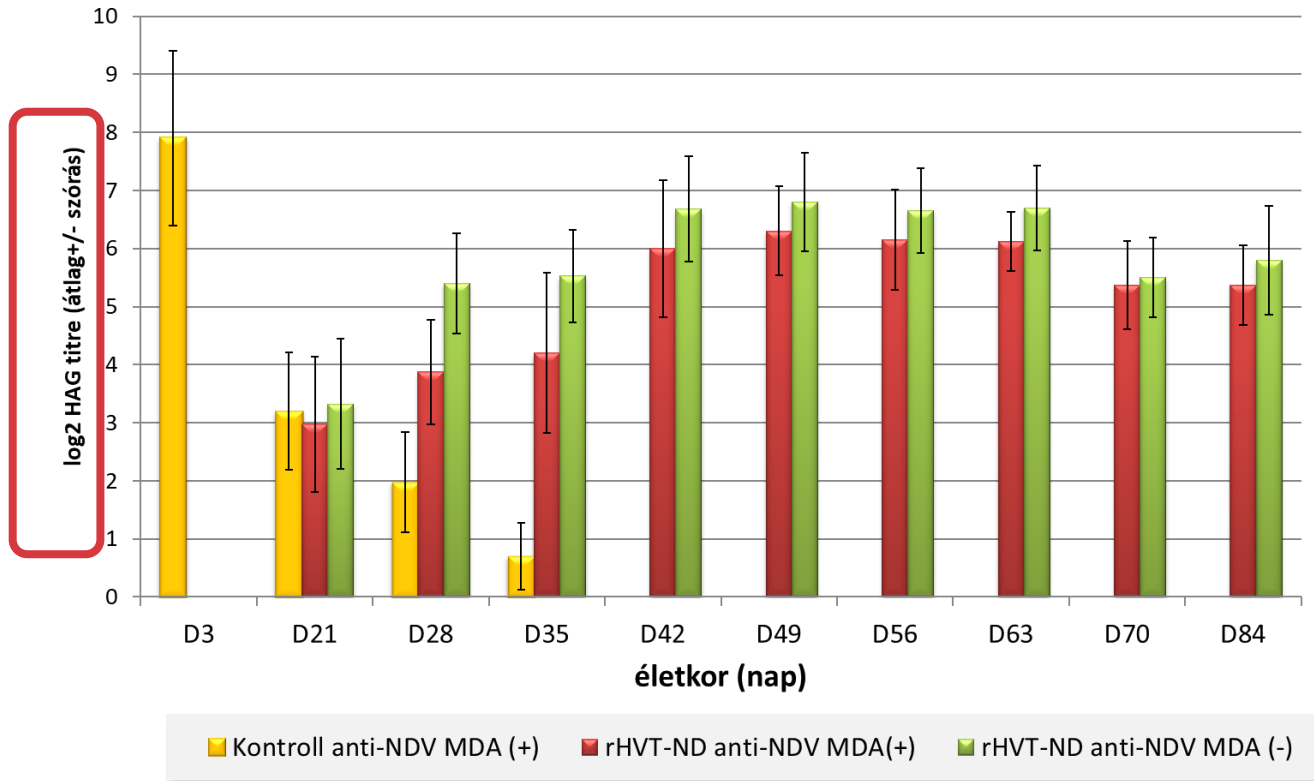


rHVT-ND vakcina egyszeri, s.c. alkalmazását követően klinikai védelem NDV ráfertőzéssel (GVII) szemben, kommersz broilerben

HVT vektor-vakcinák

Alkalmazhatóság maternális ellenanyagok jelenlétében

In ovo (gyors, tömeges alkalmazás), illetve s.c.; keltetői vakcinázás

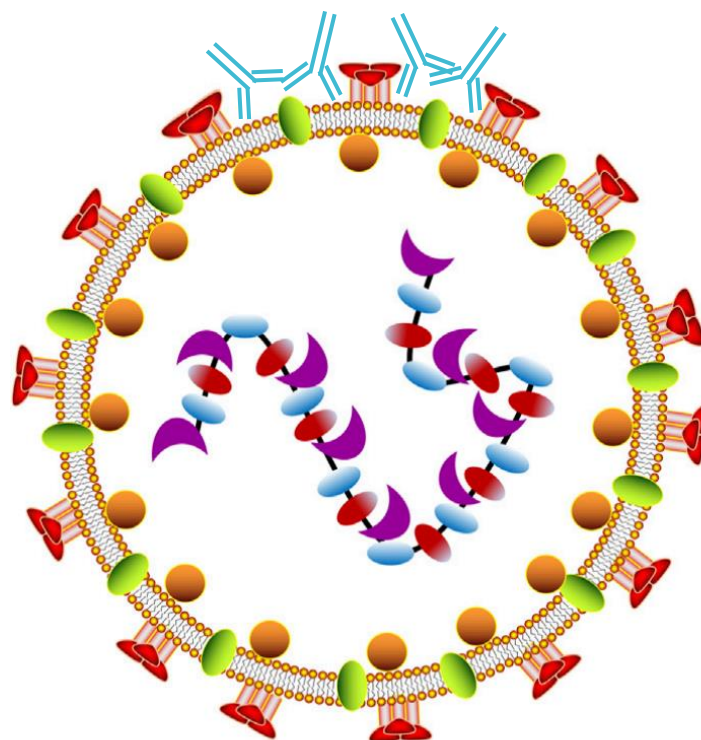


rHVT-ND vakcina egyszeri, s.c. alkalmazását követően kialakuló ellenanyagszint, kommersz tojóban NDV elleni maternális immunitás jelenlétében, illetve hiányában

rHVT-ND vakcinák:

