

Pre-registration efficacy studies of a novel marker vaccine against classical swine fever on target animals

R. Lévai^{1*}, T. Barna¹, K. Fábián¹,
S. Blome², K. Belák³, Á. Bálint⁴,
F. Koenen⁵, G. Kulcsár¹,
A. Farsang^{1**}

1. Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága
H-1107 Budapest, Szállás utca 8.

*E-mail: levair@neh.gov.hu

2. Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Germany

3. National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden

4. Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, Budapest, Magyarország

5. Veterinary and Agrochemical Research Centre, Ukkel, Belgium

** Jelenlegi cím: Ceva-Phylaxia Zrt., Budapest, Magyarország

Újonnan kifejlesztett, klasszikus sertéspestis elleni markervakcina regisztrációs hatékonysági vizsgálata

Lévai Réka^{1*}, Barna Tímea¹, Fábián Katalin¹, Sandra Blome², Belák Katinka³, Bálint Ádám⁴, Frank Koenen⁵, Kulcsár Gábor¹, Farsang Attila^{1**}

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők klasszikus sertéspestis (KSP) ellen újonnan kifejlesztett markervakcina hatékonyságát vizsgálták fertőzőes kísérletekben hathetes malacokon. Az oltatlan kontroll csoportokkal ellentétben a kezelt csoportokat izomba oltva (im.), vagy szájon át (p.o.) immunizálták. A vakcinázást követő 14. napon a malacokat oronasalisan fertőzték virulens KSP-vírus törzsszel. Az im. alkalmazott vakcina a kezelt állatokban megfelelő védettséget biztosított, míg a p.o. alkalmazás csak részleges védelmet nyújtott. Megállapították továbbá, hogy az anyai ellenanyagok jelenléte károsan befolyásolta a vakcinajelölt hatékonyságát, ami azonban nagymértékben függött az alkalmazás módjától.

SUMMARY

Background: Classical swine fever (CSF) or hog cholera is a highly contagious and devastating disease of Suidae caused by an enveloped single-stranded RNA virus (CSFV) of the family Flaviviridae, genus Pestivirus. CSF has vast economic and trade significance all over the world, and it has the massive potential to spread rapidly from country to country. This is the reason why the World Organisation for Animal Health has listed CSF as a Notifiable Disease and it is also considered a transboundary animal disease.

Objective: The objective of the present studies was to determine the efficacy of a single dose of a newly developed marker vaccine candidate against CSF, administered intramuscularly or orally in 6-week-old domestic piglets with and without maternally derived antibodies (MDAs) against Pestiviruses, to provide protection against a challenge with the highly virulent CSFV strain "Koslov" 14 days post vaccination.

Materials and Methods: In both experiments two test groups were formed with 15 animals each, one group for intramuscular (im.), while another one for oral (p.o.) immunisation. The control groups contained 10 animals as unvaccinated controls, respectively. All piglets were oronasally challenged with the highly virulent CSF virus (CSFV) strain "Koslov" 14 days post-vaccination.

Results and Discussion: The vaccine candidate when administered im. provided complete protection in MDA- animals, while p.o. administration triggered only partial protection. Furthermore, we found that the presence of the MDAs had negative effect on the efficacy of the vaccine candidate. However, this was greatly influenced by the route of administration. Based on our observations, im. administration is recommended to achieve better immune response during the CSF control programs. The vaccine candidate met the criteria of Ph. Eur Monograph 0065, "Swine-fever vaccine (live, prepared in cell cultures), classical" 7th Edition. Fulfilling these validity criteria is a key step in the registration procedure for a vaccine candidate.

A klasszikus sertéspestis a házisertés (*Sus scrofa domestica*) és a vaddisznó (*Sus scrofa*) ragályos, nagy gazdasági kártétellel járó, vírus által okozott betegsége. A klasszikus sertéspestis vírusa (KSPV) a *Flaviviridae* család *Pestivirus* nemébe tartozó, burkos, egyszálú, pozitív irányultságú RNS genommal rendelkező kórokozó (7, 31). A betegség jellegzetes, heveny formája általános lázas tünetekben, a hátulsó végtagok gyengeségében, és a testszerte előforduló, pontszerű vérzésekben nyilvánul meg. A KSP-t az Állategészségügyi Világszervezet (OIE) bejelentési kötelezettség alá tartozó fertőző betegségeként tartja számon.

**A klasszikus sertés-
pestis a házisertés és
a vaddisznó ragályos,
nagy gazdasági kártétellel járó vírusos
megbetegedése**

**A betegség hazánkban
1895-ben házisertések-
ben jelentkezett először**

**Vaddisznóállományunk
2013-ban nyerte vissza
mentes státuszát**

**A KSP elleni védekezés
az Európai Unió terüle-
tén vakcinázás nélkül,
igazgatási eszközökkel
történhet**

**A jelenleg elérhető vak-
cinák nem rendelkeznek
DIVA-lehetőséggel**

ELŐFORDULÁS

A betegség hazánkban 1895-ben házisertésekben jelentkezett először a kőbányai sertéshizlaldákban, ahol tömeges elhullást okozott. Az 1960-as években indított nagyszabású mentesítési program eredményeként Magyarország házisertés-állománya 1972-re mentessé vált a betegségtől, hasonlóan számos, más európai országhoz, ahol az 1970-es évek elejére sikerült a fertőzéstől megszabadulni. Az 1980-as évektől a betegség azonban az európai kontinensen ismét felütötte a fejét, és azóta számos ország vaddisznóállományában endémiássá vált (20, 23, 24). Ezzel párhuzamosan a betegség klinikai képe megváltozott. Az utóbbi évtizedekben megjelent egy jóval enyhébb lefolyású forma, amelyet leginkább a vaddisznók körében terjedő vírustörzsek okoznak. Ennek következtében az újabb járványesetek korai észlelése jóval nehezebbé vált, holott a múltban lezajlott kitörések tapasztalatait összegezve egy KSPV-vel fertőzött állomány korai felde-
rítése kritikus a későbbi járvány mérete szempontjából (11, 15). Így hiába tettek már eddig is óriási erőfeszítéseket Európában a betegség megfékezésére, a két faj érintkezése állandó KSP-fenyegetettséget jelent a kontinensen. Hazánkban a vaddisznókat érintő legutóbbi járvány 2007. január 22-én kezdődött, az utolsó esetet 2009. október 30-án észlelték. Mentességünket 2013. június 14-én nyertük vissza.

A KSP elleni védekezés tekintetében az Európai Unió területén az esetleges járványhelyzetek felszámolása jelenleg a 2001/89/EK irányelvvel összhangban vakcinázás nélkül, főszabályként igazgatási eszközökkel történhet (1). Az irányelv 19. számú cikke ugyanakkor kivételes körülmények esetén lehetőséget biztosít a vészhelyzeti vakcinázásra (1, 3, 4). Az állatok tömeges leölése által kiváltott etikai problémák és a negatív közvélemény a kiirtásra fordított hatalmas költségekkel együtt újra és újra felveti a vakcinázás szükségességét (12, 22). A fertőzött állomány szomszédságában található telepeken, ill. ahol a betegség endémiásan fordul elő, a járványok elleni védekezésben nélkülözhetetlen segítséget jelenthetnek az oltóanyagok. A jelenlegi vakcinák felhasználhatóságát ugyanakkor nagyban korlátozza, hogy bár az élő, attenuált vírust tartalmazó oltóanyagok általában véve hatékony védelmet biztosítanak, a jelenleg elérhető ilyen típusú vakcinák nem hordoznak megfelelő markert, amely lehetővé tenné az oltott egyedek elkülönítését a fertőzött állatoktól, azaz nem rendelkeznek ún. DIVA-lehetőséggel (DIVA = Differentiating Infected from Vaccinated Animals).

Erre az igényre válaszul REIMANN és mtsai a KSP ellen kifejlesztettek egy olyan újgenerációs markervakcina-jelöltet, amely a KSPV Alfort 187-es törzsének E2 felszíni fehérjéjét expresszázó génszakaszt hordozza a szarvasmarha vírusos hasmenésének vírusába (BVDV), mint vektorba kódolva (26). A vakcinajelölt vírussal oltott sertésekben csak az E2 felszíni fehérje ellen termelődnek KSP-specifikus ellenanyagok, így egyéb immunogén fehérjék (pl. az Erns) alkalmasak lehetnek arra, hogy elkülönítsék a fertőzött egyedeket a vakcinázottaktól.

Mivel a vakcinajelölt előállításánál génszűréses eljárást is alkalmaztak, ezért a vakcina az Unió területén csak ún. centrális engedélyezési eljárás során kaphat forgalomba hozatali engedélyt. Az állatgyógyászati készítmények enge-

délyezése során az elvégzett kísérleteknek meg kell felelniük az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur.) aktuális vonatkozó monográfiáinak. (8, 9).

SAJÁT VIZSGÁLATOK

A szerzők egy marker-vakcina-jelölt hatékonyságát vizsgálták

A szerzők egyik célja az volt, hogy fertőzéses kísérletekben igazolják az egy adag CP7_E2alf markervakcina-jelölt hatékonyságát. Emellett össze kívántuk hasonlítani a vakcinajelölt különböző alkalmazási módok által kiváltott hatásait 6 hetes, pestivírusok elleni anyai ellenanyagoktól mentes, ill. anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokon.

