

# Kuchende kalveren en benauwde kinderen

Translationeel onderzoek in de strijd tegen RSV

Infectieziektenpanel, 20 April 2020



# KUCHENDE KALVEREN



# Bovine Respiratory Disease (BRD)

Luchtweginfecties behoren tot de meest voorkomende gezondheidsproblemen bij jonge kalveren

Oorzaak luchtweginfectie is vaak multifactorieel

## The BRD complex

Environmental  
(temperature,  
ventilation,  
humidity)

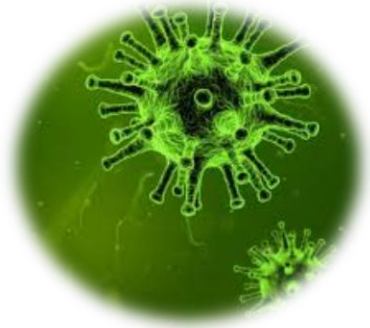
Infectious agents  
(viruses, bacteria,  
mycoplasma)

Management &  
Nutrition

Host factors  
(breed, sex,  
age)



# Respiratory disease



## Viral

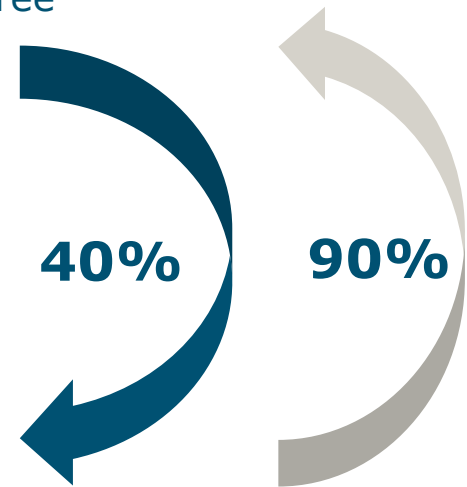
BRSV, PI3V, BVDV, BHV1, BCV

Porte d'entrée

## Bacterial

*M. haemolytica*, *P. multocida*,  
*H. somni*, *T. pyogenes*

*M. Bovis*, *M. Bovirrhinis*, *M. dispar*

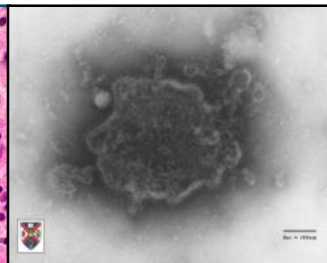
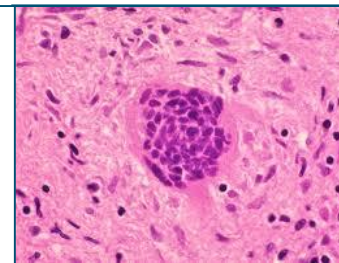


# Ziekteverwekkers luchtweginfectie

	Morbiditeit	Mortaliteit
bRSV	60-80%	up to 20%
IBR	low to 100%	~2%
PI3V/BCV	Low pathogenicity	0%

- bRSV wordt beschouwd als het meest pathogene virus in de respiratoire pathologie
- bRSV speelt een rol in het merendeel van de BRD uitbraken
- Overgrote deel van de volwassen runderen test serologisch positief

Boviene                      respiratoir                      syncytieel                      virus



# bRSV – in de praktijk



- Endemische dierziekte
- Primaire infectie jong kalf(<6 mnd): ernstig ziektebeeld
- Ziektebeeld kan verergeren door secundaire bacteriële infecties
- Blijvende groeiachterstand > economische schade
- Biest beschermt onvolledig (mn tav virusuitscheding)
- Seizoensgebonden uitbraken (herfst / winter seizoen)
- Subklinische herinfecties: beperkte immuniteitsduur (?)

# bRSV- klinische infectie

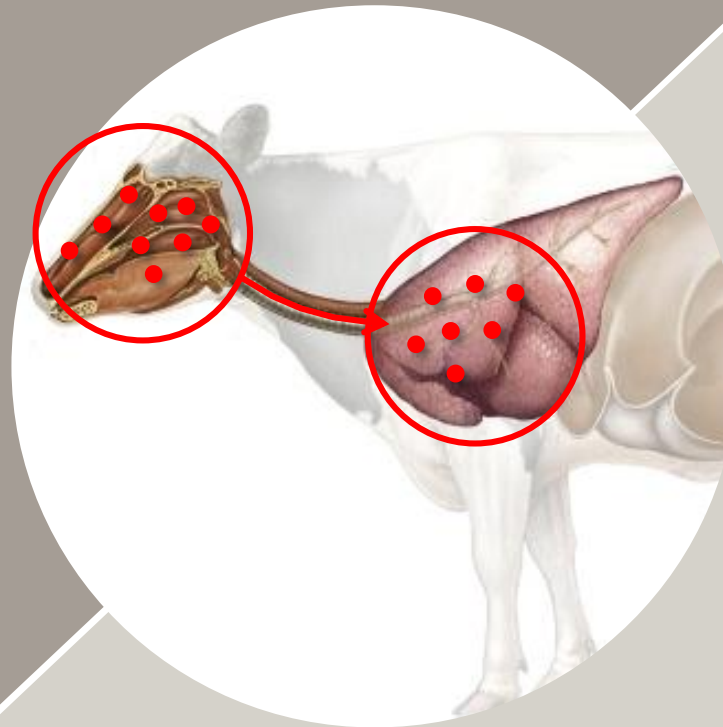
Incubatietijd: 3-5 dg



## Voorste luchtwegverschijnselen



Snotneus  
Traanoog  
Hoest

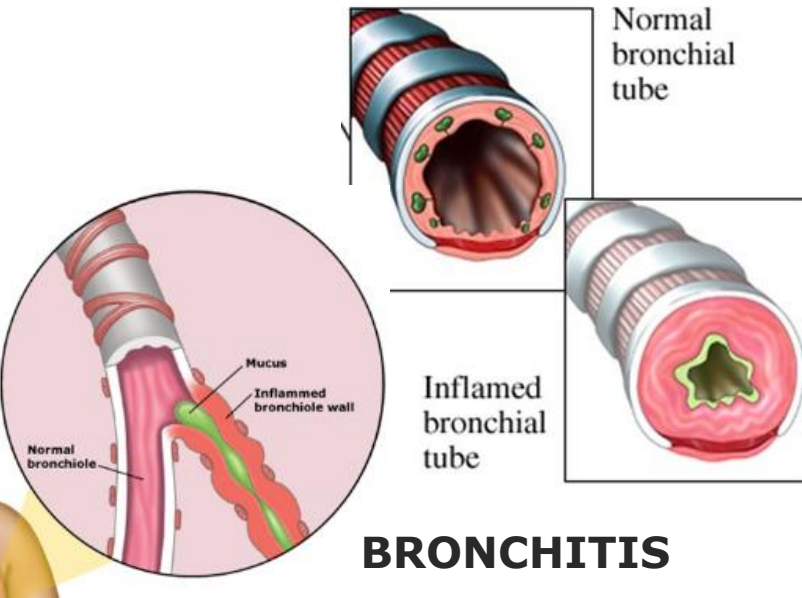


Versnelde ademhaling  
Pompen  
Accesoire adembewegingen  
en geluiden

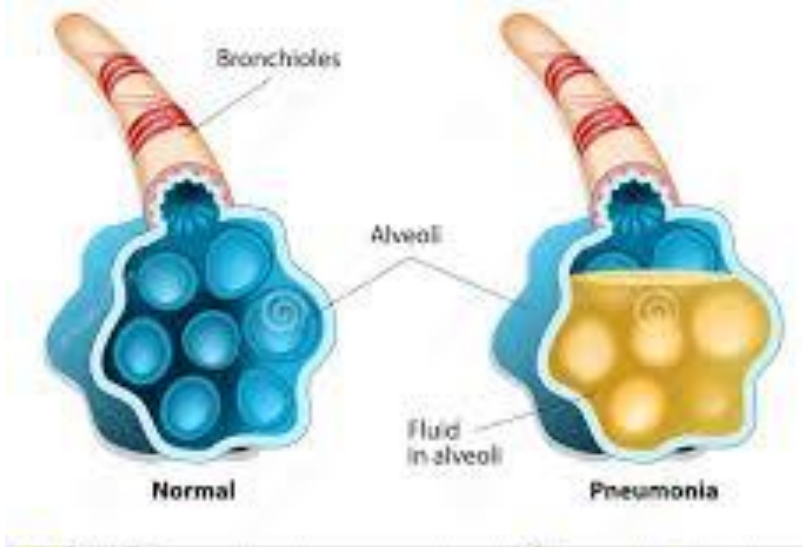


## Achterste luchtwegverschijnselen

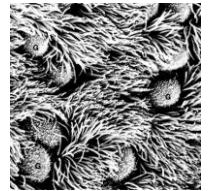
# Pathogenese



## PNEUMONIA



- Virus vermeerdert zich in luchtwegen
  - epitheelcellen / pneumocyten
- Ontstekingsreactie
- Verdikking slijmvlies bronchus en mucusproductie (bronchitis): ventielwerking
- Vocht in longblaasjes (pneumonie): verminderde gasuitwisseling