F gén insertként, de HAG titer mérhető a savóból
Sztérikus gátlás

Baromfipestis vírusának sematikus rajza; anti-F ellenanyagokkal



HN

F

M

N

P

L

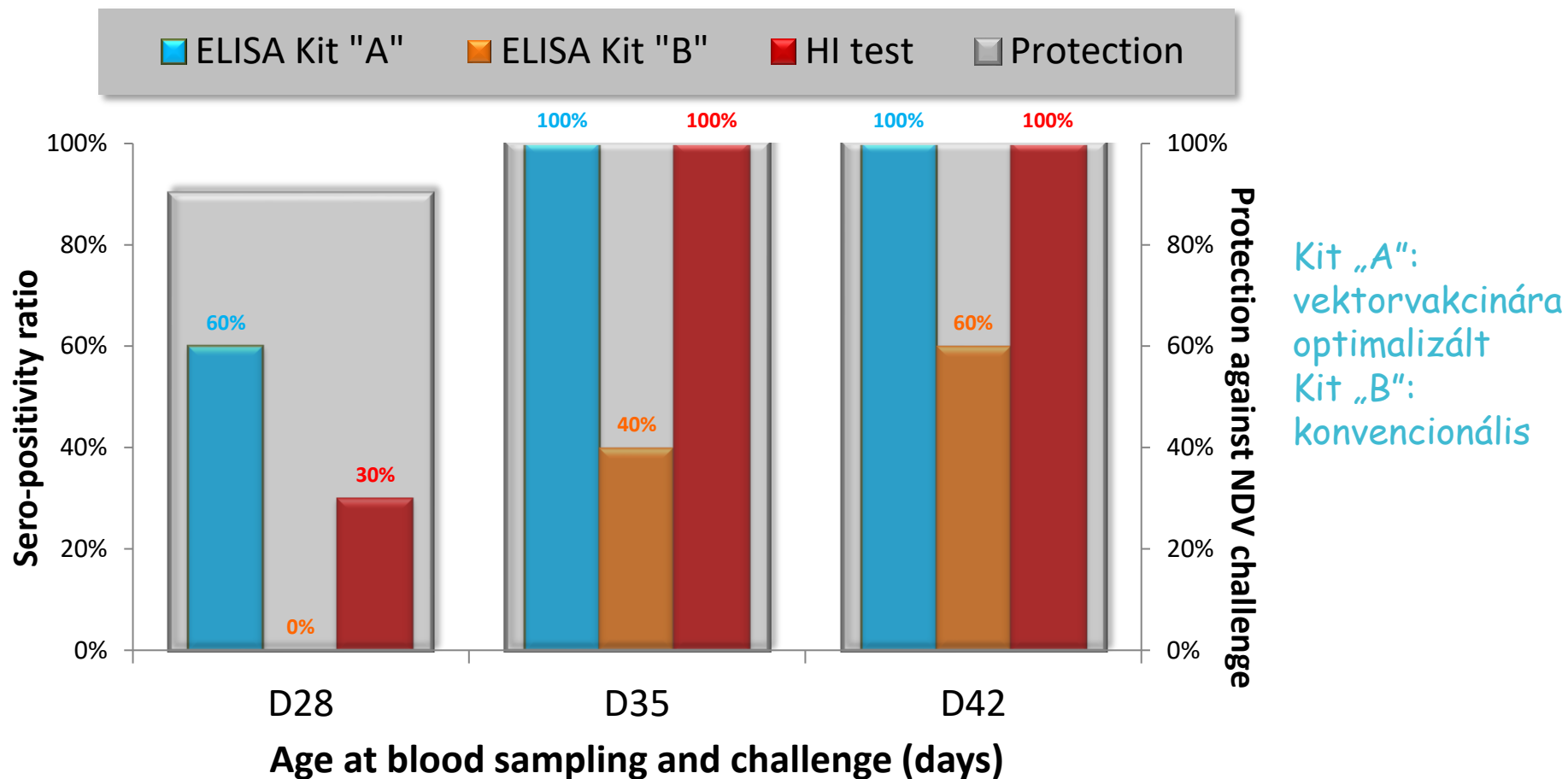
ssRNA

Lassabban kiépülő
HAG pozitivitás

Alacsony HAG
titerek
(konvencionálishoz
mérten)

