

IRTA

RECERCA I TECNOLOGIA

AGROALIMENTÀRIES

CReSA UAB



@CReSA_r



@SanitatAnimal



IRTA CReSA



Generalitat
de Catalunya

Oie



Una vacuna eficaz contra la PPA: *¿Wishful thinking o realidad?*

Francesc Accensi i Alemany

Francesc.Accensi@uab.cat

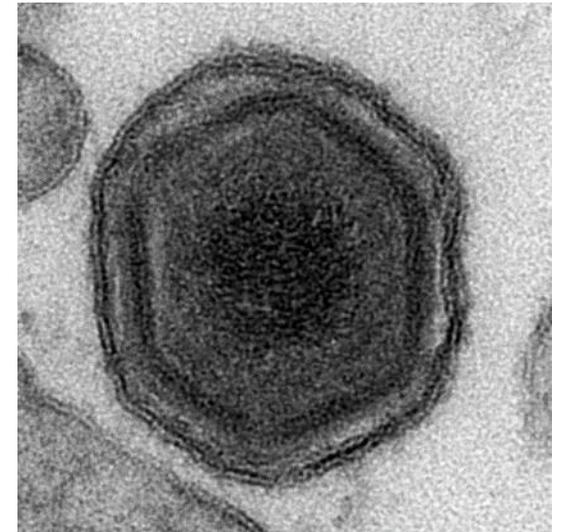
un tros de virus!

Familia: *Asfarviridae*

género: *Asfivirus*

- ✓ **envuelto**
- ✓ **DNA bicatenario (170-193Kb)**
- ✓ **virus “grande” (>150 proteínas)**
- ✓ **> 20 genotipos**

- ✓ **Células diana: macrófagos/monocitos**



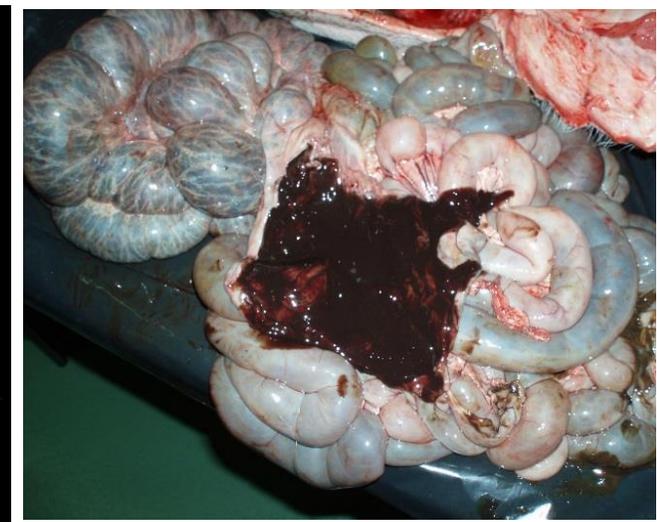
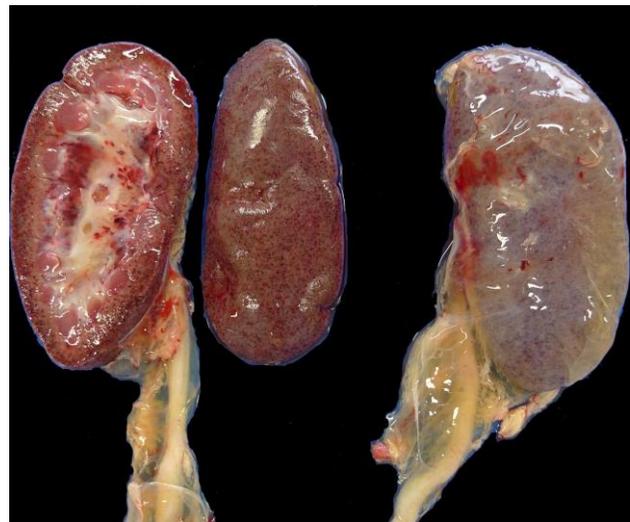
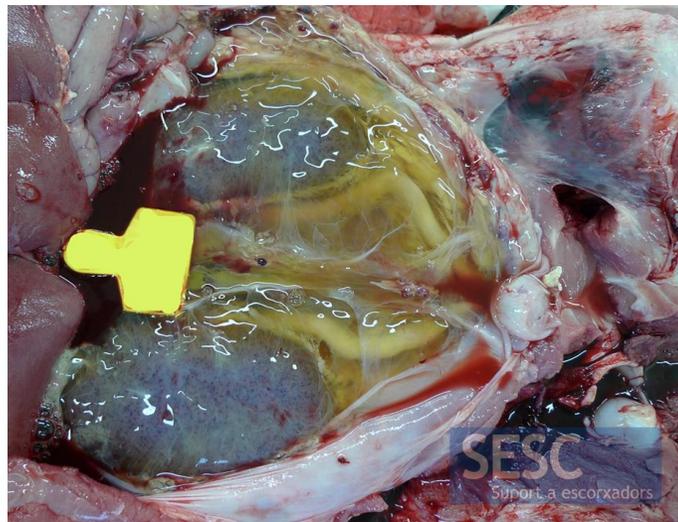
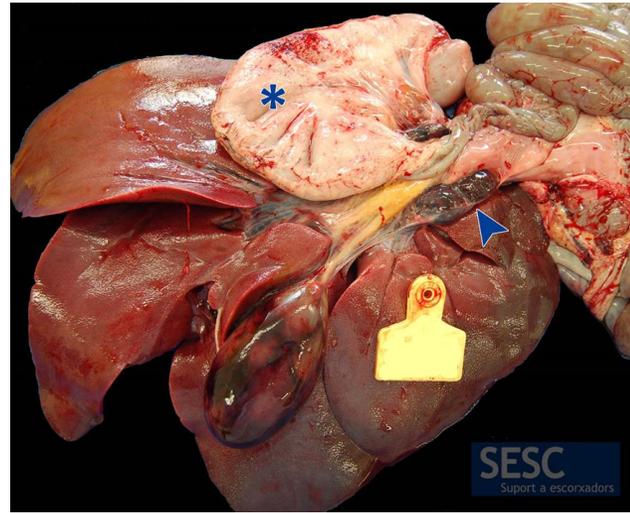
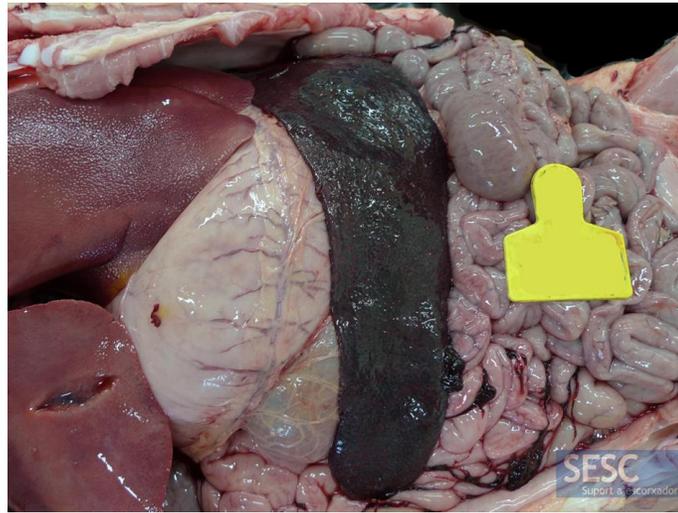
Cuadros clínicos y lesiones de la PPA

	Peragudo	Agudo	Subagudo	Crónico
Antemortem	Muerte súbita	<ul style="list-style-type: none"> • Fiebre alta • Anorexia • Apatía • Debilidad • Disnea • Eritema/Cianosis piel • Hemorragias (epistaxis, melena) • Abortos 	Similar a la forma aguda, pero más leve.	<ul style="list-style-type: none"> • Fiebre baja, intermitente • Pérdida de peso • Tos, disnea • Diarrea, vómito • Inflamación articulaciones • Lesiones cutáneas (necrosis, eritema) • Abortos
Postmortem	Sin lesiones	<ul style="list-style-type: none"> • Hemorragias internas (hemotórax, hemoabdomen, contenido gastrointestinal) • Esplenomegalia • Linfonodos hemorrágicos y aumentados de tamaño (Gastrohepático!) • Petequias renales +/- edema perirrenal. • Petequias/equimosis en serosas (pleura, pericardio, peritoneo). • Edema pulmonar. • Edema de la pared de la vesícula biliar. 		<ul style="list-style-type: none"> • Focos de necrosis/úlceras cutáneas • Consolidación pulmonar • Pericarditis • Adhesiones pleurales • Linfadenopatía • Inflamación articulaciones

Cuadros clínicos y lesiones de la PPA



Cuadros clínicos y lesiones de la PPA

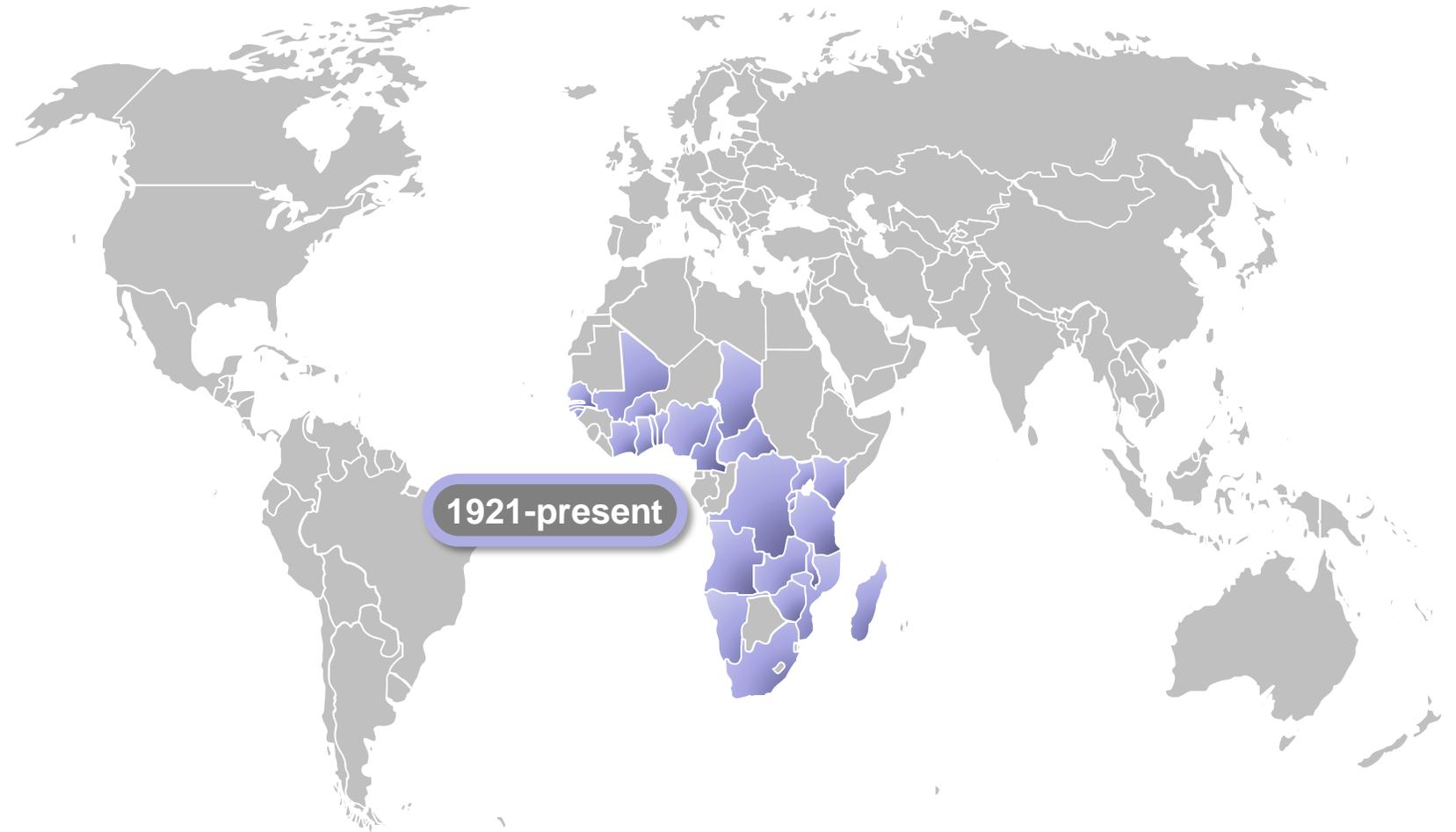


Un poquito de historia...