Benauwdheid



# bRSV- taxonomy & genom

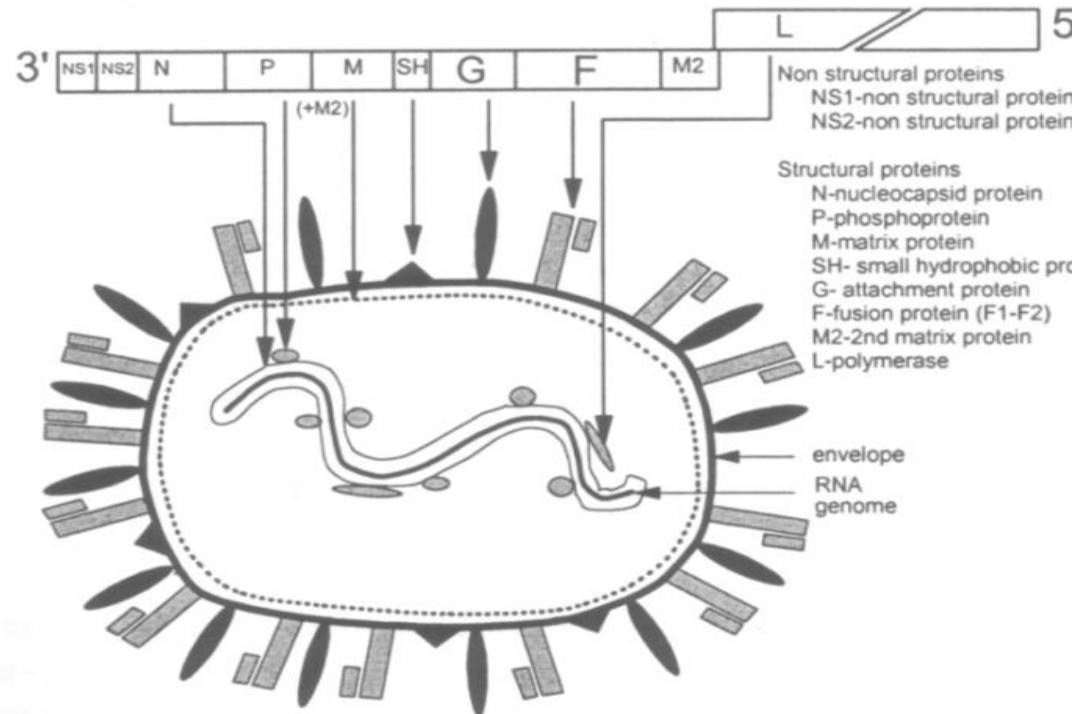
- Eerste isolatie & naamgeving in 1967 (Paccaud & Jacquier)
- Taxonomy 2016: Order mononegavirales

Genus *Orthopneumovirus*

Family *Pneumoviridae*

*human (RSV) & rodent (PVM)*

- Enveloped virus met negatief enkelstrengs non-segmented RNA (10 genes)

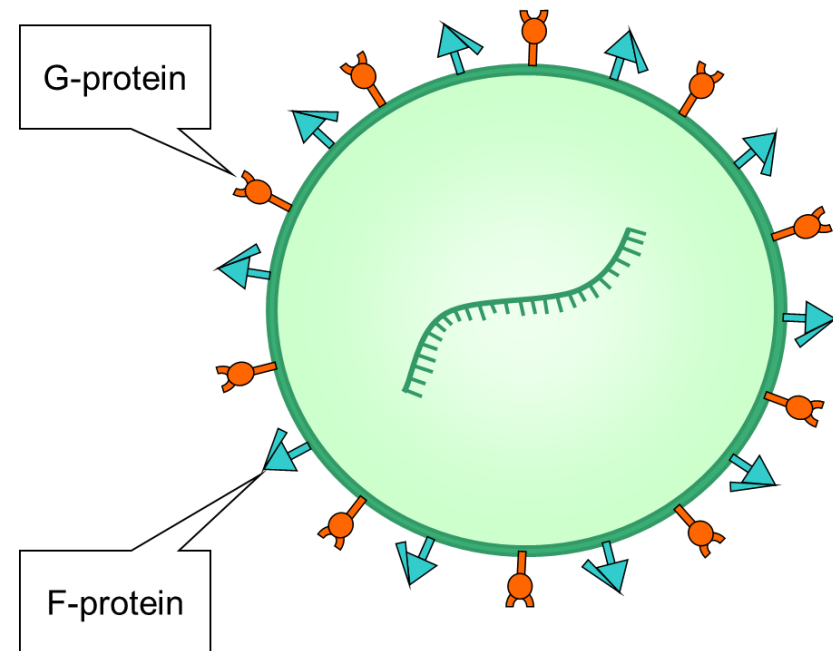


# bRSV- morfologie

## ■ Immuno-dominante transmembraan eiwitten (epitooop neutraliserende antistoffen):

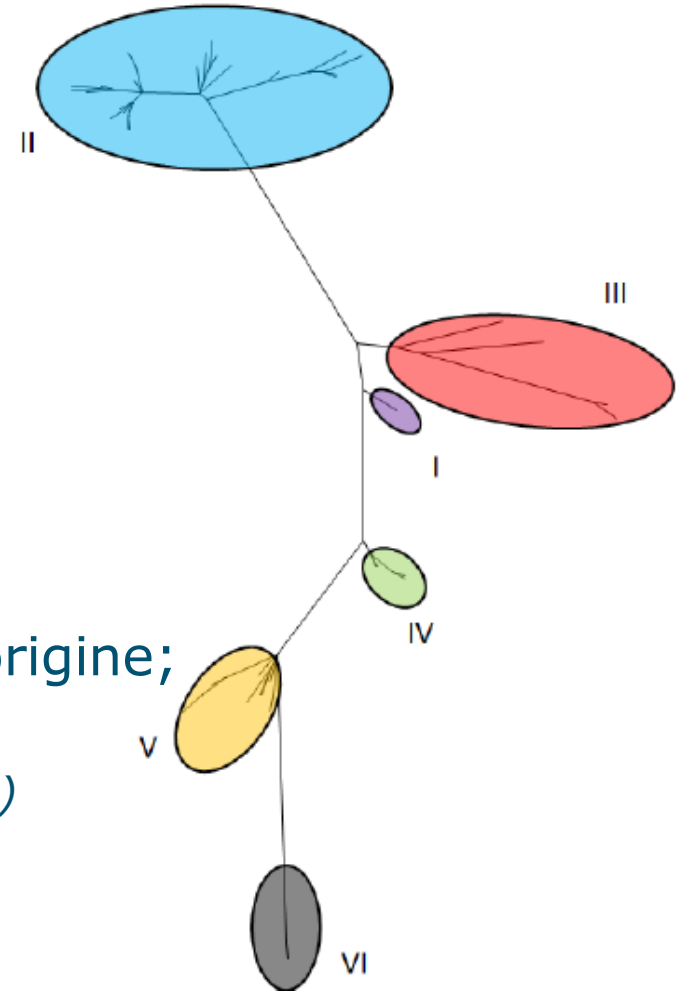
- G-eiwit (attachment)
- genetisch veel variatie

