

Marek Walczak

Dział Wirusologii i Chorób
Wirusowych Zwierząt

Opracowywanie szczepionek – proces, wyzwania i trudności.
Na przykładzie szczepionki przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń (ASF)



Opracowywanie szczepionek – proces, wyzwania i trudności na przykładzie szczepionki przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń (ASF).

Korzyści płynące ze szczepień
Rodzaje szczepionek

Wpływ szczepień na profil chorób

Spadek zachorowalności i śmiertelności

- Ospa prawdziwa: całkowicie wyeliminowana (WHO, 1980).
 - Polio: >99% spadek liczby przypadków od 1988 r.
 - Redukcja chorób wieku dziecięcego
Odra, krztusiec, błonica, świnka – kilkukrotny spadek zachorowań w krajach z wysokim poziomem szczepień.
 - Zmiana struktury zdrowotnej populacji
- Choroby zakaźne → marginalne znaczenie w krajach rozwiniętych.
Wzrost udziału chorób przewlekłych (np. sercowo-naczyniowych, nowotworów) jako głównych przyczyn zgonów.



RABIES EPIDEMIOLOGICAL SITUATION IN POLAND IN 2009 AND 2010

MARCIN SMRECZAK, ANNA ORŁOWSKA, PAWEŁ TRĘBAS, AND JAN F. ŻMUDZIŃSKI

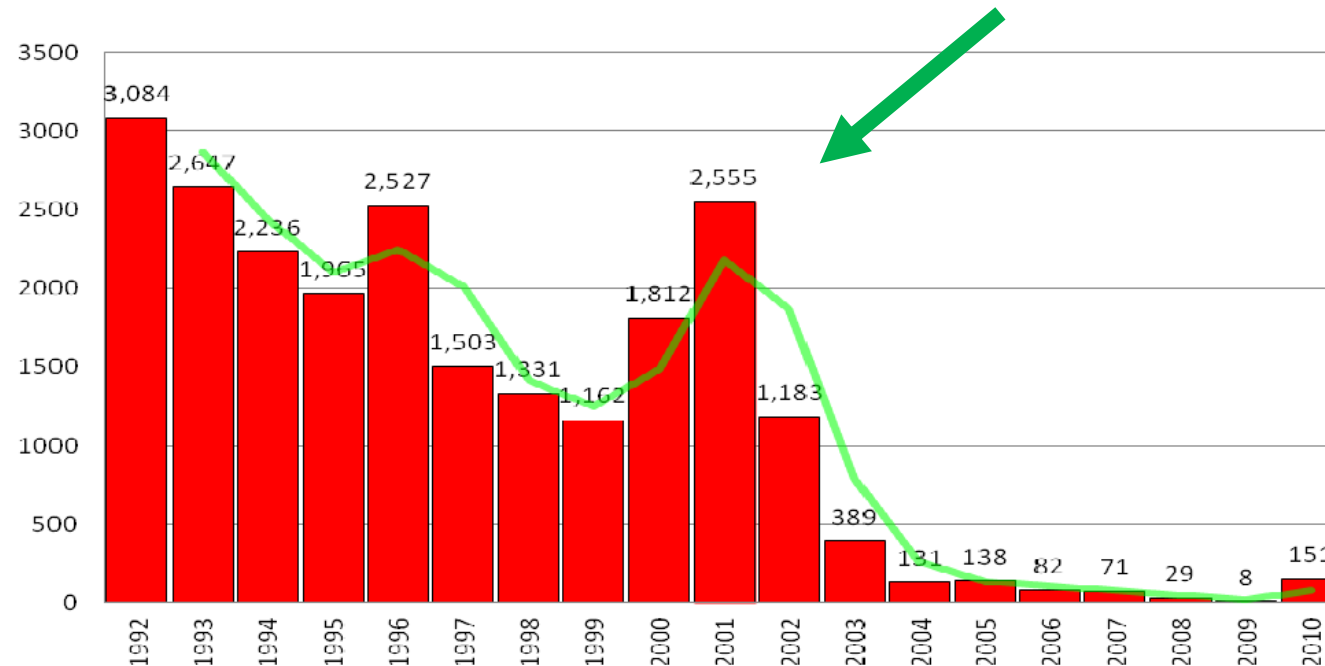


Fig. 4. Number of rabies cases after introduction ORV in Poland.

Rodzaje szczepionek

- **Inaktywowane** – martwe patogeny
- **Wektorowe** – zmodyfikowane wirusy jako nośniki materiału genetycznego
- **Żywe atenuowane (LAV)** – osłabione patogeny pobudzające odporność
- **Podjednostkowe/rekombinowane** – fragmenty patogenów
- **Toksoidowe** – inaktywowane toksyny bakterii
- **mRNA** – cząsteczki mRNA pobudzające organizm do produkcji antygeny
- **Skoniugowane** – antygeny połączone z białkami dla lepszej odpowiedzi immunologicznej





Dlaczego tak trudno uzyskać szczepionkę przeciwko ASF?

- Skomplikowana odpowiedź immunologiczna – mechanizmy ucieczki immunologicznej
- Brak odpowiedzi ASFV na obecność przeciwciał
- Złożoność genetyczna
- Trudności natury technicznej
- Kontrowersje związane z bezpieczeństwem stosowania szczepionek LAV

Mechanizmy ucieczki immunologicznej

INTERFERONY

Geny: MGF505, MGF360

- hamowanie wydzielania interferonów (C-GAS STING, STAT 1, STAT 2)

Czynnik NF- κ B

Gen: A238L

- homolog i inhibitor fosfatazy kalcineury (IkB)

