

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Egy klasszikus sertéspestis ellen
kifejlesztett markervakcina
hatékonysági vizsgálatai célállat
fajon**

PhD értekezés tézisei

Felföldiné Lévai Réka

2019

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Farsang Attila

(projektmenedzser)

Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.
témavezető

Prof. Dr. Soós Tibor

(nyugalmazott igazgató)

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága
témabizottság tagja

Dr. Kulcsár Gábor

(igazgató)

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a n..... sz. példány.

Felföldiné Lévai Réka

I. Bevezetés

A humán és állatgyógyászati vakcinák fejlesztésének egyik fontos lépését jelentik a laboratóriumi és célállatokon végzett állatkísérletek. A vakcinajelölt törzsek biológiai tulajdonságainak, ártalmatlanságának és hatékonyságának vizsgálata már a fejlesztés korai fázisában döntő jelentőséggel bír, és később a törzskönyvi dokumentáció összeállításához is szükség van a jogszabályban meghatározott állatkísérletek elvégzésére.

Jelen doktori értekezésem során egy állategészségügyi szempontból jelentős kórokozó, a klasszikus sertéspestis vírusa elleni vakcinafejlesztés kulcskérdéseit vizsgálom immunológiai, metodikai, minőségügyi, illetve hatósági szempontból.

Az újgenerációs oltóanyagok egyre fontosabb szerepet játszanak mind a humán, mind pedig az állatbetegségek megelőzésében, kontrollálásában. Az értekezésemben a klasszikus sertéspestis ellen kifejlesztett CP7_E2alf elnevezésű kiméra vakcinavírus-törzsnek a hatékonyságával kapcsolatos, az Európai

Gyógyszerkönyvben leírtaknak megfelelő vizsgálatokat mutatom be.

II. Célkitűzések

Célunk volt, hogy:

- i) fertőzésekben igazoljuk az egy adag CP7_E2alf markervakcina-jelölt hatékonyságát,
- ii) megállapítsuk az immunitás kialakulásának idejét (onset of immunity, OOI)
- iii) összehasonlítsuk a vakcinajelölt különböző alkalmazási módok által kiváltott hatásait 6 hetes, pestivírusok elleni anyai ellenanyagoktól mentes, ill. anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokban,
- iv) megvizsgáljuk az immunizálás eredményességét az anyai ellenanyagok árnyékában is.

III. Vizsgálati módszerek

A két vizsgálatot azonos körülmények között, azonos kísérleti elrendezés mellett a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (Nébih) Állatgyógyászati Termékek Igazgatóságának (ÁTI)

gödöllői zárt állattartó telepén végeztük el. Az egyetlen eltérés a kísérleti állatok immunológiai státuszában volt, ugyanis az egyik kísérlethez pestivírusok elleni anyai ellenanyagoktól mentes (Maternally Derived Antibody negative, MDA-), míg a másikkhoz pestivírusok elleni anyai ellenanyagokkal rendelkező (Maternally Derived Antibody positive, MDA+) malacokat használtunk fel. Az MDA+ malacok előállításához a beszállítótól 6 db KAHYB vemhes kocát vásároltunk, amelyeket a vemhességük 75. napján helyeztünk el a zárt istállóban. A kocákat az ellést megelőző 4. héten Thiverval CSF-vírustörzsszel immunizáltuk. A vakcinázott kocák malacai közül a születésüket követő második, ill. ötödik héten vett szérummintáik alapján a szerológiailag pozitív egyedeket vontuk be a kísérletbe.

Mindkét kísérletbe vizsgálatonként 40 db 6 hetes malacot állítottunk be. A kísérlet időtartama alatt a malacok takarmányhoz és vízhez *ad libitum* jutottak.

Három kísérleti csoportot hoztunk létre: két, egyenként 15 egyedből álló vakcinázott (TG1, TG2), valamint egy 10 egyedű számláló, oltatlan kontroll csoportot (CG).

Az állatok testhőmérsékletét, illetve a klinikai tüneteiket rögzítettük. Lázasnak tekintettük a kísérleti állatot, ha a testhőmérséklete két egymást követő napon is meghaladta a 40,0°C-ot.