- F-eiwit (fusion)
- genetisch sterk geconserveerd



# bRSV – classificatie

- 1 serotype
- 4 antigenen subgroepen (subtype A, B, AB, untyped)
  - obv eiwit/antigeenstructuur; binding MAb aan G-eiwit (*Schrijver, 1996*)
- 6 phylogenetische subgroepen (genotypes I t/m VI)
  - obv tijdsperiode & geografische origine; genetische sequenties G-eiwit (*Valarcher, 2000 & Sarmiento-Silva 2012*)



# bRSV – genetische variatie

## ■ Kruisneutralisatie antigene subgroepen

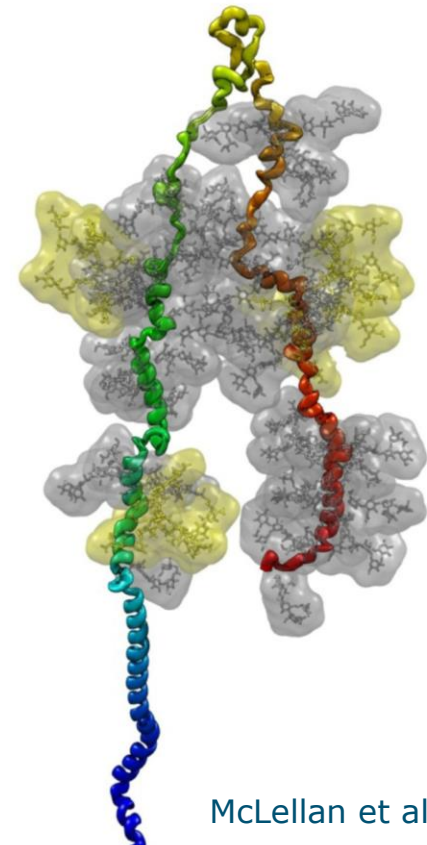
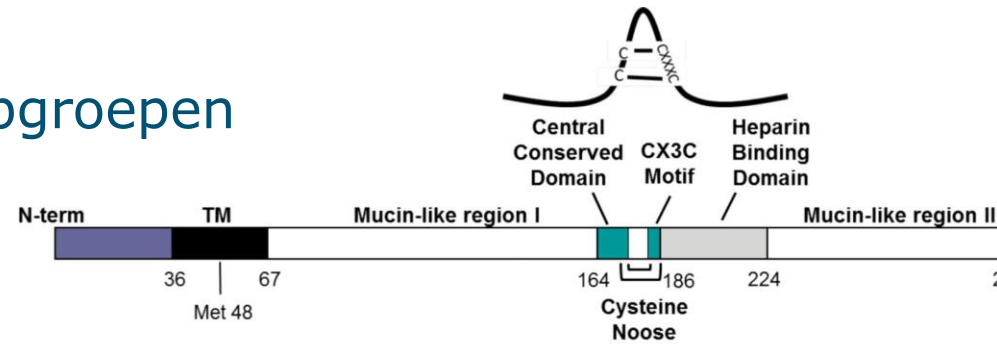
- G-eiwit: nee
- F-eiwit: ja

## ■ Variatie eiwitsequenties bovine strains

- G-eiwit: 83% homologie
- F-eiwit: 99% homologie

## ■ Continue evolutie (antigenic drift)

- Selectiedruk dmv vaccinatie
- Hoogste mutatie rate in G-eiwit;  
in mucin-like regions  
(zonder gevolgen voor antigene structuur)



# bRSV - immuunrespons

- Aspecifiek (direct)
  - Innate immuunrespons > ontstekingscellen  
cytokine release
- Specifiek (memory)
  - Humorale immuunrespons > antistoffen  
(mucosaal/systemisch)
  - Cellulaire immuunrespons > cytotoxische T cellen
- Immuunpathologie

# bRSV - vaccinstrategie

## Bestaande vaccine platforms

- geïnactiveerd bRSV (+adjuvans)
- levend verzwakt bRSV

## Uitdaging:

- bescherming meest belangrijk op jonge leeftijd > dus vaccineren in aanwezigheid van maternale immuniteit (tgv biestopname) en van een nog niet volledig gerijpt immuunsysteem

## Gangbare strategie:

1-malige intranasale immunisatie (neus/spray enting) op jonge leeftijd (<2 wk) >> snelle onset van (locale) immuniteit (hogere weerbaarheid bij aankomst bij de mestkalverhouder) >> relatief korte immuniteitsduur en matige inductie van systemische neutraliserende antistoffen (memory response) >> 2de intramusculaire immunisatie op leeftijd van ong. 3 maanden



# bRSV - vaccin werkzaamheid

- Al jaren bRSV (combinatie)vaccins op de (NL) markt
- bRSV circuleert nog steeds:
  - onvoldoende vaccineffectiviteit tav virologische bescherming op populatieniveau?
  - Antigenetische drift tgv evolutie bRSV circulerende bRSV stammen?
  - Korte immuniteitsduur?
- Ruimte voor vaccinverbetering?
- Belang van diagnostiek\* & surveillance!

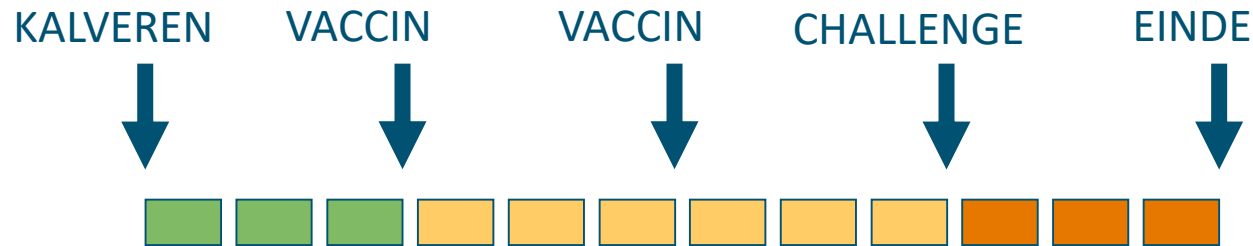
# bRSV- marktautorisatie vaccins



- Ontwikkeling en selectie traject (R&D)
- Registratietraject
  - Wettelijk vereist om veiligheid & werkzaamheid aan te tonen volgens richtlijnen Europese Farmacopee
    - Reverse to virulence / overdosis
    - Vermindering van virusuitscheiding
    - (Vermindering van ziekte symptomen)
  - Experimentele infectie in doeldier (NB zonder maternale immuniteit)



