

**Állatorvostudományi Egyetem  
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

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

PhD értekezés

Felföldiné Lévai Réka

2019

Témavezető és témabizottsági tagok:

---

**Dr. Farsang Attila**

*(projektmenedzser)*

Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.  
témavezető

**Prof. Dr. Soós Tibor**

*(nyugalmazott igazgató)*

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal  
Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága  
témabizottság tagja

**Dr. Kulcsár Gábor**

*(igazgató)*

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal  
Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága  
témabizottság tagja

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

---

**Felföldiné Lévai Réka**

# TARTALOMJEGYZÉK

1)	ÖSSZEFOGLALÁS .....	9
2)	SUMMARY .....	10
3)	BEVEZETÉS .....	11
4)	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	12
4.1)	A klasszikus sertéspestis története, előfordulása .....	12
4.2)	Kóroktan .....	12
4.3)	Járványtan.....	15
4.4)	Kórfejlődés.....	16
4.5)	Tünetek.....	16
4.6)	Kórbonctani, kórszövettani elváltozások.....	18
4.7)	Európai Uniós és hazai szabályozás járványkitörés esetén .....	18
4.8)	A vakcinafejlesztés általános áttekintése .....	21
4.9)	A klasszikus sertéspestis elleni vakcinázás története .....	23
4.9.1)	Első generációs markervakcinák .....	26
4.9.1.1)	Alegységvakcinák.....	26
4.9.2)	Újgenerációs markervakcinák.....	26
4.9.2.1)	Virális vektorvakcinák.....	26
4.9.2.2.)	Szintetikus peptidvakcinák.....	28
4.9.2.3)	DNS vakcinák.....	28
4.9.2.4)	Transz-komplement deléciós mutánsok.....	28
4.9.2.5)	Kiméra pestivírusokon alapuló vakcinák.....	29
4.10)	A vakcinák törzskönyvezése .....	30
5)	CÉLKITŰZÉSEK .....	32
6)	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	33
6.1)	Kísérleti állatok és elrendezés.....	33
6.2)	A vakcina és a fertőző CSF vírustörzs .....	33
6.3)	Klinikai megfigyelések, testhőmérséklet-mérés .....	34
6.4)	Mintavétel .....	35
6.5)	Sejtek és konjugátum .....	36
6.6)	A vakcina- és a fertőző törzs titrálása .....	36

6.7)	Ellenanyag detektálás.....	36
6.8)	Antigén detektálás .....	37
6.9)	Nukleinsav detektálás .....	37
6.10)	Patológiai, kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok .....	38
6.11)	A vakcinajelölt hatékonyságának megállapítása.....	39
7)	<b>EREDMÉNYEK</b> .....	40
7.1)	A kísérletekben használt vírustörzsek titrálása.....	40
7.2.)	Klinikai tünetek .....	40
7.3)	Testhőmérsékletek.....	41
7.4)	Ellenanyag detektálás.....	43
7.5)	Antigén detektálás .....	47
7.6)	Nukleinsav detektálás .....	49
7.7)	Kórbonctani, kórszövettani vizsgálatok.....	50
7.8)	Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	52
8)	<b>MEGBESZÉLÉS</b> .....	57
8.1)	Hatékonysági vizsgálatok követelményei.....	57
8.2)	Kísérleti beállítás .....	58
8.3)	A vaddisznók tömeges orális vakcinázásának nehézségei.....	60
8.4)	A rekombináns vakcinajelölt tulajdonságai .....	63
8.5)	A kapott eredmények kiértékelése .....	65
8.6)	Az orális alkalmazás technikai nehézségei .....	68
8.7)	Újszülött malacok immunológiai jellemzői.....	69
8.8)	A vakcinajelölt hatékonyságának mérése .....	70
8.9)	Konklúzió .....	72
9)	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b> .....	73
10)	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	74
11)	<b>A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI</b> .....	92
11.1)	Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk (szakcikk) .....	92
11.2)	Konferencia prezentációk.....	93
11.3)	A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények listája.....	93
12)	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	94

## RÖVIDÍTÉSEK

ÁDI.....	Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
AR.....	assessment report; értékelő jelentés
ARU.....	attack rate of unvaccinated; az oltatlan csoport morbiditási rátája
ARV.....	attack rate of vaccinated; a vakcinázott csoport morbiditási rátája
ATCC.....	American Type Culture Collection
ÁTI.....	Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága
BDV.....	border disease virus; juhok border betegségének vírusa
BVDV.....	bovine viral diarrhoea virus; szarvasmarhák vírusos hasmenésének vírusa
CD.....	Cluster of Differentiation (a különböző specificitású, de azonos sejtmembrán-molekulákhoz kötődő ellenanyagok csoportosításán alapuló nomenklátúra)
cDNS.....	komplementer (kiegészítő) DNS
CG.....	control group; kontroll csoport
CMS.....	competent member state; érintett tagállam
CP.....	centralised procedure; centralizált eljárás
CPE.....	cytopathogen effect; sejtkárosító hatás
CSF.....	Classical Swine Fever; klasszikus sertéspestis
CSFV.....	Classical Swine Fever Virus; klasszikus sertéspestis vírus
ct.....	cycle treshold; ciklus küszöbérték
CVMP.....	Committee for Medicinal products for Veterinary Use; Állatgyógyászati Készítmények Bizottsága
DCP.....	decentralised procedure; decentralizált eljárás
DIVA.....	Differentiating Infected from Vaccinated Animals; a fertőzött állatok elkülönítése a vakcinázottaktól
DNS.....	dezoxiribonukleinsav

EDQM.....	European Directorate for the Quality of Medicines; Európai Gyógyszerminőségi Igazgatóság
EFSA.....	European Food Safety Authority; Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
EGK.....	Európai Gazdasági Közösség
ELISA.....	enzyme-linked immunosorbent assay; enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat
EMA.....	European Medicines Agency; Európai Gyógyszerügynökség
EMCV.....	encephalomyocarditis vírus
EU.....	European Union; Európai Unió
FAO.....	Food and Agriculture Organization of the United Nations; Élelmészügyi és Mezőgazdasági Világszervezet
FITC.....	fluorescein isothiocyanate; fluoreszcein-izotiocianát
GLP.....	Good Laboratory Practice; Helyes Laboratóriumi Gyakorlat
GRBD.....	generalized randomized block design; általánosított véletlenszerű blokk modell
IF.....	immunfluoreszcencia
IL.....	interleukin
im.....	intramuscular; izomba
IPX.....	immunperoxidáz
IZ.....	international zone; nemzetközi zóna
MDA.....	maternally derived antibody; anyai ellenanyag
MEM.....	minimális esszenciális médium
MRP.....	mutual recognition procedure; kölcsönös elismerési eljárás
ND.....	neutralizációs dózis
Nébih.....	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
NS.....	nem-strukturális
OIE.....	World Organisation for Animal Health; Állategészségügyi Világszervezet
OMCL.....	Official Medicines Control Laboratory; hivatalos gyógyszerellenőrző laboratóriumok

OOI .....	onset of immunity; immunitás kialakulása
ORF .....	open reading frame; nyílt leolvasási keret
p.o.....	per os; szájon át
PBS.....	phosphate-buffered saline; foszfát pufferes sóoldat
PCR .....	polymerase chain reaction; polimeráz láncreakció
PD <sub>50</sub> .....	50% Protective Dose; 50%-os védő adag
Ph. Eur.....	European Pharmacopoeia; Európai Gyógyszerkönyv
PHV-1 .....	porcine herpesvirus-1; sertés herpeszvírus-1 (Aujeszky-betegség vírusa)
PK-15 .....	pig kidney (vaddisznó vese) eredetű sejtvonal
PRRS.....	porcine respiratory and reproductive syndrome; sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája
RMS .....	reference member state; referens tagállam
RNS .....	ribonukleinsav
rpm.....	round per minute; percenkénti fordulatszám
RR.....	relative risk; relatív kockázat
RT-PCR.....	Reverse transcription polymerase chain reaction; reverz-transzkripció polimeráz láncreakció
SF-21 .....	<i>Spodoptera frugiperda</i> (őszi sereghernyő) eredetű sejtvonal
SK-6.....	swine kidney (sertésvese) eredetű sejtvonal
SVA.....	National Veterinary Institute; Nemzeti Állatorvosi Intézet
TCID.....	Tissue Culture Infective Dose; szövetkárosító adag
TG .....	treated group; kezelt csoport
ti. ....	tudniillik
TKK.....	non-cytopathic atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen
ún.....	úgynevezett
USA.....	United States of America; Amerikai Egyesült Államok

USDA.....United States Department of Agriculture; az  
USA Mezőgazdasági Minisztériuma

UTR.....untranslated region; nem-transzlálódó régió

VE .....vaccine efficacy; vakcina hatékonysága

VI.....vírusizolálás

VNT.....vírusneutralizációs teszt



## 1) ÖSSZEFOGLALÁS

A klasszikus sertéspestis ellen újonnan kifejlesztett élő, attenuált markervakcina hatékonyságát vizsgáltuk fertőzéses kísérletekben hathetes, pestivírusok elleni anyai ellenanyagokkal rendelkező, illetve azoktól mentes malacokon. Mindkét kísérletet az Európai Gyógyszerkönyv vonatkozó monográfiáival összhangban végeztünk el, és azonos kísérleti elrendezést alkalmaztunk.

A két, 15-15 egyedből álló vizsgálati csoport egyikét izomba oltva, a másikat szájon át immunizáltuk a vakcinajelölttel. Az oltatlan kontroll csoportok 10-10 állatból álltak. A vakcinázást követően 14 nappal minden állatot oronasalisan fertőztük az erősen virulens Koslov-vírusterázzsel.

Az intramuszkulárisan alkalmazott vakcina a pestivírusok elleni anyai ellenanyagoktól mentes kezelt állatokban maximális védettséget biztosított, míg a szájon át történő alkalmazás csupán részleges védettséget nyújtott. Megállapítottuk továbbá, hogy az anyai ellenanyagok jelenléte negatívan befolyásolta a vakcinajelölt hatékonyságát, ugyanakkor a hatáselmaradás mértéke nagymértékben függött a vakcina alkalmazási módjától. Megfigyeléseink alapján a klasszikus sertéspestis elleni védekezési programban a jobb immunválasz kialakítása céljából az intramuszkuláris alkalmazási mód ajánlott.

A vakcinajelölt megfelelt az Európai Gyógyszerkönyv „*Swine-fever vaccine (live, prepared in cell cultures), classica*” monográfiája által támasztott validitási kritériumoknak, amely komoly előrelépést jelentett a vakcinajelölt későbbi regisztrációjával kapcsolatban.

## 2) SUMMARY

Classical swine fever (CSF) or hog cholera is a highly contagious and devastating disease of Suidae caused by an enveloped single-stranded RNA virus called Pestivirus C (classical swine fever virus) 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.

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.

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 CSFV strain “Koslov” 14 days post-vaccination.

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.

### **3) BEVEZETÉS**

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

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

Az újgenerációs oltóanyagok egyre fontosabb szerepet játszanak mind a humán, mind pedig az állatbetegségek megelőzésében, kontrollálásában. Az értekezésemben a klasszikus sertéspestis ellen kifejlesztett CP7\_E2alf elnevezésű kiméra vakcinavírus-törzsnek a hatékonyságával kapcsolatos, az Európai Gyógyszerkönyvben leírtaknak megfelelő vizsgálatokat mutatom be.

## 4) IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 4.1) A klasszikus sertéspestis története, előfordulása

A klasszikus sertéspestis (classical swine fever, CSF) a házisertés és a vaddisznó ragályos, nagy gazdasági kártétellel járó, vírus által okozott betegsége. Az első járványesetet az Amerikai Egyesült Államok (United States of America, USA) Ohio államában az 1830-as években írták le, napjainkban azonban már világszerte előforduló betegségről beszélhetünk. 1885-ben a betegség kórokozójának még a ma *Salmonella choleraesuis*nek nevezett baktériumot tekintették – erre utal a „hog cholera” elnevezés, amelyet az USA-ban jelenleg is a betegség hivatalos megnevezéseként használnak. A CSF hazánkban 1895-ben házisertésekben jelentkezett először a kőbányai sertéshizlaldákban, ahol tömeges elhullást okozott. Az 1960-as években indított nagyszabású mentesítési program hatására Magyarország házisertés-állománya 1972-re mentessé vált a betegségtől, hasonlóan számos, más európai országhoz, ahol az 1970-es évek elejére sikerült a fertőzéstől megszabadulni (Mocsári és Molnár, 1994; Ősz, 1978 és 1979).

Annak eredményeképpen azonban, hogy a sertésállományok létszáma és sűrűsége egyre emelkedett, illetve a sertésszállítások számában is ugrásszerű növekedés volt tapasztalható, az 1980-as évek elejétől előbb Nyugat-Európában, majd az 1990-es évektől kezdődően több közép-európai országban a betegség ismét megjelent, és számos ország vaddisznó-állományában endémiássá vált (Mocsári és Molnár, 1994). Ezzel párhuzamosan a betegség klinikai képe megváltozott. Az utóbbi évtizedekben megjelent egy jóval enyhébb lefolyású forma, amelyet leginkább a vaddisznók körében terjedő vírustörzsek okoznak. 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.

### 4.2) Kóroktan

A klasszikus sertéspestis vírus (classical swine fever virus, CSFV; species *Pestivirus C*; genus *Pestivirus*; family *Flaviviridae*; rendbe nem besorolt) burkos, egyszálú, pozitív irányultságú RNS genommal rendelkező kórokozó (OIE, 2014; Edwards et al., 2000; Smith et al., 2017; Wengler et al., 1995.). A genusba tartozik még a szarvasmarha vírusos hasmenésének 1-es és 2-es típusú vírusa (bovine viral diarrhoea virus, BVDV-1 és 2), a juhok ún. border betegségének vírusa (border disease virus, BDV), valamint több, és egyre növekvő számú atipikus pestivírus, mint például bizonyos zsiráfokban előforduló pestivírusok, vagy a nemrég felfedezett Bungowannah-vírus, illetve egyéb atipikus sertés pestivírusok (Blome et al., 2017a; Rossi et al., 2015; Smith et al., 2017).

A genom egy, a 3' és az 5' végeken nem-transzlálódó régiók (untranslated regions, UTR) által határolt ún. „single open reading frame”-et (ORF) kódol, amelyről elsősorban a transzlációban szerepet játszó konzervatív szakaszok íródnak át (Fletcher és Jackson, 2002; Sizova et al., 1998). A genom mérete jellemzően körülbelül 12,5 kb, amely az NH<sub>2</sub>-(Npro-C-ERNS-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B)-COOH poliproteint kódolja (Meyers et al., 1989), ami a vírus és a gazdasejt proteázainak révén ko- és poszttranszlációs úton 13 érett proteinre hasad (Rümenapf et al., 1993). A burkos viriont négy darab strukturális fehérje alkotja, úgy mint a nukleokapszidot alkotó core-protein (C), valamint a virion felszínének kialakításában résztvevő Erns (gp44/48), E1 (gp33) és E2 (gp55) fehérjék, amelyeket a genom 5' vége kódol (König et al., 1995; Rümenapf et al., 1991; Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990 és 1992). Mindhárom glikoprotein intermolekuláris diszulfid komplexekként fordul elő: Erns és E2 homodimerek, illetve E1-E2 heterodimerek formájában.

Habár eddig már számos fehérje szerepét vizsgálták, nyolc nem-strukturális (non structural, NS) protein szerepe azonban még nem teljesen ismert. Ide tartozik az N-terminális proteináz (Npro), mely autokatalitikus úton hasítja ki magát az éretlen poliproteinből, valamint az NS2-3, az NS2, az NS3, az NS4A, az NS4B, az NS5A, illetve az NS5B nem-strukturális proteinek. Ez utóbbi alkotja az RNS-függő RNS polimerázt, az NS3 pedig proteázként funkcionál (Blome et al., 2017a; Tautz et al., 1997). A nem strukturális p7 protein feltételezhetően a vírus érésében játszik szerepet (Harada et al., 2000, Elbers et al., 1996).