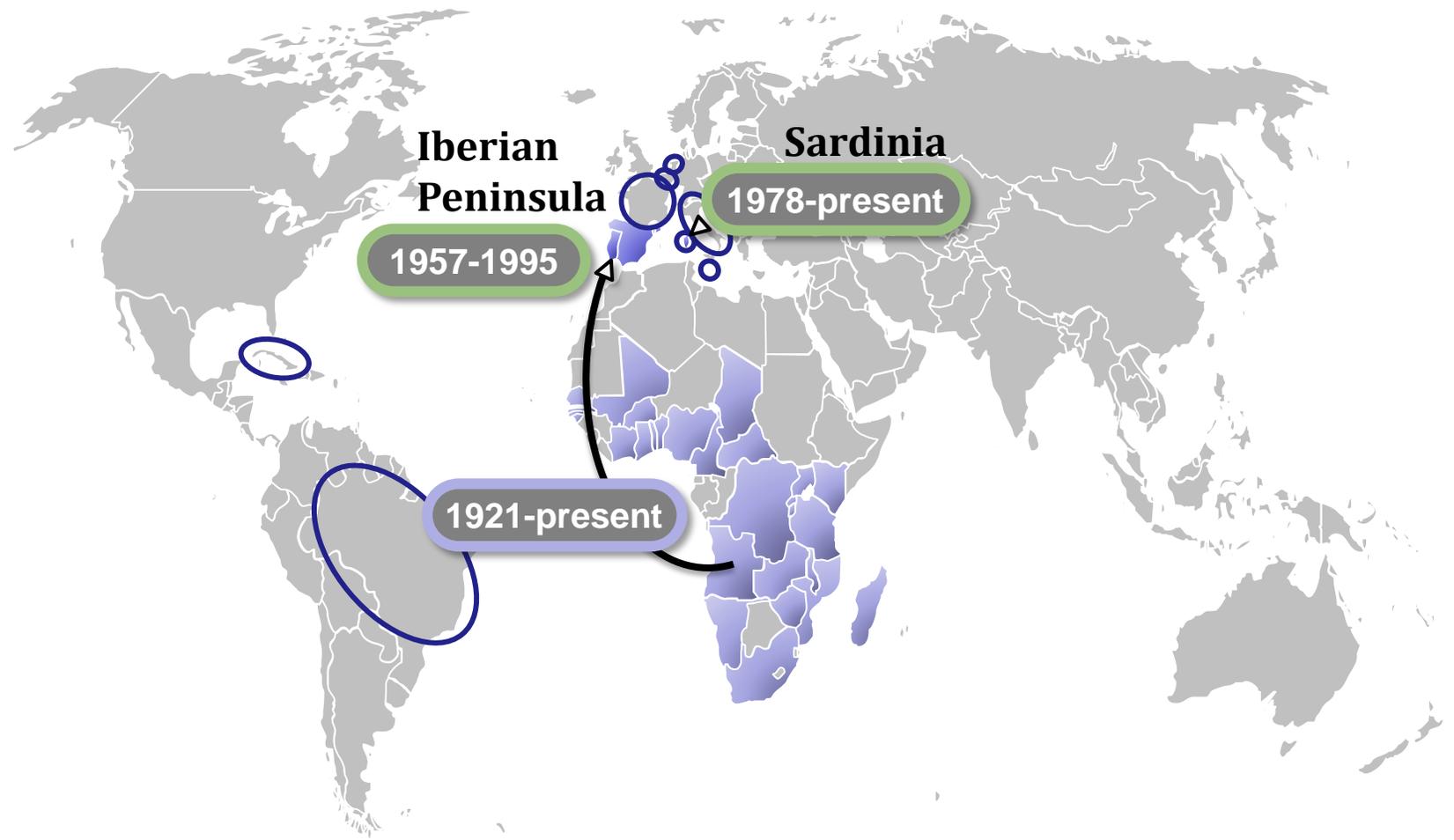
1921: Descrita por 1a vez en Kenya (Montgomery)



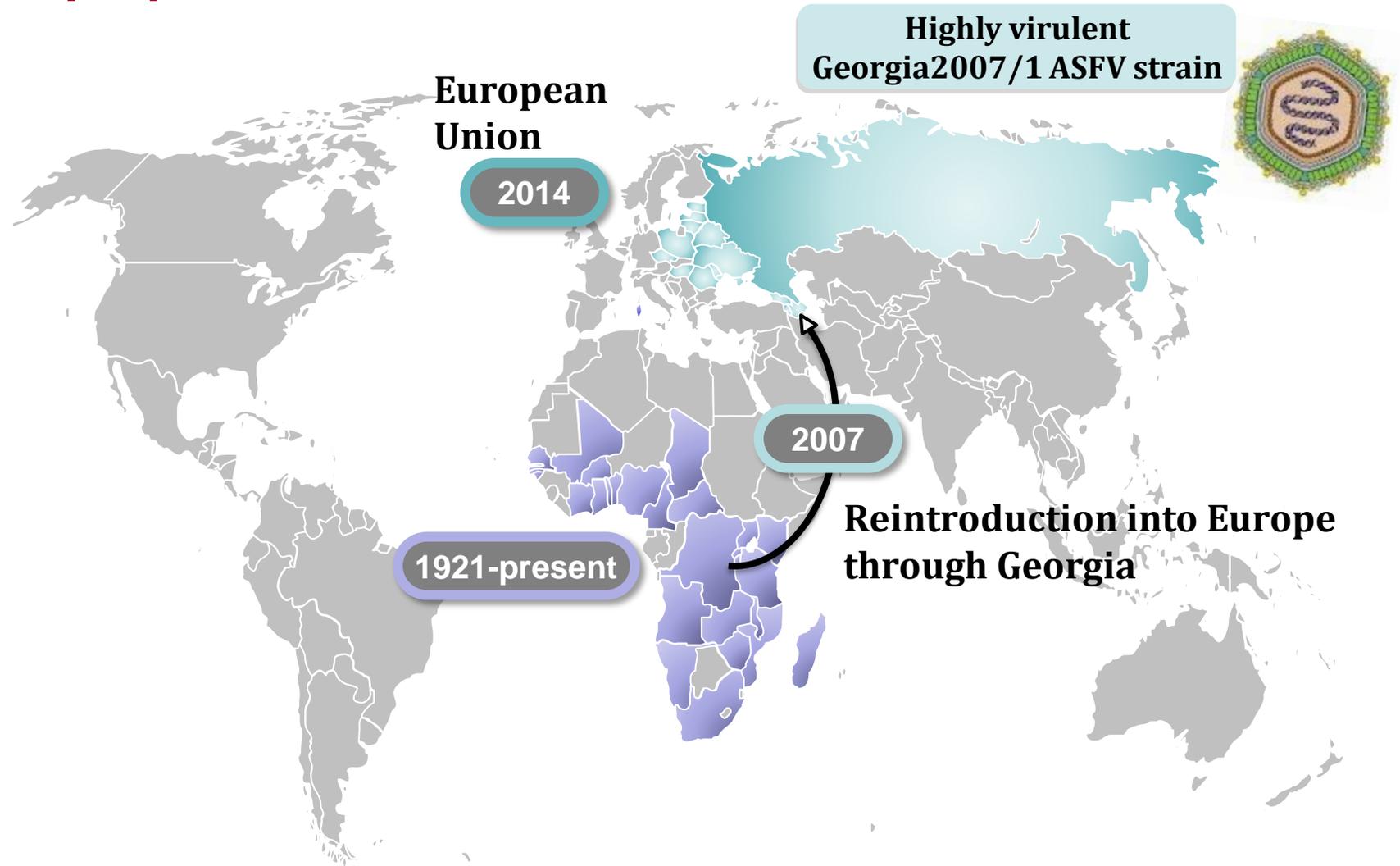
Un poquito de historia...



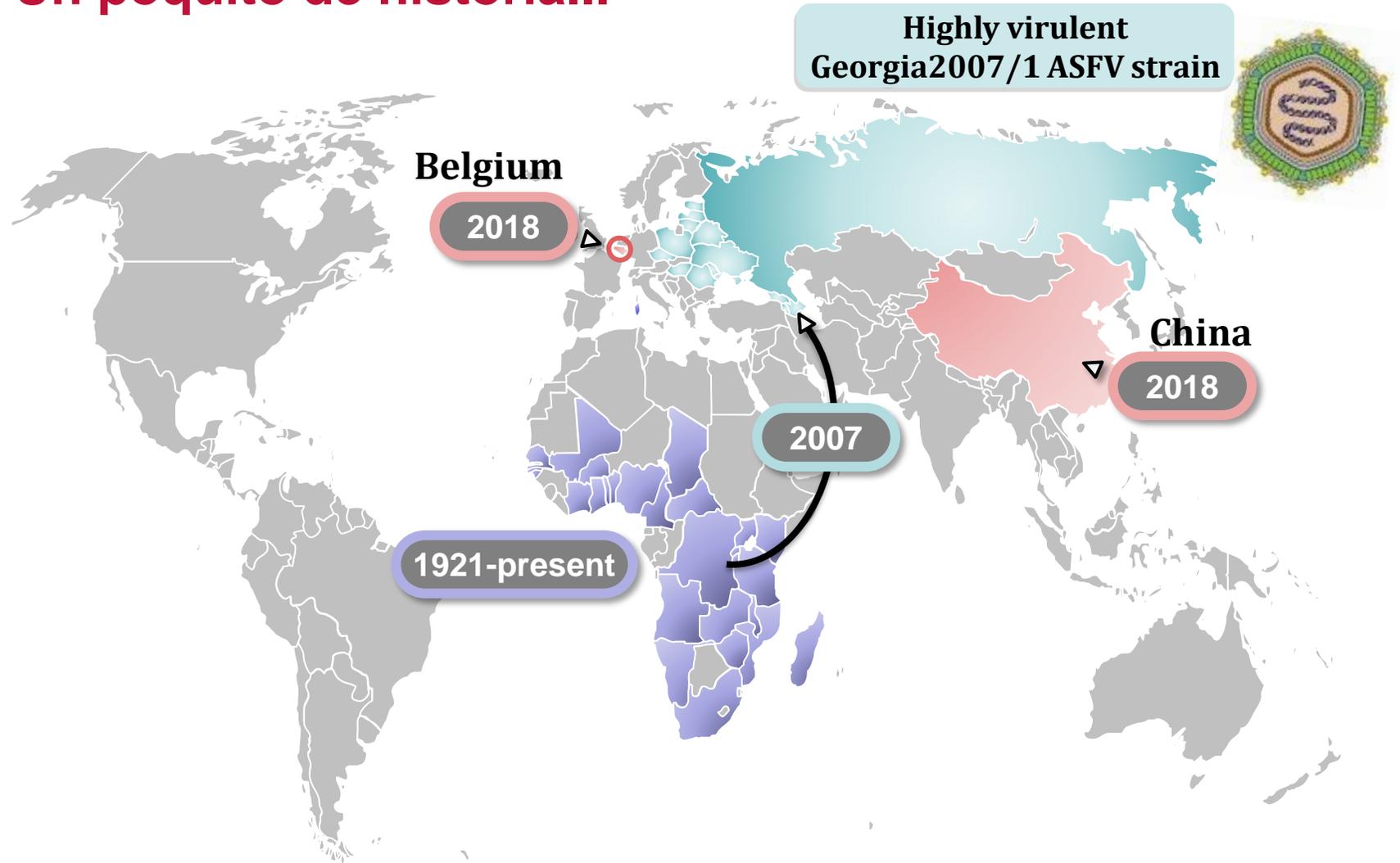
Un poquito de historia...



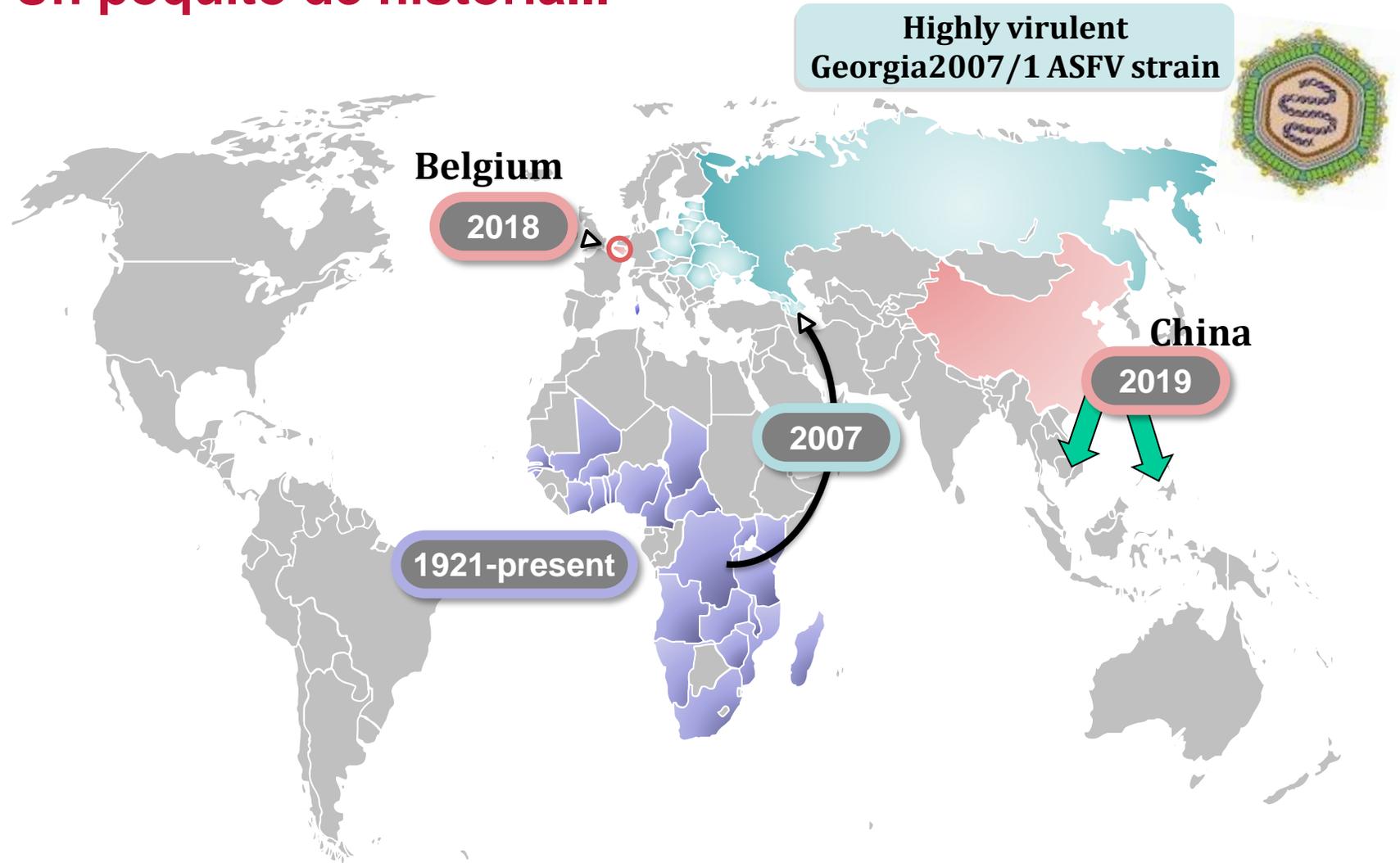
Un poquito de historia...