# bRSV - infectiemodel vaccin onderzoek



1. Aankomst + opfokfase
2. Vaccinatie fase (wel/geen vaccinatie)
3. Challenge fase

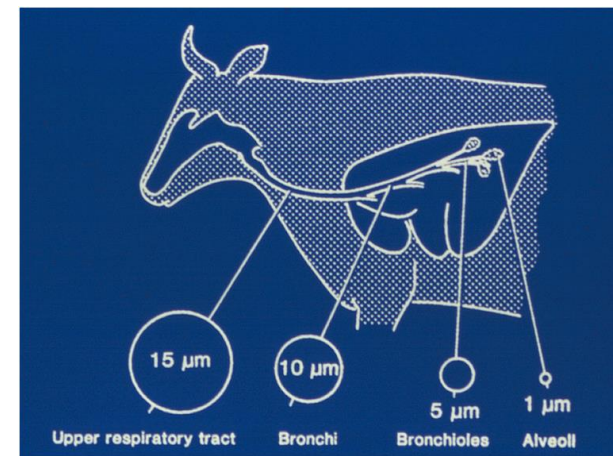
# bRSV infectiemodel – kalveren

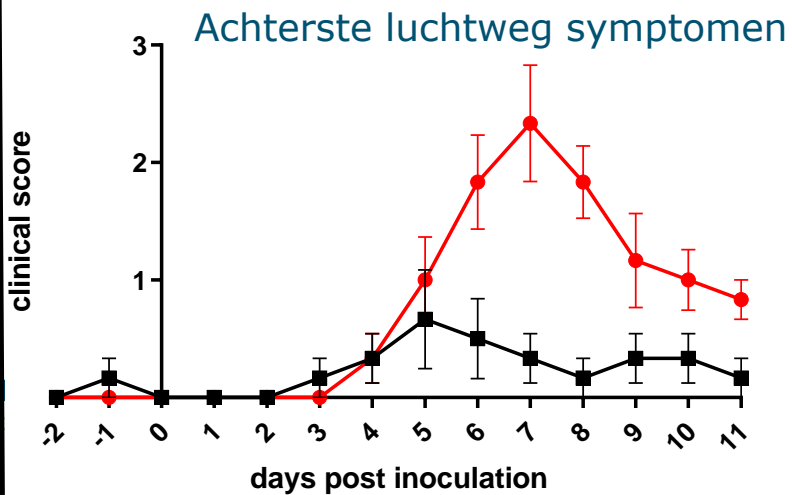
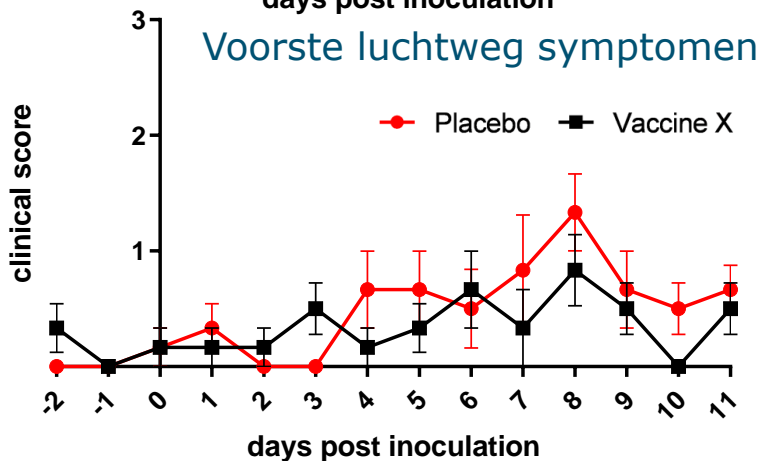
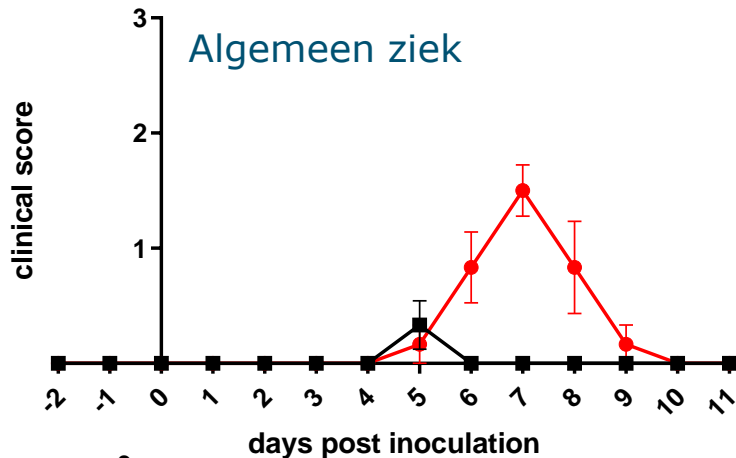
- Aankopen pasgeboren kalveren van lokale melkveebedrijven
- In containment bij WBVR (ivm endemische status bRSV)
- Gecontroleerde biestopname (ivm status maternale immuniteit)



# bRSV infectiemodel – virus inoculatie

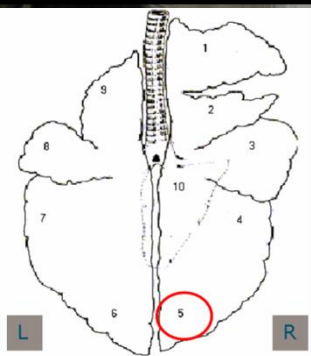
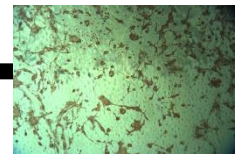
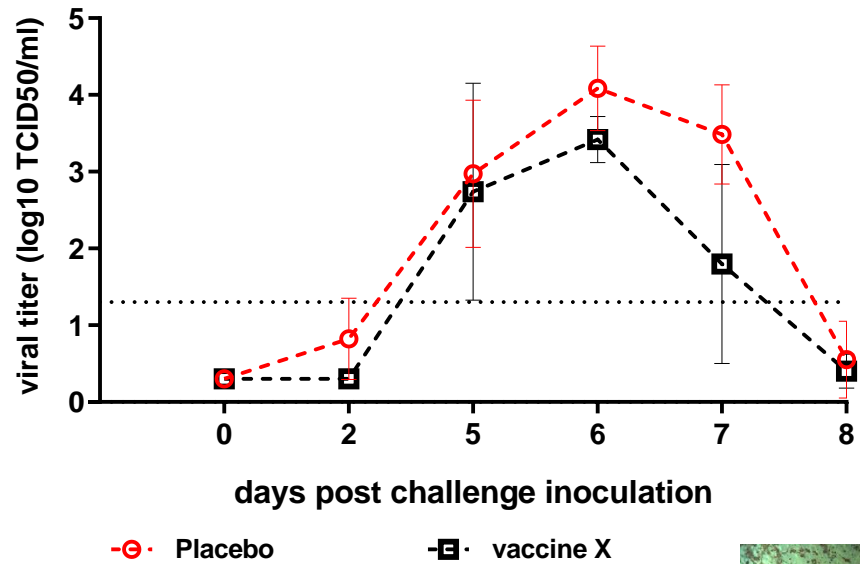
- bRSV challenge stam: *in-vivo* gepasseerd veldisolaat van geïnfecteerd kalf
- Toediening middels aerosol om natuurlijke infectieroute zoveel mogelijk na te bootsen > virusdeeltjes bereiken ook diepere luchtwegen (?)



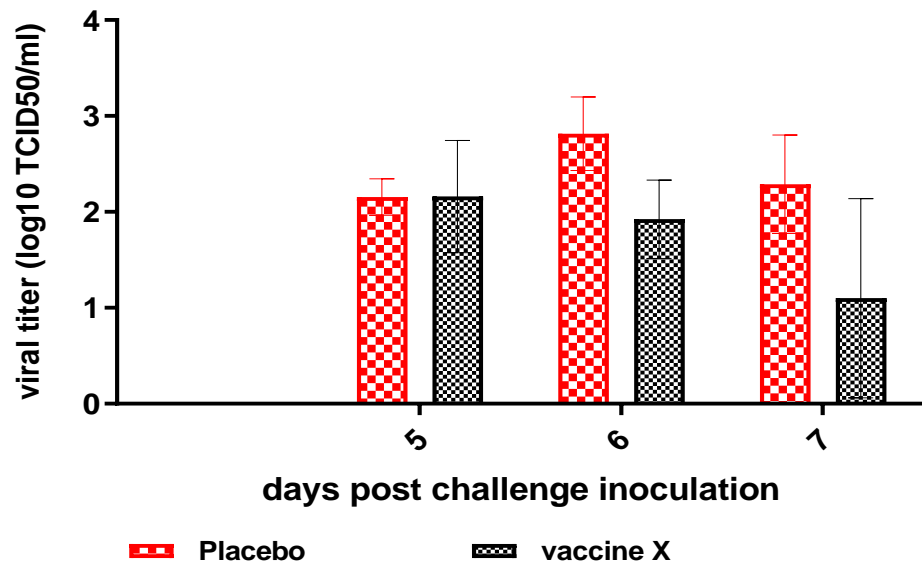




### Nasopharyngeal brush



### Lung lavage



# BENAUWDE BABIES

NOS NIEUWS • [BINNENLAND](#) • DI 12 NOVEMBER 2019, 11:05

**Arts wil aandacht voor levensgevaarlijk RS-virus:  
'Veel ouders kennen het niet'**

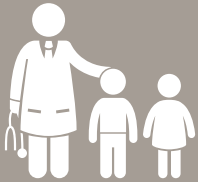


“Elke dag sterven er wereldwijd 700 kinderen aan het RS-virus”

Human RSV is genetically highly related with Bovine RSV and the infection shows many similarities in kids and calves including pathogenesis, clinical outcome & immune responses



# RSV – verspreiding en burden



In kids:

90%

infected  
< 2 years old

## Worldwide:

approx. 3 million kids hospitalized  
(~ 200.000 deaths)