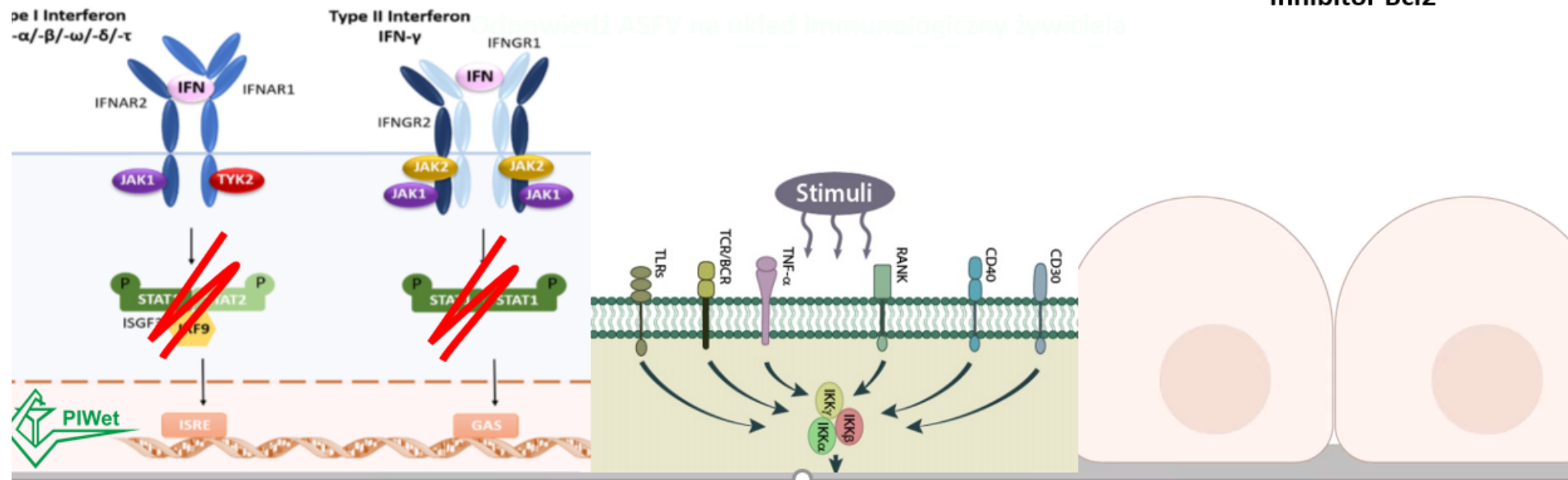
Apoptoza

Gen: A224L

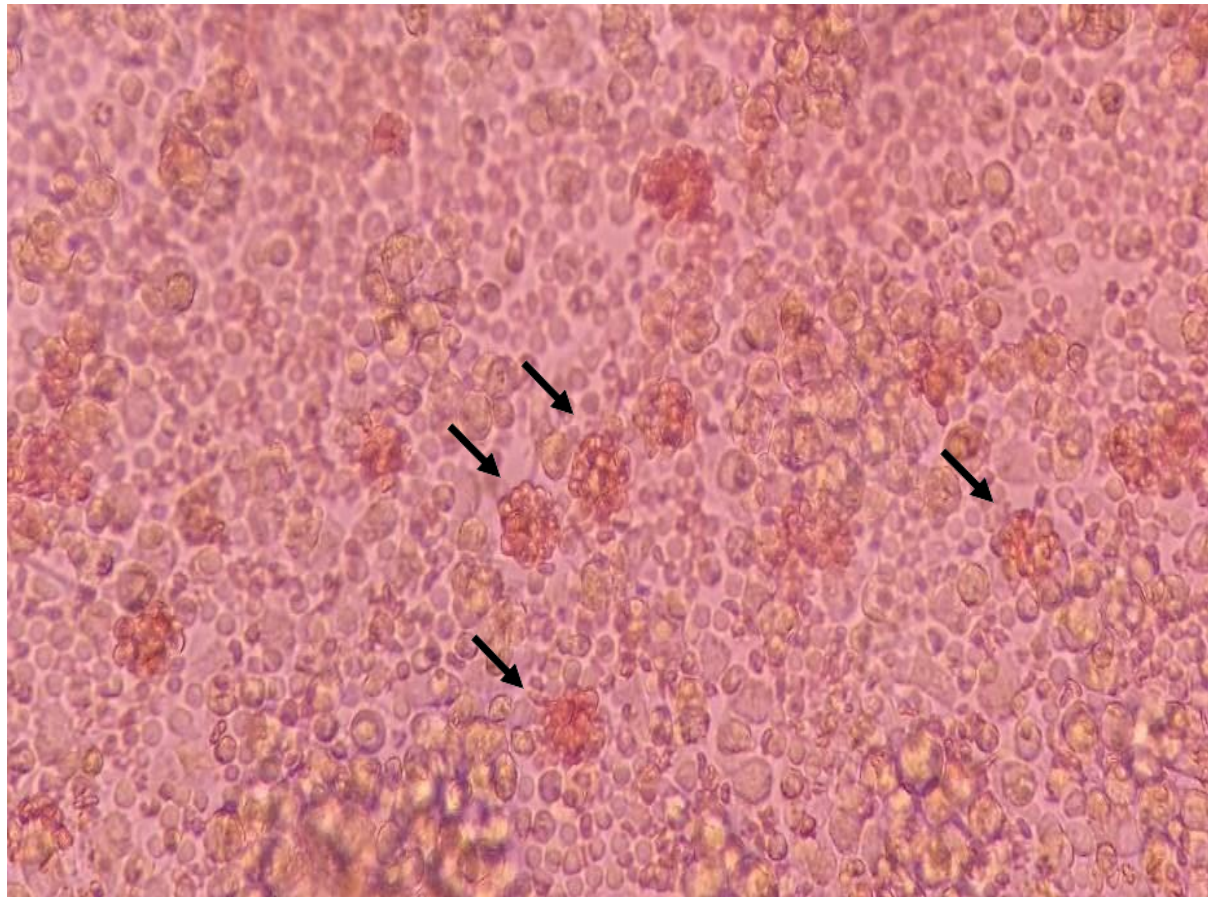
- Promotor IAP

Gen: A179L

- Inhibitor Bcl2



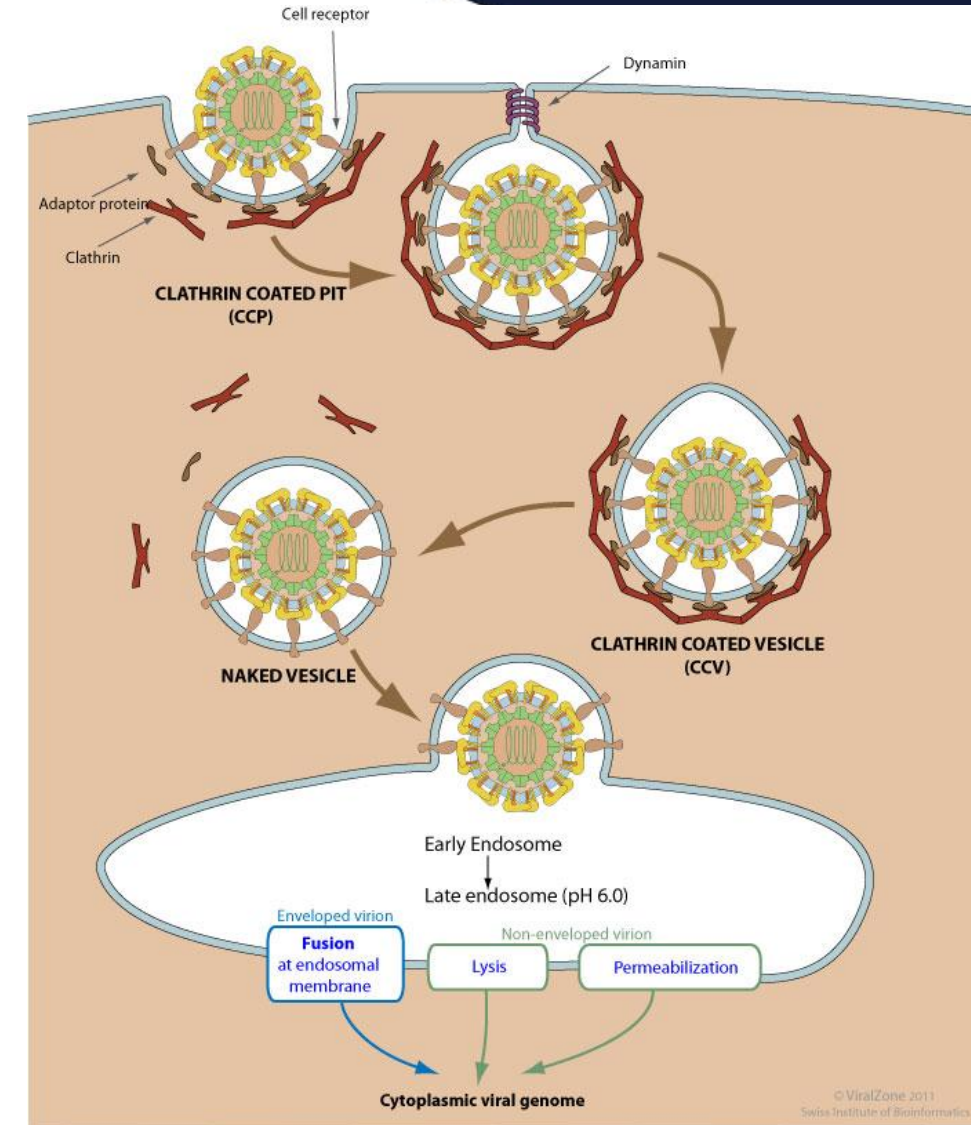
Mechanizmy uciezki immunologicznej



Hemadsorpcja (pow. 200x)

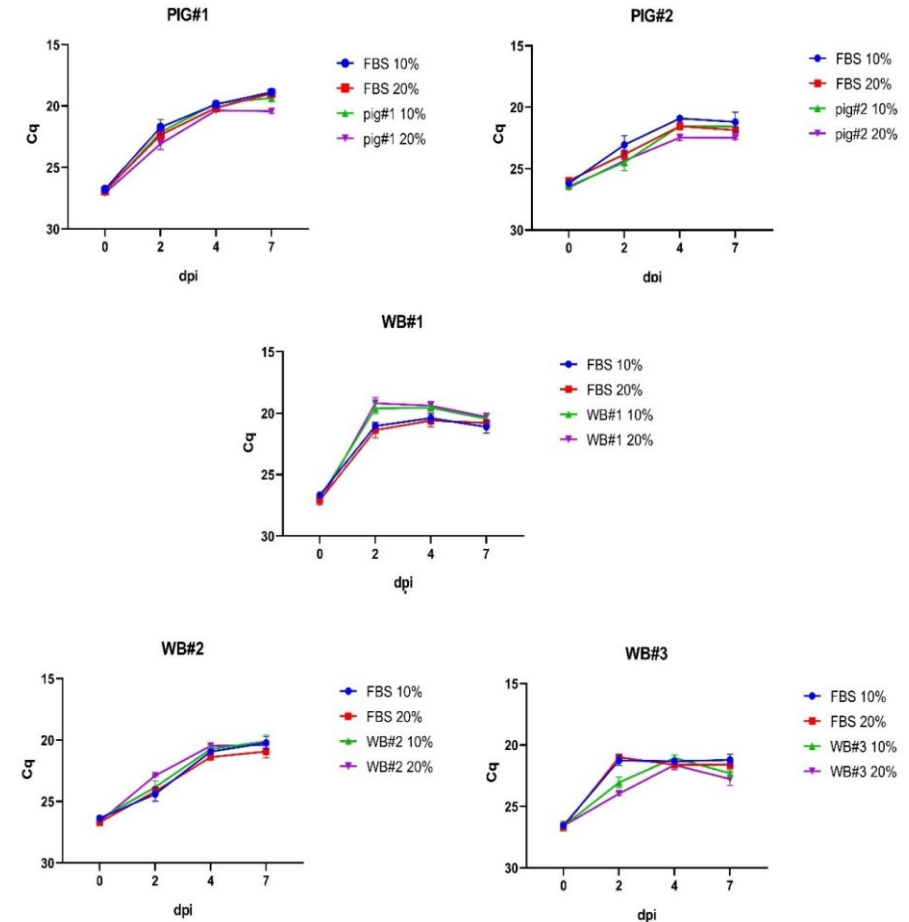
Przeciwciała vs. ASFV

- ✓ W ASF z reguły obserwuje się mały odsetek osobników **seropozytywnych** (ok. 10%), w terenie odsetek ten ulega zwiększeniu (endemia)
- ✓ Powszechnie uważa się, że w ASF nie obserwuje się tzw. przeciwciał neutralizujących
- ✓ Ma to związek z mechanizmem internalizacji wirusa
 - Mechanizm zależny od klatryny i dynaminy
 - Makropinocytoza konstytutywna (makrofagi)



Przeciwciała vs. ASFV

- ✓ W badaniach z użyciem **poliklonalnych surowic ozdrowieńców ASF** obserwowano **zahamowanie odczynu hemadsorpcji** w stosunku do próby kontrolnej
- ✓ Nie obserwowano **zahamowania replikacji wirusa ASFV** w obecności surowic ozdrowieńców w hodowli *in vitro*. Obserwowano wzrost ilości kopii DNA w dniach po infekcji.



