



Dział  
Kontroli Produktów  
Lecznicznych Weterynaryjnych

Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe (HTS) w kontroli jakości  
szczepionek weterynaryjnych – opracowanie metody i jej  
znaczenie dla standardów farmakopealnych

**dr Katarzyna Pasik**

Puławy, 27.03.2026

# EDQM & GEON

700  
ekspertów

40  
krajów

3000  
standardów

PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY



- ✓ **Cel EDQM:** harmonizacja standardów jakości bezpiecznych leków na kontynencie europejskim i poza nim
- ✓ **Cel sieci GEON:** kontrola jakości produktów leczniczych stosowanych u ludzi i zwierząt, przed i po wprowadzeniu do obrotu, ochrona zdrowia publicznego i zdrowia zwierząt



# PARAMETRY KONTROLI JAKOŚCI SZCZEPIONEK

## Szczepionki Żywe



- ✓ Identyfikacja szczepu
- ✓ Jałowość
- ✓ Brak czynników obcych
- ✓ Miano wirusa / bakterii (PFU, EID50, CFU)
- ✓ Bezpieczeństwo stosowania
- ✓ Stabilność preparatu

## Szczepionki Inaktywowane



- ✓ Skuteczność inaktywacji
- ✓ Jałowość
- ✓ Zawartość antygenu
- ✓ Adiuwanty
- ✓ Parametry fizykochemiczne (pH, objętość dawki)
- ✓ Brak żywego patogenu po inaktywacji
- ✓ Moc (potency)

### Standardy Kontroli:



**EDQM**  
Council of Europe



**Brak farmakopealnych genomicznych parametrów kontroli jakości szczepionek.**

# ZASTOSOWANIE HTS



## MEDYCINA

- >> rozwój innowacyjnych leków
- >> badania kliniczne
- >> zakres biopsji
- >> badania onkologiczne



## PRZEMYSŁ SPOŻYWCZY

- >> analiza zanieczyszczeń mikrobiologicznych



## MEDYCINA WETERYNARYJNA

- >> badania epidemiologiczne
- >> monitorowanie oporności
- >> charakterystyka mikrobiologiczna



>> analiza zanieczyszczeń mikrobiologicznych

# ZASTOSOWANIE HTS



## ANALIZA KRYMINALISTYCZNA

- >> badania kryminalistyczne
- >> analizy próbek dowodowych
- >> identyfikacja DNA, odcisków palców, materiałów sladowych



## CHARAKTERYSTYKA SALMONELLA

- >> charakterystyka genów wirulencji i oporności
- >> elementy mobilne genetycznie
- >> identyfikacja źródeł zakażenia