A virális RNS replikációja a receptor mediált endocitózist követően a gazdasejt citoplazmájában zajlik. A vírus gazdasejthez való kötődésében kulcsszerepe van a gazdasejt CD46 receptorának a proteoglikánokhoz tartozó heparán-szulfáttal, valamint a vírus felszíni fehérjével együtt (Blome et al., 2017a), hiszen az Erns lép kölcsönhatásba a glükózaminoglikánokkal, míg az E2-E1 heterodimer a receptorhoz való kötődésért, illetve a későbbi endocitózisért felel (Weiland et al., 1992; Hulst et al., 2001; Wang et al., 2004). A vírus szerkezeti fehérjéi között az E2 glikoprotein a vírus legimmunogénebb fehérjéje, mivel az E2 glikoprotein ellen termelődött ellenanyagok a vírust neutralizálják, azaz ezt a fehérjét blokkolva a vírus elveszíti fertőzőképességét.

Az egyes sertéspestis vírustörzsek virulenciája között jelentős különbségek is előfordulhatnak (Floegel-Niesmann et al., 2003 és 2009), ami jelenlegi tudásunk szerint elengedhetetlen a CSFV alkalmazkodásának megértése szempontjából. Az E2 glikoprotein kulcsszerepet játszik a vírus virulenciájának fenntartásában (Risatti et al., 2005). A glikoziláció döntő fontosságú lehet az E2 helyes feltekeredésében, majd a fehérje későbbi szekréciójában (Risatti et al., 2007; Wu et al., 2010). Mindezekon kívül a kiméra pestivírusok

fertőző-, illetve szövettanyészeten való szaporodási képessége megegyezik az E2 gén donor ilyen jellegű tulajdonságaival (Liang et al., 2003; van Gennip et al., 2000).

A vírusfelszín és az endoszómális membrán fúzióját követően a vírusmag kiszabadul, ezáltal a virális RNS a sejtplazmába jut, ahol kezdetét veszi a transzláció. Az ennek eredményeképpen létrejött virális poliprotein prekursor feldolgozását a korábban már említett módon a vírus és a gazdasejt proteázai végzik (Donis, 1995; Blome et al., 2017a; Rümenapf et al., 1993). A replikáció során negatív, szimpla szálú RNS keletkezik, amely sablonként szolgál a pozitív, szimpla szálú RNS szintéziséhez, ami utóbbi ezután a kapszidba csomagolódik (Gong et al., 1996). A víruspartikulák összeépülése, valamint az érés már az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-membránban zajlik. A virionok a gazdasejtből exocitózissal szabadulnak ki, jellemzően a sejt morfológiai sérülése nélkül (Gray et al., 1987).

A vírus természetes módon előforduló törzsei szövettanyészeten sejtkárosító hatást (cytopathogen effect, CPE) nem mutatnak (Gray et al., 1987). Emiatt sertésvese, vagy egyéb sertés eredetű permanens sejtvonalakon tenyésztve a sejtekben jelen lévő vírus csak különböző indirekt technikák segítségével, többek között immunfluoreszcens (IF) próbával, vagy immunperoxidázon (IPX) alapuló eljárással mutatható ki. A kórokozó szerológiailag egységes, azonban monoklonális ellenanyagok segítségével az egyes törzsek közötti finomabb antigenitásbeli különbségek is kimutathatók (Pirtle és Mengeling, 1971).

A kórokozó a környezeti hatásokkal szemben ellenállóbb, mint a burkos vírusok legtöbbje. A vírus hideg, nedves, és fehérjedús környezetben hosszabb ideig fertőzőképes marad (Blome et al., 2017a). Húsban és vérben a vírus 50°C-on 3 napig, 37°C-on 7-15 napig, hűtőhőmérsékleten legalább 30 napig, míg -70°C-on akár 4,5 évet is túlél (Farez és Morley, 1997). Ugyanakkor érzékeny a gyors hőmérséklet-változásokra, mint például a felolvasztásra, majd az újra lefagyasztásra. A hőmérsékletnek a vírus inaktiválására gyakorolt hatását nagymértékben befolyásolja az a közeg, amiben a vírus található: szövetfelülúszóban 60°C-on 10 perc alatt veszíti el a vírus a fertőzőképességét, azonban alvadásgátolt vérben 68°C-on még 30 perc sem elég a teljes inaktiválódáshoz (van Oirschot, 1992).

A feldolgozott húsárúban, mint például a szalámi, 90 napos túlélési rátáról számoltak be, míg az ibériai sonkában még 252 nap után is találtak fertőzőképes virionokat (Mebus et al., 1993). A CSFV az 5 és 10 közötti pH tartományban stabil, ugyanakkor az ennél savanyúbb környezetben az inaktivációja hőmérsékletfüggő (Depner et al., 1992): pH 3 alatt és 60°C fölött fél óra, 80°C-on 5 perc kell a teljes inaktiválódáshoz. A vírus a pH 10 feletti lúgos vegyhatással szemben különösen érzékeny (Terpstra, 1991; Varga et al., 2018).

### 4.3) Járványtan

A klasszikus sertéspestist az Állategészségügyi Világszervezet (World Organisation for Animal Health, OIE) bejelentési kötelezettség alá tartozó fertőző betegségeként tartja számon (Edwards et al., 2000). A betegség klasszikus, heveny formája általános lázas tünetekben, a hátulsó végtagok gyengeségében, és a testszerte előforduló, pontszerű vérzésekben nyilvánul meg (Varga et al., 2018).

A vírus iránt természetes körülmények között a disznófélék családjának tagjai, leginkább a házisertés (*Sus scrofa domestica*) és a vaddisznó (*Sus scrofa scrofa*) fogékony (Depner et al., 1995; Varga et al., 2018), azonban napjainkra már a közönséges varacskosdisznó (*Phacochoerus africanus*), és a folyami disznó (*Potamochoerus larvatus*) érzékenysége is bizonyított (Everett et al., 2011).

A CSFV terjedése direkt vagy indirekt módon, illetve a méhlepényen keresztül történik, a vírusnak gerinctelen köztigazdája nincsen. A legfontosabb indirekt útvonalak közé tartozik például a fertőzött nyers sertéshúsnak, vagy a sertés eredetű termékeknek, illetve az ezekből keletkező nyers hulladékoknak a házisertésekkel való feletetése, valamint a mechanikai átvitel, azaz a ragályfogó tárgyak és az ember által közvetített (iatrogén) fertőződés (van Oirschot, 1999; Varga et al., 2018). Mindezek mellett Weesendorp és munkatársai (2008 és 2009) kísérleti körülmények között előidézett aerogén úton való terjedésről is beszámoltak, ami feltételezhetően a vírus kondák közötti átvitelében is szerepet játszhat (Laevens et al., 1999).

A vaddisznó, mint a vírus rezervoárja, szintén központi szerepet játszik a CSFV terjesztésében, veszélyeztetve ezzel az adott területen tartott házisertés-állományokat. Habár a sertés és a vaddisznó azonos mértékben fogékony a betegségre (Depner et al., 1995; Laddomada, 2000), a kórkép tünetmentes formája a vaddisznók esetében mégis nagyobb számban fordul elő (Lange et al., 2012), ami miatt a házisertés-állomány folyamatos fertőződése elkerülhetetlen.

Járványtanilag nagyobb veszélyt a gyengébb virulenciájú törzsek jelentik, mert a fertőződés állomány szinten nehezen ismerhető fel, a vaddisznók pedig főleg ezt a változatot tartják fenn. Ennek következtében az újabb járványesetek korai észlelése jóval nehezebbé vált, holott a múltban lezajlott kitörések tapasztalatait összegezve egy CSFV-vel fertőzött állomány korai felderítése kritikus a járvány későbbi mérete szempontjából (Elber et al., 1999; Horst et al., 1997). Így hiába tettek már eddig is óriási erőfeszítéseket Európában a betegség megfékezésére, a két faj érintkezése állandó CSF-fenyegetettséget jelent a kontinensen.

Ezzel párhuzamosan a vírus az állományon belül „csendben” terjed, miáltal megnövekszik az állatok fakultatív patogénekkal szembeni érzékenysége. Ennek következtében pedig megnő a különféle antibiotikumok felhasználása, csökken az alomszám, romlanak a hízlalási paraméterek, és emelkedik a selejtszám is. Ekkor a CSF klasszikus tünetei tehát nem, csak a felülfertőzésekkel adódó klinikai tünetek észlelhetők (Dahle et al., 1992).

#### **4.4) Kórfejlődés**

A CSFV felvétele többnyire szájon át történik. A vírus elsődlegesen a mandulák kriptáinak epithel sejtjeiben szaporodik el, majd ezt követően a környező limfoid szövetbe szóródik. A regionális nyirokcsomókat a nyirokérrendszeren keresztül éri el, ahol tovább szaporodik. A vérben a vírus a fertőzést követő 24 órán belül jelenik meg, s a véráram segítségével jut el a másodlagos szaporodási helyekre, azaz a lépbe, a csontvelőbe, és a zsigeri nyirokcsomókba (Liess, 1987; Varga et al., 2018). A kapillárisok falában az endothel sejtekben elszaporodva a vírus azok elfajulását okozza, ami magyarázatul szolgál az egyik legjellegzetesebb tünetre, a testszerte a bőrben és a szervekben jelentkező, pontszerű vérzésekre.

#### **4.5) Tünetek**

A betegségnek az alábbi három típusát különíthetjük el: i) az akut (átmeneti vagy halálos), ii) az idült (krónikus), illetve iii) a perzisztens formát, amely utóbbi főleg a vemhesség alatti fertőződés következtében alakul ki (Moennig et al., 2003). Mind a házisertések, mind pedig a vaddisznók esetében a betegség jellemzően ugyanazokat a klinikai tüneteket mutatja, amelyek a fertőzést követően 4-7 (ritkán 10) nap lappangási idő után jelentkeznek. A betegség kifejlődése esetenként nagymértékben eltérhet, függ ugyanis a fertőzést okozó vírustörzs virulenciájától, a gazdaszervezet immunválaszától, illetve a másodlagosan fellépő, bakteriális társfertőzésektől is (Blome et al., 2011).

A betegség akut fázisában a vírusfertőzést követő 2 héten belül megjelenő klinikai tünetek aspecifikusak: a beteg sertéseken magas láz, anorexia, általános gyengeség, az emésztőrendszert érintő tünetek és kötőhártya-gyulladás figyelhető meg (Dahle et al., 1992; Petrov et al., 2014). Újabb két hét elteltével mindezek súlyosbodnak, és megjelennek a betegség már jellemző tünetei is: az idegrendszeri tünetek (egyensúlyzavar, izomgörcsök, remegés, részleges, majd teljes bénulás), a kiterjedt pontszerű vérzések, valamint az elhalásos területek a bőrben – ez utóbbiak főleg a füleken, a végtagokon, illetve az alhasi részen figyelhetők meg, és az elhullás rendszerint még a fertőzést követő negyedik hét előtt bekövetkezik. Az olyan magas virulenciájú vírustörzsekkel való fertőzést követően, mint



például a Margarita vagy a Koslov, amelyeket gyakran használnak vakcinakísérletekben, a mortalitási ráta akár a 100%-ot is elérheti, függetlenül a fertőzött állat korától (Floegel-Niesmann et al., 2003; Moennig et al., 2003).

A helyes diagnózis felállításakor nem szabad figyelmen kívül hagyni a CSF immunszuppresszív hatását sem, hiszen a légző- és emésztőrendszerrel kapcsolatos komoly másodlagos fertőzések súlyosbíthatják a kórképet, és könnyen elfedhetik az eredeti betegség tüneteit.

A CSF idült formája abban az esetben alakulhat ki, amikor egy fertőzött sertés nem képes megfelelő immunválasz kialakítására. A beteg egyedekben ilyenkor jellemzően nem specifikus klinikai tüneteket figyelhetünk meg: mint például visszatérő láz, letargia, sorvadás, vagy akár kiterjedt bőrgyulladás. A napjainkban elfogadott nézet szerint a CSF krónikus formájában szenvedő sertések a betegség következtében végül mind elhullanak, de addig akár hónapokat is túlélhetnek, ami alatt nagy mennyiségben ürítik a vírust. Az érintett állatokban a vírusfertőzésre válaszul termelődhet ugyan ellenanyag, ezek azonban bizonyos esetekben csupán szórványosan jelennek meg, és nem befolyásolják a vírusürítést (Blome et al., 2017a). Jenckel és munkatársai (2017) tanulmányukban arra a következtetésre jutottak, hogy a gazdaszervezetnek nagyobb szerepe van a krónikus betegség fenntartásában, mint a virális faktoroknak.

A perzisztens fertőzéssel együtt mindezeknek komoly jelentőségük van ott, ahol a betegség érinti a vaddisznó-populációkat, vagy ahol a CSF az állandó víruskörforgás miatt endémiásan fordul elő (Depner et al., 1995; Kaden et al., 2005).

A betegség a vemhes kocákra és azok malacaira is komoly veszélyt jelent. Attól függően, hogy a koca a vemhességének mely időszakában, és milyen virulenciájú törzssel fertőződött meg, a magzatok károsodása eltérő mértékű lehet. A vemhesség első felében lezajlott CSFV fertőzés következtében felléphet vetélés, mumifikálódott vagy életképtelen magzatok ellése, de néha látszólag tünetmentes, szerológiailag nem felismerhető, vírusürítő malac is születhet. (Kaden et al., 2005; Stewart et al., 1972 és 1973) Az immuntolerancia jelensége abban az esetben tapasztalható, ha a kórokozó a vemhesség 50. és 70. napja között jut a fejlődő magzatba, amikor annak immunrendszere a saját-idegen felismerését tanulja. Ezek a malacok születésükkor egészségesnek tűnnek, és több hónapot is túlélnek, azonban a betegség ún. későn kifejlődő formája miatt idejekorán elhullanak (Blome et al., 2017a). Amennyiben a vírus a gesztáció egy későbbi szakaszában fertőzi meg a vemhes kocát, a magzatok kevésbé károsodnak, hiszen addigra már immunkompetenssé, azaz megfelelő immunválaszra képesekké váltak.

Friss kutatások igazolják, hogy perzisztens fertőződés oly módon is bekövetkezhet, hogy újszülött malacok életük első nyolc órájában, vagy akár az ellést követő 48 órán belül fertőződnek. Mindezek komolyan befolyásolhatják az alkalmazni kívánt vakcinák hatékonyságát, és megnehezíthetik a járvány felszámolását az endemikusan fertőzött régiókban (Cabezon et al., 2017; Munoz-Gonzalez et al., 2015).

#### **4.6) Kórbonctani, kórszövettani elváltozások**

A betegség akut formájától szenvedő állatokban testszerte kiterjedt vérzések találhatók, de előfordulhat negatív bonclet is, azonban az esetek döntő többségében a savóshártyák alatt, illetve a vese kéregállományában pontszerű vérzések ekkor is megfigyelhetők. A nyirokcsomók vizsgálatakor csak a kérgi részen vagy a szerv egész terjedelmében élénk- vagy feketevörös metszést figyelhetünk meg a nyirokcsomók gyökérterületén keletkezett vérzések mértékétől függően. A lépben lehetnek infarctusok.