## Netherlands:

approx. 2.000 hospitalized/year  
(~ 150 IC admissions)



In calves:  
Major cause  
of respiratory infections



# RSV – classificatie & genetische homologie

- Zelfde classificatie: antigene & phylogenetische subtypes
- Type A hoogste prevalantie (en meest virulent?)
- Homologie van de virale eiwitsequenties RSV en bRSV:

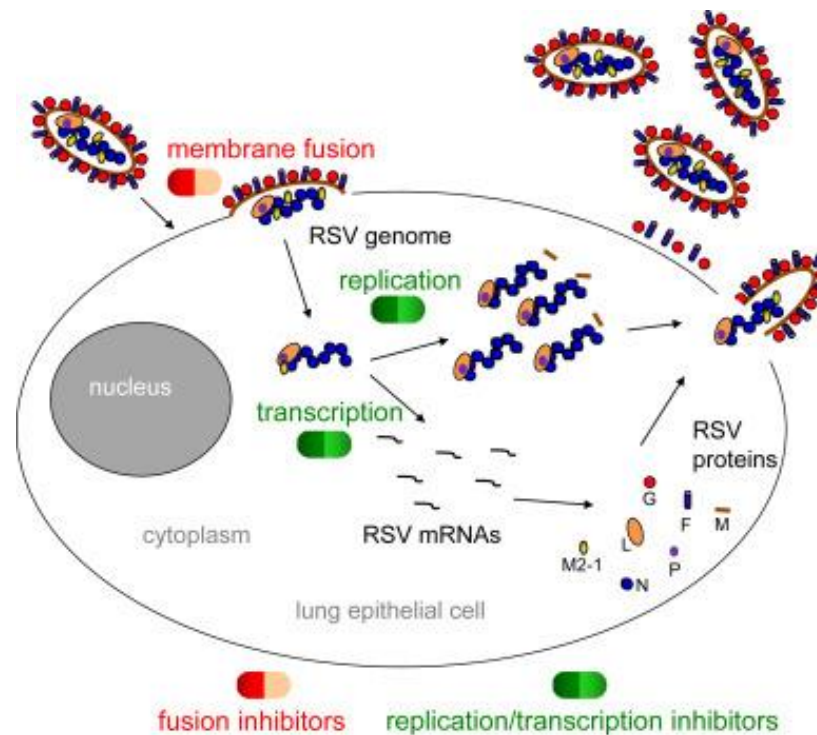
**Table 3**

Amino acid sequence identity between the protein of hRSV subgroup A, hRSV subgroup B (hRSV-B), bovine (b)RSV and pneumonia virus of mice (PVM).

Viral protein		% Amino acid sequence identity		
		hRSV-B	bRSV	PVM
NS1	Non-structural protein 1	87	69	16
NS2	Non-structural protein 2	92	84	20
N	Nucleoprotein	96	93	60
P	Phosphoprotein	91	81	33
M	Matrix protein	91	89	42
SH	Small hydrophobic protein	76	38	23
G	Attachment glycoprotein	53	30	12
F	Fusion protein	89	81	43
M2-1	Matrix protein 2-1	92	80	43
M2-2	Matrix protein 2-2	72	42	10
L	RNA polymerase	93	84	53

# RSV – profylactische / curatieve therapie

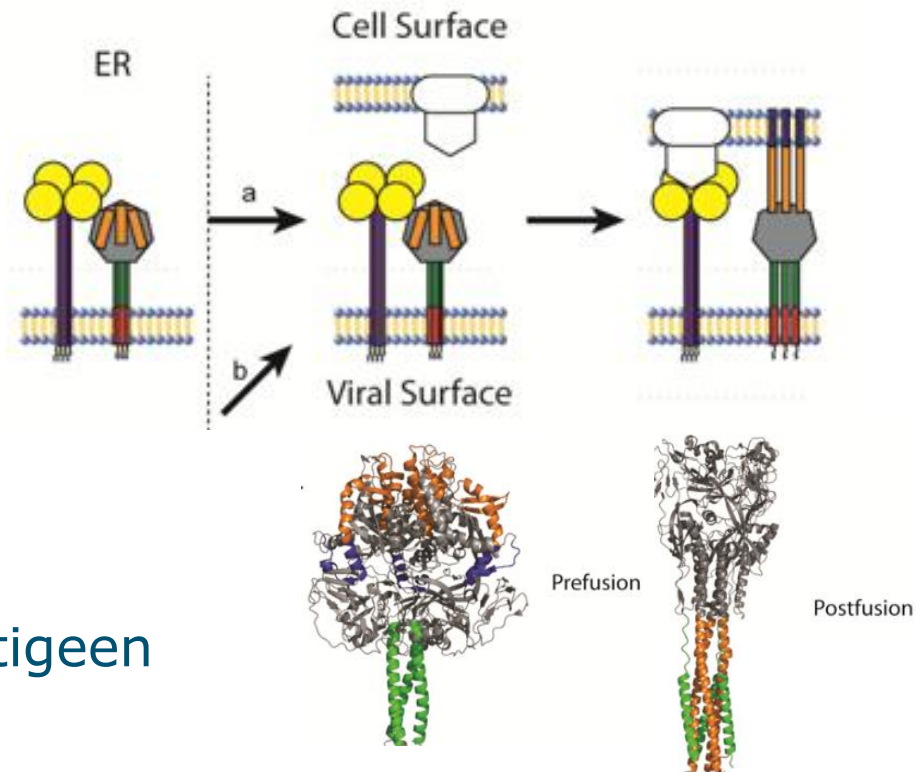
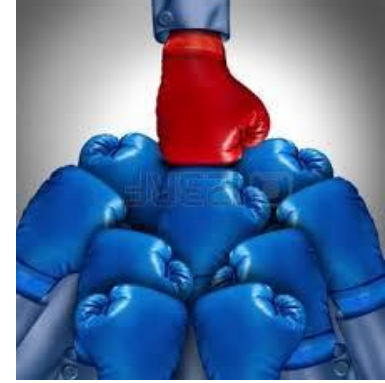
- Monoclonale antistoffen (Synagis®)
- Antivirale middelen (specifiek / immuun modulators)



# RSV – vaccin strategie

Er is nog geen vaccin voor kinderen beschikbaar!

- Zelfde uitdaging als in kalf: bescherming jonge leeftijd
- Daarnaast veel aandacht voor veiligheid nav ontspoorde immunreactie volgend op vaccinatie met formalinegeïnactiveerd vaccinpreparaat in 1960 (*vaccine-enhanced disease*)
- Focus op F-eiwit als vaccin antigeen
  - Meest geconserveerd
  - In gestabiliseerde pre-fusie conformatie > ivm bereikbaarheid epitoom voor neutraliserende antistoffen