## WAKCYNOLOGIA

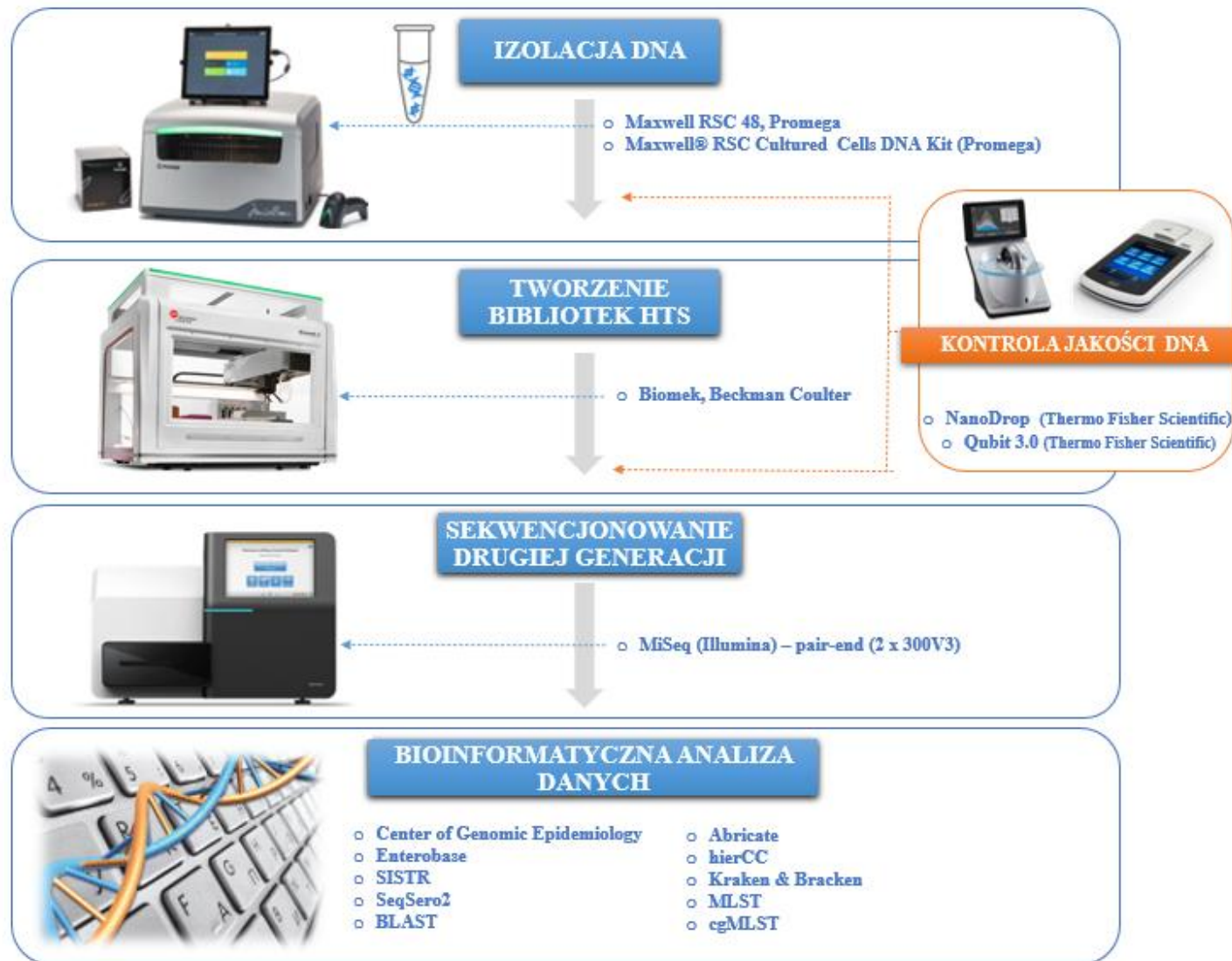
- >> badania epidemiologiczne szczepień
- >> analiza pokrewieństwa filogenetycznego
- >> klasyfikacja szcepów szczepionkowych

# CEL PROJEKTU

- ✓ Wykorzystanie nowoczesnej technologii HTS do kontroli jakości immunologicznych weterynaryjnych produktów leczniczych dla drobiu.
- ✓ Z uwagi na brak dedykowanych narzędzi dla genomowej kontroli jakości szczepionek, w pracy wykorzystano ogólnodostępne narzędzia genomiczne i oceniono ich przydatność do realizacji celu pracy.
- ✓ Niniejsza praca stanowi pierwsze w Polsce oraz jedno z nielicznych na świecie udokumentowanych badań wykorzystujących HTS do kontroli jakości żywych szczepionek weterynaryjnych.



# MATERIAŁY I METODY



# WYNIKI KONTROLI GENOMICZNEJ SZCZEPIONEK



## Potwierdzenie serowaru i szczepu szczepionkowego

- ✓ *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar **Enteritidis**
- ✓ CHS44
- ✓ SA19992322
- ✓ SA19970510



## Stabilność genomowa

ST: 11  
cgST: 44177 / 81336  
AD: 0

seria 01    seria 02  
seria 03

- ✓ Bliskie pokrewieństwo ze szczepem referencyjnym



## Geny wirulencji

- SPI-1, SPI-2



- ✓ Adhezja: *Agf*, *Lpf*, fimbrie typu 1
- ✓ Kolonizacja: *sinH*
- ✓ Stres: *sodC1*



## Geny oporności na antybiotyki

- ✓ Brak istotnych genów AMR
- ✓ *aac(6')-Iaa* (gen kryptyczny)

## Geny replikonów plazmidowych

- ✓ IncFII(S), IncFIB(S)



- ✓ Multireplikacyjny plazmid IncF (IncFII/IncFIB)

# KEY CRITERIA

## FOR GENOMIC QUALITY CONTROL OF VACCINES



### Potwierdzenie serowaru i szczepu szczepionkowego

Weryfikacja zgodności genomowej szczepu zawartego w preparacie z deklarowanym serowarem *Salmonella* oraz potwierdzenie jego jednoznacznej identyfikacji molekularnej.