Az idült vagy krónikus lefolyású esetekben a gyomorban kruppos álhártyákat figyelhetünk meg, és a vastagbélben ekkor kialakulhatnak a betegségre jellemző ún. diphtheroid bélgombok (boutonok), amelyek kiemelkednek a nyálkahártya felületére. Ezeket a béltartalom a gyógyuló állatokban lekoptathatja. Bizonyos hullákban vérzéses jellegű kruppos tüdőgyulladást észlelhetünk, amit bakteriális felülfertőződés súlyosbíthat.

Szövettani vizsgálattal már a betegség korai szakaszában az agyvelő fehér-, illetve szürkeállományában enyhe vizenyő, és többnyire 2-3 sejtsoros lymphocytás érköpenyek figyelhetők meg, ami a hajszálerek falának a vírus okozta károsodásának a következménye (Varga et al., 2018).

#### **4.7) Európai Unió és hazai szabályozás járványkitörés esetén**

A vakcinázás a járvány kezelésének hatékony és biztonságos módja, amivel kritikus szint alá csökkenthető a vírusfertőzés gyakorisága (Rossi et al., 2010). Ugyanakkor egyes, a betegség által érintett területeken (például Kína, Oroszország, Dél-Amerika, vagy a karibi régió) a vakcinázás önmagában nem eredményezte a járvány felszámolását (Moennig és Becher, 2015). Mindez azt mutatja, hogy endémiás helyzetben, illetve a fertőzött állomány szomszédságában található telepeken az állandó és szisztematikus megelőző vakcinázási stratégia akkor lehet eredményes, ha előtte igazgatási eszközök következetes alkalmazásával (például intenzív monitoring, védő- és megfigyelési körzetek kialakítása,

valamint a fertőzött, illetve a fogékony állatok leölése) a járvány kontrollálhatóvá válik (Postel et al., 2017; Rossi et al., 2010).

Mindezek fényében az Európai Unió (EU) a területén a klasszikus sertéspestis ellen betiltotta a házisertések vakcinázását: az esetleges járványhelyzetek felszámolása jelenleg a 2001/89/EK irányelvvel összhangban vakcinázás nélkül, főszabályként igazgatási eszközökkel történhet (2001).

Postel és munkatársai (2017) szerint a sertésstartás típusának függvényében a CSF által kiváltott társadalmi-gazdasági hatásokat két fő csoportba lehet sorolni. A betegségtől mentes országokban, ahol a sertésstartás nagymértékben iparosított, a CSF behurcolása katasztrofális következményekkel jár mind a sertéságazat, mind pedig a gazdaság számára a nagyszámú állatleölések, a kereskedelmi és forgalmi korlátozások, valamint az exportlehetőségek beszűkülése következtében keletkezett bevételkiesés, illetve többek között az állami kártalanításra fordított hatalmas összegek miatt. Ráadásul a betegségtől mentes státusz ismételt megszerzése – akár a kereskedelmi partnerektől, akár pedig az OIE-től – hosszú procedúra, ami tovább erősíti egy esetleges járványkitörés hosszú távú negatív hatásait (Postel et al., 2017).

A másik csoportba a szegényebb, fejlődő országokat sorolták: itt a mezőgazdaság kevésbé iparosodott, ezért elterjedt a háztáji sertésstartás. Ezekben a régiókban a lakosság számára a serteshús fontos fehérjeforrásnak számít, ezért (bár a CSF-nek közvetlenül humán egészségügyi kockázata nincsen) a „one-health” koncepció mentén a sertésállomány klinikai státusza közvetlenül kihat a családok ételmezésére, illetve jövedelmére (Gilbert et al., 2015; Leslie et al., 2015). Az sem elhanyagolható tény, hogy az Étellemezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) adatai szerint ezekben az országokban a globális sertésállomány egy jelentős része, mintegy 60%-a változatos, nem strukturált, kis létszámú populációkban van jelen, a háztáji sertésstartásnak ebből kifolyólag regionálisan és világszerte is társadalmi-gazdasági szinten komoly kihatása van, illetve jelentősen befolyásolja a járványos állatbetegségek dinamikáját is. Hiszen annak ellenére, hogy ezekben a gazdaságokban a sertésállomány mérete és sűrűsége is kicsi, a biológiai biztonsági előírások alacsony színvonala, valamint az állatorvosi szolgáltatások igénybevétele iránt mutatott mérsékelt hajlandóság a betegség megelőzése és felszámolása során kritikus szempontoknak számítanak (Postel et al., 2017).

Mindezek mellett napjainkban már nem hagyható figyelmen kívül az a trend sem, miszerint az állatvédelem, az etikus állattartás a társadalom egyre szélesebb rétegei által megkövetelt viselkedési norma lett, emiatt az igazgatási eszközök alkalmazása során a fogékony állatok a közvélemény számára feleslegesnek tűnő tömeges leölése, valamint a

kiirtásra fordított hatalmas összegek már nagymértékű civil ellenállást ébresztenek (Report from the scientific veterinary committee, 1994; Meuwissen et al., 2009).

A fentieket mind figyelembe véve a járványok elleni védekezésben nélkülözhetetlen segítséget jelenthetnek az oltóanyagok. A jelenlegi vakcinák felhasználhatóságát ugyanakkor nagymértékben korlátozza az, hogy bár az élő, attenuált vírust tartalmazó oltóanyagok az esetek túlnyomó többségében hatékony védelmet biztosítanak, a klasszikus sertéspestis ellen jelenleg elérhető marker típusú vakcinák (lásd később „*A vakcinafejlesztés általános áttekintése*” c. fejezetben) köre meglehetősen szűk. Ráadásul a vakcinázott állatokra, illetve a belőlük származó termékekre komoly kereskedelmi megszorítások érvényesek, mindez pedig hatással van a vészhelyzeti vakcinázás során alkalmazható vakcinák körére is (Blome et al., 2013; Greiser-Wilke és Moennig, 2004; Postel et al., 2017).

Az Európai Unió korábban már említett 2001/89/EK számú irányelvének (2001) 19. számú cikke ugyanis kivételes körülmények fennállásakor lehetőséget biztosít a házisertések vészhelyzeti vakcinázására (Report from the scientific veterinary committee 1994; Commission decision, 2002). Ez a cikk megengedi a marker típusú vakcinák használatát erre a célra a későbbi kereskedelmi korlátozások nélkül, ugyanakkor eddig még egyetlen tagállam sem élt ezzel a lehetőséggel (Postel et al., 2017).

Egy vészvakcinázási forgatókönyv esetében a célállatok immunizálását a lehető leghamarabb el kell kezdeni. Bizonyos sertésbetegségek, mint például a sertésinfluenza, az Aujeszky-betegség, vagy a sertésorbánc megfékezésére alkalmas eszköz lehet a vemhes kocák immunizálása (Pomorska-Mól et al., 2010 és 2012; Pyo et al., 2015; Sandbulte et al., 2014). A vakcinázott kocák utódai a születésük utáni pár hétben a különböző fertőző betegségekkel szemben az anyai ellenanyagok (maternally derived antibodies, MDA) által még védve vannak, ugyanakkor az MDA-k szintjének csökkenésével ezekre a betegségekre hamar fogékonyakká válnak. Az optimális vakcinázási stratégia mindezeket figyelembe veszi, ami a gyakorlatban azonban egy rövid időre az anyai, és a vakcina által indukált ellenanyagok együttes jelenlétét eredményezheti a malacokban, amelynek következtében az MDA-k gátolhatják a vakcina által kiváltott immunválaszt. Az újszülött egyedek immunizálásának problematikája tehát komoly kihívás elé állítja az állatgyógyászati vakcinafejlesztéssel foglalkozó kutatókat (Bouma et al., 1997; Pomorska-Mól et al., 2010 és 2012; Pyo et al., 2015; Sandbulte et al., 2014; Siegrist, 2001).

Valamivel szofisztikáltabb, ugyanakkor költségesebb megoldást jelenthet, ha az oltott és a fertőzött állatok elkülönítésére olyan korszerű molekuláris biológiai módszereket alkalmaznak, mint például a hibrid genotípus-specifikus real-time RT-PCR módszer (Blome et al., 2011). A szerzők ebben a vizsgálatban részleges szekvenálással kombinálták a

differentiáló multiplex RT-qPCR próbát, amely módszert a genetikai DIVA-stratégia (lásd később „A vakcinafejlesztés általános áttekintése” c. fejezetben) során nem csupán azokban a régiókban lehet sikeresen alkalmazni, ahol vaddisznók száján át történő megelőző vakcinázása folyik, hanem a konvencionális vakcinákat alkalmazó immunizálási kampányok, vagy akár a vészvaksinázások során is (Blome et al., 2011; Everett et al., 2014).

#### **4.8) A vakcinafejlesztés általános áttekintése**

A CSF felszámolására többféle vakcinázási stratégia érhető el, amelyek megvalósításához különböző típusú oltóanyagokra van szükség (van Oirschot, 2003b) attól függően, hogy endemikus vagy mentes terület vészhelyzeti vakcinázásáról beszélünk. Endemikusan fertőzött régióban az immunizálás célja a gazdasági veszteségek mérséklése, vagy megelőzése, amihez megfelelő és hatékony vakcinákat kell alkalmazni. Ezekben az országokban a vakcinázást a nemzeti mentesítési programok részeként alkalmazzák. Ezek a programok forrásigényesek, igénylik emellett az összes érdekelt fél támogatását, illetve egy jól szervezett állategészségügyi hálózat meglétét is (Postel et al., 2017).

Járványkitörés alatt a vészhelyzeti vakcinázási kampányok célja a betegség tovaterjedésének megakadályozása, így ilyen esetben gyorsan ható, lehetőleg marker potenciállal rendelkező oltóanyagokat célszerű használni (van Oirschot, 2003a). Kétségtelen, hogy az élő, attenuált oltóanyagok világszerte jelentősen hozzájárultak a CSF kontrollálásához (Vandeputte és Chappuis, 1999), ugyanakkor terepi körülmények között még egy majdnem tökéletes vakcina is elbukhat, amennyiben a hozzá kapcsolódó kampány és menedzsment nem megfelelően végrehajtott (Blome et al., 2017b).

Minderre szemléletes példa lehet Kína, ahol a hosszan tartó kötelező C-törzsön alapuló immunizálási stratégiák mégsem eredményezték a betegség teljes eradikációját (Luo et al., 2014). Abban a legtöbb szerző egyetért, hogy mindezekhez leginkább szervezési hiányosságok vezettek. Az egyik fő gond Kínában a vakcinák minőség-ellenőrzése: több, mint 50 gyártó eltérő minőségű és típusú készítménye van az országban kereskedelmi forgalomban, és az idegenágens-szennyezettség (leginkább BVDV) egy létező, valós probléma (Blome et al., 2017b). Egy másik jelentős tényező, hogy az élő vakcinák nagyon érzékenyek lehetnek, és zárt hűtési láncot igényelnek, ami Kína távoli vidékein gyakran nem megoldott. Mindezekon túl a nem jól időzített oltási kampányok, a vakcina indukálta antitesteknek az anyai ellenanyagokkal való kölcsönhatása, a különböző társfertőzések, amelyek befolyásolhatják az oltóanyag hatékonyságát, valamint főleg vidéken a hiányos immunizálás, és a háztáji sertések mind fontos szerepet játszanak a betegség elleni harcban (Luo et al., 2014).

Sokszor a gyártók javasolnak meglehetősen bizarr immunizálási sémákat, amelyek az immunológia területén elért eredményeket egyáltalán nem veszik figyelembe. Személetes példa erre az újszülött malacok vakcinázására való buzdítás még a kolosztrum felvétele előtt – holott ismert és bizonyított tény, hogy a nagyon fiatal egyedek immunválasz kialakítására még nem képesek, és a kolosztrummal együtt felvett ellenanyagok kiiktatják a vakcinatörzs szaporodását (Blome et al., 2017b). Munoz-Gonzalez és munkatársai (2015) pedig elsőként írták le a vakcinázásra adott immunválasz teljes hiányát a születés után CSFV-vel perzisztensen fertőződött malacokban.

A másodlagos fertőzések, és az egyéb betegségek elleni immunizálásnak a CSF eradikációjára gyakorolt hatásait Lim és munkatársai (2016a) vizsgálták. Kísérleteik során megállapították, hogy sem a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa (porcine respiratory and reproductive syndrome virus; PRRS-vírus), sem pedig a 2-es típusú sertés circovírus-fertőzés nem befolyásolták negatívan a CSFV elleni ellenanyagok mennyiségét, illetve a CSFV antigének detektálhatóságának időtartamát sem.

Ahogy azt Luo és munkatársai (2014) leírták, a vakcinázás önmagában sosem elég egy betegség felszámolásához: a teljes eradikációhoz mindig szükség van a biológiai biztonságosság növelésére, a vakcinák szigorú minőség-ellenőrzésére, a használatuk pontos nyomon követésére, megfelelő előrejelzésre, és kompenzációs programok bevezetésére. Vidéken, illetve olyan területeken, ahol háztáji sertéstartás folyik, a szájon át történő alkalmazási mód segíthet elérni a megfelelő vakcina-lefedettséget többek között azáltal, hogy nem igényel közvetlen állatorvosi beavatkozást, és így a farmerek is aktívabban bevonhatók az immunizálási kampányokba (Dietze et al., 2013; Milicevic et al., 2013; Monger et al., 2015).

A vakcinákat ártalmatlanságuk és hatékonyságuk alapján jellemzik: a modern vakcinák esetében az előny-kockázat értékelés pozitív, azokra az ártalmatlanság és hatékonyság optimális aránya a jellemző. A CSF-fel (de minden más virális betegséggel) szembeni védekezésben felhasználható ideális vakcináknak az alábbi feltételeknek kellene megfelelniük:

- az állatokban legalább enyhítsék a betegség klinikai tüneteit (a korszerű oltóanyagok ugyanakkor ezeket már meg is szüntethetik),
- ideális esetben akadályozzák meg a fertőződést is,
- ne jelentsenek veszélyt a célállat fajokra,
- ne okozzanak se rövid, se hosszú távú nem kívánatos mellékhatásokat,

- váltsanak ki korai és erőteljes immunválaszt,
- az immunitástartósság legyen élethosszig tartó,
- legyenek hatékonyak az összes vírusvariánssal szemben.

Lényeges szempontoknak tekinthetők mindezek mellett, hogy:

- az oltóanyagok alacsony biológiai kockázattal rendelkezzenek,
- a vakcinatörzs legyen genetikailag stabil,
- legyen könnyen alkalmazható a célállat fajon,
- indukáljon homogén állományszintű immunitást,
- illetve hogy az oltott egyedekből se a kórokozó, se a vakcinavírus ne ürüljön.

Ez utóbbi annak ellenére sem kívánatos jelenség, hogy ezáltal az állomány többi tagja is áthangolódhatna, mert ebben az esetben a vakcinázás már kontrollálhatatlanná válik. A vakcinákkal kapcsolatos további fontos kritérium még, hogy megbízhatóan, olcsón és egyszerűen lehessen azokat sztenderd körülmények között előállítani.

A járványvédelemben való felhasználhatóságuk miatt további követelményként jelent meg, hogy az igazgatási rendelkezéseket is szolgálva a vakcina által biztosított védetség szerológiaiailag megkülönböztethető legyen a természetes fertőződéstől. Ez az ún. DIVA-stratégia (DIVA = Differentiating Infected from Vaccinated Animals), amely jelentheti többek között markervakcinák használatát (ezen oltóanyagok által indukált ellenanyagok megfelelő szerológiai próba segítségével megkülönböztethetők a természetes fertőzés hatására termelődött ellenanyagoktól), ugyanakkor a stratégia megvalósítható nem marker-jellegű oltóanyagokkal is, amennyiben a megfelelő diagnosztikai eszköztár a rendelkezésre áll (Dong és Chen, 2007; Soós és Tuboly, 2009a).