Vektorvakcinák monitorozására kifejlesztett szerológiai módszerek- ELISA

Szero-pozitivitás különböző módszerekkel, illetve klinikai védelem kiépülése



Vektorvakcinák monitorozására kifejlesztett szerológiai módszerek- ELISA

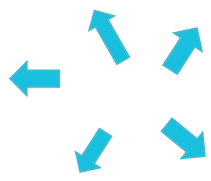
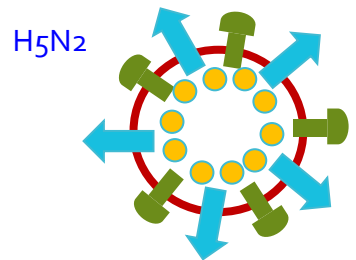
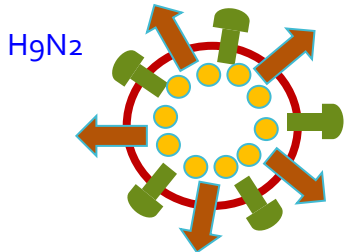
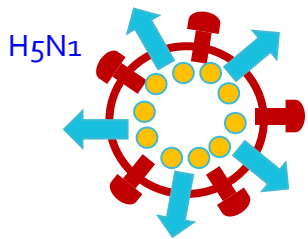
Betegség	Beépített gén (ek)	ELISA kittek vektorvakcinákra optimalizálva
ND	F	nem kizárólag anti-F mérése
IBD	VP ₂	anti-VP ₂ ellenanyagok
ILT	gB / gD és gI / gD	anti-gI; anti-gB (anti-gD, még nincs forgalomban)
AI	HA	altípus specifikus kittek (H5 és H9 van forgalomban vakcinázás monitorozásra)

DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)

Minden „A-típusú influenza” elleni ellenanyagok mérésére alkalmas ELISA NP ELISA (több gyártó)
(ugyanígy VLP/alegység; SRV, DNS)

MEZEI VÍRUSOK MONITOROZÁSA

rHVT-AI MONITOROZÁSA



NP ELISA

NA ELISA

AIV-ből csak HA
(H5) fehérje
fejeződik ki

H5 ELISA

DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)

Betegség	Beépített gén (ek)	ELISA kittek vektorvakcinákra optimalizálva	ELISA kittek teljes, élő vírus (mezei vagy vakcina) detektálására
ND	F	nem kizárólag anti-F mérése	anti-NP vagy, konvencionális ELISA párhuzamosan*
IBD	VP2	anti-VP2 ellenanyagok	konvencionális ELISA párhuzamosan*
ILT	gB	anti-gB	anti-gl
	gD és gl	anti-gl	anti-gB
	gD	(anti-gD, még nincs forgalomban)	anti-gB vagy anti-gl
AI	HA	anti- H5 vagy anti-H9 (vagy anti-H7)	anti-NP (anti-N1, N2...)

*amennyiben nincs teljesen szelektív módszer

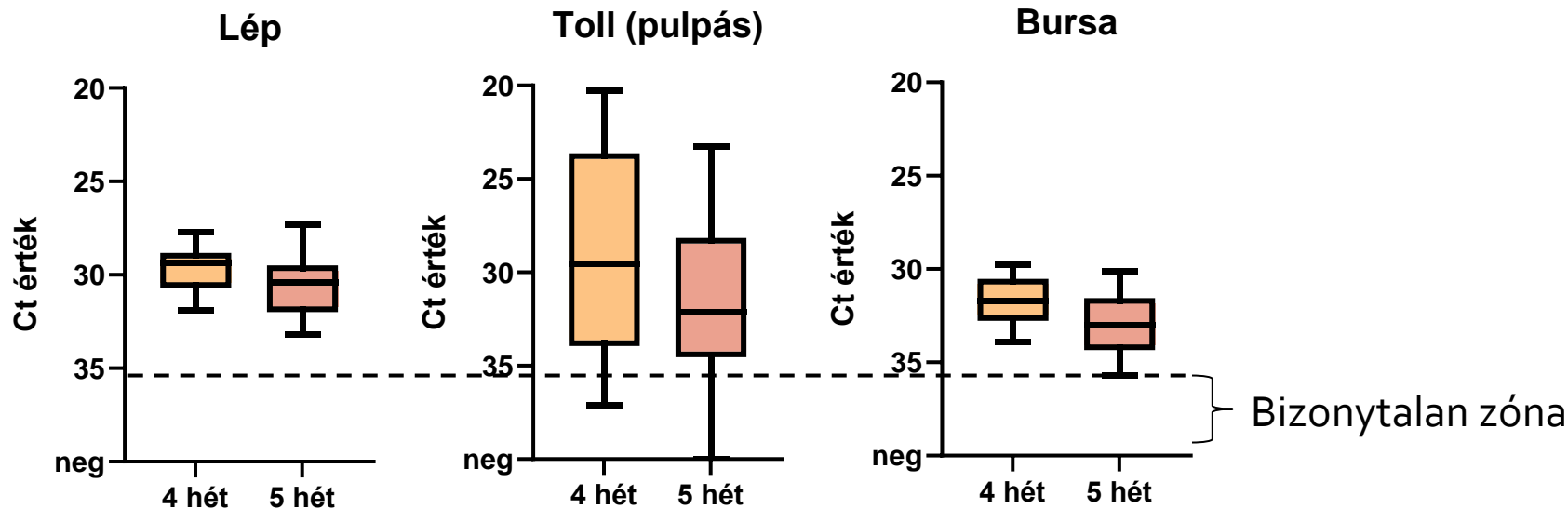
Vakcina alkalmazás hatékonyságának tesztelése