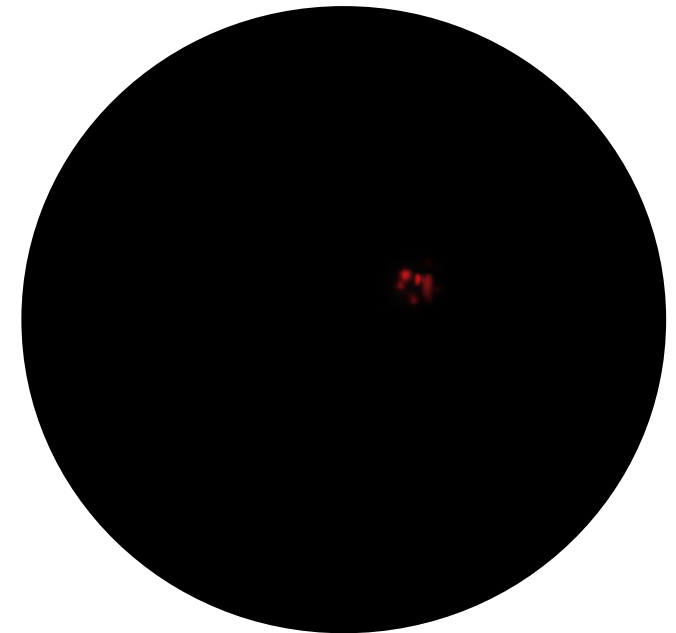
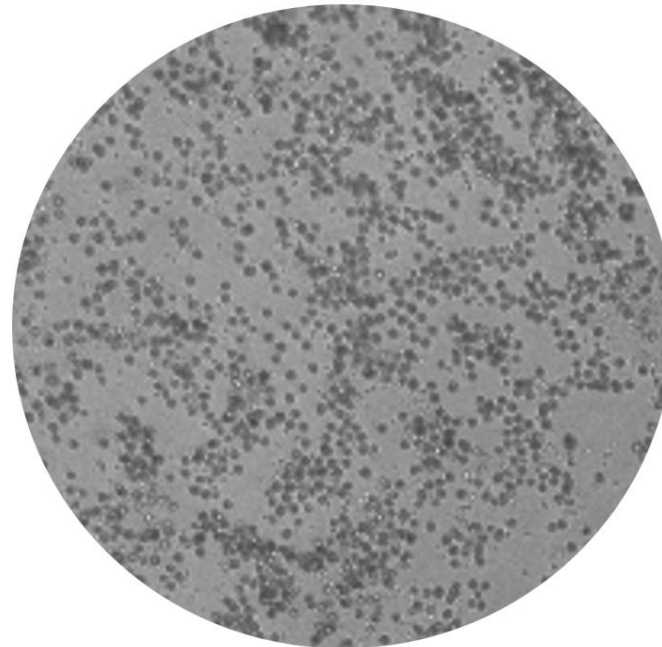
Złożoność genetyczna

	ASFV	SARS-Cov-2	CSFV
Genom	190 kbp	30kbp	12 kbp
ORF	157-160	12(13-15)	1

- ✓ Rozbudowany materiał genetyczny
 - ✓ 157 otwartych ramek odczytu
- ✓ Brak identyfikacji funkcji większości genów

Trudności natury technicznej

- ✓ Mało wydajne procesy biotechnologiczne
- ✓ Trudności w rozdzieleniu populacji wirusa delecyjnego od populacji wirusa natywnego
- ✓ Zbyt silna atenuacja – brak replikacji szczepu szczepionkowego



OPRACOWYWANIE SZCZEPIONEK LAV

- POZYSKANIE SZCZEPÓW ATENUOWANYCH Z TERENU



PROSTOTA



„NIEPEWNY” materiał genetyczny
Brak markerów DIVA

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 Porras¹,
Carmina Gallardo³ and Jose M. Sánchez-Vizcaíno^{1,2}*

- WIELOKROTNY PASAŻ W HODOWLI KOMÓRKOWEJ



Patrz ENDEMIA



„NIEPEWNY” materiał genetyczny
Brak markerów DIVA



<https://nucleusbiologics.com/>

- PRZYPADKOWE POZYSKANIE MATERIAŁU



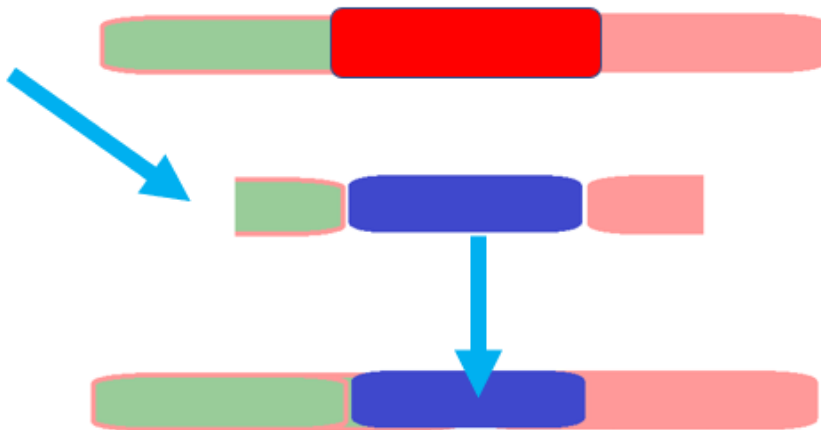
Article

Oronasal or Intramuscular Immunization with a
Thermo-Attenuated ASFV Strain Provides Full Clinical
Protection against Georgia 2007/1 Challenge

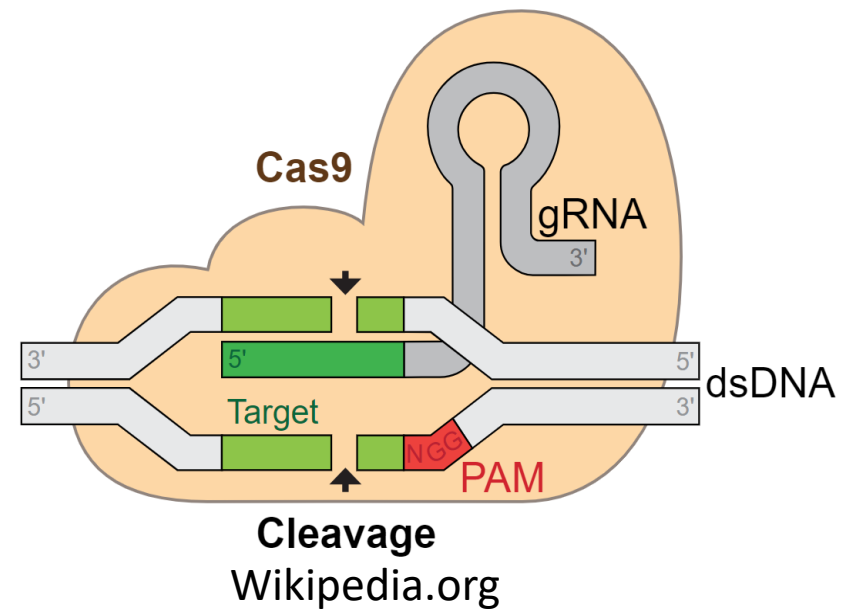
Olivier Bourry ^{*}, Evelyne Hutet, Mireille Le Dimna, Pierrick Lucas , Yannick Blanchard, Amélie Chastagner,
Frédéric Paboeuf and Marie-Frédérique Le Potier 