Mai tudásunk szerint egyelőre egyik jelenleg forgalomban lévő CSF elleni vakcina sem teljesíti az összes itt felsorolt feltételt (Blome et al., 2017b).

#### **4.9) A klasszikus sertéspestis elleni vakcinázás története**

A CSF ellen kezdetben passzív immunizálással védekeztek. Az ún. reconvaleszcens vérsavó alkalmazásakor a fertőzésen már átesett sertésekből vett vérsavót használtak, majd később sorozatoltásokkal hiperimmunizált szérumtermelő állatokból származó immunszérum alkalmazásával kísérleteztek, ami 2-3 hétig tartó passzív védetséget biztosított az oltott sertéseknek. Ezt a módszert az aktív immunizálás egy korai formája, a szimultán oltás gyakorlata követte, amelynek során hiperimmun szérummal és virulens vírussal egyidejűleg oltották az állatokat. A fent említett módokon történő immunizálás azonban ártalmatlansági

szempontból (például az ún. sérumbetegség kialakulásának magas kockázata miatt) ma már teljességgel elfogadhatatlan, emellett pedig a virulens vírus terjesztése nagymértékben hátráltatta a mentesítési törekvéseket.

Az inaktivált vakcinák közül a legismertebb az ún. kristályibolya-vakcina, amit a CSF virulens vírusával megfertőzött sertések alvadásgátolt és kristályibolya festékkel kezelt véréből 37°C-on 14 napig történő inaktiválással állítottak elő. Az inaktivált oltóanyagok ártalmatlanok, hatékonyságuk azonban nem kielégítő, ezért a megfelelő mértékű antigénhatás érdekében adjuvánsokat is kell alkalmazni. Hátrányuk még, hogy viszonylag nagy mennyiség szükséges belőlük, emellett a víruszaporodást és -ürítést sem akadályozzák meg (Bíró, 1947; Pehl, 1954).

A XX. század második felében az USA-ban sikerült a vírus virulenciáját házinyulakon végzett passzálassal csökkenteni, és az így előállított ún. lapinizált amerikai törzsekből (mint például a Baker, a Koprowski, vagy akár a Hudson) hozták létre az akkor kereskedelmi forgalomban kapható oltóanyagokat (Baker, 1946 és 1947; Koprowski et al., 1946) (Magyarországon például a Koprowski-törzset tartalmazó vakcina Rovac néven került kereskedelmi forgalomba). Az első tapasztalatok a lapinizált vakcinákkal kapcsolatban azonban nem voltak biztatók: a nyulakon végzett passzázs-szám függvényében a vakcinatörzsek több-kevesebb maradék virulenciával rendelkeztek, emiatt pedig a vemhes kocák immunizálásának következtében esetenként előfordult a magzatok intrauterin fertőződése, illetve az oltott fiatal malacok megbetegedése (Overby és Eskildsen, 1977). Ez igaznak bizonyult néhány napjainkban használt, a C-törzsből származó módosított, élő vakcinatörzsrre, mint például az LOM-törzsrre is (Lim et al., 2016b), amelynek naiv sertésekben történő alkalmazása Dél-Koreában, Jeju-szigetén CSF járványkitörést okozott (Je et al., 2018).

Az 1950-es években ezeket az amerikai gyengített törzseket Kínában passzálták tovább, előállítva ezáltal az ún. kínai törzset (Chinese strain, C-törzs). A törzsnek a pontos eredete bizonytalan (Xia et al., 2011): jelenlegi tudásunk szerint azt 1956-ban a Kínai Állatgyógyászati Termékeket Ellenőrző Intézet és a Harbini Állatorvosi Kutatóintézet közösen fejlesztette ki (Luo et al., 2014). A C-törzs alapú oltóanyagok használata ezután az iparilag fejlett országokban világszerte általánossá vált. Hazánkba a kínai törzset 1959-ben a harbini intézetből hozta be Mészáros János és Tóth Béla, majd itthon Bognár Károllyal karöltve széles körű állatkísérleteket követően 1963-ban állították elő belőle a Suvac nevű vakcinát, amit évtizedekig sikeresen alkalmaztak hazánkban (Mészáros, 1983).

Az Európa-szerte használt C-törzs eredetű oltóanyagokkal kapcsolatban kimutatták, hogy megbízható védelmet biztosítanak akár már négy nap után egy egyszeri adaggal



történő immunizálást követően (Dahle és Liess, 1995; Kaden és Lange, 2001; Terpstra et al., 1990), továbbá igazolták, hogy az immunitástartósság legalább 6-11 hónapig, vagy akár egész élethosszan fennáll (Kaden és Lange, 2001; Terpstra et al., 1990; van Oirschot, 2003b). Jelenlegi tudásunk szerint a C-törzs alapú vakcinák megfelelő védelmet nyújtanak bármelyik CSFV genotípus ellen (Graham et al., 2012). Arra vonatkozóan nem állnak egyelőre rendelkezésünkre adatok, hogy ezen vakcinák intramuszkuláris alkalmazása megakadályozza-e a magzatok transzplacentáris fertőződését (Diagnostic techniques and vaccines, 2003), ugyanakkor Kaden és munkatársai (2008) vemhes vaddisznók orális immunizálását követően bizonyították az újszülött malacok passzív védettségét. Mindezek mellett a C-törzsből származó vakcinatörzsek ártalmatlannak bizonyultak mind a célállat, mind pedig a nem célállat fajokban (Kaden et al., 2010) – sőt még az immunszuppresszált egyedekben is (Biront és Leunen, 1988). Végül pedig az ilyen típusú oltóanyagoknak (az imént tárgyalt ártalmatlanságra és hatékonyságra vonatkozó jellemzőin kívül) az előállítás is egyszerű és gazdaságos, alkalmazásukkor adjuvánsok használata nem szükséges, valamint vaddisznók szájon át történő immunizálására is alkalmasak (Kaden et al., 2002).

Az ALD és Alfort-törzsekből származó, és tengerimalac szövethez adaptált japán GPE<sup>-</sup>, valamint a sertésvese eredetű PK-15 sejtvonalon szaporított francia Thiverval-törzsek ún. hidegmutánsok, azaz szaporodásuk 30°C-on optimális (Aynaud et al., 1971; Sasahara et al., 1969). Az ezekből termelt vakcinák gazdasági és állatjóléti szempontokból is előnyösebbek voltak, mivel szövettenyészetben szaporítva olcsóbban, élő állat felhasználása nélkül lehetett az oltóanyagot előállítani. A hideg törzseken alapuló vakcinák használata után az immunválasz hozzávetőlegesen 5 nap alatt alakul ki, az immunitástartósság pedig akár 2-3 év is lehet (Aynaud et al., 1971; Sasahara et al., 1969).

Láthatjuk, hogy az ideális vakcinák jellemzőivel kapcsolatos korábban tárgyalt megállapítások egy kivétellel mind igazak a CSF ellen használt élő, attenuált vakcinákra, azaz egyetlen hátrányuk a marker-jelleg hiánya (Beer et al., 2007), amely lehetővé tenné a vakcinázott egyedek szerológiai elkülönítését a természetes módon fertőzöttektől. A molekuláris biológiai módszerek fejlődésével azonban a DIVA-stratégia már ebben az esetben is megvalósítható: a vad és a C-törzs alapú vakcinatörzsek genetikai alapon történő megkülönböztetésére például sikerült már több reverz transzkripció polimeráz láncreakciós módszert is kidolgozni (Leifer et al., 2009a; Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2008). Mivel azonban a fent részletezett konvencionális vakcinákkal immunizált sertésekre és az azokból származó termékekre továbbra is szigorú kereskedelmi korlátozások érvényesek, a kutatások az elmúlt pár évtizedben egy ideális CSF elleni marker-jellegű oltóanyag kifejlesztésére kezdtek fókuszálni (Blome et al., 2017b).

#### 4.9.1) Első generációs markervakcinák

##### 4.9.1.1) Aleggységvakcinák

Miután világossá vált, hogy a CSFV E2 felszíni fehérjéjének tisztított formája a kezelt állatokban képes protektív immunválaszt kialakítani, két kutatócsoport is kifejlesztett élő vírust nem tartalmazó, E2 glikoproteinen alapuló kísérleti vakcinákat (König et al., 1995; van Rijn et al., 1996). Ezek az ún. aleggységvakcinák egy SF-21 jelű rovar eredetű sejtvonalon szaporított baculovírus által expresszált rekombináns E2 fehérjét tartalmaztak (Hulst et al., 1993). Ebben az esetben a marker-jelleg már megvalósul, hiszen a CSFV egy másik felszíni fehérjéjén, az Erns-en (vagy akár az egyik nem-strukturális fehérjéjén, az NS3 proteázon) alapuló ellenanyag ELISA-val szerológiai ki lehet szűrni a pozitív reakciót adó, természetes módon fertőződött állatokat, míg az oltott egyedek csupán az E2 antigén ellen termelnek antitesteket (Blome et al., 2017b).

A kezdeti vizsgálatokat követően nagy számú kísérletet végeztek el annak érdekében, hogy ezeknek az aleggységvakcináknak az ártalmatlanságát és hatékonyságát egyértelműen megismerhessék (Bouma et al., 1999; de Smit et al., 2001a; de Wulf et al., 2000; Dortmans et al., 2008; Klinkenberg et al., 2002; Lipowski et al., 2000; Moormann et al., 2000; van Aarle, 2003). Igazolták többek között, hogy ezek az E2 aleggységvakcinák ártalmatlanok, azonban a hatékonyságuk nem összemérhető a C-törzs alapú, illetve az egyéb élő, attenuált oltóanyagokéval, mivel a ráfertőzéses kísérletekből kapott eredmények nagy szórást mutattak (van Oirschot, 2003b). Hátrányuk továbbá, hogy a konvencionális vakcinákhoz képest hatásukra az immunitás kialakulása később következik be, illetve ahhoz, hogy a CSFV vertikális és horizontális terjedését megakadályozzák, minimum kétszeri, parenterális oltás szükséges (Diagnostic techniques and vaccines, 2003; de Smit et al., 2000; Ziegler és Kaden, 2002). Mindezekből következik, hogy ezek a vakcinák nem megfelelőek a szájon át történő alkalmazásra, így nem használhatók a vaddisznók immunizálási stratégiájában (Blome et al., 2017b).

Napjainkban az Unió területén kereskedelmi forgalomban már csupán a CSFV Alfort-törzsének E2 felszíni fehérjéjét tartalmazó aleggységvakcina kapható Porcilis<sup>®</sup> Pesti (MSD Animal Health) néven.

#### 4.9.2) Újgenerációs markervakcinák

##### 4.9.2.1) Virális vektorvakcinák

A vektorvakcinák esetében az adott betegséget okozó vírus immunogenitásáért felelős antigénjét egy, az érintett állatra nézve ártalmatlan kórokozó genomja, mint vektor hordozza.

Egy vektor kiválasztásánál fontos szempontok, hogy i) a hordozó kielégítő módon szaporodjon, ii) az inszertet megfelelő mértékben expresszálja, valamint hogy iii) az ne legyen ártalmas a célállat fajra nézve. Nem szabad viszont figyelmen kívül hagyni ennek a megoldásnak a veszélyeit sem, hiszen ezzel a génebeszeti eljárással tulajdonképpen egy genetikailag módosított szervezetet hozunk létre, amelynek az egész ökoszisztémára gyakorolt lehetséges hatásait komolyan át kell gondolni.

Kezdetben Rümenapf és munkatársai (1991b) a vaccinia vírusvektorral egy, a CSFV négy strukturális fehérjéjét teljesen kódoló rekombináns vakcinát hoztak létre, amely az oltott állatokban neutralizáló ellenanyagok képződését indukálta, és megfelelő védelmet biztosított a kísérleti fertőzéssel szemben.

Hatékonyak tűntek még az Aujeszky-betegség genetikailag módosított 783-as jelzésű, a CSFV E2 és C glikoproteinjeinek kódolásáért felelős régióit hordozó törzse segítségével előállított vektorvakcinák: protektív immunitás alakult ki mindkét betegséggel szemben. Ugyanakkor az Aujeszky-betegség ellen termelődött anyai ellenanyagok gátló hatása miatt ezek a vektorvakcinák nem bizonyultak jó megoldásnak (Peeters et al., 1997; van Zijl et al., 1991).

Később több, egyéb virális vektor rendszert is leírtak, és mint potenciális vakcinatörzs vizsgáltak: mint például a sertés-, illetve humánadenovírus (Hammond et al., 2003; Hammond és Johnson, 2005; Sun et al., 2011b), a sertéshimlő (Hahn et al., 2001), vagy akár a baromfi- és kanárihimlővírus vektor alapú jelöltek (Dong és Chen, 2007). A két utóbbi madárhimlővírusnak megvan az az előnyös tulajdonsága is, hogy jelenlegi tudásunk szerint eredményesen kizárólag madarakban képesek szaporodni. A Li és munkatársai (2016) által leírt HAdV-5 (rAdV-E0-E2-IL2) jelű vakcinajelölt egy CSFV E2-t, Erns-t és interleukin-2-t (IL-2-t) expresszáló rekombináns humánadenovírus vektoron alapul, ami két magas titerű adagban, háromhetes időközzel intramuszkulárisan alkalmazva teljes védelmet biztosított az immunizált állatokban kísérleti fertőzés követően. Ennél a rendszernél a marker tulajdonság a CSFV nem-strukturális fehérjéje, az NS3 ellen termelődött ellenanyagok kimutatásával valósul meg.

Annak fényében, hogy az encephalomyocarditis vírusfertőzés (EMCV) következtében a sertésekben szívizomgyulladás és szaporodási zavarok, míg emberekben akár lázroham is előfordulhatnak, merész törekvésnek bizonyult Zhu és munkatársai (2015) részéről ennek a vírusnak a rekombináns élő, attenuált formáját vektorként használni, ami a CSFV E2 glikoproteinjének egy részét expresszálta. Kísérletesen egyelőre csupán ellenanyagválaszt tudtak igazolni.

Mivel a legtöbb vektorvakcina-jelölttel, és leginkább az azok ellen esetlegesen kialakuló immunválasszal kapcsolatban kísérletekkel alátámasztott adatok nem állnak rendelkezésre, emiatt bizonyos vektorok alkalmazása gondot jelenthet, mert megzavarhatják a szerológiai monitoring programokat – lásd PHV-1 vektor használata Aujeszky-betegségtől mentes régiókban. Napjainkban ezeket a megoldásokat csupán kísérleti jelleggel alkalmazzák, egy esetleges vakcinajelölt engedélyeztetése egyelőre nincs kilátásban (Blome et al., 2017b).

#### *4.9.2.2.) Szintetikus peptidvakcinák*

Az ebben a részben tárgyalt vakcinajelöltek a CSFV E2 felszíni fehérjéjének különböző antigéndoménjeinek (legtöbbször a BC, illetve az A doméneket) megfelelő peptidekből állnak, és vagy egy peptidet (mono-peptid-vakcinák), vagy pedig több különböző peptid keverékét (multi-peptid-vakcinák) tartalmazzák (Dong et al., 2002; 2005 és 2006; Dong és Chen, 2006; Liu et al., 2006a és 2006b). Az ilyen típusú vakcinák teljesen ártalmatlanok, mivel nem találhatóak bennük szaporodásra képes víruspartikulák, hatékonyság tekintetében ugyanakkor fertőző kísérletekben a több adaggal, adjuvánsok jelenlétében történő parenterális alkalmazás mellett is csupán részleges védettséget nyújtottak.