ANYAG ÉS MÓDSZER

KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS

Az egyik kísérlethez anyai ellenanyagoktól mentes (MDA-), a másikhoz anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokat használtak fel (MDA+)

A cikkben ismertetett 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 (13, 16). 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 másikhoz pestivírusok elleni anyai ellenanyagokkal rendelkező (Maternally Derived Antibody positive, MDA+) malacokat használtunk fel. A kísérletben résztvevő seretéket mindkét esetben a brucellózistól, leptospirózistól, PRRS-tól, valamint Aujeszky-betegségtől mentes telepet üzemeltető Pietkert Kft.-től szereztük be. 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”-törzset tartalmazó KSP elleni vakcinával (Ceva-Phylaxia Zrt.) oltottuk. 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.

Az állatok testtömege és a karámok elhelyezkedése alapján mind az MDA-, mind pedig az MDA+ kísérletben véletlenszerűen három kísérleti csoportot hoztunk létre: két, egyenként 15 egyedből álló vakcinázott (TG1, TG2), valamint egy 10 egyedű számláló, oltatlan kontroll csoportot (CG). 14 nappal a vakcinázást követően valamennyi malacot oronasalisan fertőztük a erőteljes virulenciájú „Koslov” KSP-vírustörzssel.

Az állatok testhőmérsékletét a vakcinázást megelőző 3. naptól az azt követő 7. napig (kivéve a kontroll csoport egyedeinek testhőmérsékletét), valamint a fertőzést megelőző 3. naptól a kísérlet lezárásáig digitális hőmérő segítségével naponta mértük. 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 (2), és az ÁTI állatkísérleti szabályzatával összhangban kezeltük. A kísérlet lezárását követően a jogszabályoknak megfelelő módon az állatokat kiirtottuk.

A VAKCINA, A FERTŐZŐ TÖRZS ÉS A NEUTRALIZÁLÓ VÍRUS

A kísérlet során az 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 vakcinajelölt két különböző gyártási tételét a Zoetis Manufacturing & Research Spain, S. L. (akkori nevén Pfizer Olot S. L. U.) spanyolországi gyártóhelyén GMP körülmények között állították elő. A vakcina hatóértéke 100 PD₅₀ volt adagonként.

Im. és szájon át adott vakcinát is alkalmaztak

A vakcinázás után 14 nappal az állatokat virulens KSP-törzssel fertőzték

A fertőzéshez használt nagy virulenciájú „Koslov” KSP vírustörzset a Friedrich-Loeffler Intézet (Insel Riems, Németország) bocsátotta a rendelkezésünkre. A vakcinázás után 14 nappal a felhasználásra kész izolátum 2 ml ($10^{5.5}$ TCID₅₀/ml) adagjával minden állatot oronasalisan fertőztünk.

A pontos titerértékek megállapítása céljából mind a vakcinavírust, mind pedig a fertőzéshez használt KSP-vírustörzset az alkalmazást követően megtitráltuk.

A vírusneutralizáció során használt „Alfort 187” KSP vírustörzset az Európai Klasszikus Sertéspestis Referencialaboratórium (Tierärztliche Hochschule, Hannover, Németország) bocsátotta rendelkezésünkre.

KLINIKAI MEGFIGYELÉSEK

A malacok klinikai tüneteit a módosított Mittelholzer-féle pontrendszer segítségével a vakcinázást megelőző 3. naptól az azt követő 7. napig, valamint a fertőzést megelőző 3. naptól a kísérlet lezárásáig rögzítettük (19).

MINTAVÉTEL

Az immunizálást megelőző 3. napon, továbbá a vakcinázás utáni 14., 18., 21., 24., 28. és 35. napokon alvadásban nem gátolt vért vettünk az állatokból, hogy a malacok pestivírusok elleni ellenanyagoktól mentes (szeronegatív) státuszát, valamint a vakcinázás következtében kialakuló immunválaszt ellenanyag ELISA (HerdChek® CSFV Ab ELISA [IDEXX Laboratories]) és vírusneutralizációs tesztekkel igazolni tudjuk (19). A szérummintákban jelen lévő KSPV 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 és vírusizolálással kimutathassuk a KSPV genomját, ill. igazolhassuk a vírus jelenlétét (17,30,32).

A natív vérmintákat 4 °C-on 10 percig 2000 rpm fordulaton centrifugáltuk, hogy az ELISA- és vírusneutralizációs tesztekhez a savót kinyerhessük. A vírusizoláláshoz és az RT-PCR-hez szükséges lítium-heparinnal alvadásgátolt vérmintákat 4 °C-on 30 percig 6000 ×g fordulaton centrifugáltuk, majd 1:10 arányban antibiotikumot tartalmazó PBS-sel hígítottuk.

SEJTEK ÉS KONJUGÁTUM

A vírusneutralizációs teszthez és a vírusizoláláshoz SK-6 sejtvonalat használtunk, amelyet a NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (ÁDI, Budapest, Magyarország) bocsátott a rendelkezésünkre. A visszatitrálásokhoz szükséges PK-15-sejtvonal az ATCC-katalógusból származik. Ezekhez a tesztekhez gyári, poliklonális FITC CSFV-konjugátumot használtunk.

PATOLÓGIAI, KÓRSZÖVETANI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK

Minden elhullott és kiirtott állatot felboncoltunk, és a tetemekből kórszöveti és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz szervmintákat gyűjtöttünk. A mintákat 4%-os frissen készített pufferolt formaldehid-oldatban 24 órán keresztül fixáltuk, majd a szövetmintákat szokásos kórszöveti eljárással víztelenítettük, paraffinba ágyztuk, metszettük, ill. hematoxilinnal és eozinnal (HE) megfestettük. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat kétlépéses peroxidáz-módszer segítségével (Dako Cytomation EnVision TM+System-HRP Labelled Polymer anti-mouse, DakoCytomation, DK) kereskedelmi forgalomban kapható gpE2 specifikus monoklonális ellenanyaggal végeztük (WH303, VLA, UK).

A VAKCINAJELÖLT HATÉKONYSÁGÁNAK MEGÁLLAPÍTÁSA

A vakcina hatékonysága nem egyenlő a vakcina hatásosságával. A hatásosság csak az előnyöket veszi figyelembe: azaz nyújt-e az oltóanyag megfelelő védel-

Szerológiai, vírusneutralizációs és vírusizolációs vizsgálatokat végeztek

Az elhullott, ill. a kísérlet végén kiirtott állatokat felboncolták, szerveikből kórszöveti és IHC-vizsgálatokat végeztek

Kiszámították a vakcinajelölt hatékonyságát

met vagy sem. A hatékonyság mérése esetében ugyanakkor az előnyök és a kockázatok értékelése együttesen történik.

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).

EREDMÉNYEK

A KÍSÉRLETEKBEN HASZNÁLT VÍRUSTÖRZSEK TITRÁLÁSA

Mindkét kísérlet során a hígítatlan, és az immunizáláshoz használt hígított vakcinavírust, valamint a fertőzéshez használt „Koslov” KSP-vírustörzset is megtitráltuk annak érdekében, hogy az alkalmazáskori pontos titerértéket megismerhessük.

Az MDA- kísérletben a TG2 csoportban használt 081010 termelési számú vakcina hígítás előtti titere $10^{6,07}$ TCID₅₀/ml, a hígítás utáni titere pedig $10^{5,6}$ TCID₅₀/ml volt, emellett az MDA+ kísérletben a 191211 termelési számú vakcinánál a hígítás előtt $10^{6,58}$ TCID₅₀/ml, míg a hígítás után $10^{5,0}$ TCID₅₀/ml titerértékeket mértünk.

Az MDA- kísérletben a TG1 csoportban használt 191010 termelési számú vakcinánál a hígítás előtt $10^{5,5}$ TCID₅₀/ml, míg a hígítás után $10^{4,5}$ TCID₅₀/ml titer-értékeket kaptunk, ugyanakkor az MDA+ kísérletben a VMRD-12-005 termelési számú vakcina hígítás előtti titere $10^{6,8}$ TCID₅₀/ml, míg a hígítás utáni titere $10^{4,8}$ TCID₅₀/ml volt. A fertőzéshez használt „Koslov”-törzs titere $10^{6,1}$, ill. $10^{5,7}$ TCID₅₀/ml-nek bizonyult.

FERTŐZÉS ELŐTTI MEGFIGYELÉSEK

Klinikai tünetek, testhőmérsékletek

A vakcinázást megelőző három napban a malacok mindkét kísérletben egészségesek voltak, klinikai tüneteket vagy testhőmérséklet-emelkedést nem mutattak – kivéve az MDA- kísérletben egy oltatlan kontroll és egy im. vakcinázott malacot, amelyek ebben a három napban lázasnak bizonyultak. Ennek ellenére az állatokat a kísérletből nem zártuk ki, hiszen egyéb tüneteket nem észleltünk rajtuk, és a vizsgáló állatorvos szakvéleménye alapján a kísérlet számára alkalmasnak találtuk azokat. Közvetlenül az immunizálást követően a kezelt állatokban a vakcina alkalmazásához köthető helyi reakciót, vagy szisztémás mellékhatást egyik kísérlet során sem tapasztaltunk.