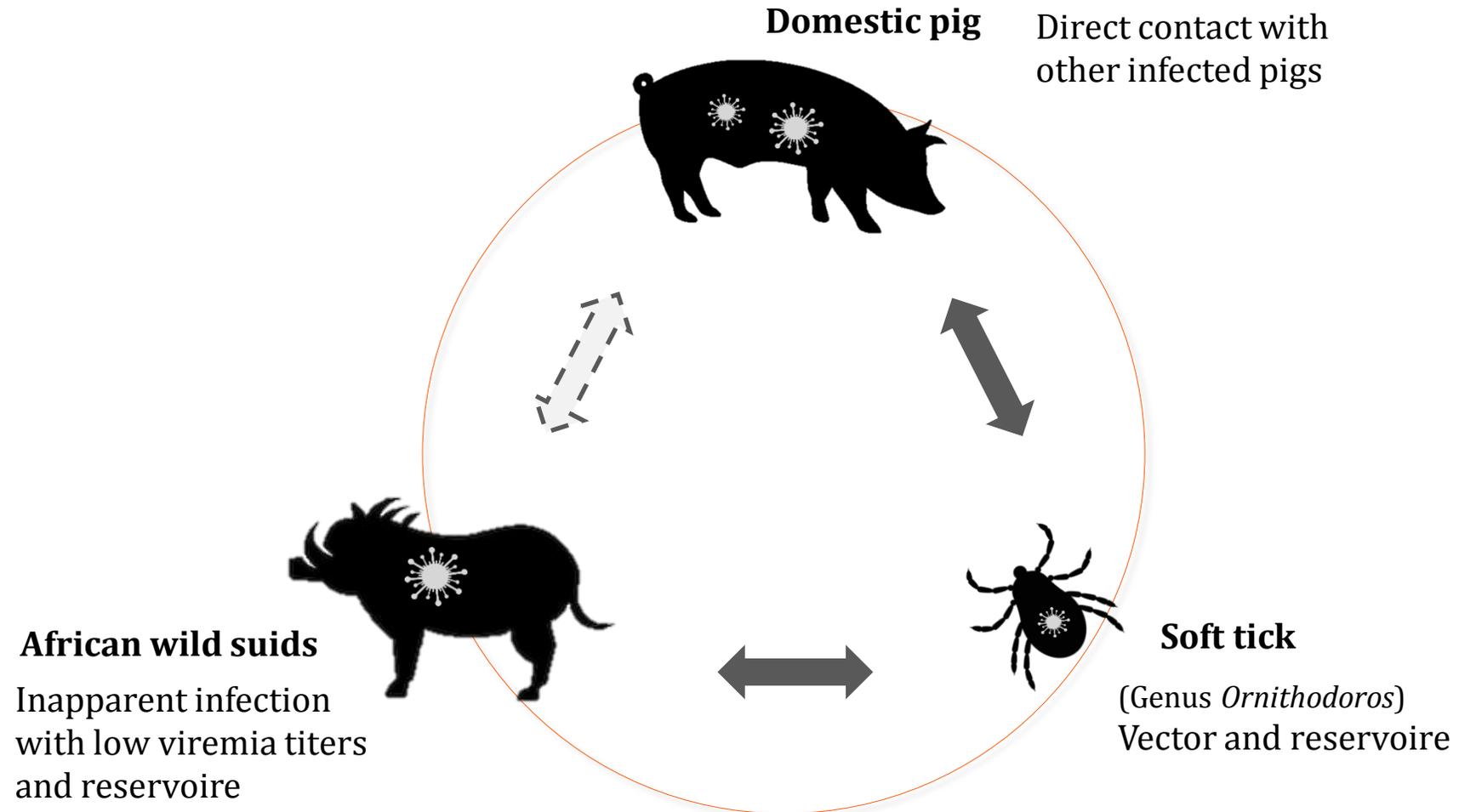
Un poquito de historia...



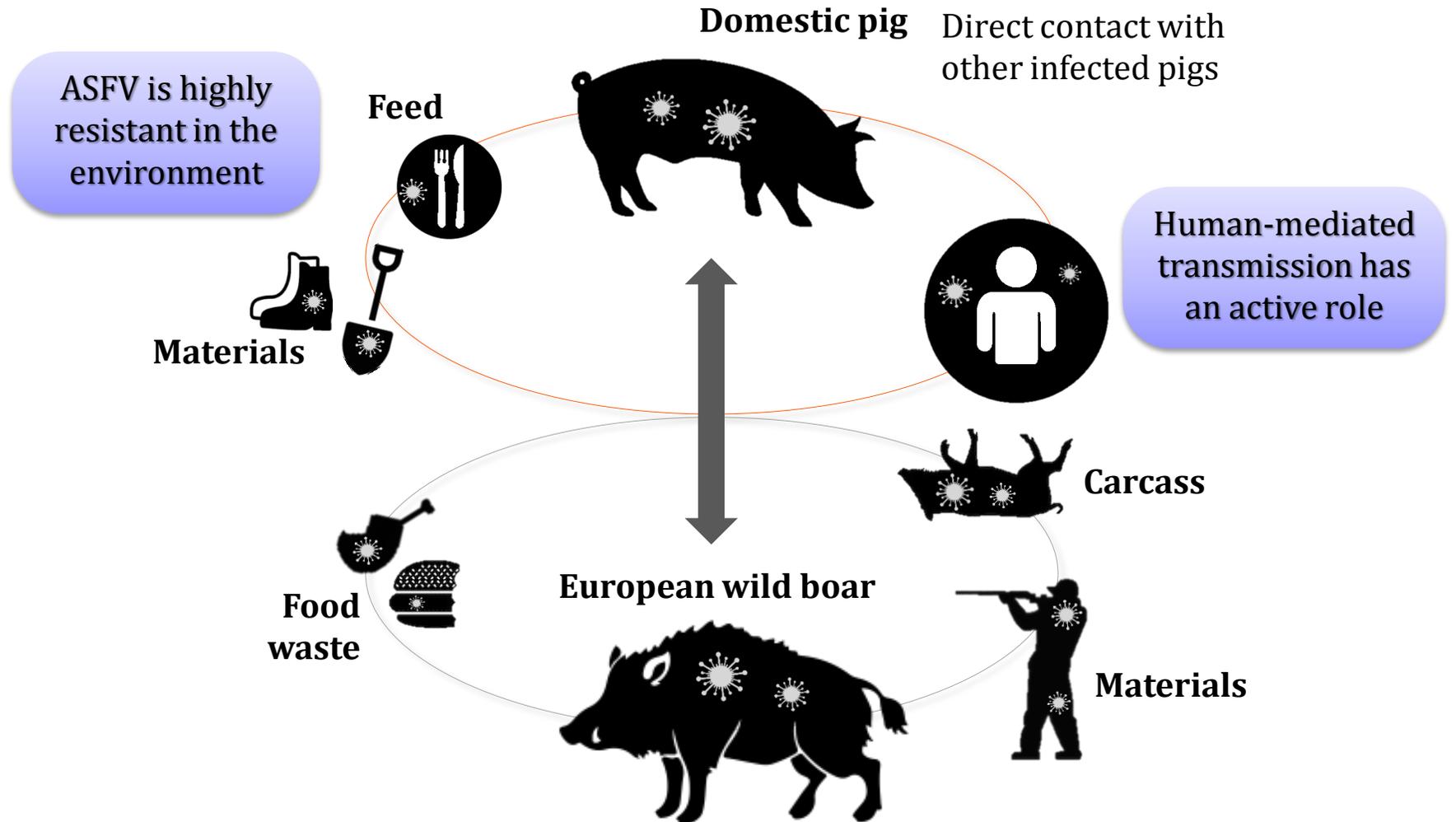
Un poquito de historia...



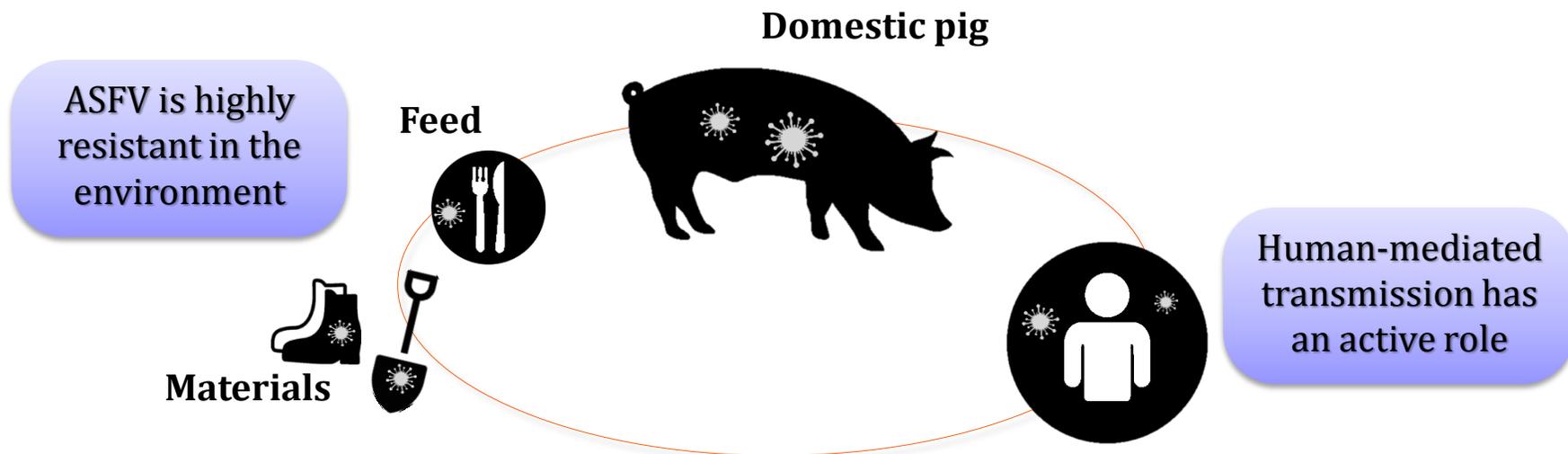
El escenario africano



El escenario europeo



El escenario asiático...



OUT OF **CTRL**

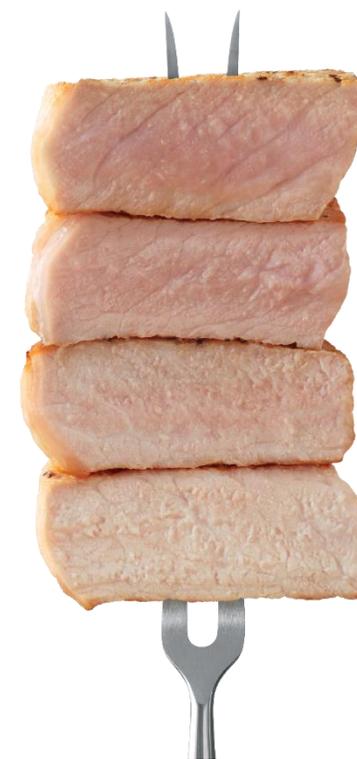
Un virus altamente resistente...

Muy resistente en medio ambiente (baja Tª!)

Puede mantenerse viable:

- días en heces
- hasta 18 meses en sangre (4°C)
- años en canales congeladas
- más de 140 días en procesados

(30' a 70°C / 150°F : inactivación)



Medium-Rare
145-150°F

Medium
150-155°F

Medium-Well
155-160°F

Well
160°F

...o no

cerdos introducidos en corrales contaminados :

- 1 día post vaciado: transmisión
- 3, 5 o 7 *dpv*: no transmission PPA

(Olesen *et al*, 2018)

Received: 20 October 2017

DOI: 10.1111/tbed.12837

ORIGINAL ARTICLE

WILEY 

Short time window for transmissibility of African swine fever virus from a contaminated environment

A. S. Olesen¹  | L. Lohse¹ | A. Boklund² | T. Halasa² | G. J. Belsham¹ |
T. B. Rasmussen¹ | A. Bøtner¹

¹DTU National Veterinary Institute,
Technical University of Denmark, Lindholm,
Kalvehave, Denmark

²DTU National Veterinary Institute,
Technical University of Denmark, Kongens
Lyngby, Denmark

Correspondence
A. Bøtner, Division for Diagnostics and
Scientific Advice, DTU National Veterinary
Institute, Technical University of Denmark,
Lindholm, Kalvehave, Denmark.
Email: aneb@vet.dtu.dk

Funding Information
Technical University of Denmark (DTU);
Danish Ministry of Environment and Food

Summary

Since the introduction of African swine fever virus (ASFV) into the Baltic states and Poland in 2014, the disease has continued to spread within these regions. In 2017, the virus spread further west and the first cases of disease were reported in the Czech Republic and Romania, in wild boar and domestic pigs, respectively. To control further spread, knowledge of different modes of transmission, including indirect transmission via a contaminated environment, is crucial. Up until now, such an indirect mode of transmission has not been demonstrated. In this study, transmission via an environment contaminated with excretions from ASFV-infected pigs was investigated. Following euthanasia of pigs that were infected with an isolate of ASFV from Poland (POL/2015/Podlaskie/Lindholm), healthy pigs were introduced into the pens, in which the ASFV-infected pigs had been housed. Introduction was performed at 1, 3, 5 or 7 days, following euthanasia of the infected pig groups. Pigs, that were introduced into the contaminated environment after 1 day, developed clinical disease within 1 week, and both ASFV DNA and infectious virus were isolated from their blood. However, pigs introduced into the contaminated pens after 3, 5 or 7 days did not develop any signs of ASFV infection and no viral DNA was detected in blood samples obtained from these pigs within the following 3 weeks. Thus, it was shown that exposure of pigs to an environment contaminated with ASFV can result in infection. However, the time window for transmissibility of ASFV seems very limited, and, within our experimental system, there appears to be a rapid decrease in the infectivity of ASFV in the environment.