#### *4.9.2.3) DNS vakcinák*

Eddig a CSF ellen kifejlesztett összes ismert és leírt DNS vakcina a vírus E2 glikoproteinjét expresszáló plazmid rendszereken alapult (Andrew et al., 2000 és 2006; Ganges et al., 2005; Wienhold et al., 2005; Yu et al., 2001), továbbá ezen kívül különböző citokineket (mint például az IL-3, az IL-12, vagy akár az IL-18), illetve felszíni szabályozó molekulákat (például a CD154, vagy a tetraspanin CD81) kódoló génszakaszokat is beültettek, hogy a konstruktok immunogenitását növelhessék (Andrew et al., 2006; Li et al., 2015; Wienhold et al., 2005). A marker tulajdonság ezeknél a jelölteknél is az Erns, vagy az NS3 ellen termelődött ellenanyagok kimutatásával valósul meg.

Az, hogy a korábban a szintetikus peptidvakcináknál tárgyaltakhoz hasonlóan CSFV fertőzés elleni védelmet csupán magas adaggal történő többszöri oltás eredményezett, a DNS vakcináknak a sertéságazatban történő alkalmazását gazdaságilag életképtelenné teszik (Sun et al., 2011a).

#### *4.9.2.4) Transz-komplement deléciós mutánsok*

A CSF elleni harcban leginkább az Erns vagy E2 deléciós mutánsok használata terjedt el (Frey et al., 2006; Maurer et al., 2005; van Gennip et al., 2002; Widjojoatmodjo et al.,

2000). Az ún. transz-komplement deléciós mutánsok esetében nem kell számolni a virulencia visszatérésével, mivel a transz-komplementáció során (amelyet Erns-t vagy E2-t expresszáló rekombináns sejtvonalak RNS transzfekciójával értek el) keletkezett virionok a második replikációs ciklusban már szaporodásra képtelenek (Beer et al., 2007). Az elvégzett kísérletek eredményeinek értékelésekor világossá vált, hogy az immunizálás sikere nagyban függött a vakcinázás módjától: az intradermális alkalmazással ellentétben az intramuszkuláris, illetve a szájon át történő alkalmazás csupán részleges védeltséget nyújtott (Frey et al., 2006; van Gennip et al., 2002). Érdeemes még megjegyezni, hogy az E2 deléciós mutánsok kevésbé bizonyultak hatékonyak (Maurer et al., 2005; van Gennip et al., 2002). Ezen replikonok esetében a DIVA tulajdonság a vakcinázott állatokból hiányzó specifikus ellenanyagok detektálásán alapul.

#### 4.9.2.5) *Kiméra pestivírusokon alapuló vakcinák*

A C-törzs korábban már tárgyalt kivételes immunogén tulajdonságai miatt kézenfekvő megoldásnak tűnt belőle egy marker-jellegű vektorvakcinát előállítani. Moormann és munkatársai (1996) a C-törzs E2 glikoproteinjét kódoló génszakaszát a Brescia CSF-vírustörzs megegyező régiójával helyettesítették, és úgy találták, hogy a létrehozott FLc-h6 jelű hibridvírus legalább olyan jól képes szaporodni, mint a C-törzs, illetve megőrizte annak kiváló immunogén jellemzőit is. A két kiinduló vírustörzs felszíni fehérjéire (Erns, E2) specifikus monoklonális ellenanyagok segítségével pedig a vektorvakcina által indukált ellenanyagok megkülönböztethetőek a natív törzsek által indukáltaktól.

Jelenleg egyetlen, C-törzs alapú újgenerációs markervakcina van kereskedelmi forgalomban: a CP7\_E2alf-törzset tartalmazó Suvaxyn<sup>®</sup> CSF Marker (Zoetis), amelynek regisztrációjához szükséges hatékonysági vizsgálatok pontos leírását az „*Anyagok és módszerek*” c. fejezetben, a kapott eredményeket, és azok kiértékelését pedig az „*Eredmények*”, illetve a „*Megbeszélés*” c. fejezetekben fogom részletesen tárgyalni.

Ezt a pestivírus kimérát Reimann és munkatársai (2004) fejlesztették ki, ami a CSFV Alfort 187-es törzsének E2 felszíni fehérjéjét expresszáló génszakaszát hordozza a citopatogén hatással rendelkező CP7 jelű BVDV-törzs cDNS klónjába, mint vektorba kódolva (Meyers et al., 1997). A kiméra vírussal oltott sertésekben csak a CSFV E2 glikoproteinje ellen termelődnek specifikus ellenanyagok, míg a vad vírussal fertőzött sertésekben az E2, és az Erns is indukálja az ellenanyag-termelődést, így az Erns alkalmas lehet arra, hogy megfelelő diagnosztikai módszer segítségével szerológiailag elkülönítse a fertőzött egyedeket a vakcinázottaktól (Xia et al., 2015).

A CP7\_E2alf-törzsön kívül idő közben több más kiméra pestivírust is leírtak már, amelyek közül számos konstrukció (például az flc9 és flc11 jelű törzsek) ígéretesnek bizonyult (Blome et al., 2012; de Smit et al., 2001b; Eble et al., 2012). Egy másik jelölt, a CP7\_E2gif-törzs pedig megfelelő védelmet biztosított, mérsékelte a fertőző vírus szaporodását (Rasmussen et al., 2007), és jó DIVA-potenciállal is rendelkezett (von Rosen et al., 2014). Kifejlesztettek ezeken kívül még ún. módosított epitóp mintával rendelkező kiméra vírusokat, azonban az ezekhez kapcsolódó megbízható DIVA diagnosztikai lehetőségek megalkotása elmaradt (Blome et al., 2017b).

#### **4.10) A vakcinák törzskönyvezése**

Az állatgyógyászati gyógyszerek, és immunológiai készítmények törzskönyvi engedélyezése, majd a már kereskedelmi forgalomban lévő termékek jogszabályban rögzített hatósági ellenőrzése garantálja, hogy a hazai piacra kerülő állatgyógyászati termékek hatékonyak, megfelelő minőségűek és mind a kezelt állatokra, mind az állatok kezelését végző személyre, mind pedig a fogyasztókra ártalmatlanok legyenek. Ennek értelmében tehát az állati eredetű élelmiszerek közegészségügyi biztonságára közvetve az alkalmazott állatgyógyászati vakcinák is kihatnak (Soós és Tuboly, 2009b).

Az Európai Unió területén egységes a törzskönyvezés jogszabályi háttere: a vakcinák forgalomba hozatali engedélyezése során az elvégzett kísérleteknek meg kell felelniük az éppen érvényben lévő Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur.) vonatkozó monográfiáinak (Council of Europe, 2010a és 2010b), valamint az Európa Tanács 2001/82/EK irányelvének (2001). Az eljárás alapját a gyártó által összeállított törzskönyvi dokumentáció (amelynek követelményeit szintén ez az irányelv határozza meg) képezi: ez részletesen és hitelesen dokumentálja a készítménnyel kapcsolatosan elvégzett vizsgálatokat, valamint azok eredményeit, így ez a dosszié akár több ezer oldal terjedelmű is lehet. A dokumentáció a jogszabálynak megfelelően négy nagy részből áll:

- az adminisztratív részből, ahol a gyártóra vonatkozó adminisztratív adatok, a termékirodalom, és a szakértői vélemények találhatóak,
- az analitikai részből, amely az adott készítmény gyártásának és ellenőrzésének részletes leírását tartalmazza,
- az ártalmatlansági rész ismerteti a készítmény biztonságosságát igazoló összes elvégzett laboratóriumi és nagyüzemi vizsgálatot, illetve azok eredményét,
- a hatékonysági részben pedig a készítmény hatékonyságát bemutató kísérletek részletes ismertetése szerepel.

Valamennyi tagállamban lehetőség van az állatgyógyászati készítmények törzskönyvi engedélyezését nemzeti eljárásban lefolytatni. A kérelmező csak abban az esetben

folyamodik ehhez az eljáráshoz, ha az adott készítményt kizárólag egyetlen tagállamban kívánja forgalmazni. Amennyiben egy adott készítmény az egyik tagállamban már rendelkezik forgalomba hozatali engedéllyel, akkor másik tagállamban már nem lehet nemzeti engedélyezési eljárást alkalmazni.

A több tagállamban érvényes, egységes forgalomba hozatali engedély kiadására jelent megoldást az ún. kölcsönös elismerésen alapuló (mutual recognition procedure, MRP), illetve az ún. decentralizált eljárás (decentralised procedure, DCP). Mindkét folyamatra igaz, hogy a kérelmező által benyújtott törzskönyvi dokumentáció értékelését a referens tagállam (reference member state, RMS), és az érintett tagállamok (competent member state, CMS), ahol a kérelmező forgalmazni kívánja a készítményt, közösen végzik.

Az MRP során az engedélyezés végeredményben egy nemzeti eljárással indul, a kérelmező ugyanis először a referens tagállam illetékes hatóságához nyújtja be a törzskönyvi dokumentációt. Ez alapján az RMS elkészíti, majd a CMS-ek és a kérelmező részére megküldi az értékelő jelentését (assessment report, AR), amit az érintett tagállamok vagy kölcsönösen elismernek, vagy pedig kisebb módosításokkal fogadnak el, így az érintett felek között zajló egyeztetések végén kialakul egy közös álláspont. A decentralizált eljárás során a kérelmező által megküldött törzskönyvi dokumentáció értékelését az RMS és a CMS-ek együtt végzik. Az érintett tagállamok illetékes hatóságai mindkét eljárás lezárulását követően azonos tartalmú nemzeti engedélyt adnak ki.

A fentiekben tárgyalt három eljárás mellett létezik még az ún. centrális vagy centralizált eljárás (centralised procedure, CP), amelyet a 726/2004/EK számú rendelet (726/2004/EK rendelet, 2004) szabályoz. Ennek a központosított engedélyezési eljárásnak a célja a készítmények egyetlen eljárásban történő engedélyezése, amelynek végén az adott készítmény az Európai Bizottságtól az EGK összes tagállamában érvényes forgalomba hozatali engedélyt kap. Az eljárást a korábban londoni, de 2019 márciusától már amszterdami székhelyű Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) koordinálja, az állatgyógyászati készítmények engedélyezésével kapcsolatos szakértői és értékelési feladatokat pedig a tagállamok által delegált résztvevőkből álló Állatgyógyászati Készítmények Bizottsága (Committee for Medicinal products for Veterinary Use, CVMP) végzi (Soós és Tuboly, 2009b).

Centralizált eljárást kötelező lefolytatni többek között minden olyan esetben, amikor az állatgyógyászati készítményt biotechnológiai, például génebézészeti eljárást alkalmazva állítják elő – ez az oka annak, hogy a jelen doktori értekezésemben tárgyalt CP7\_E2alf-törzset tartalmazó Suvaxyn<sup>®</sup> CSF Marker vakcina is CP során kapott forgalomba hozatali engedélyt.

## 5) CÉLKITŰZÉSEK

A tudományos értekezésemben bemutatott laboratóriumi és állatkísérletek céljai összhangban voltak a munka alapjául szolgáló Európai Unió projekt célkitűzéseivel.

A 2004. és 2013. között zajlott, „CSF VACCINE & WILD BOAR”, valamint „*Epidemiology and control of classical swine fever (CSF) in wild boar and potential use of a newly developed live marker vaccine*” elnevezésű, az Európai Közösség 6. és 7. keretprogramja által támogatott, egymásra épülő nemzetközi tudományos projektek (amelyben Igazgatóságunk kilenc kutatóintézettel együtt vett részt) célja volt, hogy:

- i) a CSF vaddisznó-populációkból történő sikeres eradikációjára alkalmas járványtani és gazdasági modellek kidolgozása,
- ii) vaddisznók orális immunizálására alkalmas csali kifejlesztése, amely biztonsággal felvehető minden korosztály számára (különös tekintettel a fiatal egyedekre),
- iii) egy markervakcina, és a hozzá kapcsolódó diagnosztikai rendszer kifejlesztése.

Ezen célkitűzések eléréséhez az ÁTI a regisztrációhoz szükséges laboratóriumi és állatházi munkák lebonyolításáért felelős munkacsoporthoz csatlakozott. Célunk volt, hogy:

- i) fertőzéses kísérletekben igazoljuk az egy adag CP7\_E2alf markervakcina-jelölt hatékonyságát,
- ii) megállapítsuk az immunitás kialakulásának idejét (onset of immunity, OOI)
- iii) összehasonlítsuk a vakcinajelölt különböző alkalmazási módok által kiváltott hatásait 6 hetes, pestivírusok elleni anyai ellenanyagoktól mentes, ill. anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokban,
- iv) megvizsgáljuk az immunizálás eredményességét az anyai ellenanyagok árnyékában is.



## 6) ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 6.1) Kísérleti állatok és elrendezés

Az értekezésemben tárgyalt két vizsgálatot azonos körülmények között, azonos kísérleti elrendezés mellett a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (Nébih) Állatgyógyászati Termékek Igazgatóságának (ÁTI) gödöllői zárt állattartó telepén végeztük el. Az egyetlen eltérés a kísérleti állatok immunológiai státuszában volt: 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 sertéseket mindkét esetben a brucellózistól, leptospirozistól, PRRS-től, valamint Aujeszky-betegségtől mentes telepet üzemeltető Pietkert Kft.-től vásároltuk. Az MDA+ malacok előállításához a beszállítótól 6 db KAHYB vemhes kocát vásároltunk, amelyeket a vemhességük 75. napján helyeztünk el a zárt istállóban. A kocákat a fialást megelőző 4. héten Thiverval-törzset tartalmazó CSF elleni vakcinával (Ceva-Phylaxia Zrt.) oltottuk. A vakcinázott kocák malacai közül a születésüket követő második, illetve 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 (generalized randomized block design, GRBD) mind az MDA-, mind pedig az MDA+ kísérletben három kísérleti csoportot hoztunk létre: két, egyenként 15 egyedből álló vakcinázott (izomba oltott csoport: TG1, szájon át vakcinázott csoport: TG2), valamint egy 10 egyedet számláló, oltatlan kontroll csoportot (CG). A TG csoport egyedeit a kísérlet nulladik napján immunizáltuk, majd valamennyi malacot 14 nappal a vakcinázást követően oronasalisan fertőztük a magas virulenciájú Koslov CSF-vírus törzsszel.

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

### 6.2) A vakcina és a fertőző CSF vírustörzs

A vakcinajelölt két különböző gyártási tételét a Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L. (akkori nevén Pfizer Olot S.L.U.) bocsátotta rendelkezésünkre. A spanyolországi gyártóhelyen a Helyes Laboratóriumi Gyakorlatnak (Good Laboratory Practice, GLP)

megfelelő körülmények között, 75% CP7\_E2alf antigén és 25% L2 stabilizátor arányban előállított vakcina hatóértéke minimum 100 PD<sub>50</sub> (50% Protective Dose; 50%-os védő adag) volt adagonként.

Immunizáláskor mindkét kísérletben a célállaton végzett hatékonysági vizsgálatok követelményének megfelelően a vizsgált vakcina minimum titerét alkalmaztuk. A kísérlet során a TG1 csoport egyedeit a 19101 számú tétel 1:10-es, és a VMRD-12-005 számú tétel 1:100-as hígításának 1 ml adagjával izomba (im.) oltottuk, míg a TG2 csoport egyedeit a 081010 és 191211 számú tételek 1:3-as hígításának 1,6 ml adagjával szájon át (p.o.) immunizáltuk (**1. táblázat**).

**1. táblázat.** A kísérletekben használt vakcinatörzsek alkalmazott adagja, és hígítása.

Vakcina	MDA-		MDA+	
	191010	081010	VMRD-12-005	191211
Immunizálás módja	intramuszkuláris	szájon át	intramuszkuláris	szájon át
Alkalmazott adag	1 ml	1,6 ml	1 ml	1,6 ml
Hígítás	1:10	1:3	1:100	1:3

A fertőzéshez használt magas virulenciájú Koslov CSF-vírus törzset a Friedrich-Loeffler Intézet (Insel Riems, Németország) bocsátotta a rendelkezésünkre. A vakcinázás után 14 nappal a felhasználásra kész izolátum 2 ml adagjával egy 5 ml-es egyszer használatos műanyag fecskendővel minden állatot oronasalisan az alábbi módon fertőztünk: az inokulumból 0,5-0,5 ml-t adagoltunk a malacok mindkét orrlyukába, illetve 1 ml-t a szájukba.