Ellenanyag-kimutatás

Az MDA- kísérletben az oltatlan kontroll malacok vérsavómintáinak neutralizációs titere a fertőzés előtt végig a kimutathatósági szint (< 10 ND₅₀) alatt volt (1. táblázat). Ugyanakkor a kontroll állatok közül három vérsavójának a neutralizációs titerét a fertőzés napján 10–10, ill. 15 ND₅₀-nek mértük. A vakcinázás után, de még a fertőzés előtt egy im. és hat szájon át vakcinázott malac szérumin-tájának neutralizációs titere a kimutathatósági szint (< 10 ND₅₀) alatt maradt, ugyanakkor három szájon át immunizált állat kivételével a többi oltott malac vérsavójának titere nagyobb volt vagy megegyezett 15 ND₅₀-nel.

A kezelt malacok vakcinázás előtti, ill. a kontroll állatok fertőzés előtti savómin-táiból a kereskedelmi forgalomban kapható HerdChek® CSFV Ab ELISA teszttel KSPV E2-specifikus ellenanyagokat nem tudtunk kimutatni (2. táblázat).

Az MDA+ kísérletben a 14. napon a malacok nagy részében 640 ND₅₀-nél nagyobb neutralizációs titer-értékeket mértünk (1. táblázat).

Víruskimutatás

Mindkét kísérlet összes vizsgált mintája a fertőzést megelőzően vírusizolálással (3. táblázat), antigén ELISA-val (4. táblázat), valamint RT-PCR-rel is negatív eredményt adott.

1. TÁBLÁZAT. A két kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett teljes vérből vírusneutralizációs próbával kapott eredmények
CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; †: elhullott; n/a: nincs adat

TABLE 1. Virus neutralisation results from whole blood samples of different intervention days, regarding the piglets from both studies
CG: control group; TG: treated group; IM: intramuscularly applied; PO: per os applied; †: died; n/a: no data

Csoport	Állat	MDA- kísérlet							MDA+ kísérlet						
		-3. nap	14. nap*	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap	-5. nap	14. nap*	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap
CG	K01	<5	10	<10	160	†			240	960	>1280	n/a	>5120	†	
	K02	<5	15	<10	240	†			60	n/a	960	n/a	>5120	†	
	K03	<5	10	<10	†				240	n/a	1280	n/a	†		
	K04	<5	<10	<10	†				240	960	>1280	>1280	>5120	>5120	>5120
	K05	<5	<10	<10	240	960	960	†	60	640	>1280	>1280	†		
	K06	<5	<10	<10	†				>1280	640	>1280	1280	>5120	†	
	K07	<5	<10	<10	<10	†			30	>1280	1280	>1280	>5120	>5120	†
	K08	<5	<10	<10	n/a	†			480	960	n/a	>1280	>5120	>5120	>5120
	K09	<5	<10	<10	†				80	1280	n/a	>1280	>5120	>5120	5120
	K10	<5	<10	15	120	640	†		240	960	n/a	>1280	>5120	†	
TG1	IM01	<5	15	60	n/a	160	>1280	>1280	120	n/a	>1280	n/a	1920	>5120	>5120
	IM02	<5	15	40	480	160	>1280	>1280	120	n/a	>1280	1280	1920	>5120	>5120
	IM03	<5	60	40	240	>1280	>1280	>1280	240	960	>1280	>1280	3840	3840	>5120
	IM04	<5	15	40	960	1280	>1280	>1280	80	960	n/a	960	1280	>5120	>5120
	IM05	<5	40	120	320	1280	1280	960	320	>1280	n/a	>1280	>5120	>5120	>5120
	IM06	<5	40	30	480	>1280	>1280	960	120	960	n/a	>1280	>5120	>5120	>5120
	IM07	<5	20	240	640	960	960	>1280	480	960	n/a	>1280	1920	5120	>5120
	IM08	<5	30	320	240	240	>1280	>1280	480	640	n/a	1280	>5120	5120	>5120
	IM09	<5	40	960	960	960	960	480	480	960	n/a	1280	1280	1920	3840
	IM10	<5	160	640	320	>1280	>1280	>1280	960	960	n/a	1280	1280	>5120	5120
	IM11	<5	30	80	80	1280	>1280	>1280	480	960	n/a	960	>5120	>5120	>5120
	IM12	<5	30	80	480	480	>1280	>1280	240	>1280	n/a	1280	>5120	>5120	>5120
	IM13	<5	15	240	240	960	640	640	240	>1280	n/a	>1280	5120	>5120	>5120
	IM14	<5	<10	30	640	640	1280	>1280	160	1280	n/a	>1280	1920	>5120	>5120
	IM15	<5	40	160	640	480	>1280	>1280	320	1280	n/a	>1280	2560	2560	3840
TG2	PO01	<5	<10	30	480	320	640	480	15	480	1280	n/a	>1280	>5120	>5120
	PO02	<5	<10	<10	640	†			40	640	>1280	n/a	2560	3840	>5120
	PO03	<5	10	20	160	960	>1280	960	120	960	1280	n/a	>5120	>5120	5120
	PO04	<5	30	20	60	>1280	640	960	40	n/a	960	n/a	>5120	>5120	>5120
	PO05	<5	60	60	240	>1280	>1280	960	160	n/a	>1280	n/a	960	2560	>5120
	PO06	<5	<10	40	160	960	>1280	960	240	960	1280	1280	†		
	PO07	<5	<10	15	60	960	640	1280	40	>1280	1280	>1280	>5120	>5120	>5120
	PO08	<5	10	10	480	960	960	>1280	40	>1280	>1280	1280	>5120	†	
	PO09	<5	20	30	160	>1280	>1280	>1280	480	1280	n/a	1280	>5120	>5120	>5120
	PO10	<5	30	160	160	>1280	>1280	>1280	160	>1280	n/a	>1280	>5120	>5120	†
	PO11	<5	<10	30	240	320	>1280	>1280	960	960	n/a	>1280	>5120	†	
	PO12	<5	15	80	120	640	960	>1280	160	640	n/a	>1280	>5120	†	
	PO13	<5	<10	15	80	480	1280	1280	80	>1280	n/a	1280	<40	>5120	>5120
	PO14	<5	10	30	120	480	>1280	960	320	1280	n/a	1280	>5120	†	
	PO15	<5	30	40	640	>1280	>1280	>1280	120	960	n/a	n/a	3840	>5120	†

FERTŐZÉST KÖVETŐ MEGFIGYELÉSEK

Klinikai tünetek

Az MDA- kísérletben az oltatlan kontroll malacokon klinikai tünetek jelentkeztek a fertőzést követő negyedik naptól

Az MDA- kísérletben az oltatlan kontroll malacokon általános klinikai, ill. a betegségre jellemző tüneteket – mint pl. bágyadság, bőrvérzések, remegés, súlyos idegrendszeri tünetek, egyensúlyzavar, gyenge végtagok – a fertőzést követő negyedik naptól figyeltünk meg. Ezeknek a tüneteknek az intenzitása folyamatosan változott. Három kontroll állat elhullott hat, ill. hét nappal a fertőzést követően, míg a többi kontroll malacot állatjóléti szempontok figyelembe vételével a kísérlet lezárása előtt véglegesen elaltattunk.

2. TÁBLÁZAT. A két kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett szérumbinták ellenanyag ELISA-val kapott OD értékei

CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; -: elhullott; n/a: nincs adat; zöld: negatív; sárga: kétes; piros: pozitív

TABLE 2. OD data resulted from the antibody ELISA tests performed on serum samples of different intervention days, regarding the piglets from both studies

CG: control group; TG: treated group; IM: intramuscularly applied; PO: per os applied; -: died; n/a: no data; green: negative; yellow: doubtful; red: positive

Csoport	Állat	MDA- kísérlet							Csoport	Állat	MDA+ kísérlet							
		-3. nap	14. nap	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap			-5. nap	14. nap	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap	
CG	K01								CG	K01								
	K02									K02								
	K03									K03								
	K04									K04								
	K05									K05								
	K06									K06								
	K07									K07								
	K08									K08								
	K09									K09								
	K10									K10								
TG1	IM01								TG1	IM01								
	IM02									IM02								
	IM03									IM03								
	IM04									IM04								
	IM05									IM05								
	IM06									IM06								
	IM07									IM07								
	IM08									IM08								
	IM09									IM09								
	IM10									IM10			n/a					
	IM11									IM11								
	IM12									IM12								
	IM13									IM13								
	IM14									IM14								
	IM15									IM15				n/a				
TG2	PO01								TG2	PO01								
	PO02									PO02								
	PO03									PO03								
	PO04									PO04								
	PO05									PO05								
	PO06									PO06								
	PO07									PO07								
	PO08									PO08								
	PO09									PO09								
	PO10									PO10								
	PO11									PO11								
	PO12									PO12								
	PO13									PO13								
	PO14									PO14								
	PO15									PO15					n/a			

3. TÁBLÁZAT. A két kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett teljes vérből vírusizolálással kapott eredmények

CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; -: elhullott; n/a: nincs adat; zöld: negatív; piros: pozitív

TABLE 3. Virus isolation results from whole blood samples of different intervention days, regarding the piglets from both studies

CG: control group; TG: treated group; IM: intramuscularly applied; PO: per os applied; -: died; n/a: no data; green: negative; red: positive