...en todo caso, no es indestructible!

Resistente, sí, pero puede ser INACTIVADO

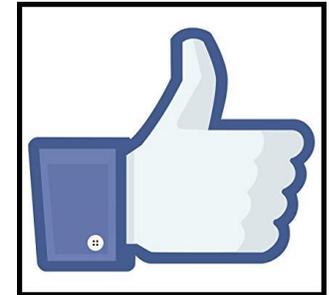
Muchos desinfectantes en el mercado no son eficaces

2% hidróxido sódico

detergentes y derivados del fenol

hipoclorito sódico o cálcico (2-3% cloro)

compuestos yodados



EMPRES 


emergency prevention system

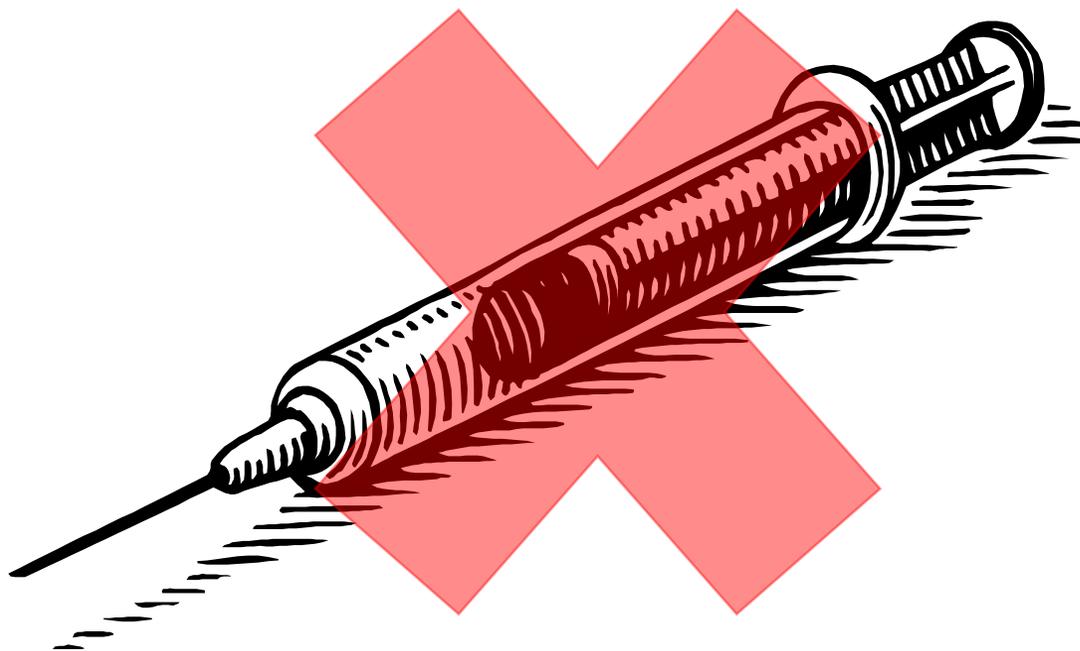
¿Cómo controlamos la PPA?

- **BIOSEGURIDAD!!!**
- **diagnóstico rápido y sacrificio**
- **compensaciones económicas**

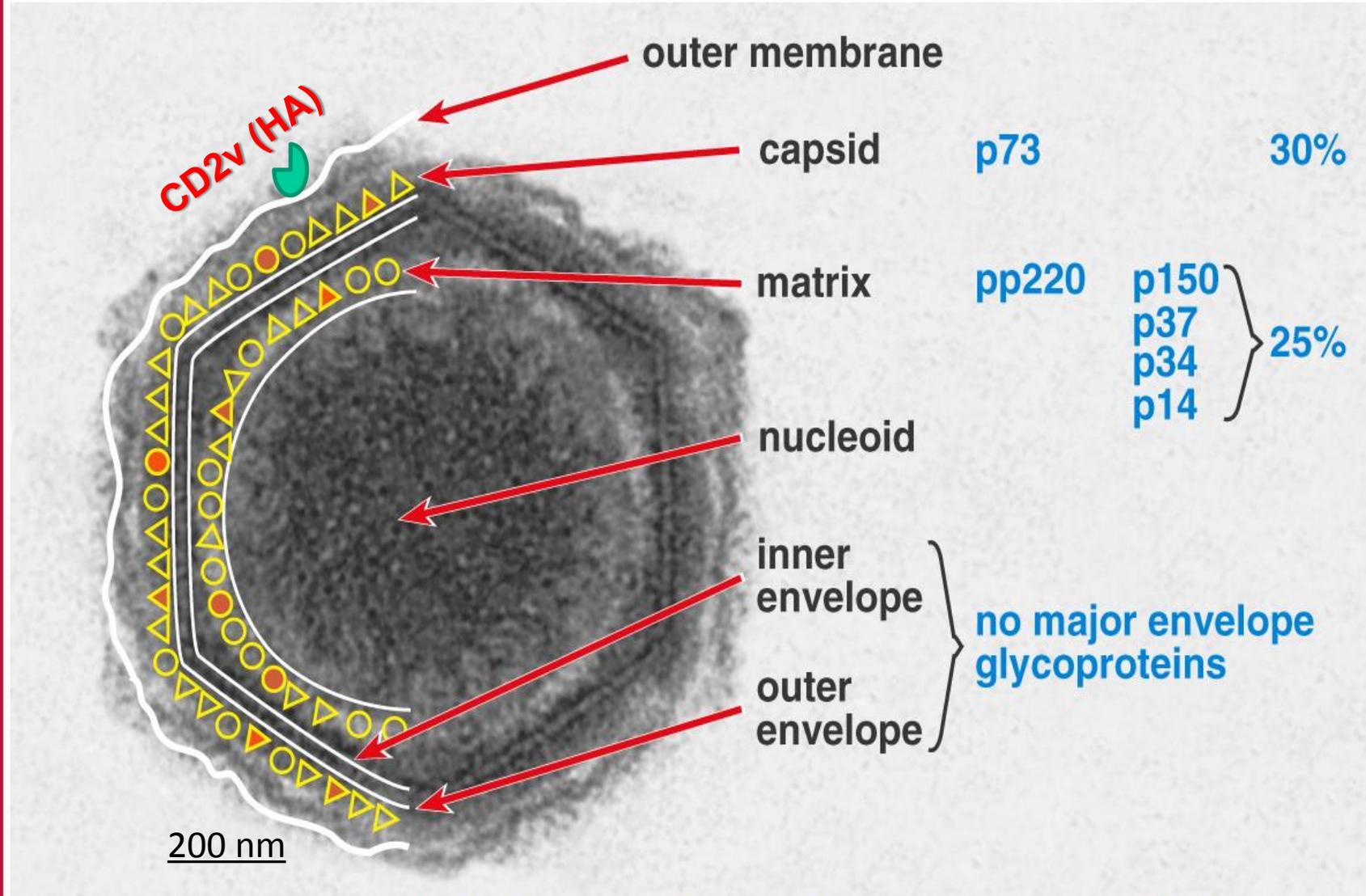


PPA FUERA DE CONTROL !!!

-¿y la vacuna?



- la vacuna no está... ¡¡¡pero se la espera!!!

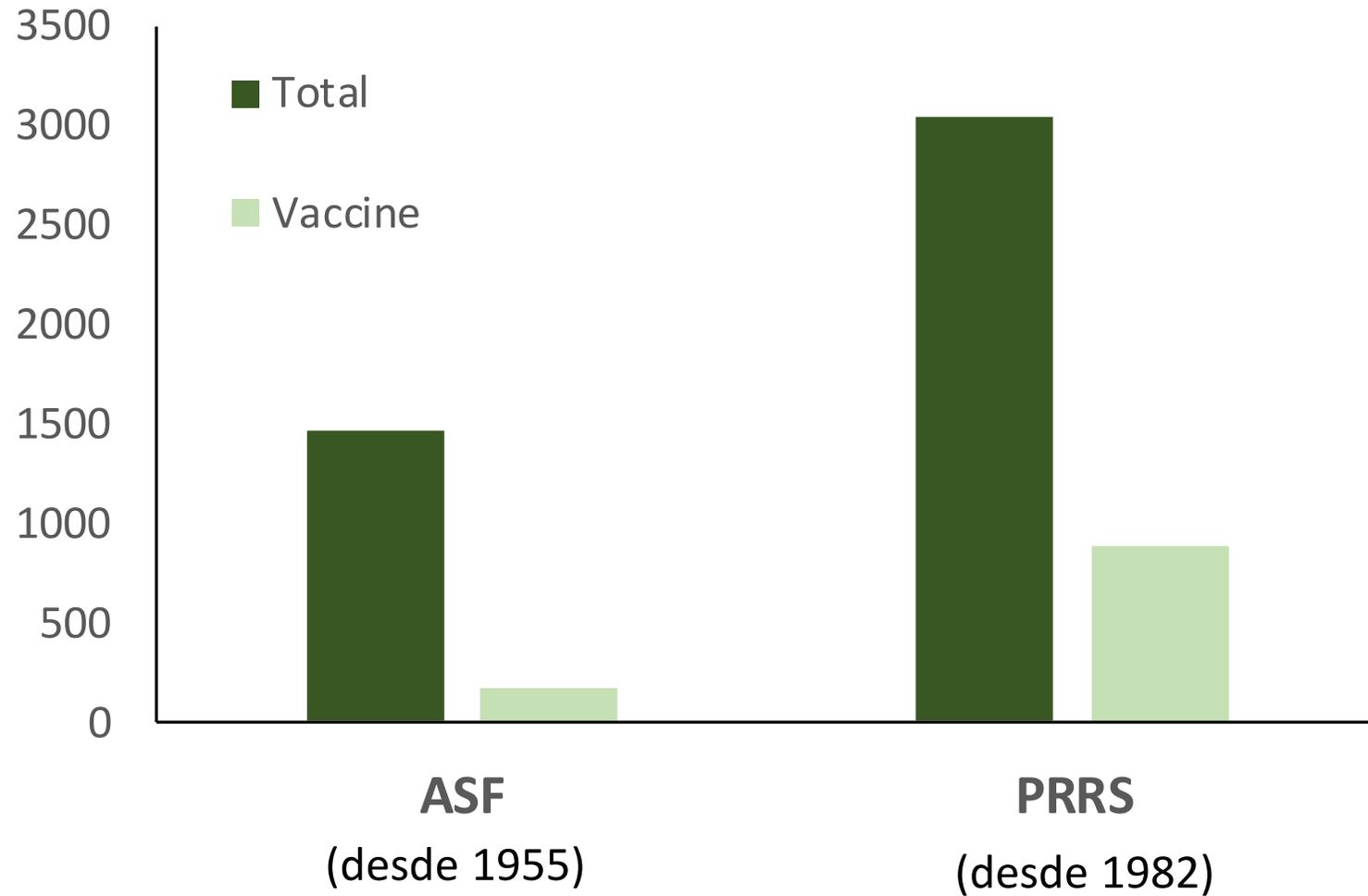


complejidad = éxito

y los números cantan...



Número de artículos publicados



¿por dónde
empezamos?



¿qué sabíamos de antemano?

- ✓ **vacunas inactivadas:** no habían funcionado
- ✓ **proteínas:** protección parcial o no-protección (interesante a largo plazo)
- ✓ **vacunas atenuadas:** sólida protección homóloga / problemas de seguridad
- ✓ **mecanismos de protección:**
 - **Ac:** pueden inducir protección parcial (transferencia pasiva, Onisk *et al*, 1994)
 - **Linf CD8+:** protección parcial (depleción *in vivo*, Oura *et al*, 2005)

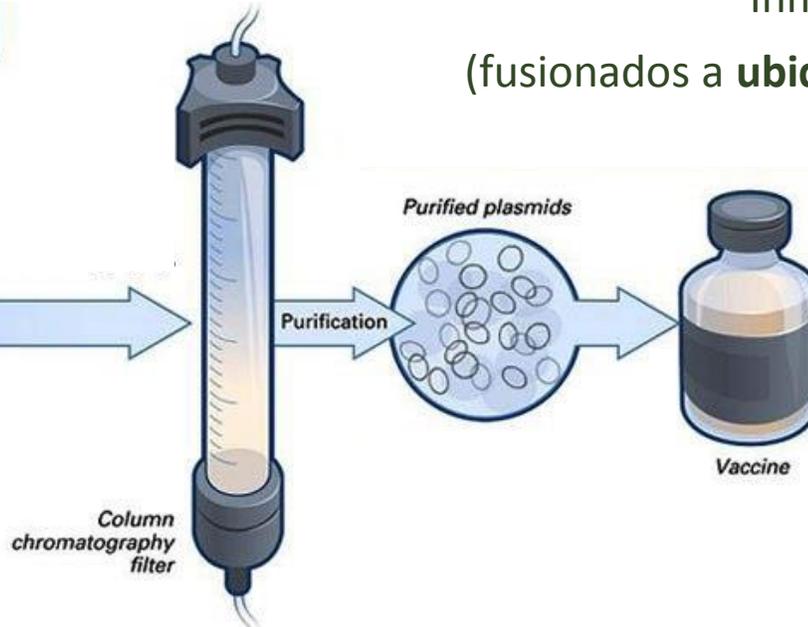
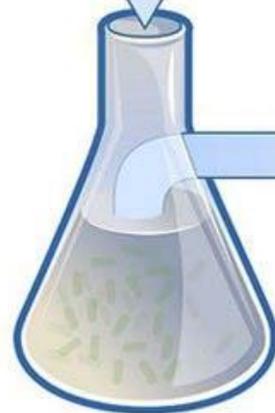
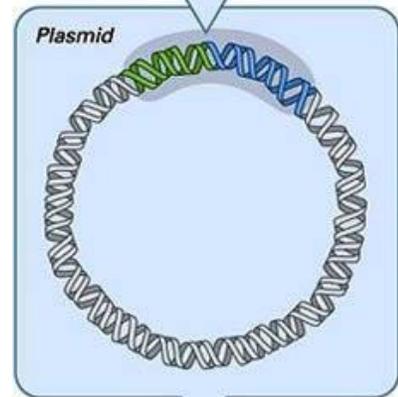
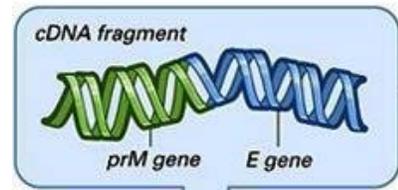


estrategias seguidas per la línea de PPA del CReSA

- ✓ inmunización con DNA
- ✓ vacunas atenuadas
- ✓ vacunas de subunidades



primeras tentativas...