### 6.3) Klinikai megfigyelések, testhőmérséklet-mérés

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 naponta rögzítettük, és egy 0-tól 3-ig terjedő skálán értékeltük (Mittelholzer et al., 2000). A cikkben leírtakhoz képest az eltérés a vizsgált paraméterek meghatározásában volt: több kategóriát összevontunk, és együtt értékeltünk (**2. táblázat**). Ennek megfelelően az alábbi nyolc paramétert különítettük el: i) életképesség, ii) testtartás, iii) légzés, iv) járás, v) bőr, vi) szemek, vii) bélsár, valamint viii) takarmány-felvétel.

**2. táblázat.** A kísérleti állatok klinikai tüneteinek rögzítésére szolgáló, a módosított Mittelholzer-féle pontrendszer alapján kialakított táblázat.

Állat száma	A klinikai tünetek értékelése								Testhőmérséklet (°C)	Megjegyzések		
	Vizsgált paraméter	Pontszámok				Vizsgált paraméter	Pontszámok					
		-	1	2	3		-	+			2+	3+
	életképesség					bőr						
	testtartás					szemek						
	légzés					bélsár						
	járás					takarmányfelvétel						
	életképesség					bőr						
	testtartás					szemek						
	légzés					bélsár						
	járás					takarmányfelvétel						
	életképesség					bőr						
	testtartás					szemek						
	légzés					bélsár						
	járás					takarmányfelvétel						

Az állatok testhőmérsékletét a vakcinázást megelőző 3. naptól az azt követő 7. napig (kivéve a kontroll csoport egyedek 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.

#### 6.4) Mintavétel

Az MDA- kísérletben a vakcinázást megelőző 3. napon, míg az MDA+ kísérletben a születés utáni 2 és 5 hetes korban történő mintavételeken kívül még mindkét kísérlet esetén a vakcinázás utáni 14., 18., 21., 24., 28. és 35. napokon az állatok *vena jugularis*ából (illetve ennek meghíúsulása esetén a *sinus vena ophthalmica externa ventralis*ából) a BD Vacutainer® rendszer segítségével preparált, illetve kezeletlen vákuumos vérvételi csövekbe (Vacuette®, Greiner Bio-One) megközelítőleg összesen 10 ml mennyiségű vértmintát vettünk.

A szérum előállításához a natív vérmintákat 4°C-on 10 percig 2000 rpm fordulaton centrifugáltuk, majd a savókat felcímkézett, 2 ml-es eldobható cryocsövekbe (Greiner Bio-One) mértük szét, és felhasználásig -20°C-on tároltuk azokat. Minden mintát tartalmazó csövet a kísérleti állat sorszámaival, a vizsgálat azonosítójával és a mintavétel dátumával jelöltünk meg.

A lítium-heparinnal alvadésgátolt teljes vérmintákat -20°C-ra lefagyasztottuk. A vírusizoláláshoz használt mintákat a vizsgálat előtt felolvasztottuk (hemolizáltuk), és 4°C-on 30 percig 6000×g fordulaton centrifugáltuk, majd azt 1:10 arányban antibiotikumot tartalmazó foszfát pufferes sóoldattal (PBS) hígítottuk.

### **6.5) Sejtek és konjugátum**

A vírusneutralizációs teszthez és a vírusizoláláshoz SK-6 sejtvonalat használtunk, amelyet a Nébih Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága (ÁDI) bocsátott a rendelkezésünkre. A titrálásokhoz szükséges PK-15-sejtvonal az American Type Culture Collection (ATCC) nevű nonprofit szervezettől (katalógus szám: CCL-33) származott. Mindkét sejtvonalat Hanks-sókat, L-glutamint és nátrium-hidrogén-karbonátot tartalmazó, 7%-os magzati borjúsavóval kiegészített minimális esszenciális médium (MEM) tápfolyadékban (Sigma-Aldrich, katalógus szám: RNBC2884) tenyésztettük. Az említett tesztekhez gyári poliklonális fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt CSFV-konjugátumot (Prionics AH, katalógus szám: 7610035) használtunk.

### **6.6) A vakcina- és a fertőző törzs titrálása**

A pontos titerértékek megállapítása céljából mind a vakcinavírust, mind pedig a fertőzéshez használt CSF-vírusterzset az alkalmazást követően PK-15 sejtvonalon megtráltuk. Ehhez a vizsgálandó vírusszuspenziókból tápfolyadékban 10-es alapú hígítási sort készítettünk, majd a hígításokból 100 µl mennyiséget PK-15 sejszuspenzióval benőtt 96 lyukú sejtenyészítő mikrolemezre mértünk. A lemezeket ezután 72 órán át széndioxidos termosztátban 37°C-on inkubáltuk, és a pontos titer-értékeket direkt immunfluoreszcens festéses módszer segítségével TCID<sub>50</sub>/ml egységben fejeztük ki.

### **6.7) Ellenanyag detektálás**

A malacok pestivírusok elleni ellenanyagoktól mentes (szeronegatív) státuszát, valamint a vakcinázás következtében kialakuló immunválaszt ellenanyag kimutatásra alkalmas enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálattal (ELISA) és vírusneutralizációs teszttel (VNT) vizsgáltuk.

A vírusneutralizációs tesztet az OIE Kézikönyv 2008-as kiadásának 2.8.3.B.2.a fejezetével (OIE, 2008) összhangban végeztük. A neutralizáló ellenanyagok titerét SK-6 sejtvonalon 30-300 TCID<sub>50</sub>/50 µl mennyiségű Alfort-187 CSF vírustörzssel szemben határoztuk meg. A 96 lyukú sejtenyésző mikrolemezeken a sejteket széndioxidos termosztátban 37°C-on 72 órás inkubáció után, majd 80°C-on 3 órás hőfixációt követően FITC-cel jelölt konjugátummal festettük meg, és a neutralizáló ellenanyagok hiányára a specifikus fluoreszcens jel megjelenéséből következtettünk. Az ellenanyagok mennyiségét 50% neutralizációs dózis (ND) egységben fejeztük ki. Az 1:5-ös kezdő szérumszűrés miatt a kimutathatóság alsó határát 10 ND<sub>50</sub>-ben állapítottuk meg. A vírusneutralizáció során használt Alfort 187 CSF-vírustörzset az Európai Klasszikus Sertéspestis Referencia-laboratórium (Tierärztliche Hochschule, Hannover, Németország) bocsátotta rendelkezésünkre.

A CSF elleni E2 specifikus antitesteket a gyártó útmutatásait követve, kereskedelmi forgalomban kapható ellenanyag ELISA módszerrel (Herd-Chek<sup>®</sup> CSFV Ab ELISA (IDEXX Laboratories)) mutattuk ki.

### **6.8) Antigén detektálás**

A szérummintákban jelen lévő CSFV antigéneket a gyártó útmutatásait követve, a vírus Erns felszíni fehérjéjét detektáló, kereskedelmi forgalomban kapható antigén ELISA teszttel (HerdChek<sup>®</sup> CSFV Ag/Serum ELISA (IDEXX Laboratories)) vizsgáltuk.

A vírusizolálást (VI) az OIE Kézikönyv 2008-as kiadásának 2.8.3.B.1.b fejezetével összhangban (OIE, 2008) az ÁDI laboratóriumában végeztük el. A „*Mintavétel*” c. fejezetben tárgyalt kezelt vérminták mindegyikének két-két hígításával (10<sup>6</sup> sejt/ml) duplán kezeltük a 96 lyukú sejtenyésző mikrolemezeken növesztett SK-6 sejtvonalat. A sejteket 37°C-on 72 órás inkubáció után, majd 80°C-on 3 órás hőfixációt követően 50 µl FITC-cel jelölt konjugátummal festettük meg. A vírus jelenlétére a specifikus fluoreszcens jel megjelenéséből következtettünk.

### **6.9) Nukleinsav detektálás**

A virális RNS-t a lítium-heparinnal alvadásgátolt vérmintákból Trizol<sup>™</sup> (Life Technologies) oldat segítségével, a gyártó útmutatásait követve vontuk ki, majd a nukleinsavat konvencionális, gél alapú reverz-transzkripció polimeráz lánreakció (RT-PCR) segítségével amplifikáltuk fel (Vilcek et al., 1994). A precipitált RNS-t 12.500×g fordulaton, 15 percig centrifugáltuk, majd a pelletet 500 µl 70%-os etanollal egyszer mostuk, és szárítás

után 25 µl duplán desztillált vízben (ddH<sub>2</sub>O) feloldottuk. A kinyert RNS-t vagy azonnal felhasználtuk, vagy -80°C-on tároltuk el.

Az RT-PCR reakcióhoz egy lépéses, reverz transzkripció kitet (QIAGEN One-Step RT-PCR Kit) használtunk. A reakcióelegy 18 µl ddH<sub>2</sub>O-t, 10 µl 5X puffert, 10 µl Q puffert, 2 µl 10 pM-os dNTP mix-et, 15-15 pMVDdiagF (5' GCC ATR CCY TTA GTA GGA CKA GC 3') és VDdiagR (5' CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA G 3') primereket, 2 µl HotStarTaq DNA Polymerase enzimet, valamint 5 µl mintát (RNS-t) tartalmazott. A program az alábbi lépéseket tartalmazta:

- |   |              |                                    |
|---|--------------|------------------------------------|
| 1. 50,0°C 30:00 percig                        | } RT-szakasz | 7. 95,0°C 0:40 másodpercig         |
| 2. 95,0°C 15:00 percig                        |              | 8. 50,0°C 0:50 másodpercig         |
| 3. 95,0°C 0:40 másodpercig                    |              | 9. 72,0°C 1:00 percig              |
| 4. 55,0°C 0:50 másodpercig<br>(-0,5°C/ciklus) |              | 10. 7-9 ciklusok ismétlése 39-szer |
| 5. 72,0°C 1:00 percig                         |              | 11. 72,0°C 7:00 percig             |
| 6. 3-5 ciklusok ismétlése 10-szer             |              | 12. vége                           |

A belső kontrollként használt Th/04\_KhonKaen jelű atípusos szarvasmarha pestivírus (TKK) plazmidot prof. Dr. Belák Sándor (SVA, Uppsala, Svédország) bocsátotta a rendelkezésünkre. A reakciót követően 8 µl PCR terméket 3 µl festékkel együtt (Blue/orange 6X Loading Dye, Promega) etídium-bromiddal kezelt 2%-os agaróz gélben 100-110 mA áramerősség mellett elektroforézis segítségével futtatunk, és a terméket ultraibolya fényben tettük láthatóvá.

A fent említett laboratóriumi vizsgálatokat validált módszerekkel, az ÁTI Európai Gyógyszerminőségi Igazgatóság (European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM) által akkreditált laboratóriumában (a vírusizolálás kivételével) – amely tagja a hivatalos gyógyszerellenőrző laboratóriumok (Official Medicines Control Laboratory, OMCL) hálózatának –, a minőségbiztosítási rendszer ISO/IEC 17025 előírásaival összhangban végeztünk el.

## 6.10) Patológiai, kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

Minden elhullott és leölt állatot felboncoltunk, és belőlük a Belák és munkatársai (2008) által korábban már ismertett kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a következő szervmintákat gyűjtöttük: i) mandula, ii) áll alatti, illetve iii) bélfodri nyirokcsomók, iv) tüdő, v) lép, vi) vese, vii) vékonybél, valamint viii) agyvelő. A mintákat 4%-os frissen készített pufferolt paraformaldehidben 24 órán keresztül fixáltuk, majd felhasználásig felcímkéztük, 50 ml-es centrifugacsövekben, szacharóz tartalmú pufferben tároltuk. A

szöveti vizsgálatokat a svéd Nemzeti Állatorvosi Intézetben (National Veterinary Institute, SVA, Uppsala) végeztük. Ehhez a szervmintákat a szokásos kórszöveti eljárással víztelenítettük, paraffinba ágyasztuk, metszettük, illetve hematoxilinnal és eozinnal megfestettük. Az immunohisztokémiai vizsgálatokat kétlépéses peroxidáz-módszer segítségével (Dako Cytomation EnVision TM+System-HRP Labelled Polymer anti-mouse, Dako Cytomation, DK) kereskedelmi forgalomban kapható E2 specifikus monoklonális ellenanyaggal végeztük (WH303, VLA, UK).

### **6.11) A vakcinajelölt hatékonyságának megállapítása**

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). A minimum 70%-os védőhatás a vakcinákkal szemben állított általánosan elfogadott követelmény.

## 7) EREDMÉNYEK

### 7.1) A kísérletekben használt vírustörzsek titrálása

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

Az MDA- kísérletben a TG1 csoportban az izomba oltáshoz használt 191010 termelési számú vakcinánál az alkalmazás előtt  $10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml, az alkalmazás után  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml titerértékeket kaptunk. Az MDA+ kísérletben a VMRD-12-005 termelési számú vakcina alkalmazás előtti titere  $10^{6,8}$  TCID<sub>50</sub>/ml, az alkalmazás utáni titere  $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/ml volt (**3. táblázat**). A gyártó minőségi bizonylata alapján ennek a két műszaki számú tételnek a minimum hatóértéke  $10^{5,3}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Az MDA- kísérletben a TG2 csoportban a szájon át történő immunizáláshoz használt 081010 termelési számú vakcina alkalmazás előtti titere  $10^{6,07}$  TCID<sub>50</sub>/ml, az alkalmazás utáni titere  $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/ml volt, az MDA+ kísérletben a 191211 termelési számú vakcinánál az alkalmazás előtt  $10^{6,58}$  TCID<sub>50</sub>/ml, az alkalmazás után  $10^{5,0}$  TCID<sub>50</sub>/ml titerértékeket mértünk (**3. táblázat**). Ennek a két műszaki számú tételnek nem ismert a gyártó által deklarált minimum hatóértéke.

**3. táblázat.** A kísérletekben használt vakcinatörzsek titrálásának eredményei.

	MDA-		MDA+	
Vakcina	191010	081010	VMRD-12-005	191211
Immunizálás módja	intramuszkuláris	szájon át	intramuszkuláris	szájon át
Alkalmazott adag	1 ml	1,6 ml	1 ml	1,6 ml
Hígítás	1:10	1:3	1:100	1:3
Alkalmazás előtti titer	$10^{5,5}$ TCID <sub>50</sub> /ml	$10^{6,07}$ TCID <sub>50</sub> /ml	$10^{6,8}$ TCID <sub>50</sub> /ml	$10^{6,58}$ TCID <sub>50</sub> /ml
Alkalmazás utáni titer	$10^{4,5}$ TCID <sub>50</sub> /ml	$10^{5,6}$ TCID <sub>50</sub> /ml	$10^{4,8}$ TCID <sub>50</sub> /ml	$10^{5,0}$ TCID <sub>50</sub> /ml

A fertőzéshez használt Koslov-törzs titere az MDA- kísérletben  $10^{6,1}$ , míg az MDA+ kísérletben  $10^{5,7}$  TCID<sub>50</sub>/ml-nek bizonyult.

### 7.2.) Klinikai tünetek

A vakcinázást megelőző három napban a fertőzésig a malacok mindkét kísérletben egészségesek voltak, klinikai tüneteket nem mutattak. Közvetlenül az immunizálást követően



a kezelt állatokban a vakcina alkalmazásához köthető helyi reakciót, vagy szisztémás mellékhatást egyik kísérlet során sem tapasztaltunk.