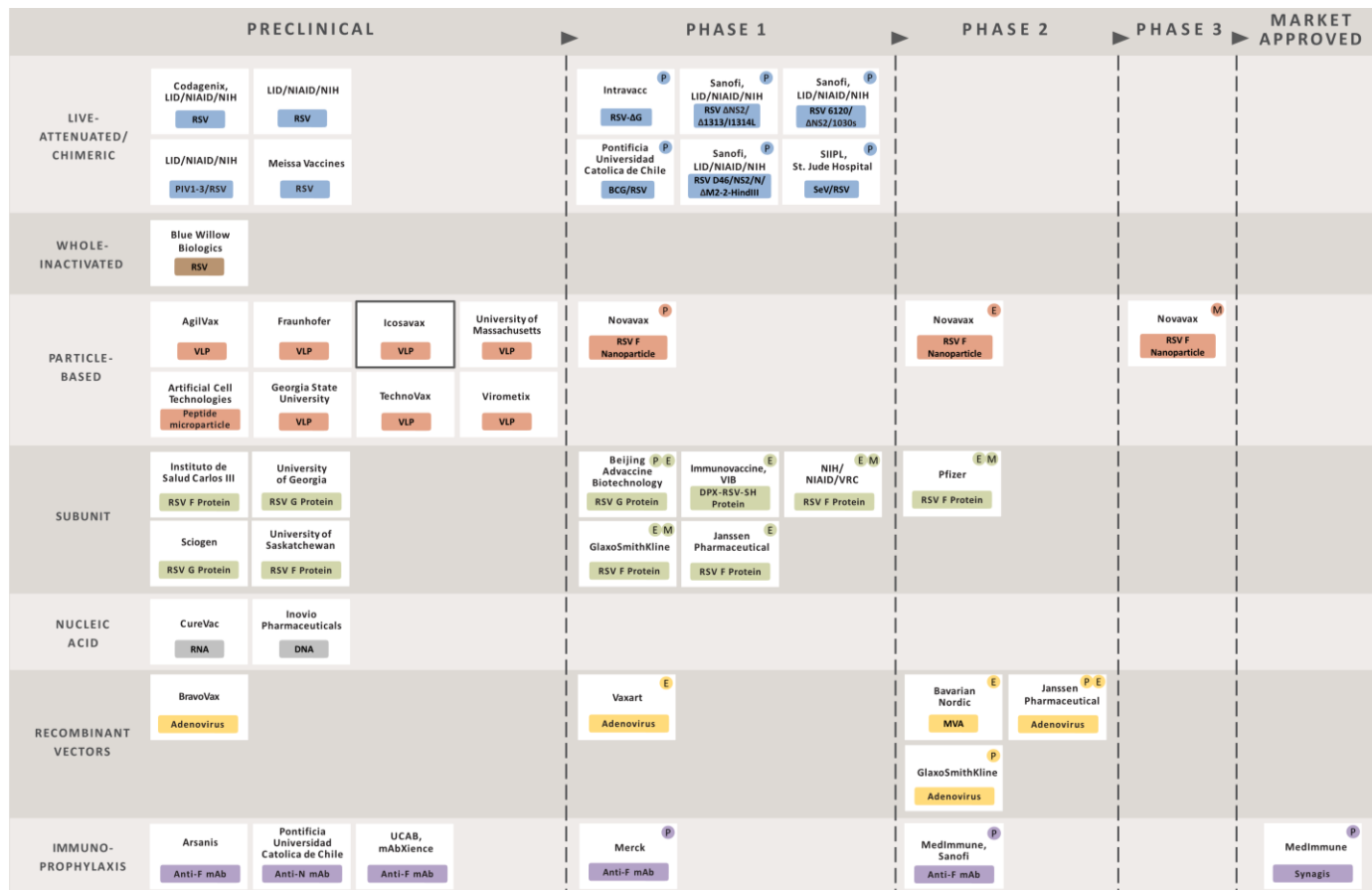


# RSV – traject vaccinonderzoek

Variëteit aan vaccin platforms:  
Live / subunit / vector / mRNA

Uitsplitsing doelgroep:  
Zuigelingen, matернаal, ouderen

Doel: wereldwijde beschikbaarheid!



[www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/](http://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/)

# Pre-klinische evaluatie - diermodel



## ➤ Heterologe modellen

- Humaan RSV in knaagdieren – muizen & katoenratten
- Humaan RSV in niet-menselijke primaten
- Humaan RSV in neonatale lammeren
- Humaan RSV in immuungecompromitteerde fretten

## ➤ Homologe modellen

- Boviene RSV in kalveren
- Humaan RSV in volwassen vrijwilligers



# bRSV infectiemodel - translationeel onderzoek

Natural-host model

Closely resembles human situation in pathogenesis & clinical severity

Offers abundant measurement advantages

Intranasal inoculation / infection

Antistoffen die worden opgewekt door een humaan RSV-F vaccin kruisneutraliseren onze bRSV challenge stam



Clinical manifestation:  
General illness, upper and lower respiratory tract disease



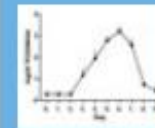
Immune responses:  
Cellular and humoral immunity in blood, nasal fluid and lung lavage samples



Pathology:  
tissue responses, immuno-histopathology



Virus Replication:  
nasopharyngeal and lung lavage samples



# Translationeel bRSV infectiemodel met uitbreiding read-out parameters

## ➤ Effectiviteit:

- Reductie ernstige klinische symptomen
  - representatieve / objectieve waarnemingen
- Reductie long pathologie
- Reductie virus replicatie

## ➤ Veiligheid:

- Preventie van vaccine-enhanced disease

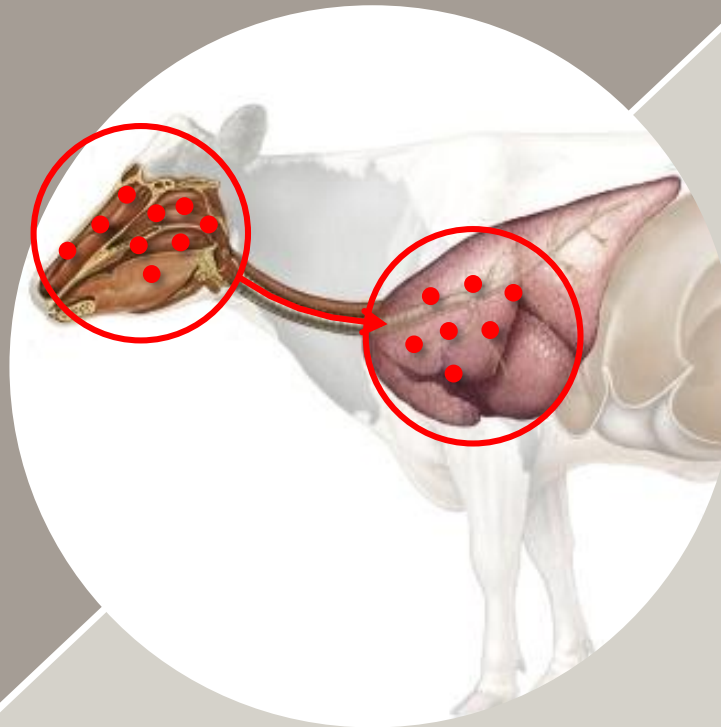
## ➤ Immunogeniciteit:

- Inductie humorale en cellulaire immuunrespons
- Correlaties tav bescherming & veiligheid?



# Representatief klinisch beeld

Voorste/bovenste luchtwegverschijnselen

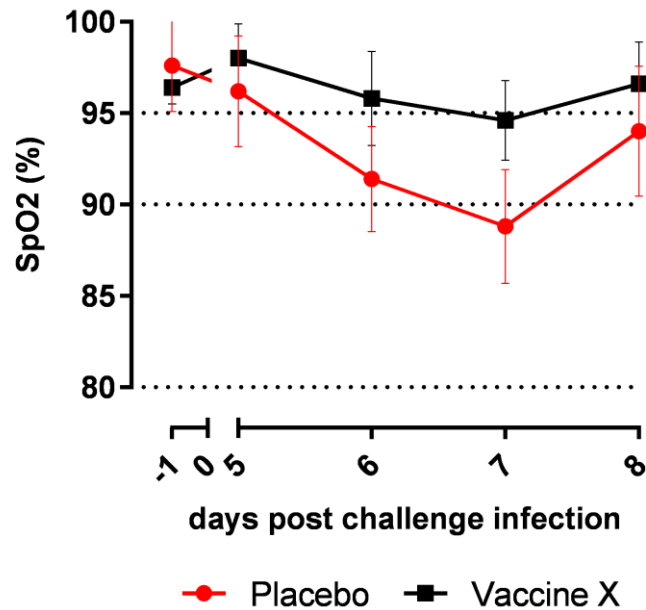


Achterste/onderste luchtwegverschijnselen



# Additionele monitoring benauwdheid

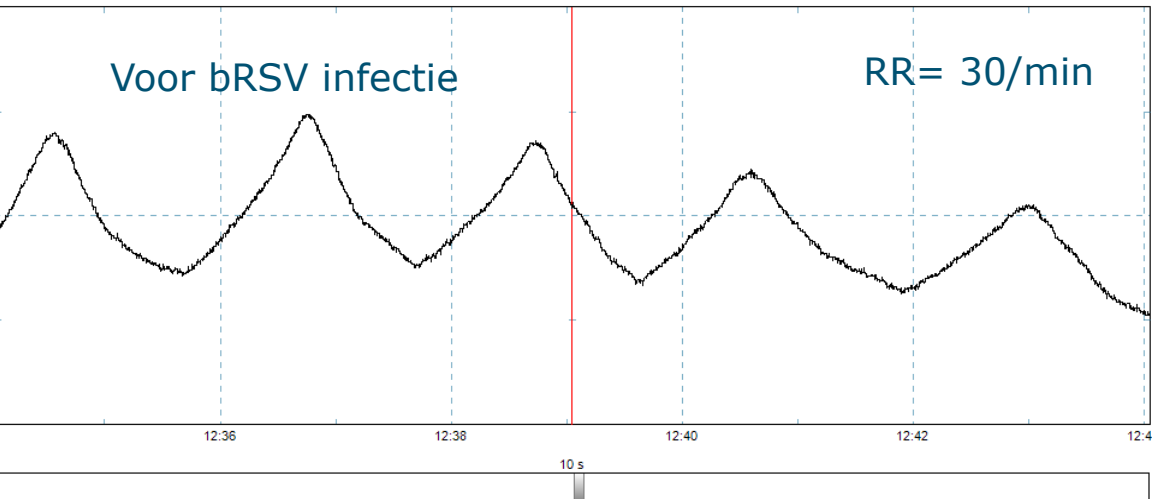
Zuurstofsaturatie dmv pulseoximetrie of bloedgasmetingen