Csoport	Állat	MDA- kísérlet							Csoport	Állat	MDA+ kísérlet							
		-3. nap	14. nap	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap			-5. nap	14. nap	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap	
CG	K01								CG	K01	n/a							
	K02									K02	n/a							
	K03									K03	n/a							
	K04									K04	n/a							
	K05									K05	n/a							
	K06									K06	n/a							
	K07									K07	n/a							
	K08									K08	n/a							
	K09									K09	n/a							
	K10									K10	n/a							
TG1	IM01								TG1	IM01	n/a							
	IM02									IM02	n/a							
	IM03									IM03	n/a							
	IM04									IM04	n/a							
	IM05									IM05	n/a							
	IM06									IM06	n/a							
	IM07									IM07	n/a							
	IM08									IM08	n/a							
	IM09									IM09	n/a							
	IM10									IM10	n/a	n/a						
	IM11									IM11	n/a							
	IM12									IM12	n/a							
	IM13									IM13	n/a							
	IM14									IM14	n/a							
	IM15									IM15	n/a							
TG2	PO01								TG2	PO01	n/a							
	PO02									PO02	n/a							
	PO03									PO03	n/a							
	PO04									PO04	n/a							
	PO05									PO05	n/a							
	PO06									PO06	n/a							
	PO07									PO07	n/a							
	PO08									PO08	n/a							
	PO09									PO09	n/a							
	PO10									PO10	n/a							
	PO11									PO11	n/a							
	PO12									PO12	n/a							
	PO13									PO13	n/a							
	PO14									PO14	n/a							
	PO15									PO15	n/a							

4. TÁBLÁZAT. A két kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett szérumminták antigén ELISA-val kapott OD-értékei
CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; -: elhullott; n/a: nincs adat; zöld: negatív; piros: pozitív

TABLE 4. OD data resulted from the antigen ELISA tests performed on serum samples of different intervention days, regarding the piglets from both studies

CG: control group; TG: treated group; IM: intramuscularly applied; PO: per os applied; -: died; n/a: no data; green: negative; red: positive

Csoport	Állat	MDA- kísérlet							Csoport	Állat	MDA+ kísérlet						
		-3. nap	14. nap	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap			-5. nap	14. nap	18. nap	21. nap	24. nap	28. nap	35. nap
CG	K01								CG	K01							
	K02									K02							
	K03									K03							
	K04									K04							
	K05									K05							
	K06									K06							
	K07									K07							
	K08									K08							
	K09									K09							
	K10									K10							
TG1	IM01								TG1	IM01							
	IM02									IM02							
	IM03									IM03							
	IM04									IM04							
	IM05									IM05							
	IM06									IM06							
	IM07									IM07							
	IM08									IM08							
	IM09									IM09							
	IM10									IM10			n/a				
	IM11									IM11							
	IM12									IM12							
	IM13									IM13							
	IM14									IM14							
	IM15									IM15			n/a				
TG2	PO01								TG2	PO01							
	PO02									PO02							
	PO03									PO03							
	PO04									PO04							
	PO05									PO05							
	PO06									PO06							
	PO07									PO07							
	PO08									PO08							
	PO09									PO09							
	PO10									PO10							
	PO11									PO11							
	PO12									PO12							
	PO13									PO13							
	PO14									PO14							
	PO15									PO15			n/a				

Egy p.o. immunizált állatban a fertőzés után súlyos klinikai tünetek léptek fel, emiatt el kellett altatni

Az MDA+ kísérletben az első klinikai tüneteket hat nappal a fertőzést követően figyelték meg

Egy szájon át immunizált állatban a fertőzés után mérsékelt, majd néhány nappal később már súlyos klinikai tüneteket észleltünk: sárgás, híg hasmenést, súlyos idegrendszeri tüneteket, úgy, mint remegést, koordinációs mozgászavarokat (ataxia), görcsrohamokat. Emiatt hét nappal a fertőzést követően a malacot állatjóléti szempontok figyelembe vétele mellett elaltattuk. Ezen kívül a TG1 csoportból még öt, a TG2 csoportból pedig még hat szájon át vakcinázott állat mutatott pár napig mérsékelt klinikai tüneteket, mint pl. enyhe kötőhártya-gyulladás, orrfolyás, gyenge hasmenés, levertség, azonban rövid idő alatt mindegyikük felépült. A többi 22 oltott malac a kísérlet teljes időtartama alatt egészségesnek bizonyult.

Az MDA+ kísérletben az első klinikai tüneteket – mint pl. bággyadtság, hasmenés, étvágytalanság, remegés, súlyos idegrendszeri tünetek, egyensúlyzavar – hat nappal a fertőzést követően, elsősorban a kontroll csoportban észleltük. Az első elhullott állatot a CG csoportban nyolc nappal a fertőzést követően találtuk, majd ezen kívül a kísérlet vége előtt még hat kontroll állat hullott el, három azonban a kísérlet végéig életben maradt. Emellett a 15-ből kilenc szájon át vakcinázott malac is mutatta a betegségre jellemző klinikai tüneteket, és hét még a kísérlet vége előtt el is hullott. A fertőzést követően a TG2 csoport malacai összehasonlítva a TG1 csoporttal jellemzően gyengébbek, étvágytalanabbak voltak. A TG1 csoportból három állatnál jelentkezett bággyadtság, valamint gyenge hasmenés, de mind a három malac még a kísérlet vége előtt felépült.

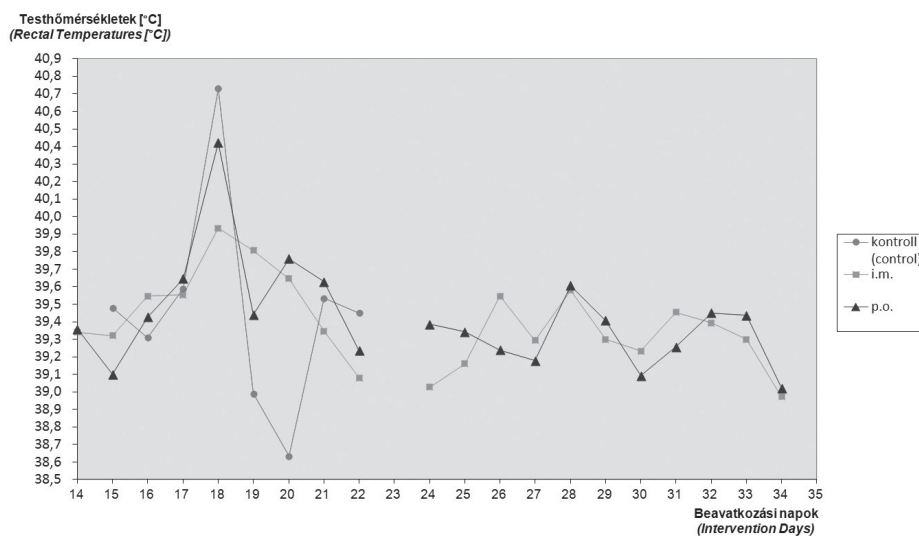
Testhőmérsékletek

Az MDA- kísérletben az átlag rektális testhőmérsékleti görbe csúcsa a fertőzést követő 4. napra esett, ekkor mértük a legtöbb 40,0°C-ot meghaladó értéket (1. ábra). Ez a hőmérsékleti csúcs a kontroll állatokban 40,7°C, a szájon át vakcinázott malacokban 40,4°C, míg az im. oltott állatokban 39,9°C volt.

Az MDA+ kísérletben az átlag rektális testhőmérsékleti görbének két csúcsa is volt: az első a fertőzést követő 5. napon esett (2. ábra). Ez a hőmérsékleti csúcs a kontroll állatokban 39,8 °C, a szájon át vakcinázott malacokban 40,0 °C, míg az im. oltott állatokban 39,7 °C volt. A második csúcs a kontroll és a TG1 csoportoknál a fertőzést követő 14. és 17. napok közé tehető, míg a TG2 csoportban ez a fertőzés után 13–15 nappal jelentkezett, és elérte, ill. meghaladta a 40,0 °C-ot.

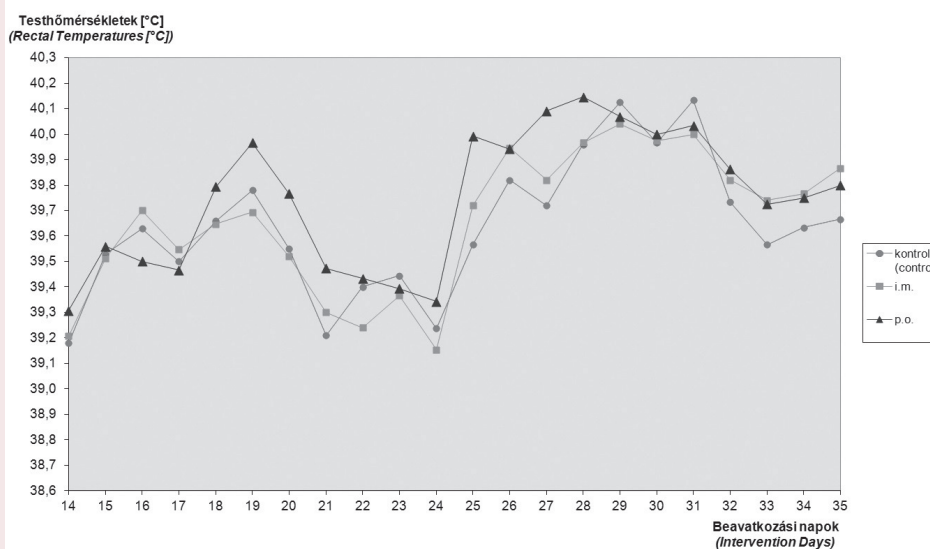
1. ÁBRA. Átlag testhőmérsékleti értékek az MDA- kísérlet kontroll, valamint a két kezelt csoportjára lebontva.