### Ocena stabilności genetycznej

Analiza genomów między seriami w celu wykrycia rearanżacji lub nieoczekiwanych mutacji.



### Kontrola czystości genetycznej

Potwierdzenie braku istotnych zanieczyszczeń



### Identyfikacja markerów atenuacji

Wykrycie delekcji lub mutacji genów odpowiedzialnych za **atenuację** szczepu.



### Geny wirulencji, AMR oraz plazmidy

Ocena genów wirulencji, oporności oraz mobilnych elementów genetycznych.



# Publikacja w czasopiśmie Q1- Vaccine 2026

IF 3.5 • 200 pkt MEiN

Vaccine 95 (2023) 120956D

Contents lists available at [ScienceDirect](http://ScienceDirect.com)

**Vaccine**

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)

---

## HTS-based control of *Salmonella Enteritidis* vaccines for chickens – pilot study

Katarzyna Pasik<sup>\*,\*</sup>, Ewelina Iwan<sup>\*</sup>, Arkadiusz Bomba<sup>\*</sup>, Katarzyna Domańska-Blicharz<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Veterinary Medicine, 24-100 Wrocław, Poland  
<sup>\*</sup> Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Veterinary Medicine, 24-100 Wrocław, Poland  
<sup>\*</sup> Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Veterinary Medicine, 24-100 Wrocław, Poland

---

**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
High throughput sequencing (HTS)  
Vaccines  
Salmonella  
Key words: *Salmonella enteritidis* (SE), OMG1

**ABSTRACT**

Salmonella vaccines constitute the majority of antimicrobial interventions used to control poultry diseases. However, the efficacy of these vaccines is often limited by the presence of wild-type *Salmonella enteritidis* (SE) in the environment. This study aimed to evaluate the effectiveness of HTS-based control of SE vaccines for chickens. The results show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment.

---

### 1. Introduction

Salmonella enteritidis (SE) is a leading cause of salmonellosis in humans and animals. The prevalence of SE in the environment is high, and it is a major public health concern. The use of vaccines is one of the most effective ways to control SE. However, the efficacy of these vaccines is often limited by the presence of wild-type SE in the environment. This study aimed to evaluate the effectiveness of HTS-based control of SE vaccines for chickens. The results show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment.

---

### 1. Introduction

The results of this study show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment. The results also show that HTS-based control of SE vaccines for chickens is effective in reducing the prevalence of SE in the environment.