- Vektorvakcina alkalmazási lehetőségei:
 - önmagában alkalmazva
 - Elég lehet a szerológia
 - vakcinázási programban, hagyományos vakcinákkal kombinálva (pl. ND)
 - Már nem működik a DIVA szerológiai alapon
 - Molekuláris módszerek- vakcinavírus nukleinsav detektálása
- HVT- csirkében horizontálisan nem terjed => az elvárt vakcina hatékonyság eléréséhez a hatékony alkalmazás kritikus

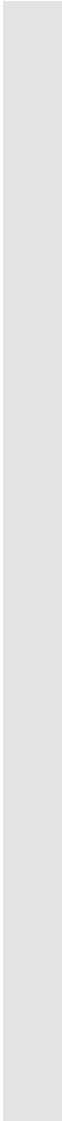

HVT vektorvakcina kimutatás immunizált állatokban

rHVT-ND vakcina egyszeri, s.c. alkalmazását követően végzett vakcinavírus detektálhatósági vizsgálat kommersz broilerben

Szerv	4 hetes (D28)	5 hetes (D35)
lép	100%	100%
bursa	100%	100%
Pulpás tollhegy	100%	86%



- Lép kiegyenlítettebb, toll heterogén
- Bursából is kimutatható (rHVT-IBD esetén „Faragher 52/70 törzs” detektálás Gumboro vírus tipizálás során)



Molekuláris biológiai eszköztár a vakcina hatékonysági vizsgálatokban

Szimultán alkalmazott vakcinákra szelektív RT-qPCR

- Amikor ugyanarra a betegségre többféle vakcinát alkalmazunk egyidejűleg

pl. Fertőző bronchitis, napos kori vakcinázás élő vakcinákkal

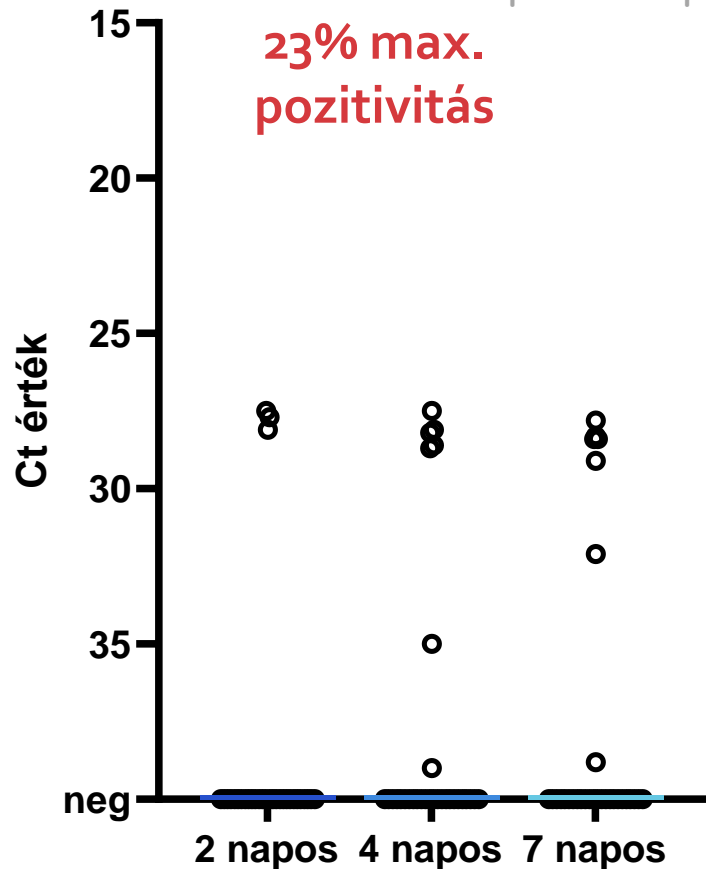
- Szelektív PCR módszerek az eltérő szerotípusú vakcinákra (pl. Mass-típusú és 793B-típusú vagy Mass-típusú és QX típusú)
- RT-real-time PCR módszert alkalmazva:
 - A mintában esetlegesen jelentősen eltérő mennyiségben jelenlevő két vírus mindegyike látható

IB vakcinázás hatékonysága- eredmények, amikor baj van

Univerzális
módszer (5'UTR)

Keltetői vakcinázás
Vakcina hígítása során
tapasztalt probléma

Kísérleti körülmények között végzett
spray vakcinázás, „3-szorozó
vakcinahígítási sor” (csak egy vakcina)



Növekvő
vírusmennyiség



RT-qPCR pozitivitás	
1 napos	5 napos
20 %	68%
64 %	96 %
84 %	100 %
96 %	100 %

- Komoly probléma esetén akár tartósan rossz eredmények (nem biztos, hogy majd „megjavul”).
- Korábbi mintavételek érzékenyebben mutatnak eltérést.