Kalf 93 - 2012-12-11

Voor bRSV infectie

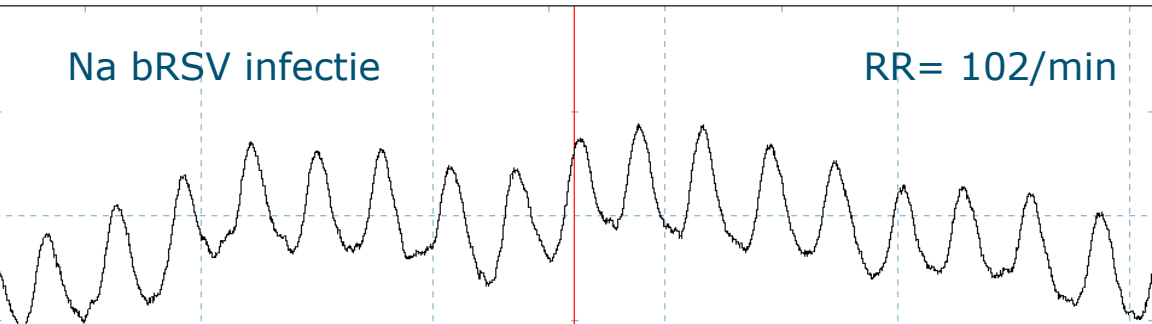
RR= 30/min



Kalf 93 - 2012-12-17

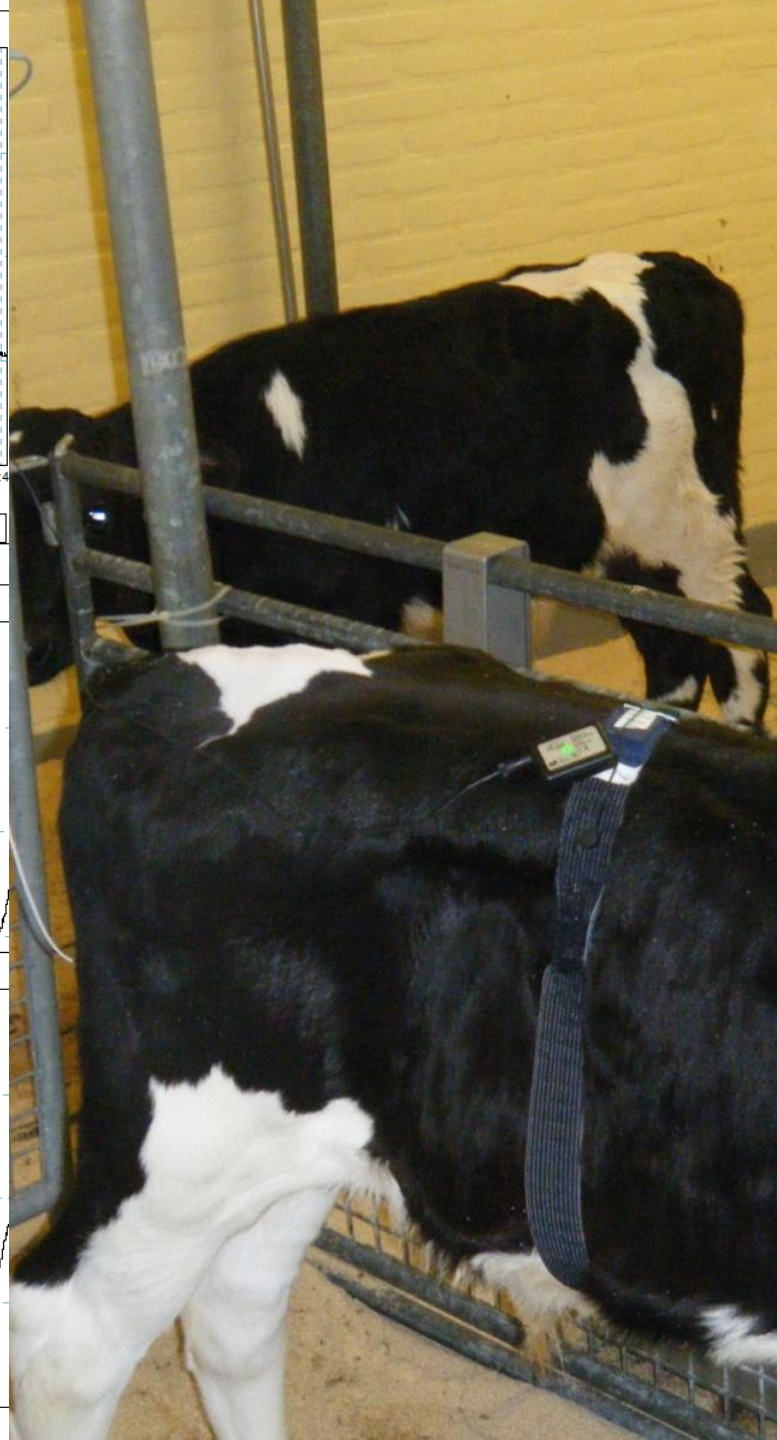
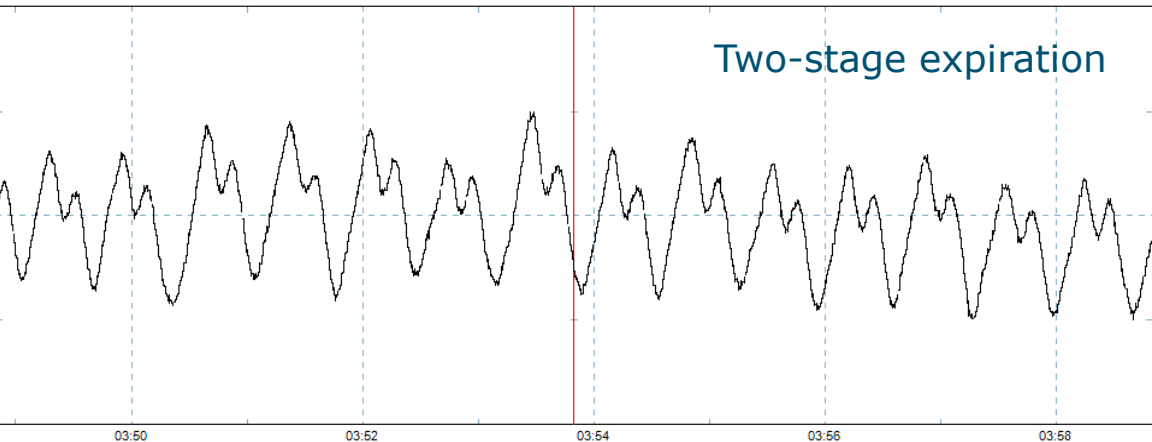
Na bRSV infectie