- ✓ fácil de producir/manipular
- ✓ no hay límite de información
- ✓ no hay respuesta contra el vector
- ✓ inmunidad de larga duración
- ✓ modular respuesta (humoral / celular)

contra **PPA**, hasta un **33% protección**

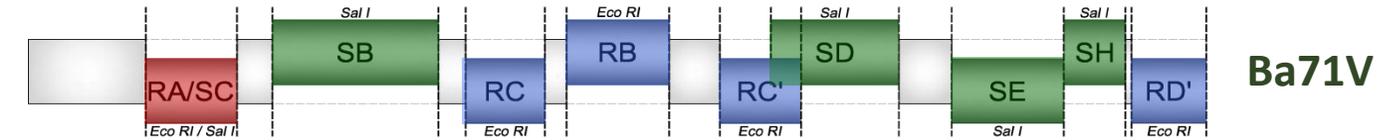
Inmunizando con **3 Ag: p30, p54 y sHA**

(fusionados a **ubiquitina**, para inducir respuesta **CD8**)

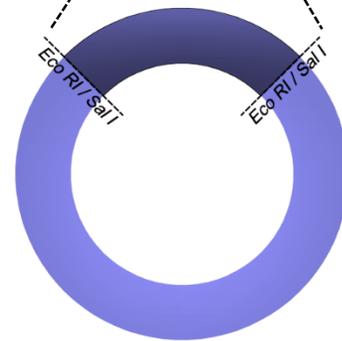


estrategia ELI: inmunización con “librerías” de expresión genómica)

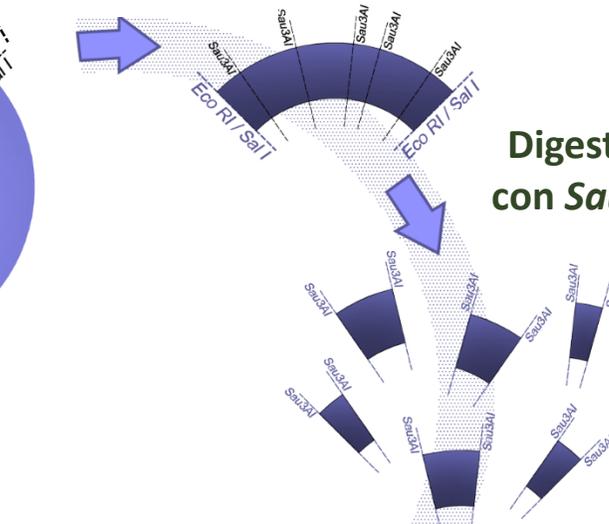
a partir del genoma de Ba71V (soca apatógena, permite trabajo en NBS2)



Digestión con *EcoRI* i *Sall*



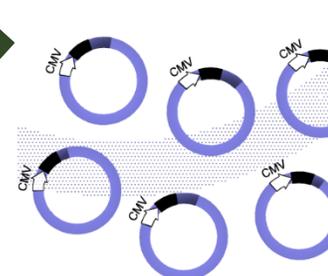
Digestión con *Sau3AI*



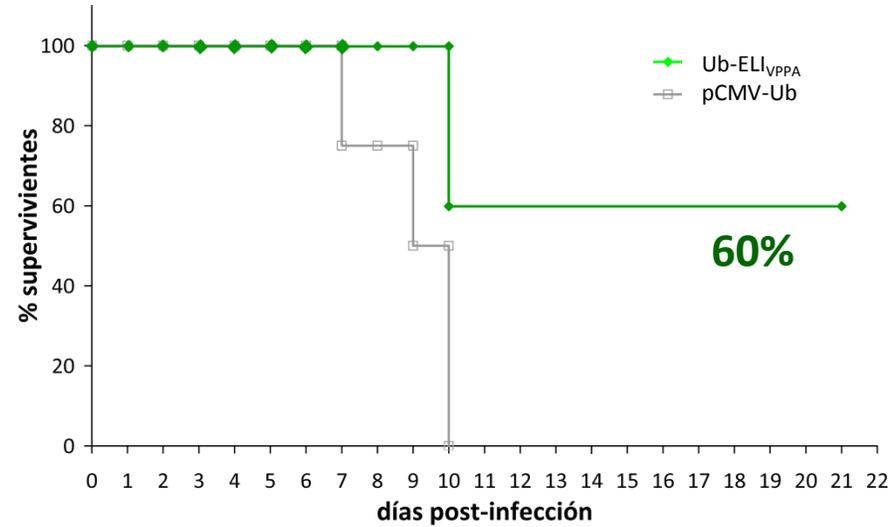
clonación al atzar en pCMV fusionado a ubiquitina

Ub-ELI_{VPPA}
4.029 clones
3 ORFs
76,5% genoma
promotor del CMV
fusionado a ubiquitina
(sin p30, p54 & HA)

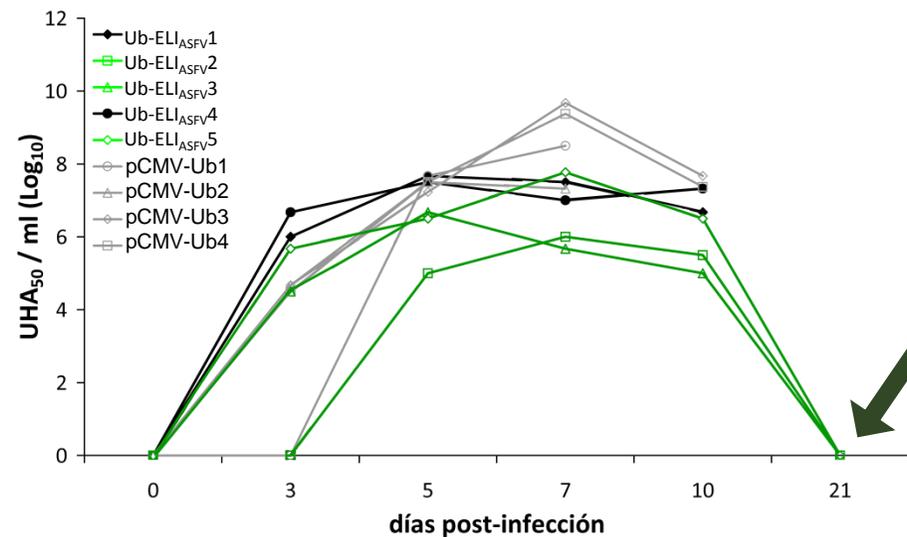
inmunización del animal



resultados de la inmunización con Ub-ELI_{VPPA}



Ub-ELI_{VPPA}
60% supervivencia
 ausencia de **Ac**
 animales recuperados
NO viremia (21dpi)



Ub-ELI_{VPPA} aumenta la protección
 obtenida anteriormente
 Hay más Ag potencialmente
 protectores en el genoma del
 VPPA (ELI_{VPPA} sin p30, p54, HA)

feina feta no fa destorb

La estrategia Ub-ELI_{VPPA} es una herramienta ideal para identificar:

- ✓ nuevos Ag con potencial protector (protección sin p30, p54 & HA)
- ✓ mecanismos inmunológicos implicados a la protección (linf T CD8+)

identificar determinantes protectivos en el genoma del VPPA es clave para diseñar una vacuna de subunidades (estrategia a largo plazo)



¿por dónde seguir?

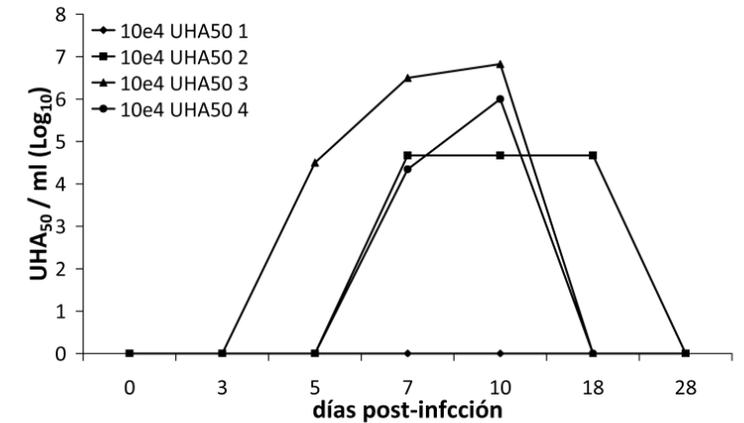
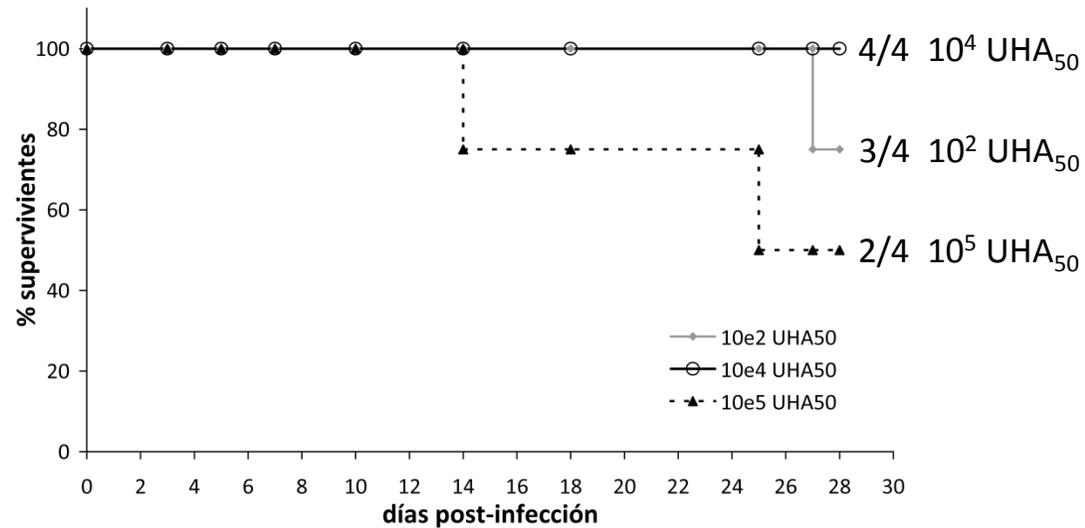


**inmunización con cepas
de VPPA atenuadas (LAV)**

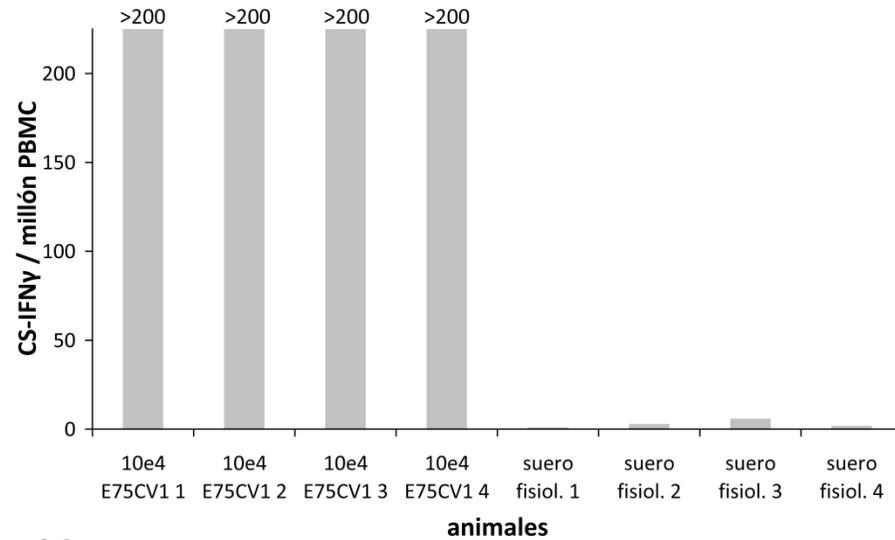
Inmunización con cepas de VPPA atenuadas