FIGURE 1. Rectal temperature means of the piglets from the control and the treated groups, regarding the MDA- study



2. ÁBRA. Átlag testhőmérsékleti értékek az MDA+ kísérlet kontroll, valamint a két kezelt csoportjára lebontva.

FIGURE 2. Rectal temperature means of the piglets from the control and the treated groups, regarding the MDA+ study



A vakcinázott malacokban a neutralizációs titerértékek a vakcinázást követő második héttől kezdtek el emelkedni

Ellenanyag-kimutatás

Az MDA- kísérletben egy kivétellel az összes kontroll állat vérsavómintájának neutralizációs titera négy nappal a fertőzést követően is még a kimutatható szint ($< 10 \text{ ND}_{50}$) alatt maradt (1. táblázat). Három nap elteltével a még életben lévő öt kontroll malacból négy szérummintájának a titera megemelkedett, és egynél elérte a 960 ND_{50} -es értéket. Ezt az állatot a fertőzést követő 19. napon állatjóléti szempontok figyelembe vételével a kísérlet lezárása előtt véglegesen elaltattuk. A vakcinázott malacok vérsavóinak nagy részében a neutralizációs titerértékek a vakcinázást követő második héttől kezdtek el emelkedni, és a legtöbb esetben elérték, vagy meghaladták a 1280 ND_{50} -es értéket.

Anyai ellenanyagok hiányában az im. vakcina 100%-os, a p.o. 93,34%-os áthangolódást okozott

A kereskedelmi forgalomban kapható HerdChek® CSFV Ab ELISA-teszt eredményei alapján elmondható, hogy a kontroll malacokból vett szérumminták mindegyike a fertőzést követően negatív volt, és mind a tíz állat az elhullásukig szeronegatív maradt (2. táblázat). A TG1 csoportban a vakcinázás után két héttel a 15 szérummintából 12 pozitív, kettő kétes, és egy negatív volt. A négy nappal későbbi mintavétel során nyert savóminták (egy kétes eredményt adó kivételével) már mindegyike pozitív lett, az im. oltott malacok tehát megfelelően áthangolódtak. Ezzel ellentétben a TG2 csoportban az általános szerológiai áthangolódást később, a vakcinázás után 21 nappal tudtuk csak kimutatni. Érdeemes kiemelni, hogy az a p.o. vakcinázott állat, amelyet a súlyos klinikai tünetei miatt állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt elaltattunk, végig szeronegatív maradt. A kapott eredmények alapján a vakcina hatékonysága anyai ellenanyagok hiányában az im. csoportban 100%, a p.o. csoportban pedig 93,34% volt.

Az MDA+ kísérletben a vakcinázás után két héttel valamennyi állat vérsavó-mintájának neutralizációs titere (beleértve a kontroll malacokét is) emelkedni kezdett: az esetek többségében elérték, vagy meg is haladták az 5120 ND₅₀-es értéket (1. táblázat). A fertőzést követően vett minták nagy részét a szövet pusztulása miatt újra kellett vizsgálnunk. Ezeket a vírusneutralizációs próbával kapott eredményeket összehasonlítottuk az ellenanyag ELISA-teszt során kapott eredményekkel, és ezek között sok helyen ellentmondást állapítottuk meg: az ellenanyag ELISA-val kapott eredmények alapján szeronegatív állatok savómintáinak neutralizációs titere ugyanis valószínűtlenül magasnak bizonyult. Mindezek következtében a fertőzés napján, valamint az azutáni negyedik, ill. tizedik napon vett szérummintákat a Friderich-Loeffler Intézetben újrvizsgálták. A kapott eredmények már inkább összhangban voltak az ellenanyag ELISA-val mért eredményekkel, azonban a minták szövetre gyakorolt ismeretlen eredetű toxikus hatása miatt továbbra is nehéz volt a vírusneutralizációs eredmények kiértékelése. Az újramérés alapján a fertőzéskor (14 nappal az immunizálást követően) hat kontroll, egy im. és nyolc szájon át vakcinázott malac vérsavójának neutralizációs titere a kimutathatósági szint (< 10 ND₅₀) alatt maradt, ugyanakkor a maradék négy kontroll és a többi kezelt állat szérummintájának titere enyhén megemelkedett, azonban egyik sem haladta meg a 20 ND₅₀-es értéket. A fertőzés utáni tizedik napra három kontroll állatból vett szérumminta titere tovább emelkedett, és egy esetben ez a 60 ND₅₀-es értéket is elérte. Érdeemes megjegyezni, hogy ez az a három kontroll malac, amely a kísérlet során nem hullott el. Emellett az összes im. és kilenc szájon át vakcinázott állat vérsavójának titere megemelkedett, azonban négy p.o. immunizált malac esetében ez a titer a kimutathatósági szint (< 5–7,5 ND₅₀) alatt maradt, és e közül a négy p.o. vakcinázott állat közül három el is hullott a kísérlet vége előtt.

A kereskedelmi forgalomban kapható HerdChek® CSFV Ab ELISA-teszt eredményei alapján hat kontroll állat a kísérlet időtartama alatt végig szeronegatív volt, azonban a többi négy kontroll malac hét, ill. tíz nappal a fertőzés után szeropozitívra vált (2. táblázat). Az im. vakcinázott állatok a vakcinázást követő 18. naptól kezdtek szerológiailag áthangolódni, és a 21. naptól már mindegyik malac szeropozitív volt. A szájon át immunizált malacok közül a vakcinázás utáni tizedik nap előtt tíz még szeronegatívra bizonyult, és végül a 15-ből összesen kilenc p.o. vakcinázott állat hangolódott át. Érdeemes megjegyezni, hogy a szeronegatív malacok közül hat, míg a később áthangolódtak közül egy hullott el a kísérlet vége előtt. A kapott eredmények alapján a vakcina hatékonysága anyai ellenanyagok jelenlétében az im. csoportban 100%, míg a p.o. csoportban csupán 33,34% volt. Ez utóbbi kicsinek mondható, ami az MDA-k jelentős gátló hatásának tulajdonítható. A módszer így számszerűen mutatja meg azt, hogy az MDA-k és az immunizálás közötti interferencia milyen erős gátló hatású lehet a vakcina hatékonyságára. Emellett

A vakcina hatékonysága anyai ellenanyagok jelenlétében az im. csoportban 100%, míg a p.o. csoportban csupán 33,34% volt

azonban meg kell jegyezni, hogy ennek a számítási módszernek van egy hátránya: nem érzékeny ugyanis az oltatlan csoport morbiditási arányára, azaz nem veszi figyelembe, hogy a fertőzés ellenére például a természetes védettség, vagy jelen esetben az MDA-k jelenléte miatt hány kontroll állat maradt életben. Amíg tehát a vakcinázott csoportban nincsen megbetegedés (vagyis ARV = 0), addig a képlet szempontjából irreleváns, hogy az ARU értéke 1, vagy 0,7.

Víruskimutatás

Az MDA- kísérletben kettő kivételével az összes kontroll állat fertőzés után vett vérmintájából vírusizolálással ki tudtuk mutatni a KSPV-t, és az elhullásukig pozitívak is maradtak (3. táblázat). Ugyanakkor egy im. és két szájon át vakcinázott malacnak a fertőzést követő negyedik napon vett vérmintája is pozitív lett, azonban csak az a p.o. immunizált állat maradt végig pozitív, amelyiket állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt véglegesen elaltattunk.

A kereskedelmi forgalomban kapható HerdChek® CSFV Ag/Serum ELISA-kittel elvégezve a víruskimutatást az összes kontroll állat fertőzés után vett vérmintájában megtalálható volt a KSPV Erns felszíni fehérjeje (4. táblázat). Négy im. és három szájon át vakcinázott malacnak a fertőzést követő negyedik napon vett vérmintája is pozitív lett, azonban ebben az esetben is csak az a p.o. immunizált állat maradt végig pozitív, amelyiket állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt kiirtottunk.

Különös módon minden vizsgált minta – a kontroll állatok vérmintáit is beleértve – RT-PCR-rel negatív lett, ugyanakkor a belső kontrollként használt TKK-vírus plazmidja, a pozitív kontrollként használt „Koslov” és a vakcinajelölt „CP7-E2Alf” vírustörzsek megfelelően működtek, és mind pozitívnak bizonyultak. Mindezek következtében bizonyos mintákat a Friedrich-Loeffler Intézetben valós idejű (real time) RT-PCR-rel újravizsgáltak. Öt kontroll állat fertőzés után négy nappal vett vérmintája PCR-pozitív lett, igazolva a vírus jelenlétét.

Az MDA+ kísérletben hat kontroll állat fertőzés után vett vérmintájából vírusizolálással ki tudtuk mutatni a KSPV-t, és ezek kettő kivételével az elhullásukig pozitívak is maradtak (3. táblázat). A maradék négy kontroll malac végig negatív volt. Ugyanakkor két im. és 11 szájon át vakcinázott malac fertőzést követő negyedik napon vett vérmintája is pozitív lett, és ebből a tizenegyből öt állat az elhullásukig pozitív maradt.