Az MDA- kísérletben az oltatlan kontroll malacokban általános klinikai, illetve a betegségekre jellemző tüneteket (bágyadtság, 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 spontán elhullott hat, illetve hét nappal a fertőzést követően, míg a többi kontroll malacot állatjóléti szempontok figyelembe vételével a kísérlet lezárása előtt végleg elaltattunk.

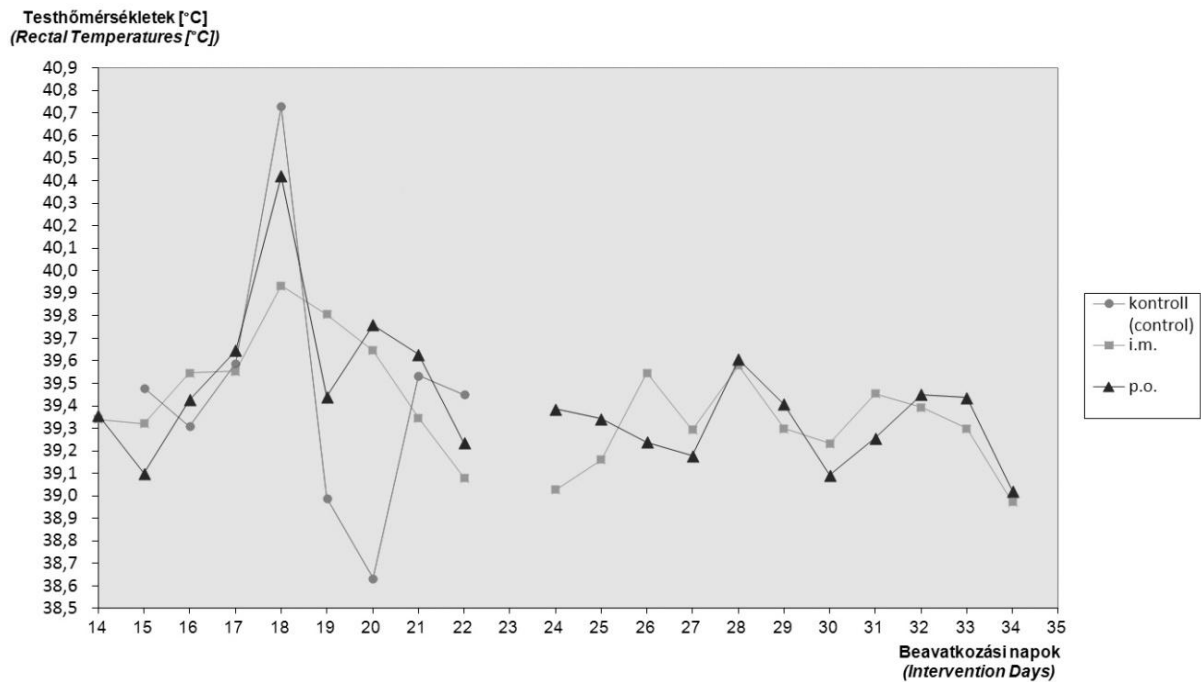
Egy szájon át immunizált állatban a fertőzés után 4-5 nappal mérsékelt, majd néhány nappal később már súlyos klinikai tüneteket észleltünk: sárgás, híg hasmenést, súlyos idegrendszeri tüneteket, úgy, mint remegést, koordinációs mozgászavarokat (ataxia), görcsrohamokat. Emiatt 7 nappal a fertőzést követően a malacot állatjóléti szempontok figyelembe vétele mellett elaltattuk. Ezen kívül a TG1 csoportból még öt, a TG2 csoportból pedig még hat vakcinázott állat mutatott a fertőzést követő 4-5. naptól pár napig mérsékelt klinikai tüneteket, mint például 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 (bágyadtság, hasmenés, étvágytalanság, remegés, súlyos idegrendszeri tünetek, egyensúlyzavar) 6 nappal a fertőzést követően, elsősorban a kontroll csoportban észleltük: az első spontán elhullott állatot is ebben a csoportban találtuk 8 nappal a fertőzést követően. Ezen kívül még hat kontroll állat hullott el spontán a kísérlet vége előtt, három azonban a kísérlet végéig életben maradt. Emellett a 15-ből kilenc szájon át vakcinázott malac is mutatta 6-7 nappal a fertőzést követően a betegségekre 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 6 nappal a fertőzés után bágyadtság, valamint gyenge hasmenés, de mind a három malac még a kísérlet vége előtt felépült.

### **7.3) Testhőmérsékletek**

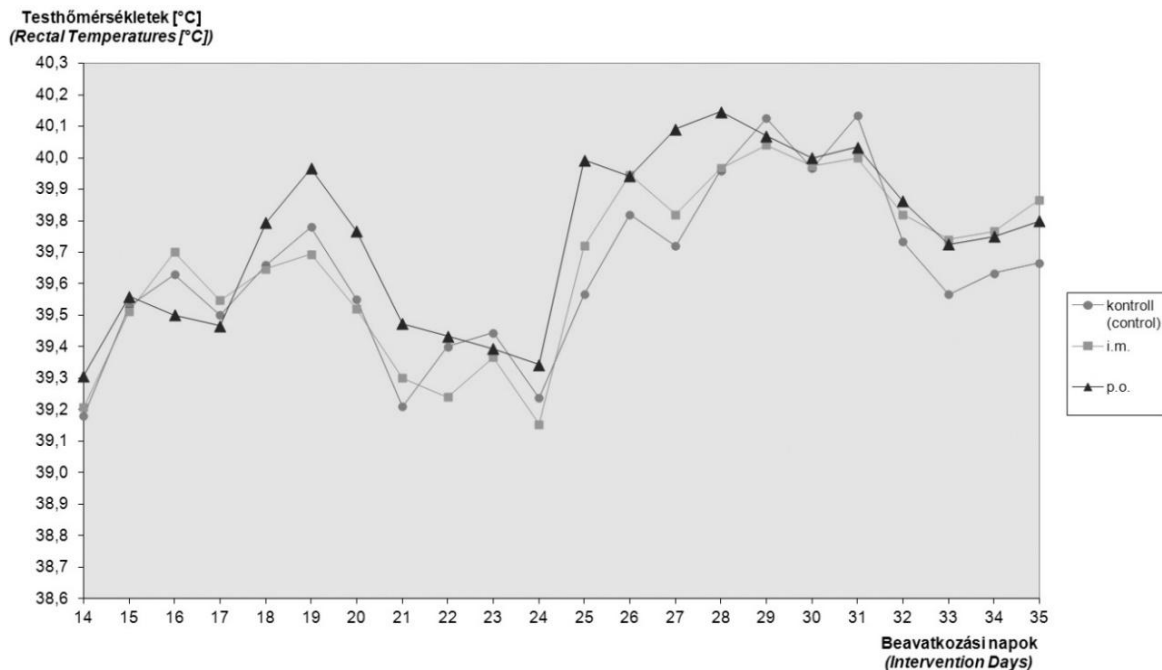
A vakcinázást megelőző három napban az MDA- kísérletben egy CG és egy TG1 malac lázas volt, az állatokat azonban a kísérletből nem zártuk ki, mivel egyéb tüneteket nem észleltünk rajtuk, és a vizsgáló állatorvos szakvéleménye alapján a kísérlet számára alkalmasnak bizonyultak.

Az MDA- kísérletben a fertőzést követően 3-4 napon keresztül egy kontroll, egy im. és egy p.o. vakcinázott malac volt lázas. Az átlag rektális testhőmérsékleti görbe csúcsa a fertőzést követő 4. npra esett, ekkor mértük a legtöbb 40,0°C-ot meghaladó értéket (**1. diagram**). 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.



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

Az MDA+ kísérletben a fertőzés után jellemzően 4-5 napnál hosszabb ideig egy kontroll, kilenc im. és nyolc p.o. vakcinázott malac volt lázas. Az átlag rektális testhőmérsékleti görbének két csúcsa is volt: az első a fertőzést követő 5. npra esett (**2. diagram**). 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 volt tehető, míg a TG2 csoportban ez a fertőzés után 13-15 nappal jelentkezett, és mindhárom esetben elérte, illetve meg is haladta a 40,0°C-t (**2. diagram**).



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

#### 7.4) Ellenanyag detektálás

Az MDA- kísérletben az oltatlan kontroll malacok vérsavómintáinak neutralizációs titere a fertőzés előtt végig a kimutathatósági szint ( $< 10 \text{ ND}_{50}$ ) alatt volt (**4. táblázat**). Ugyanakkor a kontroll állatok közül három vérsavójának a neutralizációs titerét a fertőzés napján 10-10, illetve 15  $\text{ND}_{50}$ -nek mértük. A vakcinázás után, de még a fertőzés előtt egy izomba oltott és hat szájon át vakcinázott malac szérummintájának neutralizációs titere a kimutathatósági szint ( $< 10 \text{ ND}_{50}$ ) alatt maradt, ugyanakkor három p.o. immunizált állat kivételével a többi oltott malac vérsavójának titere nagyobb volt, vagy megegyezett 15  $\text{ND}_{50}$ -nel (**4. táblázat**).

Az oltott malacok vakcinázás előtti, illetve a kontroll állatok fertőzés előtti savómintáiból a kereskedelmi forgalomban kapható ellenanyag ELISA teszttel CSFV E2-specifikus ellenanyagokat nem tudtunk kimutatni (**1. ábra**). A vakcinázás után, de még a fertőzés előtt az izomba oltott malacok három kivételével (amelyek közül kettő szérummintája kétesnek bizonyult) mind, ugyanakkor a szájon át immunizált állatok közül csupán három malac szérummintája bizonyult pozitívnak (és kettő ez utóbbi esetben is kétes eredményt adott) (**1. ábra**).

Az MDA+ kísérletben az oltatlan kontroll, illetve a kezelt malacok mindegyikében a fertőzés előtt végig jóval magasabb neutralizációs titerértékeket mértünk: a 14. napon a kísérleti állatok nagy része már 640  $\text{ND}_{50}$ -nél nagyobb titerértékeket mutatott (**4. táblázat**).

**4. 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; \*: fertőzés napja

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	†

A kontroll állatok első mintavételi napon vett savómintái közül a kereskedelmi forgalomban kapható ellenanyag ELISA teszttel öt esetben kaptunk kétes eredményt, azonban a fertőzés napján CSFV E2-specifikus ellenanyagokat már nem tudtunk kimutatni (1. ábra). A vakcinázást megelőzően a TG1 csoportban három malac kétes eredményt adott, míg a TG2 csoportban kettő malac szérummintája kétes, kettőé pedig pozitívnak bizonyult. Az im. vakcinázott malacok közül a 14. napon vett savóminták közül nyolc esetben kétes, két esetben pozitív eredményt kaptunk, a szájon át immunizált malacok savómintáiból CSFV E2-specifikus ellenanyagokat nem tudtunk kimutatni (1. ábra).

**1. ábra.** A két kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett szérumminták ellenanyag ELISA-val kapott OD értékei.

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

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				

Az MDA- kísérletben egy kivételével az összes kontroll állat vérsavómintájának neutralizációs titere négy nappal a fertőzést követően is még a kimutathatósági szint (<10 ND<sub>50</sub>) alatt maradt (4. táblázat). Három nap elteltével a még életben lévő hat kontroll malacból négy szérummintájának a titere megemelkedett, és egynél elérte a 960 ND<sub>50</sub>-es értéket. Ezt az állatot a fertőzést követő 19. napon állatjóléti szempontok figyelembe

vételével a kísérlet lezárása előtt végleg 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 az 1280 ND<sub>50</sub>-es értéket (**4. táblázat**).

A kereskedelmi forgalomban kapható ellenanyag ELISA teszt eredményei szerint a kontroll malacokból vett szérumminták mindegyike a fertőzést követően negatív volt, és mind a tíz állat az elhullásukig szeronegatív maradt (**1. ábra**). A TG1 csoportban a vakcinázás után 18 nappal nyert savóminták (egy kétes eredményt adó kivételével) mindegyike pozitív volt, ezzel ellentétben a TG2 csoportban az általános szerológiai áthangolódást később, a vakcinázás után 21 nappal tudtuk csak kimutatni. Érdeemes kiemelni, hogy az a szájon át vakcinázott állat, amelyet a súlyos klinikai tünetei miatt állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt elaltattunk, végig szeronegatív maradt (**1. ábra**). 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 vérsavómintájának neutralizációs titere (beleértve a kontroll malacokét is) emelkedni kezdett: az esetek többségében elérték, vagy meg is haladták az 5120 ND<sub>50</sub>-es értéket (**4. táblázat**). A kapott valószínűtlenül magas értékek miatt felvetődött, hogy a fertőzés napján, valamint az azt követő negyedik, illetve tizedik napon vett szérummintákat újravizsgáljuk (**5. táblázat**). Az újramérés alapján 14 nappal az immunizálást követően hat kontroll, egy izomba oltott, és nyolc szájon át vakcinázott malac vérsavómintájának neutralizációs titere a kimutathatósági szint (<10 ND<sub>50</sub>) alatt maradt, ugyanakkor a maradék négy kontroll és a többi kezelt állat szérummintájának titere enyhén megemelkedett, de a 20 ND<sub>50</sub>-es értéket egyik sem haladta meg.

A fertőzés utáni tizedik napra három kontroll állat szérummintájának titere tovább emelkedett, és egy esetben elérte a 60 ND<sub>50</sub>-es értéket. Érdeemes megjegyezni, hogy ez az a három kontroll malac, amely a kísérlet során nem hullott el. Emellett az összes izomba oltott 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 ND<sub>50</sub>) alatt maradt, és e közül a négy szájon át vakcinázott állat közül három a kísérlet vége előtt elhullott (**5. táblázat**).

**5. táblázat.** Az MDA+ kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett teljes vérből a Friderich-Loeffler Intézetben a megismételt vírusneutralizációs próbával kapott eredmények.

CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; †: elhullott; n/a: nincs adat; \*: immunizálás napja

MDA+ kísérlet														
Csoport	Állat	14. nap*	18. nap	24. nap	Csoport	Állat	14. nap*	18. nap	24. nap	Csoport	Állat	14. nap*	18. nap	24. nap
CG	K01	<5	<5	<5	TG1	IM01	7,5	<5	480	TG2	PO01	<5	7,5	640
	K02	<5	<5	<5		IM02	7,5	10	640		PO02	7,5	10	5
	K03	<5	5	†		IM03	15	10	640		PO03	15	7,5	<5
	K04	≤10	<5	≤40		IM04	15	15	>640		PO04	7,5	<5	160
	K05	5	<5	†		IM05	10	20	>640		PO05	10	5	640
	K06	5	<5	<5		IM06	15	15	>640		PO06	<5	<5	†
	K07	<5	<5	<7,5		IM07	15	7,5	>640		PO07	<5	<5	640
	K08	10	10	30		IM08	15	30	>640		PO08	<5	<5	<5
	K09	10	10	60		IM09	≤7,5	7,5	>640		PO09	10	≤7,5	20
	K10	<5	<5	<5		IM10	10	n/a	≥640		PO10	<5	<5	<5
					IM11	15	20	160	PO11	5	<5	≤7,5		
					IM12	10	10	>640	PO12	<5	<5	30		
					IM13	≤20	15	>640	PO13	<5	≤7,5	15		
					IM14	5	5	>640	PO14	<5	<5	5		
					IM15	10	10	>640	PO15	5	n/a	30		

A kereskedelmi forgalomban kapható ellenanyag ELISA teszt eredményei alapján hat kontroll állat a kísérlet időtartama alatt végig szeronegatív volt, azonban a többi négy kontroll malac hét, tíz, illetve 14 nappal a fertőzés után szeropozitívá vált (**1. ábra**). Az izomba oltott 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 21. napon vett szérumminták közül tíz negatívnak 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 áthangolódottak 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.