Volume 75, 7 March 2026

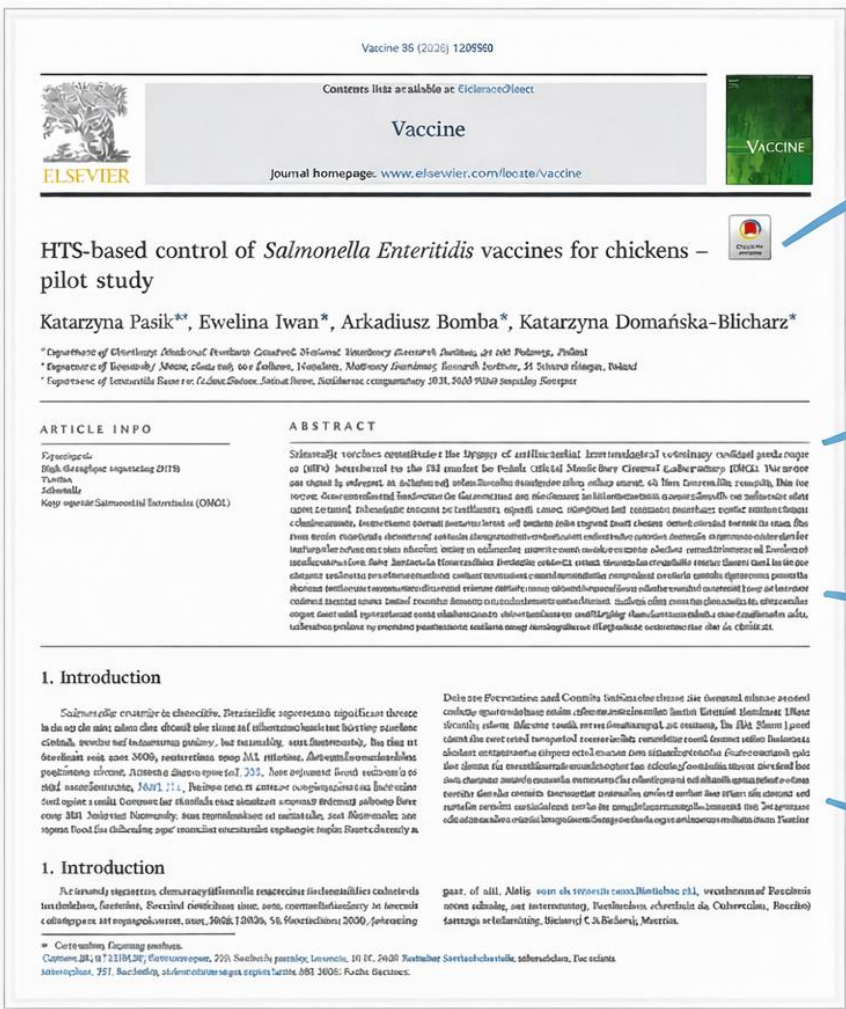
ISSN 0264-410X

# Vaccine

The official journal of The Japanese Society for Vaccinology

# Publikacja w czasopiśmie Q1- Vaccine 2026

IF 3.5 • 200 pkt MEiN



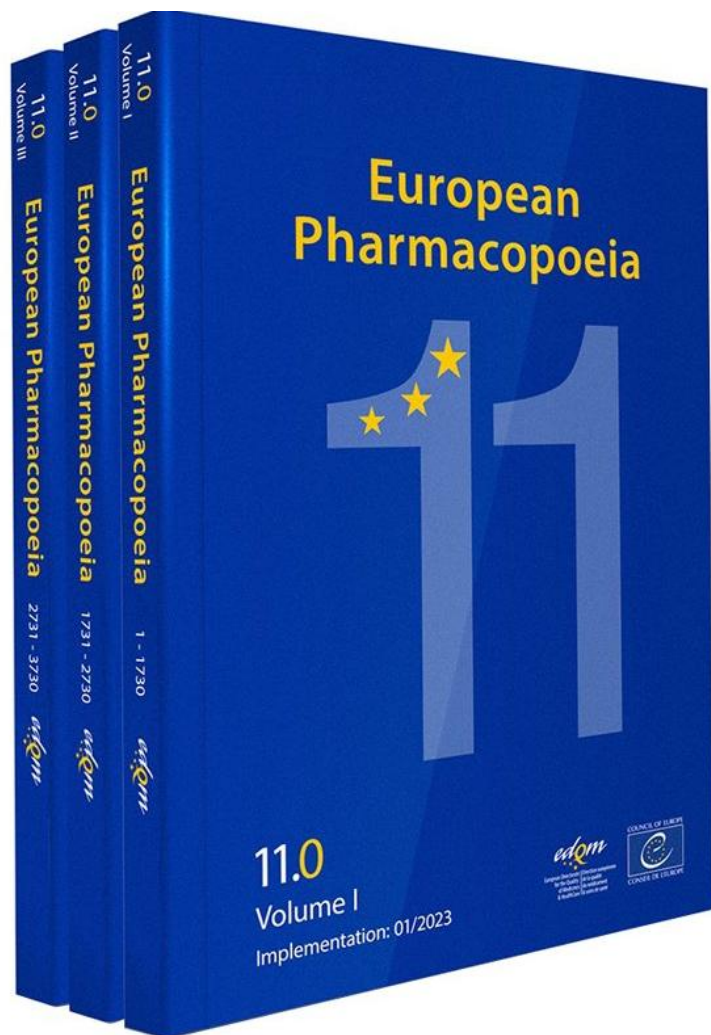
**dr Katarzyna Pasik**  
 kontrola jakości  
 szczepionek, OMCL