A kereskedelmi forgalomban kapható HerdChek® CSFV Ag/Serum ELISA-kittel kapott eredmények nagyrészt összhangban voltak a vírusizolálással kapott eredményekkel: hét kontroll malac, amelyek a kísérlet vége előtt elhullottak, a fertőzést követő hetedik naptól pozitívak voltak (4. táblázat), míg a többi három a kísérlet egész időtartama alatt negatív maradt. Ezen kívül egy im. és tíz szájon át vakcinázott állat szérummintája volt pozitív, és az utóbbiak közül hét az elhullásukig az is maradt.

Hasonlóan az MDA- kísérlethez, az MDA+ kísérlet lítium-heparinnal alvadásgátolt vérmintáiban sem tudtuk RT-PCR-rel igazolni a vírus-nukleinsav jelenlétét, emiatt bizonyos mintákat a Friedrich-Loeffler Intézetben valós idejű (real time) RT-PCR-rel újravizsgáltak: egy im. és egy szájon át vakcinázott malac mintáját kivéve minden vizsgált minta pozitívnak bizonyult.

Kórbonctani, kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

Az MDA- kísérletben a vakcinázott malacok nem mutattak súlyos kórbonctani elváltozásokat. Abban szájon át vakcinázott malacban azonban, amelyet állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt elaltattunk, súlyos elváltozásokat találtuk, mint pl. vörösvérsejtes beszűrődés jeleit mutató nyirokcsomókat, ill. vérzések, gyulladáshoz vezető bélszakaszokat. A kontroll csoportban a kísérlet vége előtt tízből három állat spontán elhullott, a többi állatjóléti szempontok figye-

Az MDA- kísérletben a vakcinázott malacok nem mutattak súlyos kórbonctani elváltozásokat

**A post mortem vizsgál-
latok minden esetben
igazolták a KSP-re jel-
lemző elváltozásokat**

lembevételével még a kísérlet lezárása előtt kiirtottunk. A kontroll állatokon elvégzett *post mortem* vizsgálatok minden esetben igazolták a KSP-re jellemző elváltozásokat. A malacok súlyosan lesoványodtak, öt malacnál vörösvérsejtes beszűrődés jeleit mutató nyirokcsomókat és gyulladásos bélszakaszokat találtunk, valamint négy állat esetében a bőrben (3. ábra), a vesékben (4. ábra) és a lépben (5. ábra) pontszerű vérezéseket is megfigyeltünk. Két malacnál a bőrben, ill. egy esetében a mandulákban elhalásos területeket is észleltünk. Érdekes módon az egyik kontroll állatban, amely a fertőzést követő hetedik napon erősen lesoványodott állapotban spontán elhullott, a kórboncolás során nem találtunk egyéb kóros elváltozást.



3. ÁBRA. Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malaca. Pontszerű vérezések és elhalásos területek láthatóak a bőrön

FIGURE 3. A control piglet from the MDA- study. Petechiae and lesions can be seen in the skin



4. ÁBRA. Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett vese. Pontszerű vérezések láthatóak a vese kéregállományában

FIGURE 4. A kidney from one control piglet from the MDA- study. Petechiae can be seen in the kidney cortex



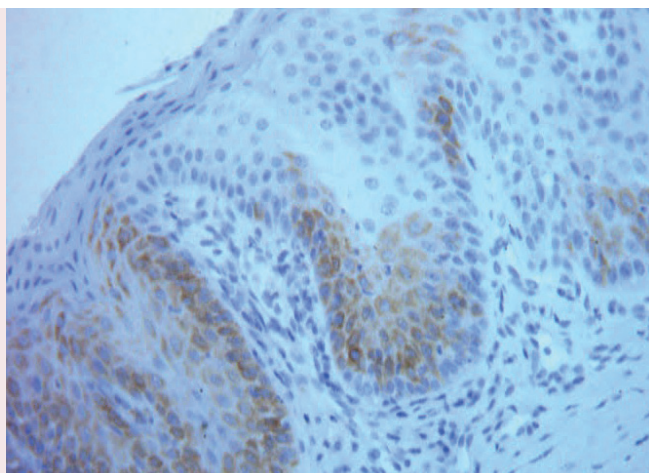
5. ÁBRA. Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett lép. Pontszerű vérezések láthatóak

FIGURE 5. A spleen from one control piglet from the MDA- study. Petechiae can be seen

Jellemzően a szájon át vakcinázott állatok között, de mérsékeltten az im. vakcinázottak esetében is találtunk általánosan előforduló kórszövet-tani elváltozásokat, mint pl. reaktív lymphocytás nyirokcsomó-gyulladás, eozinophil granulocytás bélgyulladás, valamint enyhe szövetközi tüdőgyulladás. A kontroll állatokban az elváltozások súlyosabbak voltak: az összes malac esetében a lép, ill. a nyirokcsomók lymphoid atrófiáját, nem gennyes agyhártya- és agyvelőgyulladást,

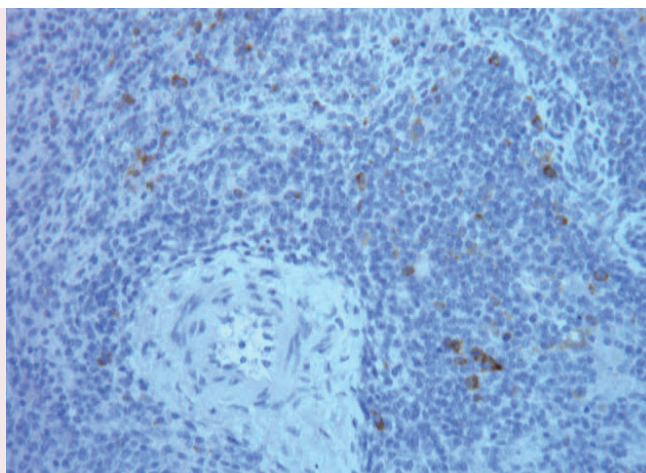
valamint hörgő- és tüdőgyulladást, két esetben pedig elhalásos mandulagyulladást állapítottunk meg.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során kettő szájon át vakcinázott malac kivételével egyik oltott állat sem mutatott pozitív immunfestődést. A kettő malac közül az egyiknek a mandulájából vett minta bizonyult pozitívnak, míg a másik állatnak (amelyet állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt extermináltunk) az agyvelője kivételével minden vizsgált mintája erősen pozitív reakciót adott. A kontroll malacokból vett minden minta esetében erősen pozitív immunfestődést tapasztaltunk (6. ábra, 7. ábra).



6. ÁBRA. Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett mandula felületi hámsajtjeinek citoplazmájában a KSP-antigén intenzív festődése látható
IHC., 1080x

FIGURE 6. A tonsil from one control piglet from the MDA-study. Strong positive immunohistochemical reaction can be seen in the cytoplasm of the epithelial cells
IHC., 1080x



7. ÁBRA. Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett lép makrofágjainak és retikulocitáinak citoplazmájában a KSP-antigén intenzív festődése látható
IHC., 540x

FIGURE 7. A spleen from one control piglet from the MDA-study. Strong positive immunohistochemical reaction can be seen in the cytoplasm of the macrophages and reticulocytes
IHC., 540x

Az MDA+ kísérlet kontroll csoportjában tízből hét állat hullott el spontán

Mindkét vakcinázott csoport malacaiban voltak általánosan előforduló kórszöveti elváltozások

Az MDA+ kísérlet kontroll csoportjában tízből hét állat hullott el spontán. Ezekben a malacokban megfigyelhetőek voltak a betegségekre jellemző kórszöveti elváltozások: a pontszerű vérzések főleg a vesék kéregállományában, de vörösvérsejtes beszűrődés jeleit mutató nyirokcsomókat és elhalásos mandulákat is megfigyeltünk minden elhullott állatban. Két malacban ezen kívül a szívburok alatt, ill. egynél a dura mater alatt pontszerű vérzéseket is észleltünk. Ugyanakkor a betegségekre jellemző tünetek a szájon át vakcinázott csoportban is megjelentek: a hét elhullott állat esetében vörösvérsejtes beszűrődés jeleit mutató nyirokcsomókat, valamint pontszerű vérzéseket láttunk, jellemzően a bőrben.

A kontroll állatok mellett mindkét vakcinázott csoport malacaiban találtunk ezen kívül általánosan előforduló kórszöveti elváltozásokat, úgy mint az eozinophil granulocyták felszaporodásával járó reaktív nyirokcsomó- és mandulagyulladást, eozinophil granulocytás bélgyulladást, diffúzan bővérű veséket és szövetközi vesegyulladást, a lépben lymphoid szövetburjánzást és extramedullaris vérképzést, valamint enyhe szövetközi tüdőgyulladást. Ezen kívül a kontroll és szájon át vakcinázott csoport agyvelőmintáiban túlnyomórészt multifokális gliasejt-proliferációt és mononuclearis perivasculitist észleltünk. Érdeemes megjegyezni, hogy ezek az elváltozások jellemzően nem voltak súlyosabbak a kontroll állatokban.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során négy kontroll és négy szájon át vakcinázott malacból vett minden minta, míg három további kontroll, ill. szájon át vakcinázott állatban a vesékből és az agyvelőből vett minták kivételével a többi szervminta esetében mérsékelt vagy erősen pozitív immunfestődést tapasztaltunk. A maradék három kontroll malac, ill. az im. oltott állatok egyike sem mutatott pozitív immunfestődést.