Establecimiento de la dosis óptima para inmunizar con E75CV1: 10^4 UHA₅₀

- ✓ 100% supervivencia
- ✓ sin viremia al final del experimento

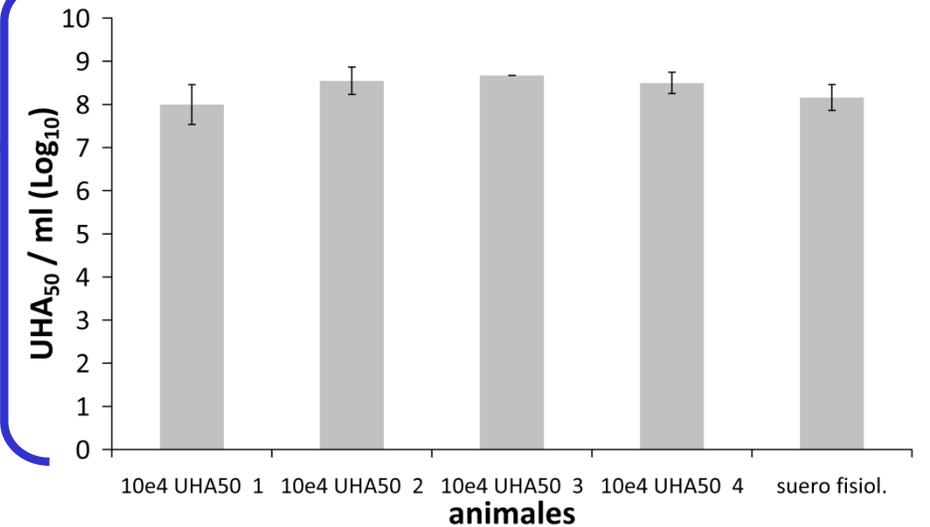
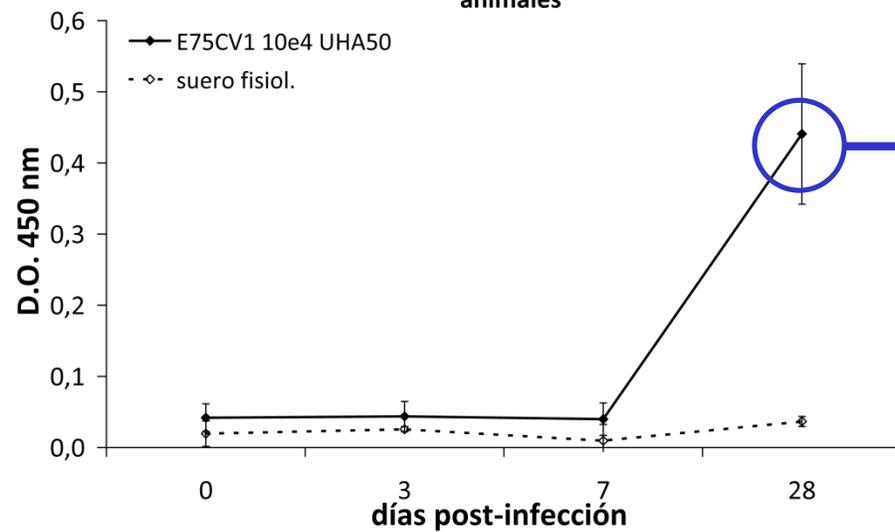


E75CV1 induce una respuesta celular y humoral específica

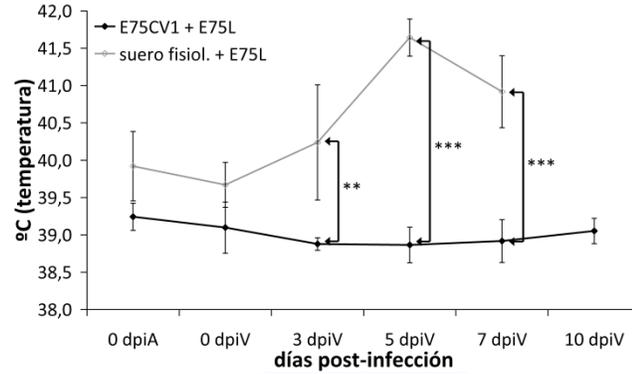


E75CV1 estimula:

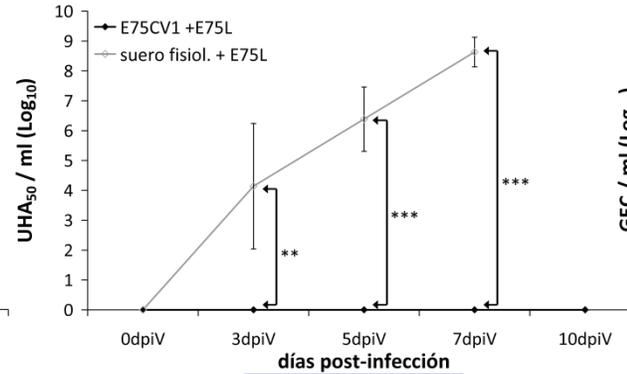
- respuesta celular
- respuesta humoral \rightarrow Ac NO neutralizantes



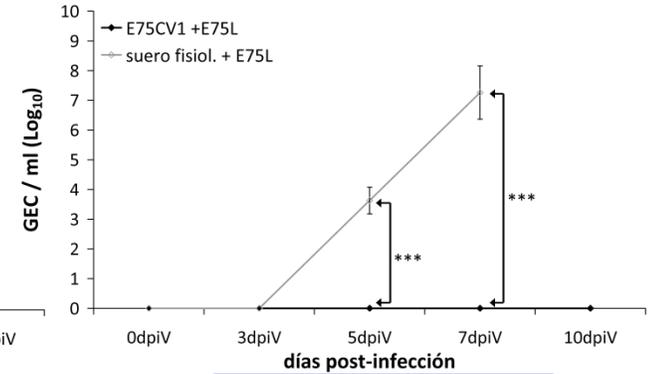
E75CV1 protege frente la infección con el **homólogo** virulento E75



NO fiebre

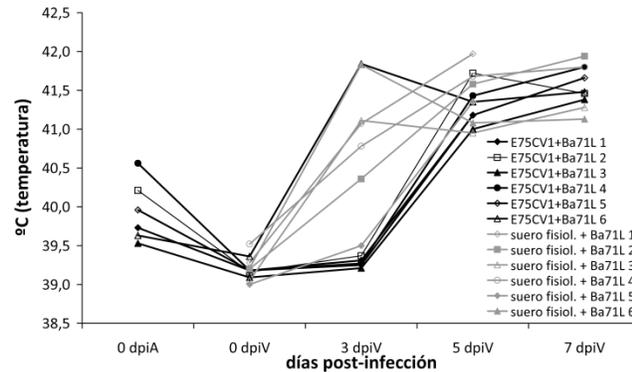


NO viremia

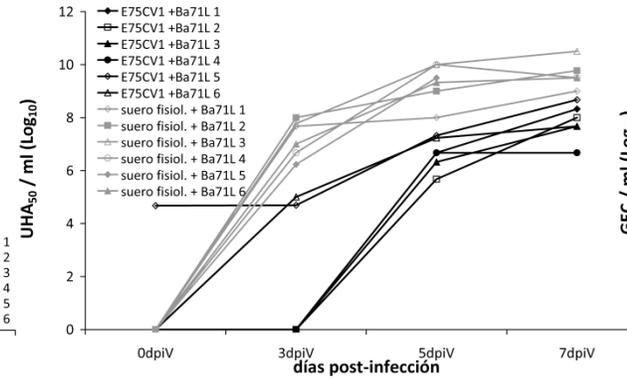


NO excreción viral

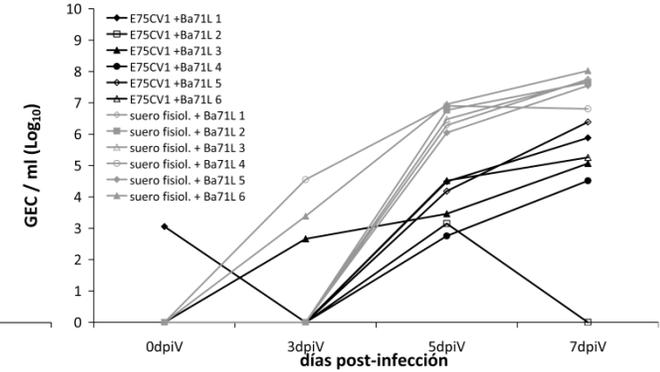
...pero no frente la infección con la cepa virulenta Ba71, **heteróloga**



más de 41°C



elevada viremia



elevada excreción viral

cepas VPPA atenuadas convencionales

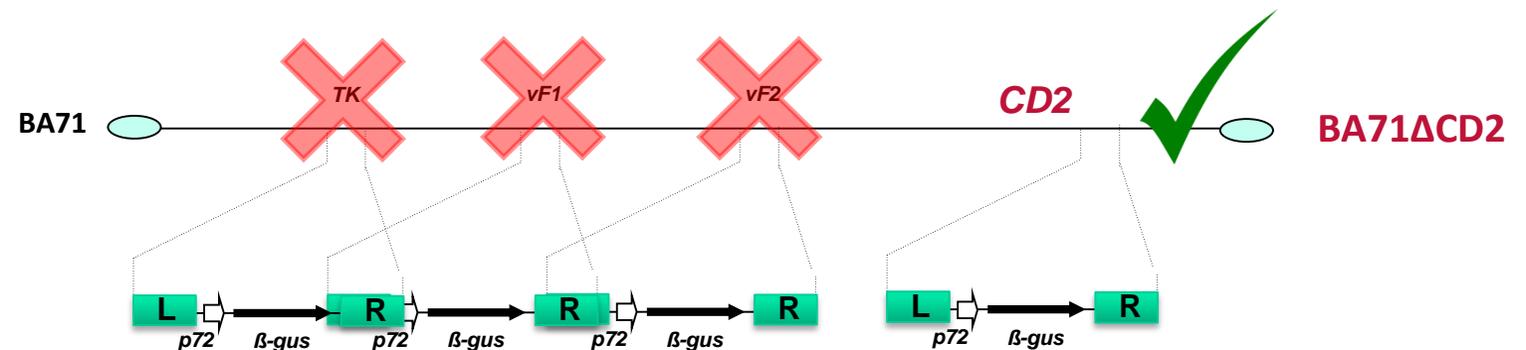
- ✓ protección sólida, pero **solo** contra la cepa homóloga
- ✓ inviable usarlas en camp (peligro de **reversión**)



**próximo paso:
trabajar con GMOs**

vacunas RECOMBINANTES: cepas atenuadas estables

- ✓ eliminar genes que codifiquen para factores de virulencia claves
- ✓ NO eliminar genes esenciales en la replicación del virus
- ✓ marcadores DIVA
- ✓ nuestro candidato: BA71 Δ CD2



la delección del gen "CD2" atenúa BA71 *in vivo*

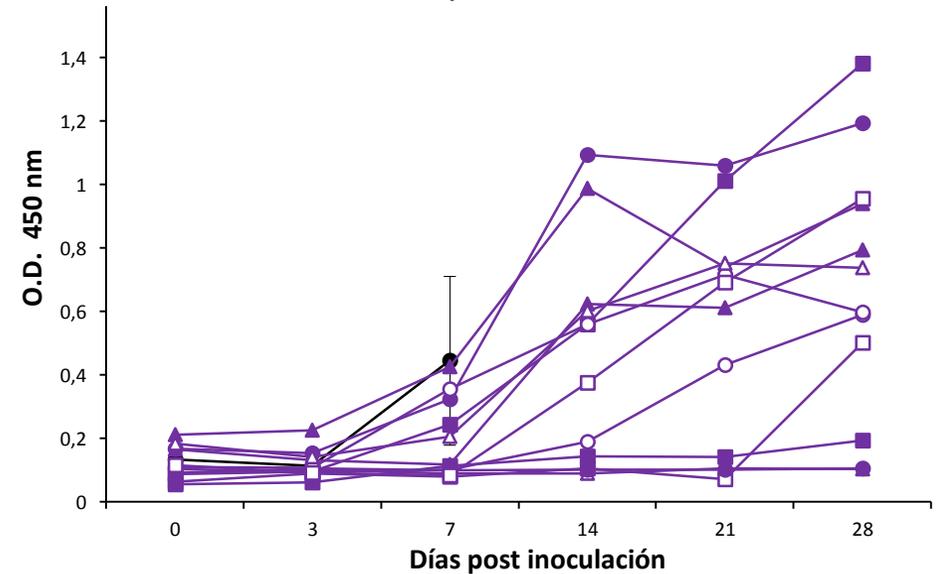
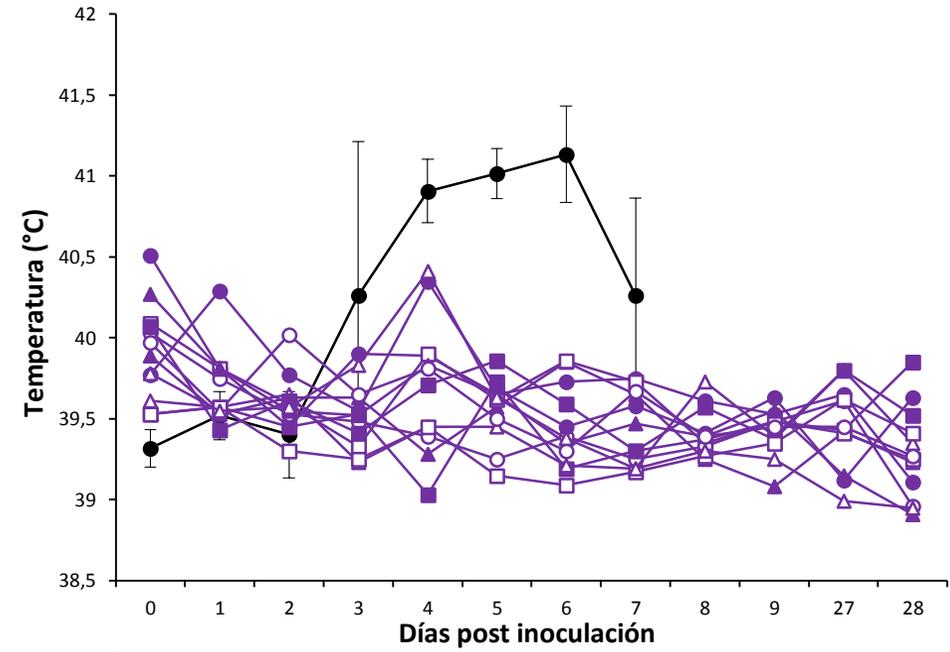
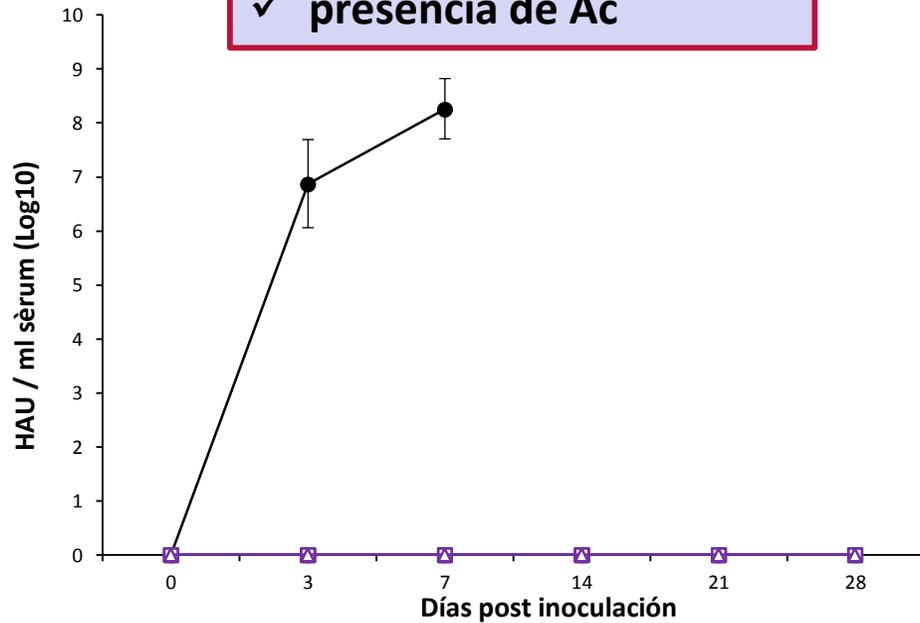