**dr Ewelina Iwan**  
 omika, bioinformatyka

**Arkadiusz Bomba**  
 bioinformatyka

**prof. dr hab.  
 Katarzyna Domańska-Blicharz**  
 choroby zakaźne drobiu

# NOWY ROZDZIAŁ PH. EUR. 2.6.41.



EUROPEAN PHARMACOPOEIA  
 2.6.41. HTS for the detection of viral extraneous agents

04/2026:20641

## 2.6.41. HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING FOR THE DETECTION OF VIRAL EXTRANEIOUS AGENTS

### 1. INTRODUCTION & SCOPE

Viral extraneous agents (also referred as viral adventitious agents) can be introduced unintentionally in biological products at various stages in the manufacturing process. To ensure product quality and safety, a comprehensive strategy is established following the principles of viral safety risk assessment detailed in general chapter 5.1.7. This strategy includes testing for viral contamination and may require a panel of suitable tests that are able to detect diverse viruses that may be present in the starting material such as the cell substrate and virus seed, or in raw materials of animal or plant origin. These tests are conducted at various stages of manufacture which may include cell banks, virus seeds, unprocessed bulks (viral or protein harvests), cells for cell therapy, and production viruses (helper viruses and viral vectors for protein expression).

High-throughput sequencing (HTS) (also referred to as next-generation sequencing/NGS, massively parallel sequencing/MPS or deep sequencing) can be introduced in the viral extraneous agent testing package to fill gaps identified through the risk assessment, to replace *in vivo* tests for extraneous agents and nucleic acid amplification techniques, or to replace or supplement *in vitro* methods using cell cultures. HTS is especially useful for the testing of new cell lines to detect known and unknown viruses, but also of virus seeds and harvests particularly when there is interference in conventional tests due to lack of neutralisation of the vaccine/vector virus or to sample toxicity.

HTS can detect all genomic viral nucleic acids (DNA and RNA) (genomics), viral RNAs (transcriptomics), or encapsidated viral genomes (viromics). The analysis approach may be selected based on the nature of the sample to be tested. HTS may be more complex for the detection of retroviruses in cases where the host genome contains endogenous retroviral sequences, as these sequences may be filtered out by bioinformatics. In such cases, a specific analytical strategy for retrovirus detection (e.g. product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assay) should be employed.

Different HTS technologies are available and are classified as short-read sequencing technologies with read lengths of less than 500 nucleotides, or long-read sequencing technologies with read lengths greater than 1000 nucleotides. These technologies also differ regarding their throughput (number of reads generated) ranging from a few million to several billion reads.

The HTS workflow includes multiple steps: sample pre-treatment (optional), extraction of nucleic acids, post-nucleic acid extraction treatment of nucleic acids (optional), library preparation, sequencing, data analysis (bioinformatics) using reference databases, scientific evaluation of the results including reporting, interpretation and follow-up investigation in the event of a positive signal.

The design of the method may allow:

- detection of a broad spectrum of viral extraneous agents (known and unknown viruses) with a non-targeted approach using a comprehensive database with viral sequence diversity, or
- detection of a range of known viruses (or viruses distantly related to known viruses) with a targeted approach using a selective capture or amplification of viral sequences, or using reference virus genomes for bioinformatic analysis.

This general chapter describes HTS methodologies that may be used for the detection of viral extraneous agents in biological products including vaccines for human and veterinary use, recombinant proteins, viral vectors used for gene therapy and cell-based preparations for cell therapy. The chapter also provides guidelines for the validation of HTS methods for viral extraneous agent detection.