IB vakcinázás hatékonysága- eredmények, amikor baj van

Szerotípus specifikus módszerek

1. kombináció	1 napos	7 napos	10 napos
Vakcina „A”	25%	40%	40%
Vakcina „B”	25%	92%	100%

2. kombináció	1 napos	7 napos	10 napos
Vakcina „A”	24%	32%	20%
Vakcina „C”	32%	100%	100%

5'UTR: mind pozitív
7 és 10 naposan

3. kombináció	1 napos	7 napos	10 napos
Vakcina „B”	60%	80%	88%
Vakcina „C”	80%	96%	100%

- Két (vagy több) vakcina esetén már meglévő erős replikáció az egyik törzs részéről akadályozhatja a másik felerősödését.

Kísérleti körülmények között végzett spray vakcinázás, két vakcina kombináltan

Ref.: Ceva-Phylaxia Tudományos Támogató Igazgatóság

Szimultán jelenlévő vakcina és fertőző vírus elkülönítés szelektív RT-qPCR

- **Vakcinavírus jelenlétében ráfertőzéssel szembeni védettség vizsgálata**

pl. Fertőző bursitis (IBD), vakcina hatékonyság értékelése
rHVT-IBD és élő/immun-komplex vakcina között

- Klinikai kép ritkán elegendő (vvIBDV esetén, tojók)

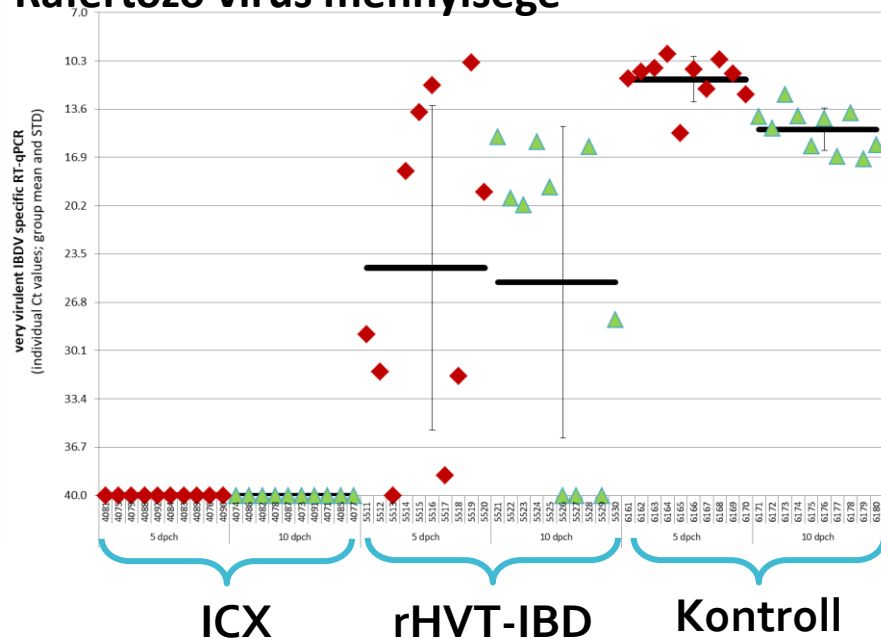


- makroszkópos és szövettani elváltozások
Élő IBDV hatására jelentős ⇔ rHVT-IBD esetén ez hiányzik
- Ráfertőzés/fertőződés esetén (ha az közel van a vakcina megeredéséhez) nem lehet biztonságosan eldönteni, melyik törzs áll az elváltozások hátterében

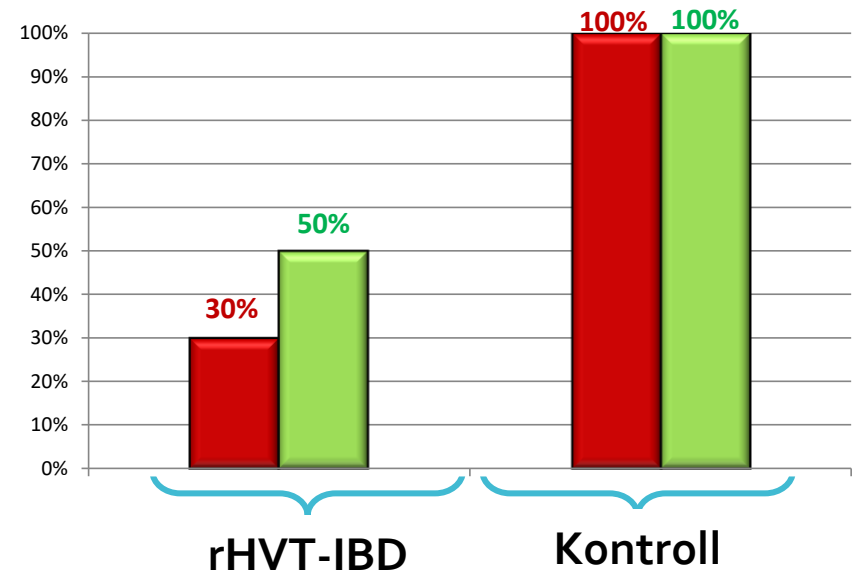
Szimultán jelenlévő vakcina és fertőző vírus elkülönítés szelektív RT-qPCR