21 días

Grupo 1: 10^3 PFU de BA71

Grupo 2: 10^3 PFU de BA71 Δ CD2

- ✓ no hay bajas
- ✓ sin fiebre
- ✓ sin viremia
- ✓ presencia de Ac



BA71 Δ CD2 protege de forma dosis-dependiente

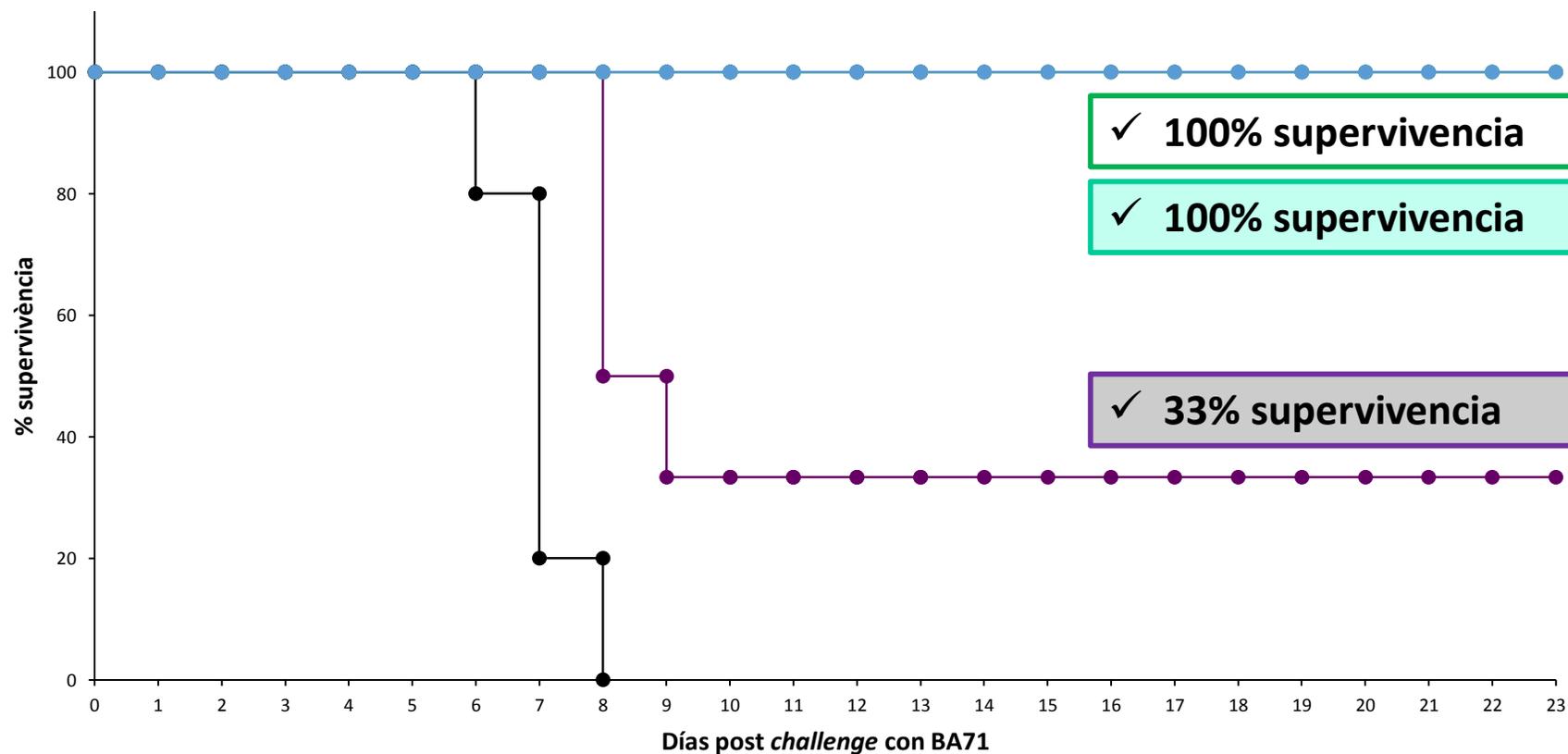
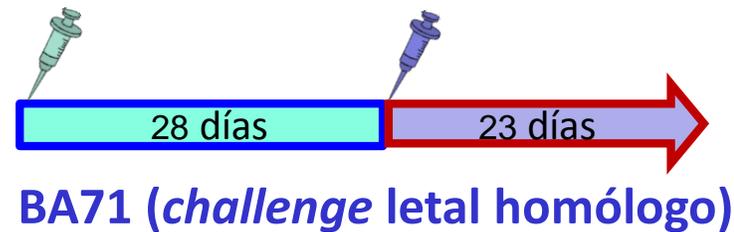
inmunización con BA71 Δ CD2

Grup 1: 10^3 PFU

Grup 2: $3,3 \times 10^4$ PFU

Grup 3: 10^6 PFU

Grup 4: PBS



BA71 Δ CD2 protege de forma dosis-dependiente frente E75

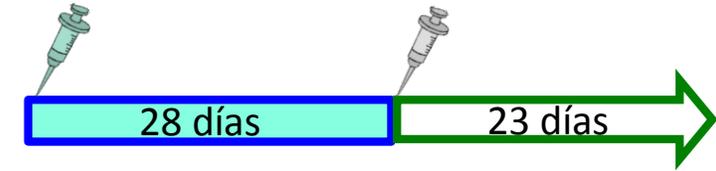
inmunización con BA71 Δ CD2

Grupo 1: 10^3 PFU

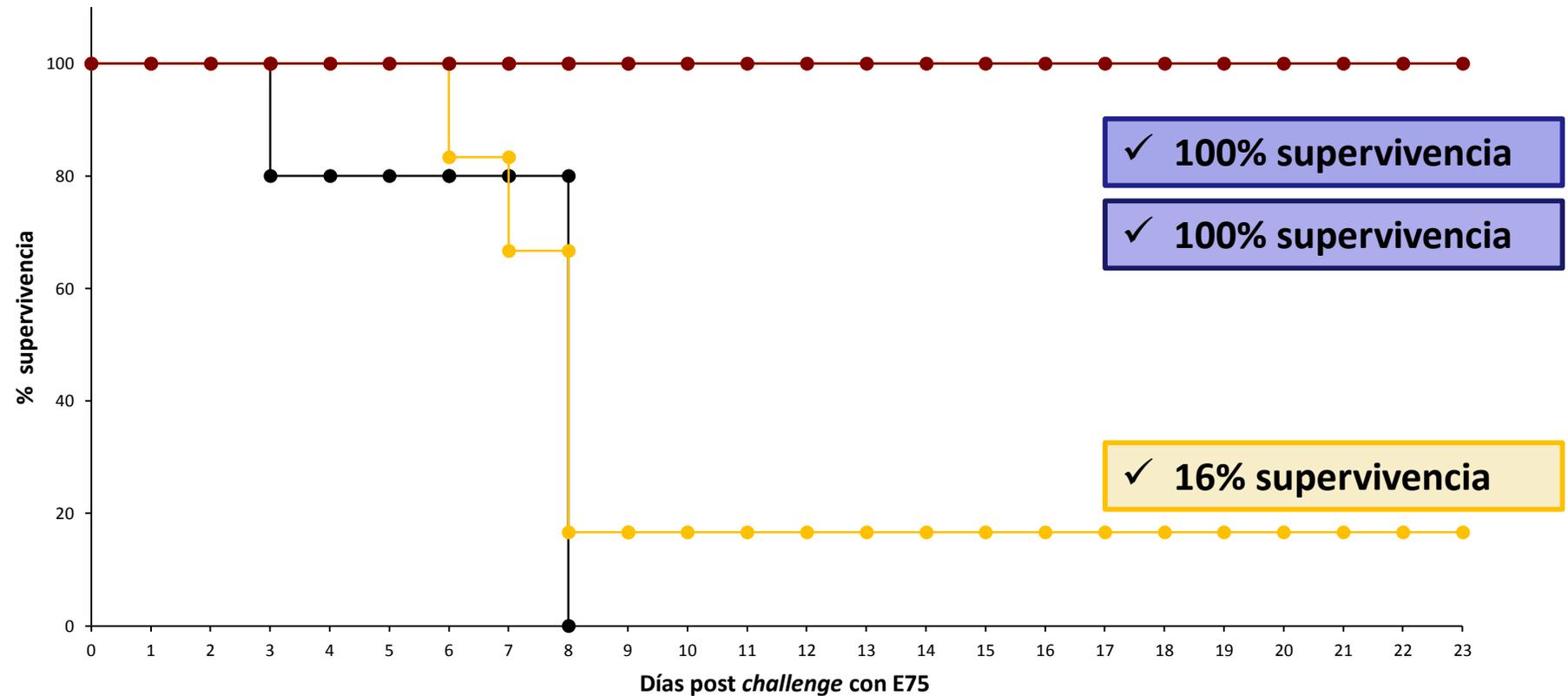
Grupo 2: $3,3 \times 10^4$ PFU

Grupo 3: 10^6 PFU

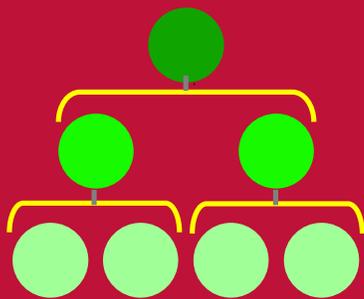
Grupo 4: PBS



E75 (*challenge* letal heterólogo)

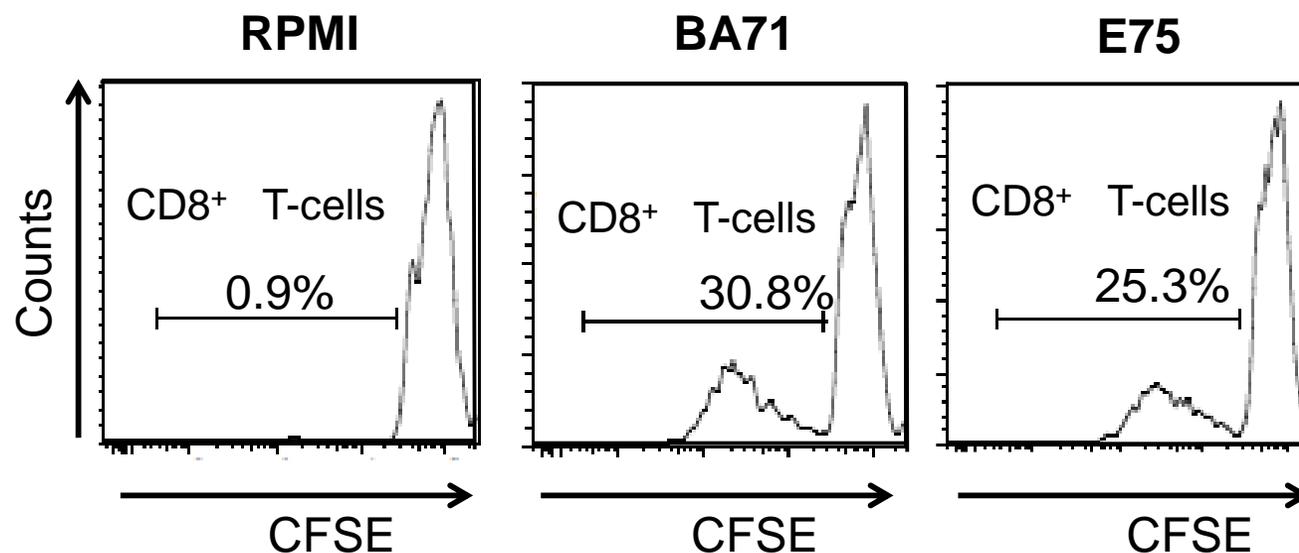


La tinción CFSE permite medir la proliferación celular (cels. madre presentan 2x intensidad de fluorescencia que las hijas y así, en cada división).