RR= 102/min



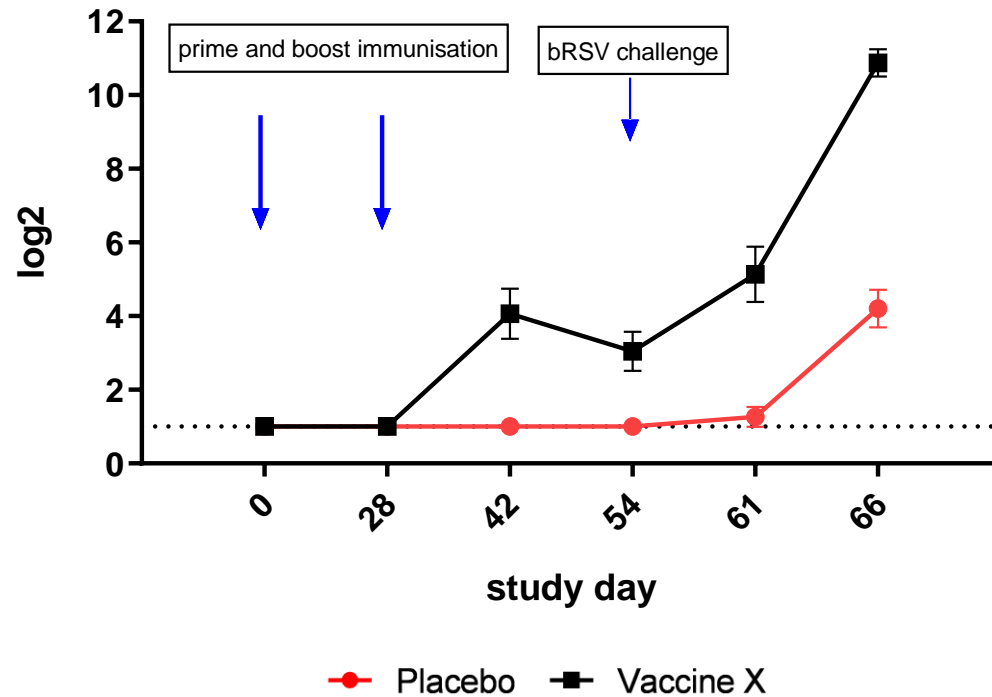
Kalf 96 - 2012-12-19

Two-stage expiration

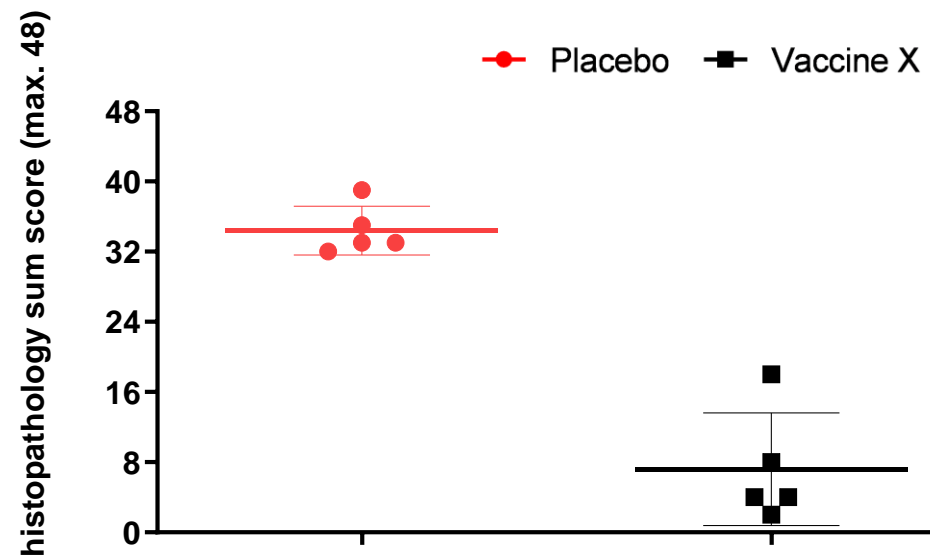
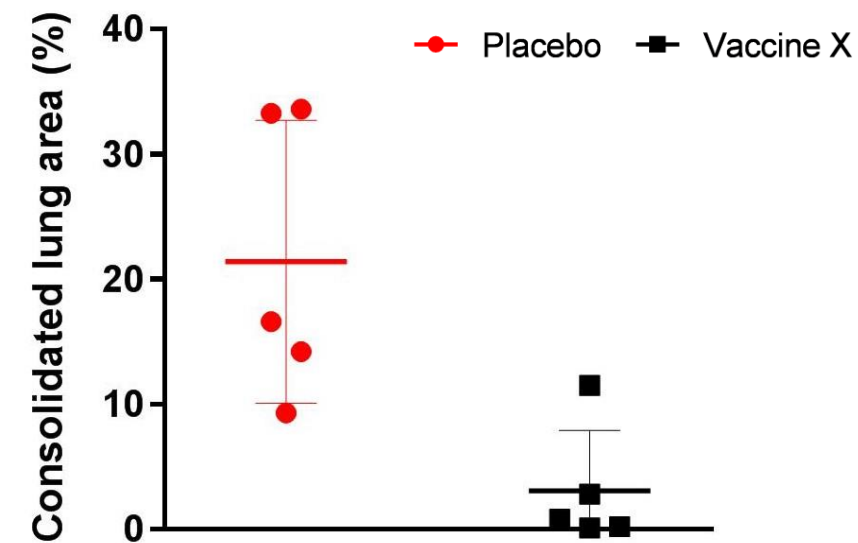
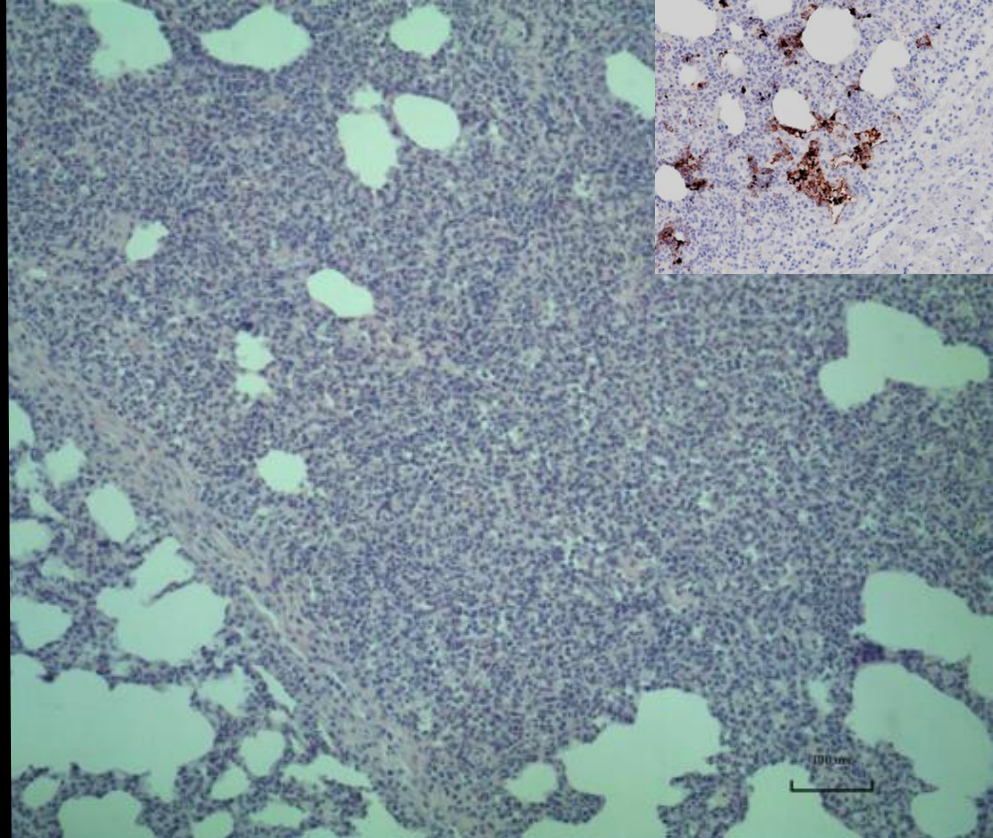


# Monitoring van de immuunrespons

bRSV neutraliserende antistof titers



# Long pathologie



**Ons bRSV infectiemodel wordt ingezet voor  
veterinair & humaan vaccinonderzoek  
en draagt bij aan  
kansen voor kalveren & kinderen**



# Vragen?