MEGVITATÁS

Egy hatékony DIVA-tulajdonságú vakcina kifejlesztésére jelentős piaci igény mutatkozik

Figyelembe véve a KSP állategészségügyre és a gazdaságra gyakorolt hatásait, egy megfelelő, DIVA-tulajdonságú vakcina kifejlesztésére jelentős piaci igény mutatkozik (21). A fertőzött területen élő állatok megelőző leölése kis vagy közepes sűrűségű sertéspopulációk esetében lehetséges, azonban ennek megvalósítása nagy állatsűrűségű állományok vonatkozásában erősen kérdéses (21). A MEUWISSEN és mtsai által elvégzett modellszámítások alapján világossá vált, hogy egy a KSP-hez hasonló határokön átívelő betegség, mint a ragadós száj- és körömfájás megfékezésére kizárólag leölést, vagy a leölés mellett vésvakcinázást is bevető stratégiák közül ez utóbbi alkalmazása potenciálisan kevesebb leölt állatot eredményezhet (18). Mivel az optimális leölés és vésvakcinázás végrehajtásának előfeltétele egy jó minőségű markervakcina és a hozzá kapcsolódó DIVA-tesztek megléte (6, 33), e téren intenzív kutatások zajlanak.

A vakcinákat a lehető legfiatalabb életkorban, az anyai ellenanyagok csökkenő mennyiségének árnyékában kell alkalmazni ahhoz, hogy a célállatokat már fiatal korban megvédhessük a fertőző betegségekkel szemben. Ugyanakkor ezen ellenanyagoknak a vakcinázás hatékonyságára gyakorolt negatív hatását nem hagyhatjuk figyelmen kívül.

A vizsgált vakcinajelölt egy kiváló DIVA-tulajdonságú kiméra Pestivírus

A CP7_E2alf vakcinajelölt egy kiváló DIVA-tulajdonságú kiméra Pestivírus, ugyanis a citopatogén hatással rendelkező BVDV „CP7” törzsén alapul, ami a KSPV E2 felszíni fehérjéjét expresszálja (26). A kereskedelmi forgalomban kapható KSPV specifikus Erns ELISA (Prionics Lelystad) így alkalmas a CP7_E2alf vakcinajelölttel oltott egyedeknek a fertőzött állatoktól való elkülönítésére.

Annak érdekében, hogy mindkét kísérletet a leginkább standardizált körülmények között végezhessük el, ezért azokat a Ph. Eur. 7. kiadásának 0065-ös monográfiájával összhangban (9) állítottuk be. Az ettől való egyetlen eltérés az MDA+ kísérletben volt, hiszen itt Pestivírusok ellen termelt anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokat használtunk fel, a kísérlet minden egyéb paramétereinek beállítása azonban ebben az esetben is követte a Ph. Eur. vonatkozó követelményeit, és így a két kísérlet az eltérő MDA státuszú malacokat nem számítva teljesen azonos volt. Vakcinázáskor a célállaton végzett hatékonysági vizsgálatoknak megfelelően a vizsgált vakcina minimum titerét alkalmaztuk adagonként. Az állatok immunizálása nem eredményezett helyi reakciót, vagy nem várt mellékhatásokat. A fertőzéshez az erőteljes virulenciájú „Koslov” KSP vírustörzset használtuk, hogy az immunizálásra és a fertőzésre adott immunválaszt megfelelően el tudjuk különíteni (6, 33).

Az anyai ellenanyagoktól mentes malacokkal összehasonlítva az MDA+ kísérletben vizsgált malacokban a klinikai tünetek megjelenésében és alakulásában világos különbségek mutatkoztak meg (13). Az MDA- kísérletben a fertőzést követő negyedik és ötödik naptól mindegyik kontroll állatban megjelentek a betegsége jellemző klinikai tünetek, és a CG csoport összes állata a kísérlet lezárása előtt kivétel nélkül elhullott (16). Ezzel szemben az MDA+ kísérlet kontroll malacai közül csupán hat állat mutatta a KSP jellegzetes klinikai tüneteit, és a kísérlet lezárása előtt csupán 70%-uk hullott el. Három kontroll malacban a fertőzést követően megjelentek az E2 glikoproteinre specifikus ellenanyagok, és a kísérlet végéig életben maradtak. Ráadásul egyik kontroll állat testhőmérséklete sem emelkedett 41,0 °C fölé.

Az MDA+ kísérlet kontroll malacai közül csupán hat állat mutatta a KSP jellegzetes klinikai tüneteit

A Ph. Eur. 0065-ös monográfiája szerint a kísérlet érvénytelen, amennyiben a fertőzés követő 21. nap előtt 50%-nál kevesebb kontroll állat mutatja a súlyos KSPV fertőzés jellegzetes tüneteit, vagy hullik el, ill. ha kontroll csoport malacainak kevesebb, mint 100%-ánál jelentkeznek KSP klinikai tünetei. („The test is not valid if fewer than 50 per cent of the control piglets display typical signs of serious infection with swine-fever virus, including cutaneous lesions, or die, and if fewer than 100 per cent of the control piglets show clinical signs of disease within the 21 days following challenge.”) A kísérlet validitása szempontjából azonban az MDA+ állatok esetében nem követelmény, hogy a fertőzés teljes egészében megfeleljen a fent említett monográfia által támasztott követelményeknek, ugyanakkor a két vizsgálatunk későbbi összehasonlíthatóságát szem előtt tartva döntöttünk az azonos kísérleti elrendezés mellett (13, 16).

RANGELOVA és mtsai hasonlóan enyhe klinikai eltéréseket és csökkent mortalitást figyeltek meg egy korábbi kísérletükben, amiben C-törzset tartalmazó vakcinával immunizált kocák utódait vizsgálták. A mérsékelt klinikai tünetek és a kis arányú mortalitás magyarázható az anyai ellenanyagok védőhatásával (25).

Az MDA- kísérletben az immunizált malacok közül öt im. és hat szájon át vakcinázott állat esetében tapasztaltunk mérsékelt klinikai elváltozásokat, kivéve egy szájon át vakcinázott malacot, amelyet a súlyos KSP-re jellemző klinikai tünetek miatt hét nappal a fertőzést követően extermináltunk. Az MDA- kísérletben részt vevő összes malac esetében a vakcinázás, a klinikai tünetek, a kórbonctani és kórszövet-tani elváltozások, valamint az immunhisztokémiai eredmények összhangban voltak. Mindez arra utal, hogy az általunk alkalmazott kísérleti elrendezés, ideértve a fertőzéshez használt vírustörzset és annak titerét is, megfelel egy potenciális vakcinajelölt hatékonyságának vizsgálatára (16).

Az MDA+ kísérletben azonban a vakcinázott malacok esetében már nehezebb egyértelmű következtetéseket levonni. Azt megállapíthatjuk, hogy az im. alkalmazott vakcina megfelelő védelmet nyújtott, hiszen megelőzte a mortalitást, értékelhetően csökkentette a klinikai tünetek megjelenését és a vírus mennyiségét a vérben, ill. megnövelte az E2 glikoproteinre specifikus ellenanyagok mennyiségét. Ugyanakkor a CG csoporthoz hasonlóan kilenc, szájon át vakcinázott malac esetében is megfigyeltünk a KSP-re jellemző mérsékelt, vagy súlyos kórbonctani, kórszövet-tani, ill. immunhisztokémiai elváltozásokat, majd ezek közül hét állat a kísérlet vége előtt spontán el is hullott.

VAN OIRSCHOT és mtsai megállapították, hogy járványkitörés esetén egy potenciális vakcina hatékonysága a vírusszaporodás és -ürítés mérséklésében mutatkozik meg (29), aminek vizsgálata az itt bemutatott két kísérletnek nem volt ugyan célja, de GABRIEL és mtsai igazolták, hogy a kísérleti állatokból a CP7_E2alf vakcinajelölt nem ürült (14).

Mindezeket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy több kutatócsoport által kapott eredményekhez hasonlóan (6, 10, 27) a p.o. alkalmazott vakcina a fertőzéssel szemben ezekben az állatokban csak részleges védettséget volt képes nyújtani, ellenben az im. oltott malacok mindegyikében teljes védettséget adott (5). Ezek az eredmények meglepőek lehetnek, mivel a szájon vagy orron át felvett KSPV elsődlegesen a mandulákban szaporodik el, emiatt a szájon át történő vakcinázást hatékonyabb alkalmazási módnak vártuk. A p.o. vakcinázás kivitelezése azonban az im. alkalmazáshoz képest nehezebb volt, ami miatt a vakcina pontos adagolása kevésbé volt garantálható. Emellett a protektív immunválasz kialakulása ebben az esetben hosszabb ideig is eltarthat, ami még bizonytalanabbá teszi a szájon át történő vakcinázásra adott reakciót. Mivel a p.o. alkalmazás hasonlóságot mutat a természetes oronasalis fertőzéssel, emiatt a vakcinajelölt is elsődlegesen a mandulákban szaporodott el (28). Az MDA+ kísérletben ezért az anyai ellenanyagok nagyobb valószínűséggel

A p.o. alkalmazott vakcina a fertőzéssel szemben csak részleges védettséget volt képes nyújtani, szemben a teljes védettséget adó im. oltással

Az MDA+ kísérlet valamennyi malacában kevesebb és mérsékeltebb klinikai tünet alakult ki

Az MDA-k rontották a vakcinajelölt hatékonyságát p.o. alkalmazás esetén

léphettek keresztreakcióba a vakcina által indukált antitestekkel annál, mint ahogyan azt az im. alkalmazás esetében tapasztaltuk. Ezen kívül érdemes még megjegyezni, hogy az MDA- kísérletben megfigyeltekhez képest az MDA+ kísérlet valamennyi malacában kevesebb és mérsékeltebb klinikai tünet alakult ki (16), ami arra enged következtetni, hogy az említett keresztreakció kialakulásával párhuzamosan ezek az anyai ellenanyagok képesek a malacokban bizonyos fokú védelmet is nyújtani a KSPV fertőzéssel szemben. Ezek a megállapítások azonban további vizsgálatokat igényelnek.