5 dpch, 10 dpch

Ráfertőző vírus mennyisége



vvIBDV-re jellemző szövettani elváltozások



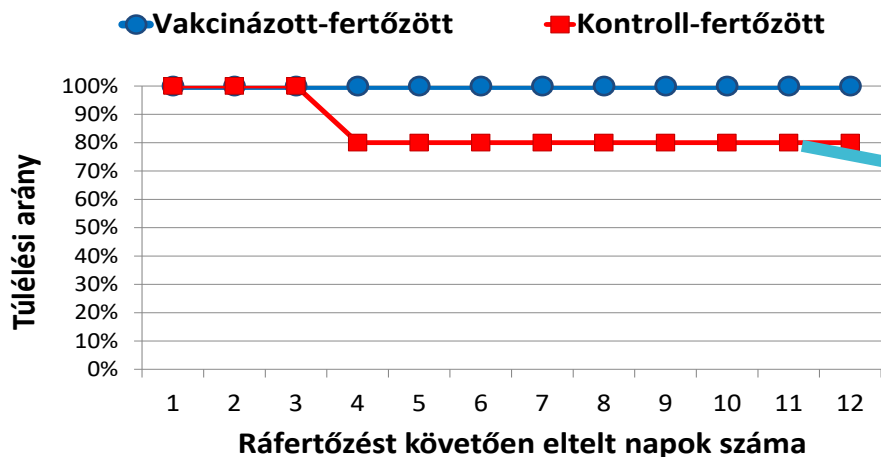
- ICX esetén nincs detektálható ráfertőző vírus
- rHVT-IBD: jelentős ráfertőző vírus replikáció csökkentés csoport szinten, de heterogén
- Szövettan kevesebb állatban jelzi a fertőző vírus szaporodását, mint RT-qPCR

vvIBDV fertőzés; broiler, 4 hetes kori fertőzés

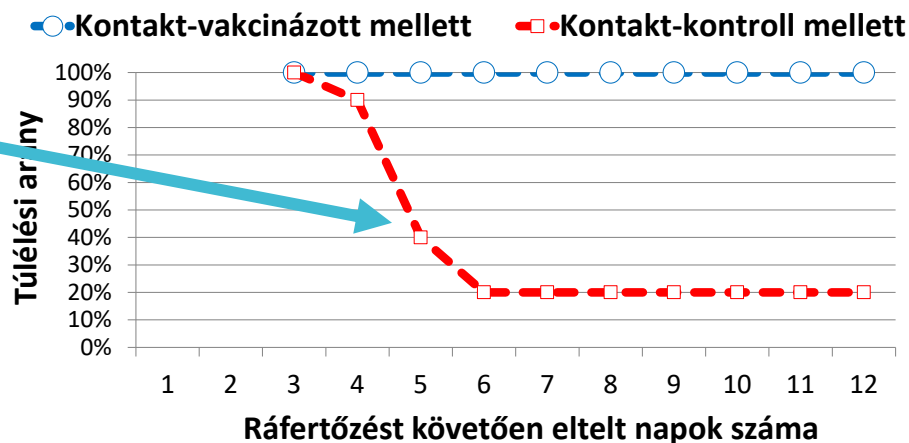
Ref.: Ceva-Phylaxia Tudományos Támogató Igazgatóság

Ráfertőző rendszer finomhangolása

Direktben fertőzött állatok



Naiv kontakt



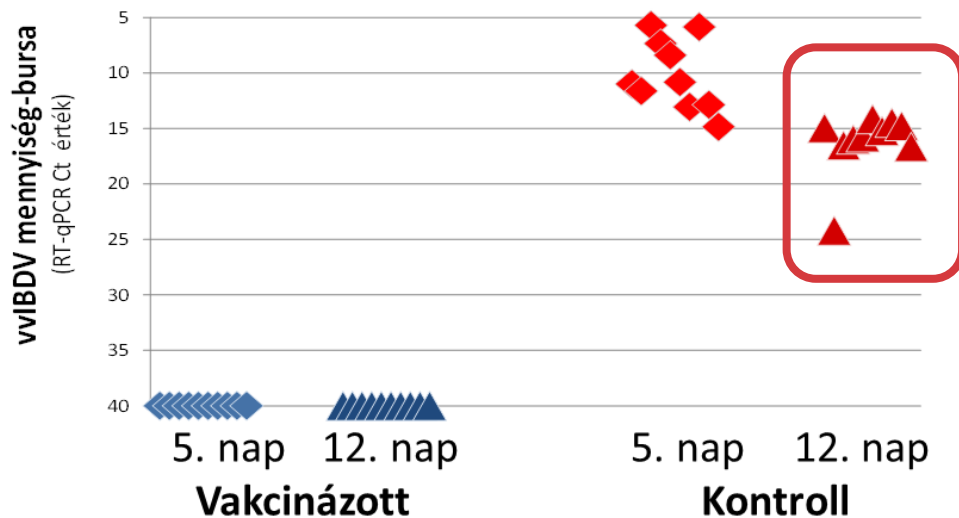
- Jóval súlyosabb a kontakt úton történő fertőzés a klinikai kép alapján, mint a direkt fertőzés ebben a vizsgálatban.