Az állatokat a kísérletek alatt a 2010/63/EU rendelet állatjóléti előírásaival, és az ÁTI állatkísérleti szabályzatával összhangban kezeltük. A kísérlet lezárását követően a jogszabályoknak megfelelő módon az állatokat végleg elaltattuk.

A kísérlet során a TG1 csoport egyedeit a CP7_E2alf vakcinajelölt 1 ml adagjával izomba (im.) oltottuk, míg a TG2 csoport egyedeit a vakcina 1,3 ml adagjával szájon át (p.o.) immunizáltuk. A vakcina hatóértéke 100 PD50 volt adagonként. A fertőzéshez a magas virulenciájú Koslov CSF-vírustermszet használtuk. A vakcinázás után 14 nappal a felhasználásra kész izolátum 2 ml adagjával minden állatot oronasalisan fertőztünk.

Az immunizálások előtt, továbbá a vakcinázások utáni 14., 18., 21., 24., 28. és 35. napokon E2 specifikus ellenanyag ELISA (HerdChek® CSFV Ab ELISA [IDEXX Laboratories]) és vírusneutralizációs tesztekhez alvadásban nem gátolt vért vettünk az állatokból. A

szérummintákban jelen lévő CSFV antigéneket a gyártó útmutatásait követve, a vírus Erns felszíni fehérjéjét detektáló antigén ELISA teszttel (HerdChek® CSFV Ag/Serum ELISA [IDEXX Laboratories]) vizsgáltuk.

Emellett alvadásban gátolt vért is vettünk a malacokból, hogy RT-PCR-rel (megerősítésképpen real-time RT-PCR-rel) és vírusizolálással kimutathassuk a CSFV genomját, ill. igazolhassuk a vírus jelenlétét.

Minden elhullott és kiirtott állatot felboncoltunk, majd belőlük kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz szervmintákat gyűjtöttünk.

A vakcinajelölt hatékonyságát a $VE = 1 - RR \times 100$ képlet alapján számoltuk ki, ahol RR (relatív kockázat) = ARV (a vakcinázott csoport morbiditási rátája) / ARU (az oltatlan csoport morbiditási rátája).

IV. Eredmények és diszkusszió

Amíg az MDA- kísérletben a fertőzést követő 4-5. naptól minden kontroll állatban megjelentek a betegségre jellemző klinikai tünetek, és közülük az összes állat a kísérlet lezárása előtt elhullott, addig az MDA+ kísérlet kontroll malacai közül a tizből csupán hat állat mutatta 6 nappal a fertőzés után a CSF jellegzetes

klinikai tüneteit, és a kísérlet lezárása előtt a kontroll állatok csupán 70%-a hullott el. Emellett az MDA+ kísérlet egyik kontroll állatának testhőmérséklete sem emelkedett 41,0°C fölé. A mérsékelt klinikai tünetek és a kis arányú mortalitás magyarázható az anyai ellenanyagok védőhatásával.

Az MDA- kísérletben a fertőzés sikerességét jelezte, hogy az összes kontroll állat fertőzés után vett vérmintája pozitívnak bizonyult antigén ELISA teszttel, kettő kivételével vírusizolálással, valamint a megvizsgált öt RT-qPCR-rel is. A kontroll állatokon elvégzett *post mortem* vizsgálatok minden esetben igazolták a CSF-re jellemző elváltozásokat, illetve minden minta esetében az immunhisztokémiai vizsgálatok során erősen pozitív immunfestődést tapasztaltunk.