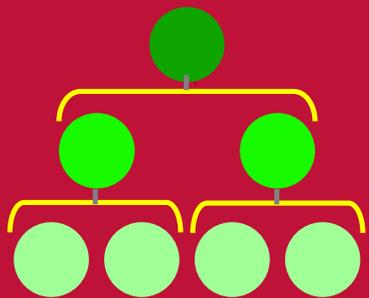
analizando la protección cruzada conferida por BA71 Δ CD2

proliferación *in vitro* de linf-T CD8⁺ correlaciona con protección observada *in vivo*



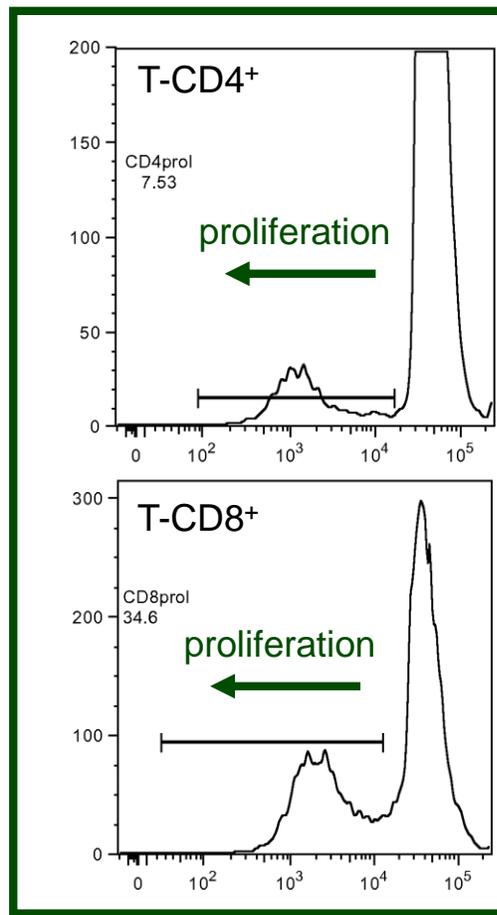
BA71 Δ CD2 induce células T-CD8⁺ que reconocen *in vitro* específicamente cepas **homólogas** (BA71) y **heterólogas** (E75) del VPPA

La tinción CFSE permite medir la proliferación celular (cels. madre presentan 2x intensidad de fluorescencia que las hijas y así, en cada división).

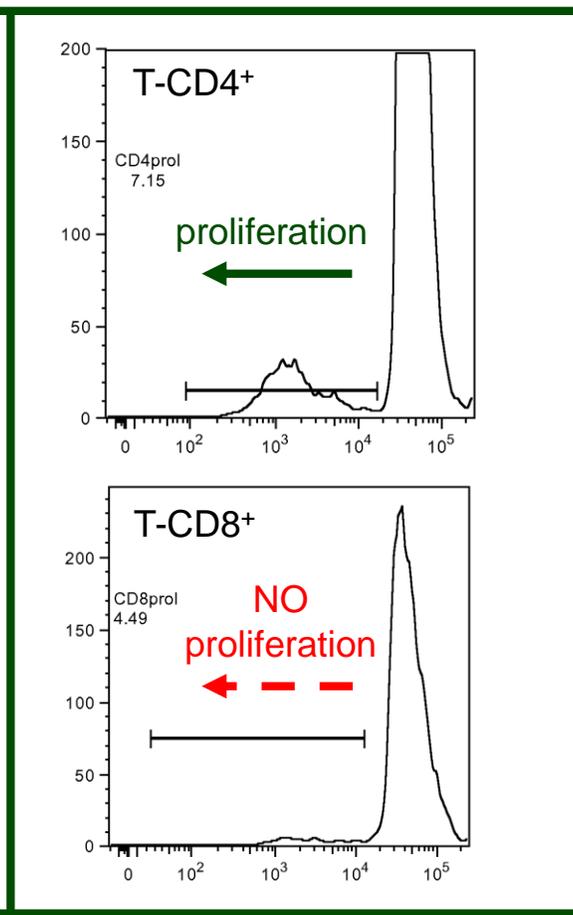


en cambio, E75CV1 (cepa atenuada “clásica”) sólo confiere una protección homóloga

Estimulación con E75L



Estimulación con Ba71L



FITC

Intensidad de fluorescencia

BA71ΔCD2 protege contra la cepa circulante en Europa y Asia?

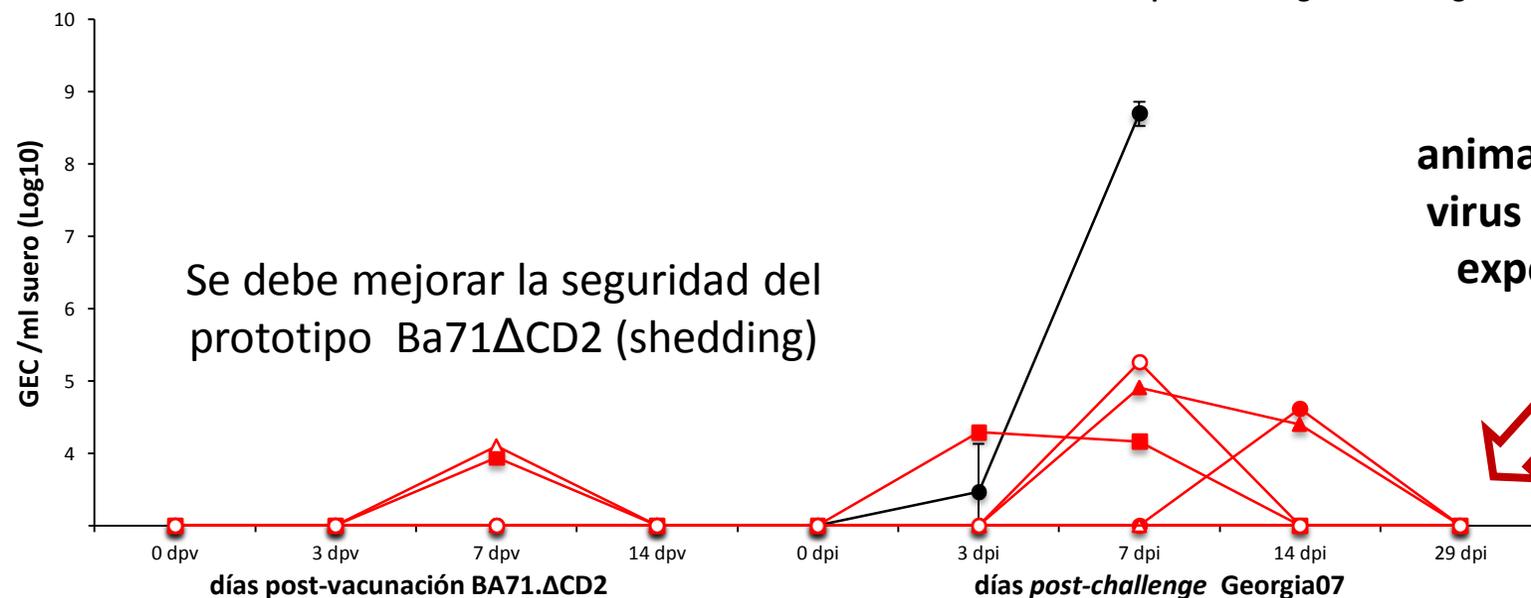
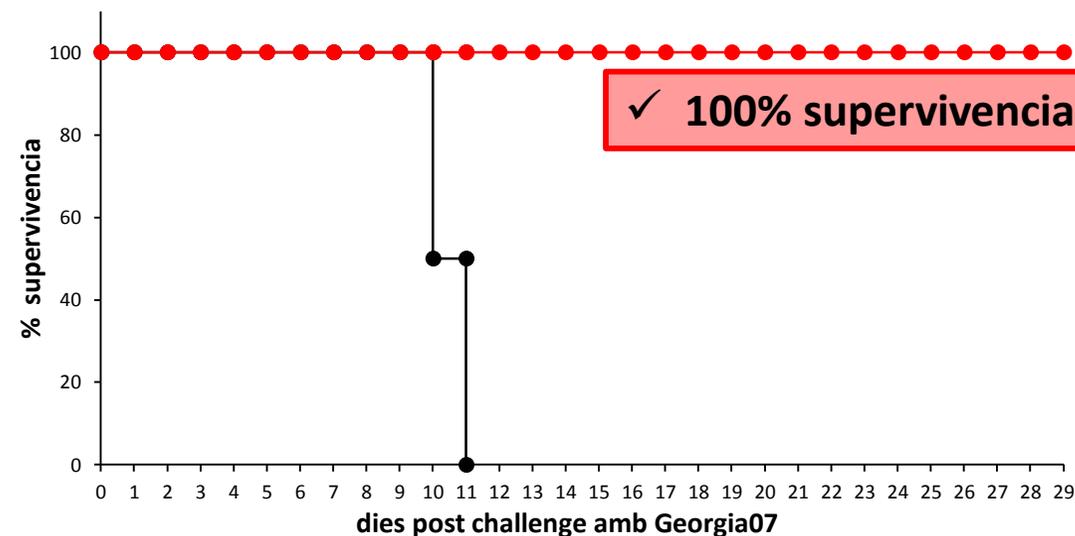
Inmunización con BA71ΔCD2

Grupo 1: 10^6 PFU BA71ΔCD2

Grupo 2: PBS

- ✓ 5/9 cerdos sense virus ni síntomas de PPA después del *challenge*
- ✓ 4/9 cerdos: viremia corta y picos de fiebre después del *challenge*

Georgia07 (*challenge* letal)



y... aún hay más!

- ✓ **BA71ΔCD2 protege *in vivo* contra un *challenge* IN (100% protección)**
- ✓ **BA71ΔCD2 protege *in vivo* contra un *challenge* hecho con garrapatas infectadas (genotipos distintos de I & II)**
- ✓ **BA71ΔCD2 no se transmite per garrapatas (defectivo en CD2)**
- ✓ **BA71ΔCD2 crece en líneas celulares inmortalizadas (*CLAVE* en PRODUCCIÓN VACUNA)**
- ✓ **Necesitamos mejorar la vacuna (seguridad / DIVA)**



BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities

Paula L. Monteagudo,^a Anna Lacasta,^a Elisabeth L. Collado,^a Javier Collado,^a Sonia Pina-Pedrero,^a Florentina María Jesús Navas,^a Enric Vidal,^a Andreas Gallei,^f Volker Thiel,^g IRTA, Centre de Recerca i Innovació Tecnològica, Departament d'Enginyeria i Ciències Ambientals, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, 17071 Sant Carles de la Riera, Tarragona, Spain

International Research Center

Simultaneous Deletion of the *9GL* and *UK* Genes from the African Swine Fever Virus Georgia 2007 Isolate Offers Increased Safety and Protection against Homologous Challenge

Vivian O'Donnell,^{a,b} Guillermo R. Risatti,^b Lauren G. Holinka,^a Peter W. Krug,^a Jolene Carlson,^{a,c} Lauro Velazquez-Salinas,^a Paul A. Azzinaro,^a Douglas P. Gladue,^a Manuel V. Borca^a



IRTA & USDA han firmado un acuerdo de colaboración para optimizar la vacuna

pero... no tot són flors i violes!

Hay que mejorar la vacuna (seguridad / DIVA)

- ✓ **delecionar un segundo gen del VPPA es MUY complejo:**
 - a menudo afecta **replicación**
 - **frágil equilibrio** entre **virulencia**, **atenuación** y **inactivación**.



respecto las vacunas de subunidades

es una estrategia a largo plazo:

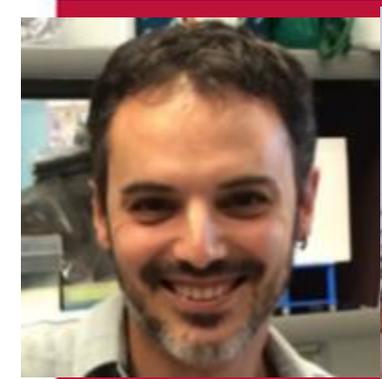
- ✓ 100% segura
- ✓ el VPPA codifica múltiples Ags protectivos
- ✓ protección relacionada con cels T-CD8+
- ✓ resultados confidenciales



Take-home messages

- ✓ Deleción del CD2 atenúa BA71 *in vivo*
- ✓ BA71 Δ CD2 protege *in vivo* (dosi-dependiente) contra *challenge* letal:
 - BA71 cepa homóloga
 - E75 cepa heteróloga
 - Georgia07 cepa circulante en Europa y Asia
- ✓ BA71 Δ CD2 induce linfocitos T-CD8+ que reconocen cepas homólogas & heterólogas de VPPA *in vitro*
- ✓ Debemos mejorar seguridad y DIVA de la vacuna
- ✓ Vacunas de subunidades como estrategia a largo plazo
- ✓ Una vacuna és posible







**THANK YOU
FOR
YOUR
ATTENTION!
ANY QUESTIONS?**