vvIBDV fertőzés (tojó, 5 hetes életkor, ICX vakcina); 5 dpch, 12 dpch mintavétel
(kontakt csak „12 dpch”=10 dpc)

Ráfertőző rendszer finomhangolása

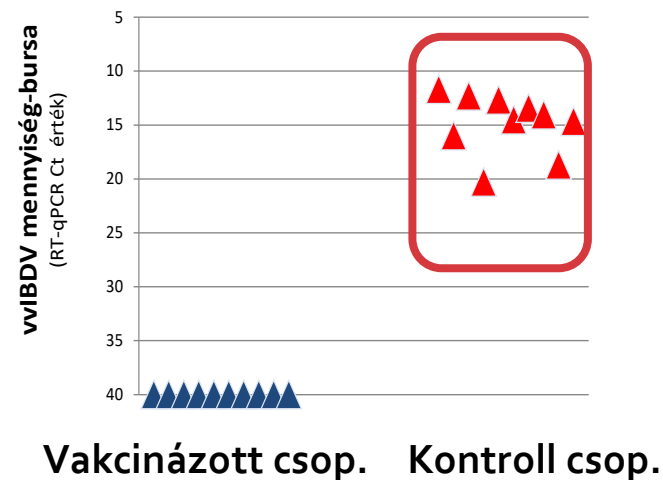
Ráfertőző vírus mennyisége

Direktben fertőzött állatok



Az azonos időben gyűjtött minták vírustartalma kb összemérhető

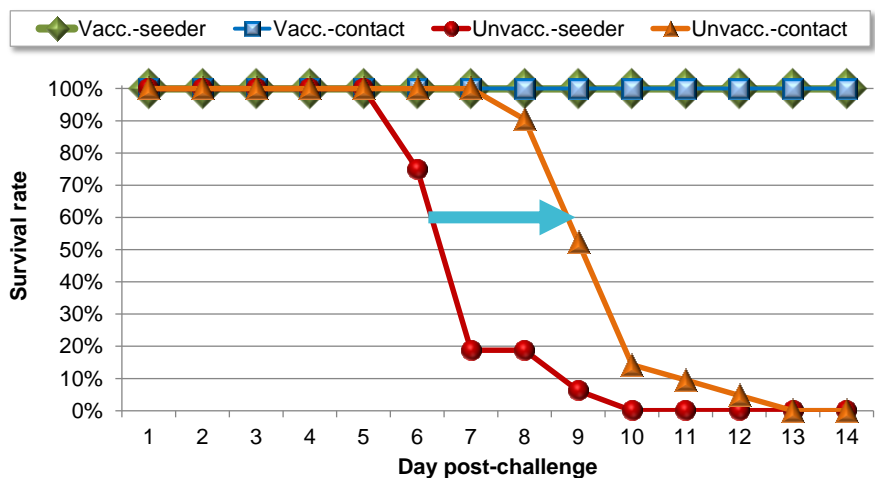
Naiv kontakt



- Nem vakcinázott állatokban erős vírusreplikáció kontaktban is
- Egy (késői) vizsgálati időpont alapján nem feltétlenül ítéhető meg a ráfertőzés „ereje”

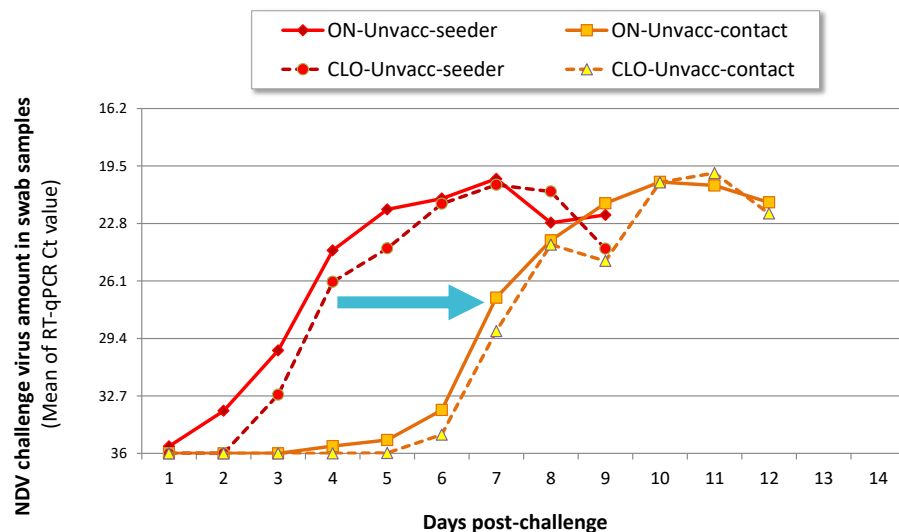
Ráfertőző rendszer finomhangolása

Túlélési görbe



Vírusürítés

(ON=szájpadhasadék tampon; CLO=kloaka tampon)



- Elhullásban és ürítésben is ugyanaz a kinetika, csak időben eltolódva.
- Ez a fertőző rendszer direkt fertőzésben jól modellezi a fogékony állatoktól érkező fertőződés erejét.