Fontos megállapítás, hogy az MDA+ kísérlet három kontroll malaca szerológiailag áthangolódott: 10-14 nappal a fertőzést követően megjelentek bennük az E2 glikoproteinre specifikus ellenanyagok, illetve a fertőzés után 10 nappal vett szérummintáiknak neutralizációs titere is enyhén megemelkedett. A hét spontán elhullott kontroll állat fertőzés után vett vérmintája pozitívnak bizonyult antigén ELISA teszttel,

egy kivételével vírusizolálással, valamint RT-qPCR-rel is. A kontroll állatokon elvégzett *post mortem* vizsgálatok a hét elhullott malac esetében igazolták a CSF-re jellemző elváltozásokat, illetve bennük az immunhisztokémiai vizsgálatok során négy esetben erősen, három esetben pedig mérsékelten pozitív immunfestődést tapasztaltunk. A három életben maradt kontroll malac fertőzés után vett összes vérmintája azonban mind antigén ELISA teszttel, mind vírusizolálással, mind pedig az immunhisztokémiai vizsgálatok során negatívnak bizonyultak. Ezek a kapott eredmények azzal együtt, hogy három kontroll malac a kísérlet végéig életben maradt, jól szemléltetik a passzív védettség és a védtelen állatok közötti különbséget, illetve igazolják, hogy a kísérleti modellünket jól választottuk meg, hiszen megfelelő mennyiségű anyai ellenanyag volt jelen az MDA+ kísérletbe vont malacokban.

Az MDA- kísérletben az immunizált malacok közül öt izomba oltott, és hat szájon át vakcinázott állat esetében a fertőzés után 4-5 nappal pár napig mérsékelt klinikai elváltozásokat figyeltünk meg – kivéve egy szájon át vakcinázott malacot, ami olyan súlyos, a CSF-re jellemző klinikai tüneteket mutatott, hogy azt állatjóléti

megfontolásból hét nappal a fertőzést követően végleg elaltattuk. Ennek a p.o. kezelt malacnak az esetében a szerológiai vizsgálatok negatív, illetve az antigendetektáló módszerek pozitív eredményeit is figyelembe véve valószínűsíthető, hogy az immunizálás kivitelezése technikailag nem volt kielégítő: az állat nem vett fel megfelelő mennyiségű vakcinát ahhoz, hogy benne protektív immunválasz alakulhasson ki. Az im. vakcinázott malacok szerológiai áthangolódását az orálisan immunizáltakhoz képest egy héttel korábban, már a 14. naptól megfigyeltük, és az intramuszkuláris alkalmazást követően a neutralizációs titerértékek is hamarabb, már a 18. naptól elkezdtek emelkedni. A kezelt állatok vakcinázás utáni, és a fertőzést követően vett vérmintái vírusizolálással és antigén ELISA teszttel is (egy malac kivételével) mind negatívnak bizonyultak. Az oltott malacok (a már említett egyed kivéve) nem mutattak súlyos kórbonctani elváltozásokat, és kettő szájon át vakcinázott malac kivételével egyik oltott állat sem mutatott pozitív immunfestődést.

Az MDA- kísérlet eredményeire tett fenti megállapítások alapján kijelenthető, hogy a vizsgált vakcinatörzs hatékony, valamint hogy a kísérletben

résztevő összes malac esetében a vakcinázás, a klinikai tünetek, a kórbonctani és kórszövettani elváltozások, valamint az immunhisztokémiai eredmények összhangban voltak egymással. Mindezek arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott kísérleti elrendezés, ideértve a fertőzéshez használt vírustörzset és annak titerét is, megfelelt egy potenciális vakcinajelölt későbbi regisztrációjához szükséges hatékonyságának a vizsgálatára.

Az MDA+ kísérletben ugyanakkor az immunizált malacok esetében már nehezebb egyértelmű következtetéseket levonni, ugyanis a 15-ből három im. oltott malacnál a CSF-re jellemző mérsékelt, míg kilenc szájon át vakcinázott malac esetében mérsékelt, vagy súlyos klinikai tüneteket tapasztaltunk, majd az orálisan immunizált malacok közül hét állat a kísérlet vége előtt spontán el is hullott.