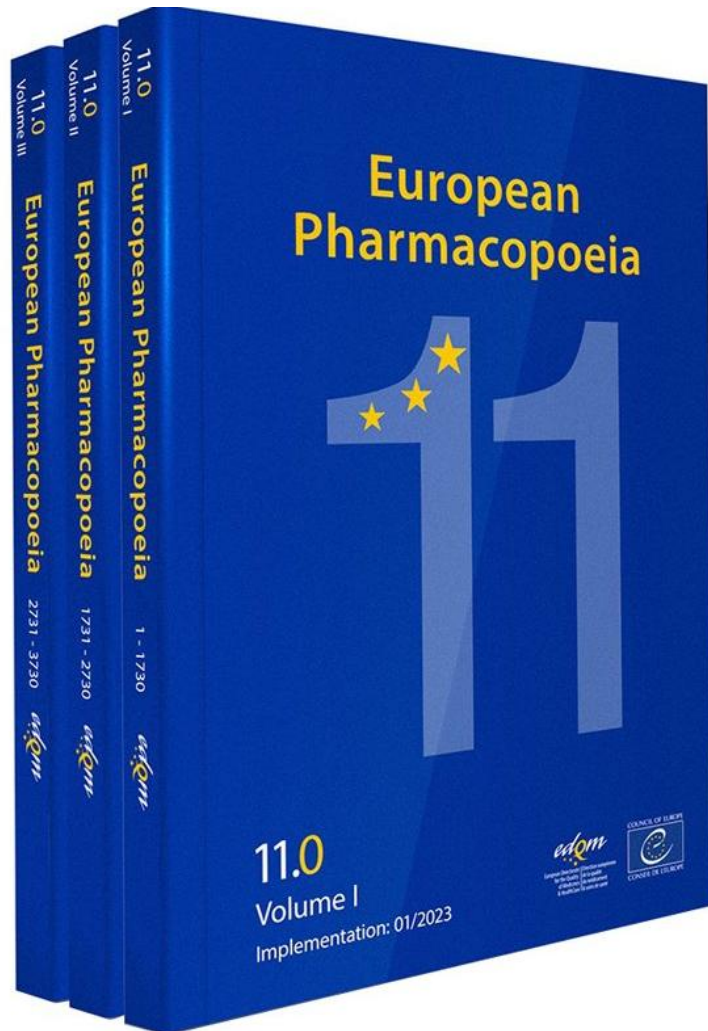
Considerations on the replacement of *in vivo* and *in vitro* tests for extraneous agents by HTS are provided by ICH guideline Q5A: *Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin*.

### 2. DESCRIPTION OF METHODS

#### 2-1. GENERAL CONSIDERATIONS

In applying a specific HTS testing strategy for viral extraneous agents, the most suitable material to analyse is chosen based on the stage of the manufacturing at which contamination is most likely to be detected. This may include different sample types or matrices, i.e. a cell-free sample (e.g. cell culture supernatant, virus seed) or a cellular sample (e.g. cell substrate/ cell bank). Unprocessed bulks (protein or viral harvest) can be cellular or cell-free. Biological products are tested for viral extraneous agents using general and specific assays, with consideration of the origin, passage history, and reagents used for developing cell banks or seed lots, as well as additional reagents and steps (e.g. purification or viral inactivation) used during the manufacturing process. This will determine the choice of sample type and production stage

# NOWY ROZDZIAŁ PH. EUR. 2.6.41.



- ✓ Umożliwia wykrywanie znanych i nowych czynników wirusowych
- ✓ Wprowadza genomowe podejście do kontroli bezpieczeństwa produktów biologicznych
- ✓ Wspiera przejście z kontroli fenotypowej na analizę opartą na genomie
- ✓ Standaryzuje pełny *workflow HTS* – od przygotowania próbki do analizy danych
- ✓ Umożliwia wprowadzanie genomowych parametrów jakości do rutynowej kontroli OMCL

# ZNACZENIE PROJEKTU



Projekt wykazał możliwość wdrożenia technologii HTS jako narzędzia łączącego nowoczesną genomikę z regulacyjną kontrolą jakości produktów biologicznych, wspierając rozwój standardów farmakopealnych.

# Dziękuję za uwagę



dr Katarzyna Pasik