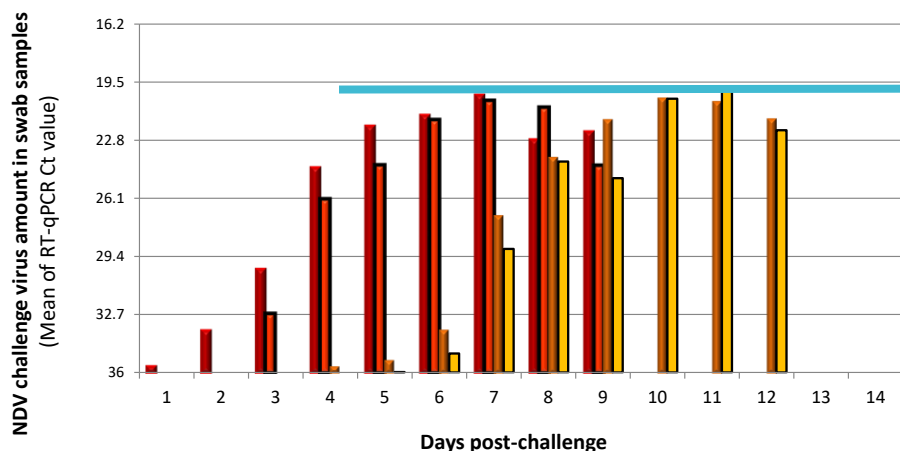
vNDV fertőzés (broiler, 5 hetes életkor, rHVT-ND vakcina)

Ref.: Tatár-Kis T. és mtsai, Vaccines 2020, 8, 614; doi:10.3390/vaccines8040614

Ráfertőző vírus ürítés mérés (akár naponkénti lekövetés)

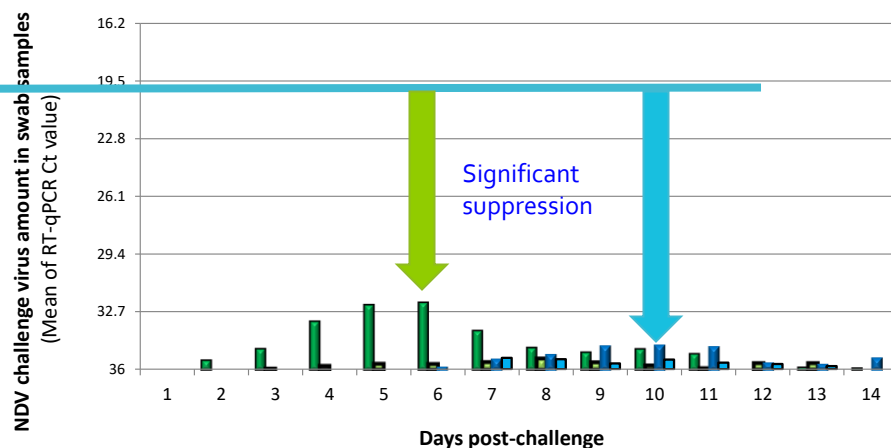
Nem vakcinázott állatok

■ ON-Unvacc-seeder ■ CLO-Unvacc-seeder ■ ON-Unvacc-contact ■ CLO-Unvacc-contact



Vakcinázott állatok

■ ON-Vacc-seeder ■ CLO-Vacc-seeder ■ ON-Vacc-contact ■ CLO-Vacc-contact



- Vakcinázás hatása nagyon jelentős már direkt fertőzés esetén is
- Vakcinázott kontaktokra továbbadva még elenyészőbb ürítés jelentkezik (kisebb dózis+csökkent fogékonyság)

vNDV fertőzés (broiler, 5 hetes életkor, rHVT-ND vakcina)

Ref.: Tatár-Kis T. és mtsai, Vaccines 2020, 8, 614; doi:10.3390/vaccines8040614

Ráfertőző vírus ürités mérés (akár naponkénti lekövetés) Transzmissziós vizsgálat

Transzmissziós paraméterek a naponkénti ürités eredmények alapján kategorizálva a csirkéket

Group	Transmission rate (β)		Reproduction ratio (R)	
	mean	95% CI	mean	95% CI
Unvaccinated	0.67	0.42-1.01	3.20	2.06-4.96
Vaccinated	0.24	0.12-0.47	0.82	0.38-1.75

- A kapott eredmények alapján a vakcina alkalmas az állományba behurcolt vírus terjedésének kontrollálására.

SRV/RNS/
DNS

Alegység/
VLP

vektorvakcinák

Konv. inakt. Konv. élő

NGS,

mélyszekvenálás

Real-time PCR

ELISA (NP, HA...)

Konv. ELISA

Klassz. virológia

Vakcinák

Labor módszerek