BIOINŻYNIERIA GENETYCZNA

Homologiczna rekombinacja



CRISPR/Cas9

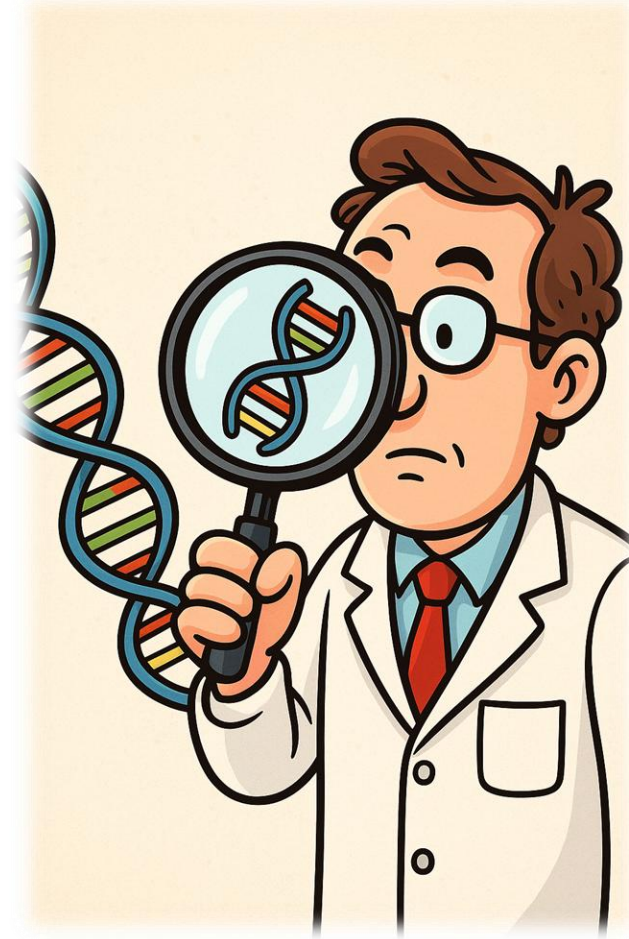


CEL: KNOCKOUT Genu docelowego

ZALETY: KONTROLA NAD PROCESEM I DIVA

SELEKCJA GENU

- ✓ LITERATURA
- ✓ PORÓWNANIE SEKWENCJI GENETYCZNYCH
- ✓ EMPIRYCZNIE na podstawie badań *in vitro*



Szczepionka LAV ASFVΔMGF_505_2R
opracowana w CBMSO (Hiszpania)



Grupa kontrolna n=4



Dwie grupy
Aklimatyzacja (7 dni)
Szczepienie i.m. Δ2R
Dawka: 10^3 TCID₅₀/zwierze
Boost - 14 dpi
Challenge - 28 dpi