A CP7_E2alf vakcinajelölt hatékonyságát Pestivírusok elleni anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokban ugyanakkor több csoport is vizsgálta már korábban (10, 25), a kísérleti elrendezés miatt azonban az itt bemutatott vizsgálat ezektől eltér: ugyanis ez az első olyan MDA+ kísérlet, amelyet az Európai Gyógyszerkönyvvel összhangban, „Thiverval” KSP-törzsszel vakcinázott kocáktól származó 6 hetes malacokkal végeztek (8, 9).

Az MDA- kísérlet eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy szeronegatív malacok esetében a CP7_E2alf vakcinajelölt a különböző alkalmazási módok sajátosságait figyelembe véve az immunizált állatokban megfelelő védelmet nyújtott a kísérleti fertőzéssel szemben, és ígéretes eszköz lehet a KSP hatékony legyőzésében.

Az említett megállapítások azonban csak részben érvényesek, amennyiben anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokat immunizálunk, az MDA-k ugyanis károsan befolyásolták a markervakcina-jelölt hatékonyságát. Ez a negatív hatás ugyanakkor nagyban függött a vakcina alkalmazási módjától, hiszen az im. oltott MDA+ állatok esetében a vizsgált készítmény teljes mértékben megakadályozta az elhullást, értékelhetően csökkentette a klinikai tüneteket és a vírus szaporodását a vérben, valamint megnövelte a malacokban a vakcina ellen termelt ellenanyagok mennyiségét. Annak az esélye, hogy az Európai Unió területén egy jövőbeli KSP járványkitörés MDA+ malacokat érintsen, elenyésző, ugyanakkor nem elképzelhetetlen, véleményünk szerint ezért nélkülözhetetlenek azok a kutatások, amelyek ezt a forgatókönyvet is figyelembe veszik.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindkét kísérlet anyagi támogatását az Európai Közösség 7. keretprogramja (FP7/2007–2013) biztosította. Támogatási megállapodás száma: 227003 CP-FP (CSFVgoDIVA). A szerzők köszönetüket fejezik ki az állatházban és a laboratóriumban dolgozó valamennyi kollégának az általuk elvégzett kiemelkedő munkájért. Külön köszönettel tartozunk PROF. DR. SOÓS TIBORNAK és PROF. DR. BELÁK SÁNDORNAK a szakmai lektorálásban nyújtott segítségükért.

IRODALOM

1. ANONYMOUS: A Tanács 2001/89/EK irányelve a klasszikus sertéspéstit elleni védekezésre irányuló közösségi intézkedésekről. Az *Európai Közösségek Hivatalos Lapja*, 2001. 03/34. kötet, L 316/5.
2. ANONYMOUS: Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről. Az *Európai Közösségek Hivatalos Lapja*, 2010. L 276/33.
3. ANONYMOUS: Commission decision of approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of classical swine fever. SANCO/2507/2001 Rev. 2. Commission of the European Communities, Brussels, 2002.
4. ANONYMOUS: Report from the scientific veterinary committee on guidelines for a classical swine fever emergency vaccination programme. Document VI/ 7389/94-EN. Commission of the European Communities, Brussels, 1994.
5. BELÁK, K. – KOENEN, F. et al.: Comparative studies on the pathogenicity and tissue distribution of three virulence variants of classical swine fever virus, two field isolates and one vaccine strain, with special regard to immunohistochemical investigations. *Acta. Vet. Scand.*, 2008. 50. 34.
6. BLOME, S. – GABRIEL, C. et al.: Efficacy of marker vaccine candidate CP7_E2alf against challenge with classical swine fever virus isolates of different genotypes. *Vet. Microbiol.*, 2014. 169. 8–17.
7. Classical swine fever. OIE general disease information sheets. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/CSF-EN.pdf [site accessed 30.05.2014].
8. COUNCIL OF EUROPE: Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera [chapter 5.2.7]. *European Pharmacopoeia*, Strasbourg 2010. 7th ed. 538.

9. COUNCIL OF EUROPE: Swine-fever vaccine (live, prepared in cell cultures), classical [vaccines for veterinary use]. *European Pharmacopoeia*, Strasbourg 2010. 7th ed. 940–941.
10. EBLÉ, P. L. – QUAK, S. et al.: Efficacy of CSF vaccine CP7.E2alf in piglets with maternally derived antibodies. *Vet. Microbiol.*, 2014. 174. 27–38.
11. ELBER, A. R. – STEGEMAN, A. et al.: The classical swine fever epidemic 1997–1998 in The Netherlands: descriptive epidemiology. *Prev. Vet. Med.*, 1999. 42. 157–184.
12. FARSANG, A. – KULCSÁR, G.: Extraneous agent detection in vaccines – a review of technical aspects. *Biologicals*, 2012. 40. 225–230.
13. FARSANG, A. – LÉVAI, R. – BARNA, T. – FÁBIÁN, 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*, 2017. 45. 85–92.
14. GABRIEL, C. – BLOME, S. et al.: Towards licensing of CP7.E2alf as marker vaccine against classical swine fever – duration of immunity. *Vaccine*, 2012. 30. 2928–2936.
15. HORST, H. S. – HUIRNE, R. B. – DIJKHUIZEN, A. A.: Risks and economic consequences of introducing classical swine fever into the Netherlands by feeding swill to swine. *Rev. Sci. Tech.*, 1997. 16. 207–214.
16. LÉVAI, R. – BARNA, T. – FÁBIÁN, K. – BLOME, S. – BELÁK, K. – BÁLINT, Á. – 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*, 2015. 43. 92–99.
17. LIU, L. – XIA, H. – BELÁK, S. – BAULE, C.: TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *J. Virol. Methods*, 2008. 154. 82–85.
18. MEUWISSEN, M. – ASSELDONK, M. ET AL.: Epidemic disease risk financing in a protective vaccination framework. *Rev. Espanola Estud. Agrosociales Pesq.*, 2009. 221. 151–173.
19. MITTELHOLZER, C. – MOSER, C. et al.: Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet. Microbiol.*, 2000. 74. 293–308.
20. MOCsÁRI E. – MOLNÁR T.: Újabb ismeretek a sertéspestisről. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1994. 49. 134–139.
21. MOENNIG, V.: Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet. Microbiol.*, 2000. 73. 93–102.
22. O'BRIEN, D. – ZANKER, S.: Animal vaccination and the veterinary pharmaceutical industry. *Rev. Sci. Tech.*, 2007. 26. 471–477.
23. ÓSZ Gy.: Visszatekintés a sertéspestis elleni küzdelem történetére a jubiláló szaklapunk tükrében. I. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1978. 33. 741–745.
24. ÓSZ Gy.: Visszatekintés a sertéspestis elleni küzdelem történetére a jubiláló szaklapunk tükrében. II. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1979. 34. 197–202.
25. RANGELOVA, D. – NIELSEN, J. et al.: Efficacy of marker vaccine candidate CP7.E2alf in piglets with maternally derived C-strain antibodies. *Vaccine*, 2012. 30. 6376–6381.
26. REIMANN, I. – DEPNER, K. et al.: An avirulent chimeric pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, 2004. 322. 143–157.
27. RENSON, P. – LE DIMME, M. et al.: CP7.E2alf oral vaccination confers partial protection against early classical swine fever virus challenge and interferes with pathogeny-related cytokine responses. *Vet. Res.*, 2013. 44. 9.
28. TIGNON, M. – KULCSÁR, G. – HAEGEMAN, A. – BARNA, T. – FÁBIÁN, K. – LÉVAI, R. – VAN DER STEDE, Y. – FARSANG, A. – VRANCKEN, R. – BELÁK, K. – KOENEN, F.: Classical swine fever comparison of oronasal immunisation with CP7.E2alf marker and C-strain vaccines in domestic pigs. *Vet. Microbiol.*, 2010. 142. 59–68.
29. VAN OIRSCHOT, J. T.: Hog cholera. In: STRAW, B. E. – D'ALLAIRE, S. et al. (ed.): *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1992. 159–172.
30. VILCEK, S. – HERRING, A. J. et al.: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, 1994. 136. 309–323.
31. WENGLER, G. – BRADLEY, D. W. et al.: Flaviviridae. In: MURPHY, F. A. – FAUQUET, C. M. et al. (ed.): *Virus taxonomy*. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Verlag, New York, 1995. 415–427.
32. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE): Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th edition. Paris, 2008.
33. XIA, H. – HARIMOORTHY, R. et al.: Differentiation of classical swine fever virus infection from CP7.E2alf marker vaccination by a multiplex microsphere immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2015. 22. 65–71.

Közlésre érck.: 2018. október. 9.