Azt megállapíthatjuk, hogy az im. alkalmazott vakcina megfelelő védelmet nyújtott, hiszen megelőzte a mortalitást, szignifikánsan csökkentette a klinikai tünetek megjelenését és a vírus mennyiségét a vérben azáltal, hogy megnövelte az E2 glikoproteinre specifikus ellenanyagok szintjét. Azonban kilenc szájon át

immunizált malac szérummintáit ellenanyag ELISA-teszttel még a vakcinázás után két héttel is negatívnak találtuk, és hat állat közülük az elhullásukig negatív is maradt. Érdeemes kiemelni, hogy az MDA+ kísérletben elhullott, szájon át vakcinázott malacok vérmintái vírusizolálással, antigén ELISA teszttel, és RT-qPCR-rel is pozitívnak bizonyultak, azaz igazoltuk bennük a vírus jelenlétét.

Napjainkban, amikor a CSF-hez egy nagyon hasonló járványtanú (szűk gazdaspektrum, vaddisznópulációk kiemelt szerepe), és hasonló járványvédelmi stratégiát megkövetelő betegség, az afrikai sertéspestis (ASP) jelent meg, kifejezetten sürgető probléma egy, a vaddisznók számára elérhető vakcina kifejlesztése.

Összességében véve megállapíthatjuk tehát, hogy a jelen doktori értekezésem alapjául szolgáló, centralizált eljárás során forgalomba hozatali engedélyt kapott klasszikus sertéspestis elleni kiméra markervakcina a betegség elleni védekezésnek egy hasznos eszköze lehet, habár használata jelenleg kizárólag járványkitöréskor, a korlátozás alatt álló területeken lévő házisertés-állományokban megengedett.

V. Új tudományos eredmények

A CSF ellen újonnan kifejlesztett kiméra CP7_E2alf vakcinajelölt hatékonyságát elsőként demonstráltuk szuboptimális dózisban.

A pestivírusok ellen termelt anyai ellenanyagoktól mentes malacokban a CP7_E2alf vakcinajelölt mindkét alkalmazási mód mellett megfelelő védeettséget biztosított, míg a pestivírusokra specifikus anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokban az in vivo alkalmazással szemben a szájon át történő immunizálás csupán részleges védelmet nyújtott.

Vizsgálataink során megfelelően demonstráltunk, hogy az újonnan kifejlesztett kiméra CP7_E2alf vakcinajelölt jó megoldást kínál az élő, attenuált CSF elleni C-törzs alapú vakcinák legnagyobb hátrányának kiküszöbölésére: a DIVA-potenciál teljes hiányára.

VI. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

*Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban
megjelent/elfogadott publikációk (szakcikkek)*

Lévai R., Barna T., Fábíán K., Blome, S., Belák K., Bálint
Á., Koenen, F., Kulcsár G., Farsang A.: **Újonnan
kifejlesztett, klasszikus sertéspestis elleni
markervakcina regisztrációs hatékonysági
vizsgálata.** MÁL, 141. 227-243, 2019.

Farsang A., Lévai R., Barna T., Fábíán K., Blome, S.,
Belák K., Bálint Á., Koenen, F., Kulcsár G.: **Pre-
registration efficacy study of a novel marker vaccine
against classical swine fever on Maternally Derived
Antibody positive (MDA+) target animals.** Biologicals,
45. 85-92, 2017.

Lévai R., Barna T., Fábíán K., Blome, S., Belák K., Bálint
A., Koenen, F., Kulcsár G., Farsang A.: **Pre-registration
efficacy study of a novel marker vaccine against
classical swine fever on Maternally Derived Antibody
negative (MDA-) target animals.** Biologicals, 43. 92-99,
2015.

Renson, P., Le Dimna, M., Gabriel, C., Lévai, R., Blome, S., Kulcsár, G., Koenen, F., Le Potier, M.F.: **Cytokine and immunoglobulin isotype profiles during CP7_E2alf vaccination against a challenge with the highly virulent Koslov strain of classical swine fever virus.** Res. Vet. Sci. 96. 389, 2014.

Tignon, M., Kulcsár G., Haegeman, A., Barna T., Fábíán K., Lévai R., Van der Stede, Y., Farsang A., Vrancken, R., Belák K., Koenen, F.: **Classical swine fever: comparison of oronasal immunisation with CP7E2alf marker and C-strain vaccines in domestic pigs.** Vet. Microbiol., 142. 59-68, 2010.