Dawka: i.m. 10^2 TCID₅₀/zwierzę

Arm/07/CBM/c2

28 dni obserwacji

Eutanazja

Sekcja

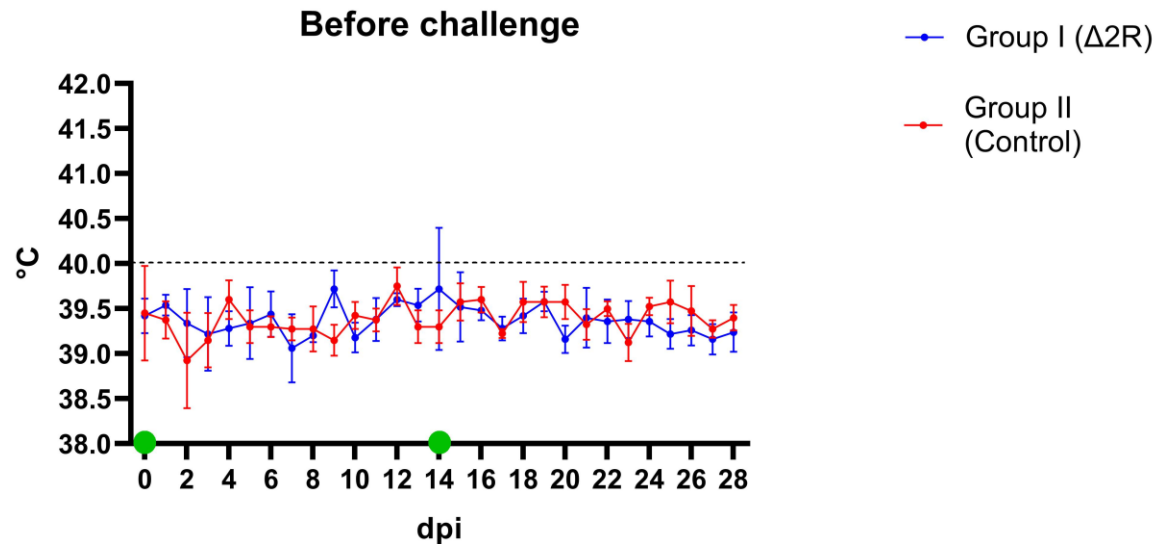


Grupa szczepiona n=5

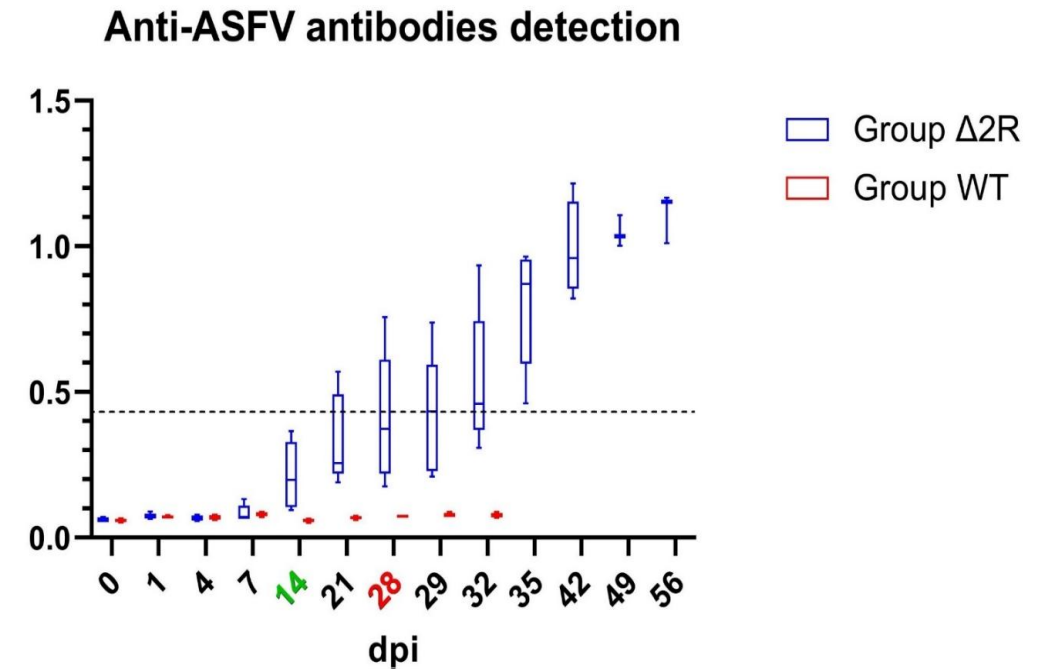


Wyniki – przed challenge'em

- Brak objawów po szczepieniu
- Zaszczepione zwierzęta prezentowały silną odpowiedź immunologiczną humoralną
- Brak wykrywalnego DNA ASFV's w ślinie, kale i krwi

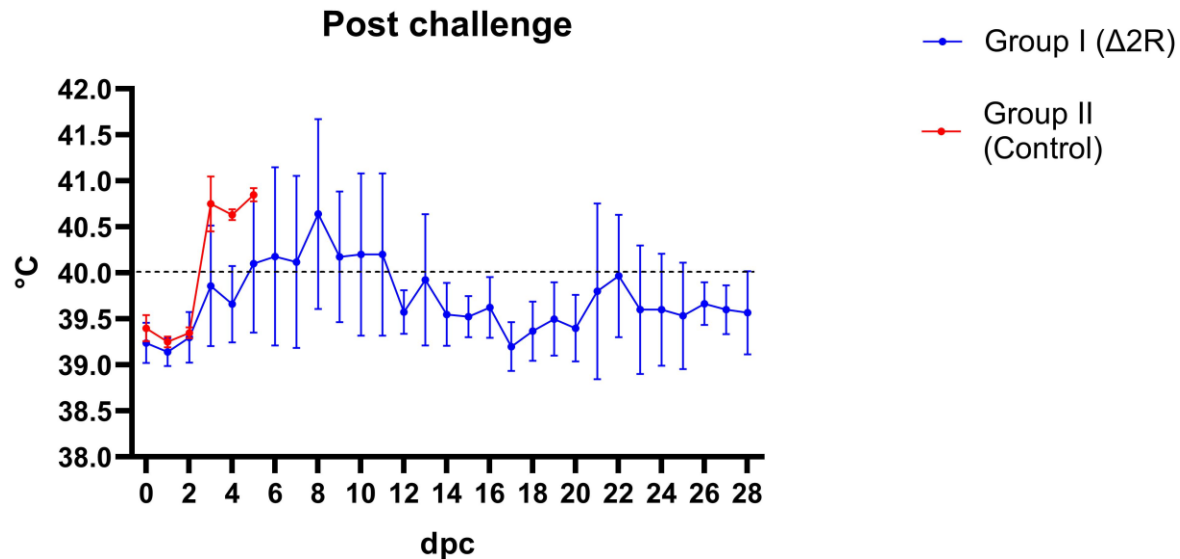


Średnia temperatura ciała – przed challenge'em



Wyniki – po challenge'u

Gorączka i apatia zostały odnotowane u wszystkich zwierząt w grupie niezaszczepionej (WT). Temperatura w przypadku świń szczepionych wykazywała tendencję do spadku, z pojedynczym przypadkiem powrotu gorączki, spowodowanym współistniejącą **infekcją bakteryjną stawu**.



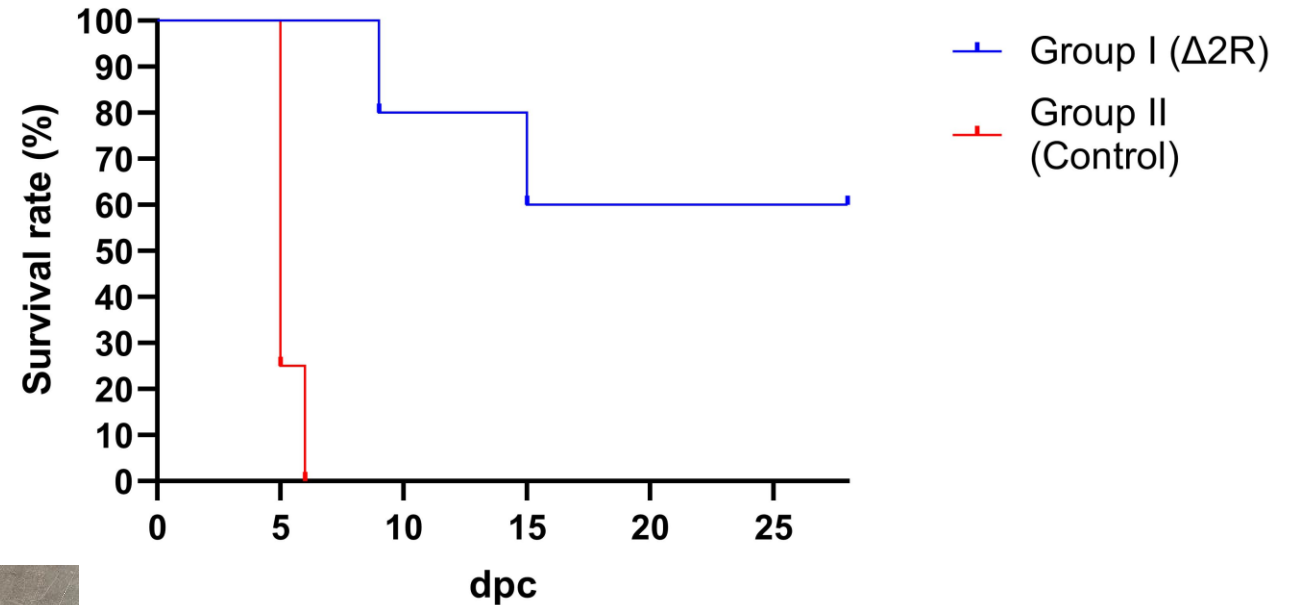
Średnia wewnętrzna ciepłota ciała po prowokacji szczepem zjadliwym



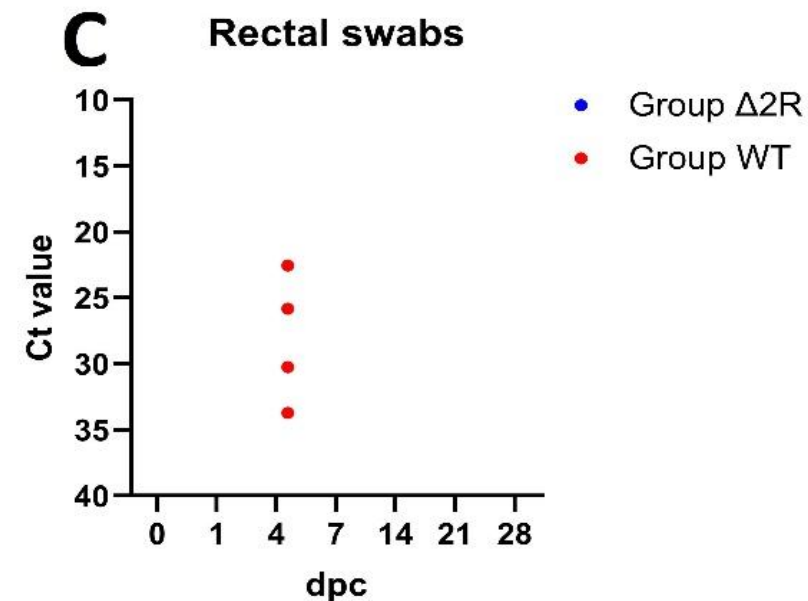
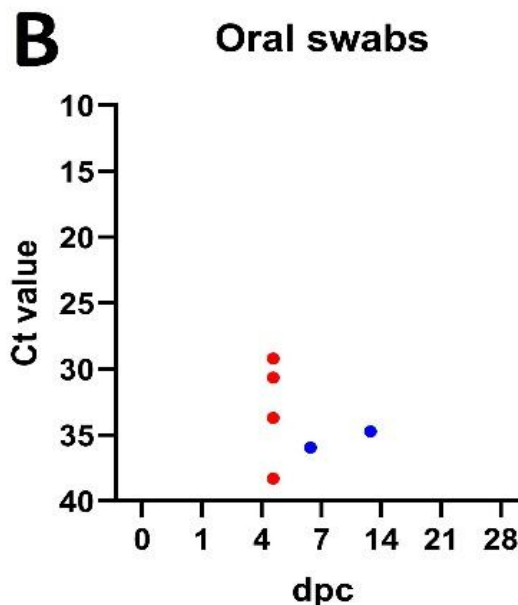
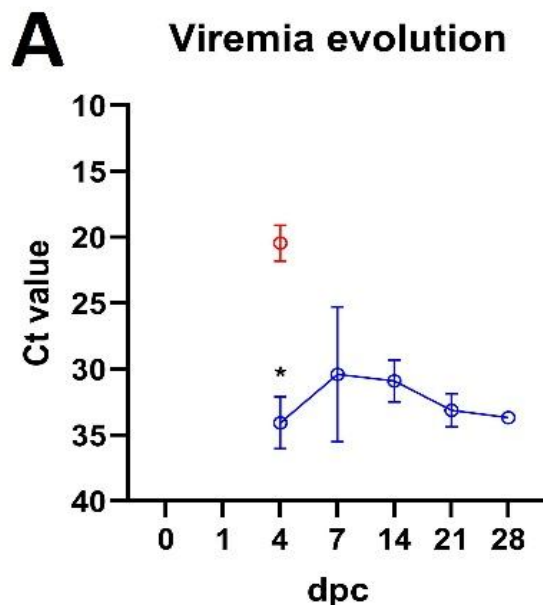
Obrzęk kończyn – infekcja bakteryjna

Śmiertelność

- Grupa nieszczepiona: W **5 dpc** dwie świnie znaleziono martwe, a jedna wymagała eutanazji. W **6 dpc** śmiertelność wyniosła 100%
- Grupa szczepiona : Jedno zwierzę znaleziono martwe w **9 dpc**, a jedno wymagało eutanazji w **15 dpc**.