Tignon, M., Kulcsár G., Belák, K., Haegeman, A., Barna T., Fábíán K., Lévai R., Farsang A., Van der Stede, Y., Vrancken, R., Koenen, F.: **Application of a Commercial Real-Time RT-PCR Assay for Surveillance of Classical Swine Fever: Evaluation by Testing Sequential Tissue and Blood Samples.** Open Vet. Sci. J., 2. 104-110, 2008.

Konferencia prezentációk

Lévai R., Tignon, M., Belák K., Barna T., Fábíán K., Farsang A., Kulcsár G., Koenen, F.: **The biological**

features of the classical swine fever virus: comparing a vaccine candidate with other strains in domestic pigs. Acta Microbiol. Immunol. Hung., 56. 1. Suppl., 2009.

Lévai R., Barna T., Farsang A., Fábíán K., Blome, S., Juanola, S., Vaengel, I., Koenen, F., Kulcsár G.: **Klasszikus sertéspestis elleni vakcinajelölt vírustörzs hatékonysági vizsgálata anyai ellenanyagoktól mentes, 6 hetes malacokban.** Akadémiai Beszámolók, 2012.

Lévai R., Barna T., Farsang A., Fábíán K., Blome, S., Juanola, S., Vaengel, I., Koenen, F., Kulcsár G.: **Klasszikus sertéspestis elleni vakcinajelölt vírustörzs hatékonysági vizsgálata anyai ellenanyagokkal (MDA) rendelkező 6-7 hetes malacokban.** Akadémiai Beszámolók, 2013.

Lévai R., Barna T., Farsang A., Fábíán K., Blome, S., Juanola, S., Vaengel, I., Koenen, F., Kulcsár G.: **Efficacy studies on target animals before registering a novel classical swine fever marker vaccine.** Acta Microbiol. Immunol. Hung., 60. 1. Suppl., 2013.

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban dr. Farsang Attilának tartozom köszönettel, aki végtelen türelmével és kitartásával képes volt átsegíteni a nehézségeken, és aki végig hitt abban, hogy ezt meg tudom csinálni. Az ő biztatása és támogatása nélkül sosem lett volna ahhoz elég bátorságom és erőm, hogy egy ilyen hatalmas feladatra vállalkozzam.

Megköszönöm dr. Kulcsár Gábornak, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága jelenlegi vezetőjének, hogy mindvégig szakmailag egyenrangú félként kezelt, és hogy biztosította az alkotó munkához szükséges szakmai háttérrel.

Szeretném kifejezni köszönetemet prof. Dr. Soós Tibornak, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága nyugalmazott igazgatójának, hogy 2005-ben lehetőséget látott bennem, és azóta is ennél a több évtizedes múlttra visszatekintő szervezetnél dolgozhatok.

Dr. Fábíán Katalinnak mindig hálás leszek azért a biztonságot nyújtó és támogató légkörért, amit a hosszú évek alatt az osztályon kialakított és fenntartott.

Dr. Barna Tímeának nem tudom elégszer hangsúlyozni, és megköszönni, hogy mennyire értékelem azt, hogy fáradtságot nem ismerve segített, és csiszolta a mondataimat.

Köszönöm dr. Belák Katinka boncteremben végzett áldozatos munkáját, és prof. Dr. Belák Sándor szakmai támogatását.

Külön köszönet illeti a biológiai laboratórium valamennyi munkatársát: Baligáné Heitler Erikát, Bandl Andreát, Kaptur Andreát, Sibáné Molnár Rozáliát, valamint a már nyugállományba vonult Rém Évát felbecsülhetetlen szakmai tudásukért és segítőkészségükért.

És végül, de nem utolsósorban a gödöllői zárt állattartó telep jelenlegi és volt munkatársainak: Csízi Józsefnek, Csikós Lászlónak, Gyenes Erzsébetnek, Kovács 'Kokó' Lászlónak [†], és Merkl Józsefnek az állatok körül végzett kiváló munkájáért mondok köszönetet.

Minden egyéb segítséget a Családomnak és a Barátaimnak köszönök meg