3 z 5 szczepionych zwierząt przeżyło challenge



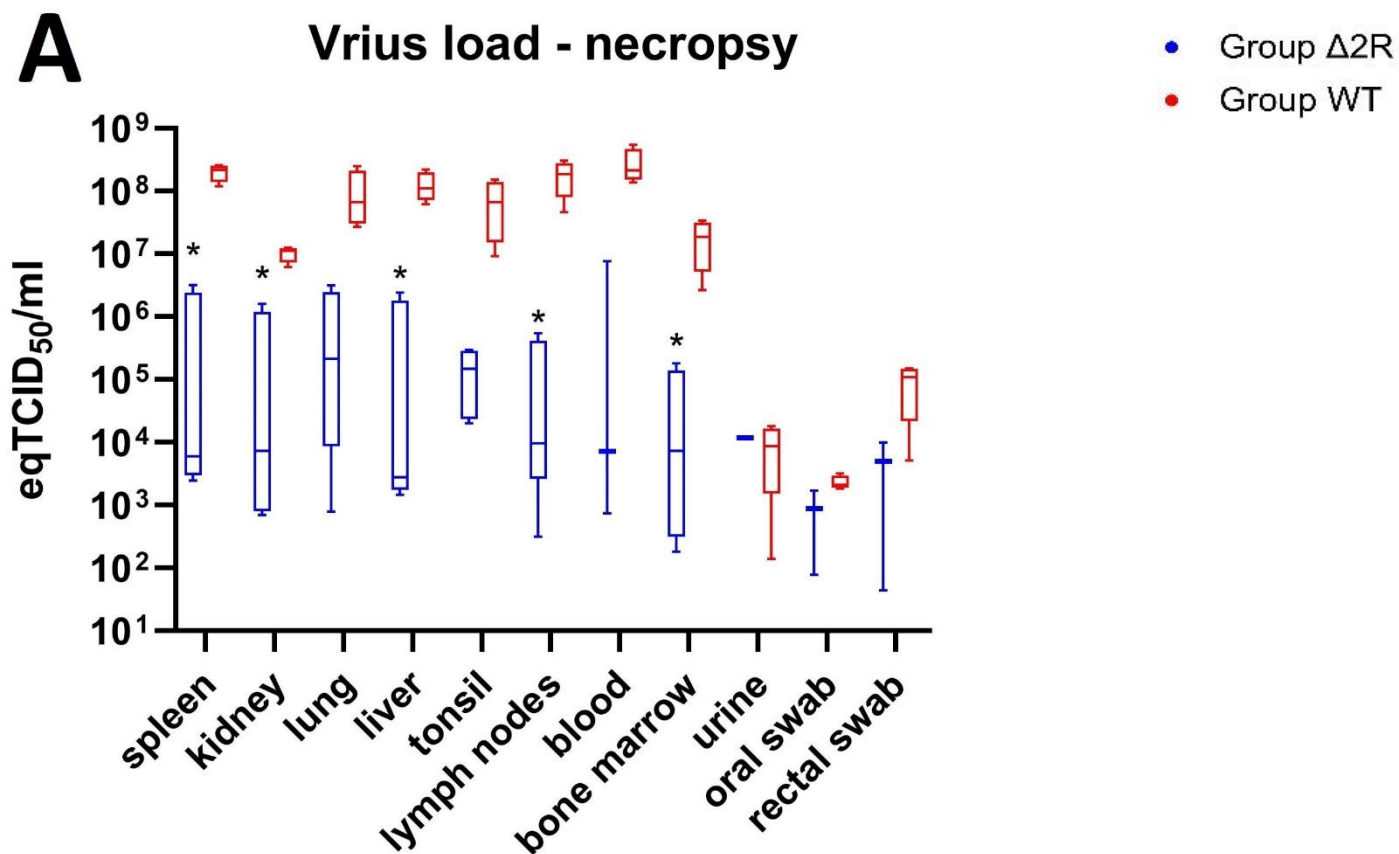
Nieszczepione : W 4 dpc (dniu po zakażeniu), DNA wirusa wykryto we wszystkich matrycach (wymazach z odbytu i jamy ustnej, krwi).

Zaszczepione: Po pierwszych dniach replikacji wirusa, zaobserwowano tendencję do eliminacji wirusa z krwi, prowadzącą do spadku lub kompletnej eliminacji materiału genetycznego ASFV z krwi

Odnotowano zmniejszone siewstwo w ślinie i kale w grupie zaszczepionej ($\Delta 2R$) (za wyjątkiem świni A – dodatnie wymazy ustne).

Sekcja

Obniżone miano w narządach było zauważalne we wszystkich pobranych próbkach od grupy $\Delta 2R$ podczas sekcji.



Właściwości protekcyjne delecyjnego szczepu ASFV Δ MGF505_2R

- wskaźnik przeżycia i dynamika choroby
- zredukowane siewstwo
- ewolucja wiremii w kierunku eliminacji wirusa
- znacząco niższe miano w narządach wewnętrznych



- Uwolnienie wirusa szczepionkowego do środowiska naturalnego
- Uzjadliwienie się wsteczne
- Pozostałości wirusa szczepionkowego/zjadliwego w tkankach
- Immunosupresja - koinfekcje

2021

Research Article

Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection

Encheng Sun, Lianyu Huang, Xianfeng Zhang, Jiwen Zhang, Dongdong Shen, Zhenjiang Zhang, ...show all

Pages 2183-2193 | Received 04 Aug 2021, Accepted 26 Oct 2021, Accepted author version posted online: 28 Oct 2021, Published online: 22 Nov 2021

2023

Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs

Article | [Open access](#) | Published: 29 May 2023

Volume 14, article number 3096, (2023) [Cite this article](#)

2024

Detection of the first recombinant African swine fever virus (genotypes I and II) in domestic pigs in Russia

Brief Report | Published: 25 September 2024



World ▾ Business ▾ Markets ▾ Sustainability ▾ Legal ▾ Commentary ▾ Technology ▾ Investigations

Vietnam suspends African swine fever vaccine after pig deaths

By Reuters

August 24, 2022 1:43 PM GMT+2 · Updated August 24, 2022



2025

African swine fever virus vaccine strain Asfv-G-ΔI177I reverts to virulence and negatively affects reproductive performance

[Erwin van den Born](#), [Ferenc Olasz](#), [István Mészáros](#), [Eszter Göttl](#), [Barbara Oláh](#), [Jui Joshi](#), [Emma van Kilsdonk](#), [Ruud Segers](#) & [Zoltán Zádori](#) 

2025

Article | [Open access](#) | Published: 28 April 2025

An African swine fever vaccine-like variant with multiple gene deletions caused reproductive failure in a Vietnamese breeding herd

[Thanh Che Nguyen](#), [Nga To Thi Bui](#), [Lua Thi Nguyen](#), [Tram Ngoc Thi Ngo](#), [Cuong Van Nguyen](#), [Luan Minh Nguyen](#), [Janin Nouhin](#), [Erik Karlsson](#), [Pawin Padungtod](#), [Nakarin Pamornchainavakul](#), [Sawang Kesdangakonwut](#), [Roongroje Thanawongnuwech](#)  & [Duy Tien Do](#) 



VAX4ASF

Horyzont Europa

Nowe technologie dla szczepionek przeciw afrykańskiemu pomorowi świń

2024-2027



VAX4ASF:

- Projekt ten ma na celu opracowanie oraz wdrożenie skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwko **ASF**.
- Zespół PIWet-PIB odpowiada za koordynację i badania na zwierzętach w celu określenia parametrów **bezpieczeństwa szczepionki**, a w szczególności możliwości **siewstwa i transmisji** wirusa szczepionkowego oraz **efektu przedawkowania** szczepionki,
- Dodatkowymi zadaniami są: opracowaniu nowych metod kontroli epidemiologicznej i **strategii szczepień** oraz opracowaniu i walidacji towarzyszącego powstałej szczepionce testu, pozwalającego odróżnić zwierzęta zaszczepione od zwierząt chorych (**DIVA**).
- **DISC (Disabled infectious cycle)**
- **CRISPR/Cas9**



VAX4ASF



VAX4ASF:

- Zapraszam do zapisu na oficjalny newsletter WWW.VAX4ASF.EU

<https://vax4asf.eu/news-events/>

DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ!



Dziękuję za uwagę



www.piwet.pulawy.pl