## 7.5) Antigén detektálás

Mindkét kísérlet összes vizsgált mintája a fertőzést megelőzően vírusizolálással (**2. ábra**), antigén ELISA-val (**3. ábra**), valamint RT-PCR-rel is negatív eredményt adott.

Az MDA- kísérletben kettő kivételével az összes kontroll állat fertőzés után vett vérmintájából vírusizolálással ki tudtuk mutatni a CSFV-t, és az elhullásukig pozitívak is maradtak (**2. ábra**). Ugyanakkor egy izomba oltott 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 végleg elaltattunk. A többi kezelt malac vérmintája végig negatívnak bizonyult (**2. ábra**).

A kereskedelmi forgalomban kapható antigén ELISA-val elvégzett vizsgálat alapján az összes kontroll állat fertőzés után vett vérmintájában megtalálható volt a CSFV Erns felszíni fehérjéje (**3. ábra**). 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 végleg elaltattunk.

Az MDA+ kísérletben hat kontroll állat fertőzés után négy, illetve hét nappal vett vérmintájából vírusizolálással ki tudtuk mutatni a CSFV-t, és ezek kettő kivételével az elhullásukig pozitívak is maradtak (**2. ábra**). A maradék négy kontroll malac végig negatív volt. Ugyanakkor 2 izomba oltott, 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 (**2. ábra**).

A kereskedelmi forgalomban kapható antigén ELISA-val kapott eredmények nagyrészt összhangban voltak a vírusizolálással kapott eredményekkel: hét kontroll malacból, amelyek a kísérlet vége előtt elhullottak, a fertőzést követő hetedik naptól ki tudtuk mutatni a CSFV Erns felszíni fehérjéjét, míg a többi három a kísérlet egész időtartama alatt negatív maradt (**3. ábra**). Ezen kívül egy izomba oltott, és tíz szájon át vakcinázott állat fertőzést követő 7., illetve 14. napon vett szérummintája volt pozitív, és a p.o. immunizált állatok közül hét az elhullásukig pozitív is maradt.



**2. és 3. ábrák.** A két kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett teljes vérből vírusizolálással kapott eredmények (2. ábra), valamint a szérumminták antigén ELISA-val kapott OD értékei (3. ábra).

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

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

## 7.6) Nukleinsav detektálás

Minden általunk vizsgált minta – a kontroll állatok vérmintáit is beleértve – RT-PCR-rel negatív lett, míg a belső kontrollként használt TKK plazmid, a pozitív kontrollként használt Koslov-törzs és a vakcinajelölt CP7\_E2alf-törzs 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 (**6. táblázat**).

**6. táblázat.** Az MDA- kísérlet kontroll állataiból a 18. napon vett teljes vérmintáknak a Friderich-Loeffler Intézetben megismételt RT-qPCR vizsgálatának eredményei.

CG: kontroll csoport; ct: cycle treshold

Csoport	Állat	RT-qPCR ct-értékek
CG	K01	22,02
	K07	19,03
	K08	19,46
	K09	17,10
	K10	21,23

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 újrazvizgáltak. A kapott eredmények alapján egy im. és egy szájon át vakcinázott malac mintáját kivéve minden vizsgált minta pozitívnak bizonyult (**7 táblázat**).

**7. táblázat.** Az MDA+ kísérlet állataiból a 18. napon vett teljes vérmintáknak a Friderich-Loeffler Intézetben megismételt RT-qPCR vizsgálatának eredményei.

CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; ct: cycle treshold; nincs ct: negatív

Csoport	Állat	RT-qPCR ct-értékek	Csoport	Állat	RT-qPCR ct-értékek	Csoport	Állat	RT-qPCR ct-értékek
CG	K01	28,3	TG1	IM01	28,1	TG2	PO01	31,0
	K02	23,8		IM02	35,2		PO02	nincs ct
	K03	24,3		IM03	28,8		PO03	32,9
	K04	33,2		IM04	34,5		PO04	30,0
	K05	25,3		IM05	31,0		PO05	27,4
	K06	28,5		IM06	33,3		PO06	27,8
	K07	27,2		IM07	30,7		PO07	28,0
	K08	35,7		IM08	31,4		PO08	27,3
	K09	33,1		IM09	34,5		PO09	n/a
	K10	27,1		IM10	n/a		PO10	28,6
		IM11		35,5	PO11		30,0	
		IM12		30,2	PO12		28,5	
		IM13		nincs ct	PO13		32,4	
		IM14		27,3	PO14		28,2	
		IM15		36,3	PO15		n/a	

### 7.7) Kórbonctani, kórszövettani vizsgálatok

Az MDA- kísérletben a vakcinázott malacok nem mutattak súlyos kórbonctani elváltozásokat. Abban a szájon át vakcinázott malacban azonban, amelyet állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt végleg elaltattunk, súlyos tüneteket észleltünk: vérzéses nyirokcsomókat, illetve vérzéses, gyulladós bélszakaszokat. A kontroll csoportban a kísérlet vége előtt tizből három állat spontán elhullott, a többi állatjóléti szempontok figyelembevételével még a kísérlet lezárása előtt végleg elaltattuk.



**1. kép.** Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malaca. Pontszerű vérzések és elhalásos területek láthatók bőrön. (saját felvétel)

A kontroll állatokon elvégzett *post mortem* vizsgálatok minden esetben igazolták a CSF-re jellemző elváltozásokat. A malacok súlyosan lesoványodtak, öt malacnál vérzéses nyirokcsomókat és gyulladással járó bélszakaszokat találtunk, valamint négy állat esetében a bőrben (**1. kép**), a vesékben (**2. kép**) és a lépben (**3. kép**) pontszerű vérzéseket is megfigyeltünk. Két malacnál a bőrben, illetve egy esetben a mandulákban elhalásos területeket is észleltünk. Az egyik kontroll állatban, amely a fertőzést követő hetedik napon erősen lesoványodott állapotban spontán elhullott, a kórboncolás során nem találtunk egyéb kóros elváltozást.



**2. kép.** Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett vese. Pontszerű vérzések láthatóak. (saját felvétel)



**3. kép.** Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett lép. Pontszerű vérzések láthatóak. (saját felvétel)

A szájon át vakcinázott állatokban, és az izomba oltott malacok esetében is az alábbi kórszövettani elváltozásokat találtuk: reaktív lymphocytás nyirokcsomó-megnagyobbodás, eozinophil granulocytás bélgyulladás, valamint enyhe szövetközi tüdőgyulladás. A kontroll állatokban az elváltozások súlyosabbak voltak: az összes malac esetében a lép, illetve a nyirokcsomók lymphoid atrofíáját, nem gennyes agyhártya- és agyvelőgyulladást, valamint hörgő- és tüdőgyulladást, két esetben pedig elhalásos mandulagyulladást állapítottunk meg.

Az MDA+ kísérlet kontroll csoportjában a kísérlet vége előtt tízből hét állat hullott el spontán. Ezekben a malacokban általánosan az alábbi, a betegségre jellemző kórbonctani elváltozások voltak megfigyelhetők: pontszerű vérzések főleg a veséken, de vérzéses nyirokcsomókat és elhalásos mandulákat is megfigyeltünk minden elhullott kezeletlen állatban. Két kontroll malacban ezen kívül a szívburok alatt, illetve egynél a dura mater alatt is pontszerű vérzéseket észleltünk. Ugyanakkor a betegségre jellemző tünetek a szájon át vakcinázott csoportban is megjelentek: a hét elhullott állat esetében vérzéses nyirokcsomókat, valamint pontszerű vérzéseket láttunk, jellemzően a bőr felszínén.

A kontroll állatok mellett mindkét vakcinázott csoport malacaiban találtunk a fentiekén kívül általánosan előforduló kórszövettani elváltozásokat: eozinophil granulocyták felszaporodásával járó reaktív nyirokcsomó- és mandula megnagyobbodást és -gyulladást, 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 érgyulladást észleltünk. A kontroll állatokban ezek az elváltozások jellemzően nem voltak súlyosabbak.

### **7.8) Immunhisztokémiai vizsgálatok**

Az MDA- kísérletben az immunhisztokémiai vizsgálatok során kettő szájon át vakcinázott malac kivételével egyik oltott állat sem mutatott pozitív immunfestődést (**8.**

**táblázat).** 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 végleg elaltattunk) az agyvelője kivételével minden vizsgált mintája erősen pozitív reakciót adott. A kontroll malacokból vett minden minta esetében (**4. kép, 5. kép**) erősen pozitív immunfestődést tapasztaltunk (**8. táblázat**).

**8. táblázat.** Az MDA- kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett szervminták immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei.

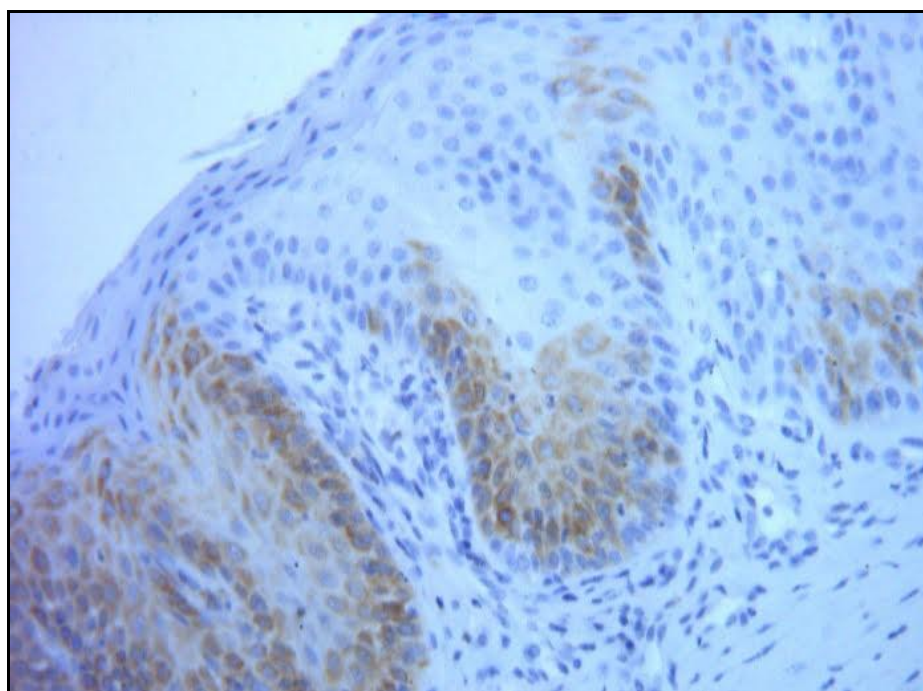
CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; +: 1-3 foci/metszet; ++: 4-10 foci/metszet; +++: >10 foci/metszet; -: negatív; n/a: nincs adat

Csoport	Állat	Elhullás napja	MDA- kísérlet							
			Mandula	Lép	Nyelv alatti nyirokcsomó	Vékony bél	Bélfodri nyirokcsomó	Tüdő	Vese	Agyvelő
CG	K01	21.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	K02	21.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	K03	21.	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	K04	21.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	K05	33.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	K06	21.	+++	+++	+++	+++	n/a	+++	+++	+++
	K07	21.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	K08	21.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	K09	20.	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+
	K10	26.	+++	+++	+++	+++	+++	n/a	+++	+++
TG1	IM01	35.	-	-	-	-	n/a	-	-	-
	IM02	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM03	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM04	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM05	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM06	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM07	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM08	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM09	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM10	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM11	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM12	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM13	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM14	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM15	35.	-	-	-	-	-	-	-	-

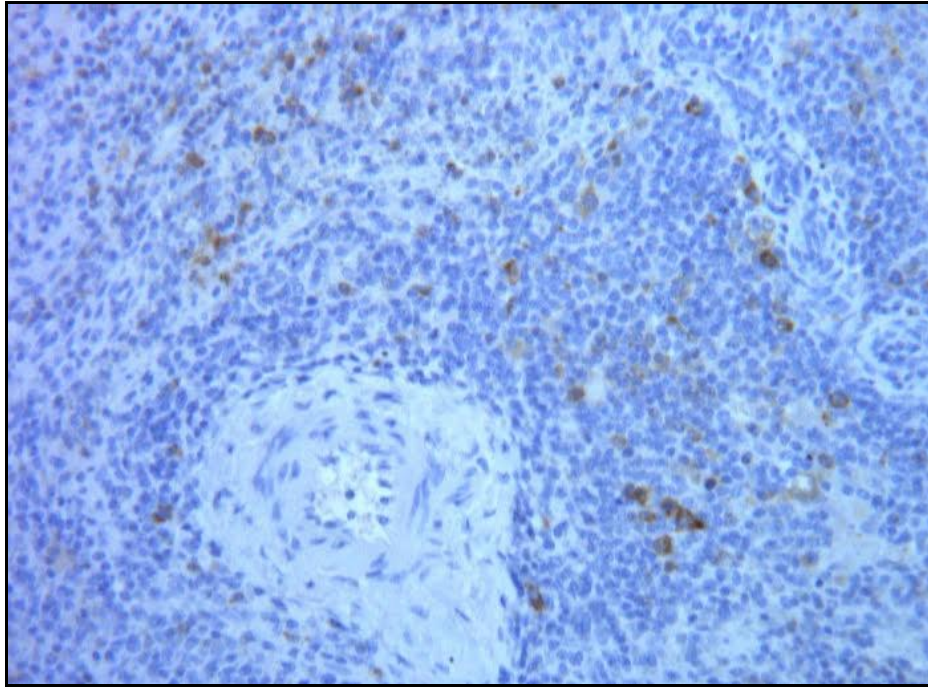


(8. táblázat folytatása)

Csoport	Állat	Elhullás napja	MDA- kísérlet							
			Mandula	Lép	Nyelv alatti nyirokcsomó	Vékony bél	Bélfodri nyirokcsomó	Tüdő	Vese	Agyvelő
TG2	PO01	35.	+	-	-	-	-	-	-	-
	PO02	21.	+++	+	+++	+++	+++	++	++	-
	PO03	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO04	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO05	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO06	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO07	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO08	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO09	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO10	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO11	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO12	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO13	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO14	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO15	35.	-	-	-	-	-	-	-	-



4. kép. Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett mandula felületi hámsejtjeinek citoplasmájában a CSF-antigén intenzív festődése látható. Nagyítás: 1080x. (Belák K.)



**5. kép.** Az MDA- kísérlet egyik elhullott kontroll malacából vett lép makrofágjainak és retikulocitáinak citoplazmájában a CSF-antigén intenzív festődése látható. Nagyítás: 540x. (Belák K.)

Az MDA+ kísérletben az immunhisztokémiai vizsgálatok során négy kontroll és négy szájon át vakcinázott malacból vett minden minta, míg három további kontroll, illetve 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, illetve az izomba oltott állatok egyike sem mutatott pozitív immunfestődést **(9. táblázat)**.

**9. táblázat.** Az MDA+ kísérlet állataiból a különböző mintavételi napokon vett szervminták immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei.

CG: kontroll csoport; TG: kezelt csoport; IM: intramuszkuláris; PO: per os; +: 1-3 foci/metszet; ++: 4-10 foci/metszet; +++: >10 foci/metszet; -: negatív; n/a: nincs adat

Csoport	Állat	Elhullás napja	MDA+ kísérlet							
			Mandula	Lép	Nyelv alatti nyirokcsomó	Vékony bél	Bélfodri nyirokcsomó	Tüdő	Vese	Agyvelő
CG	K01	29.	+++	+++	+++	++	++	+++	-	++
	K02	25.	n/a	+	+++	+	+	n/a	++	+++
	K03	24.	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++
	K04	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	K05	22.	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	n/a
	K06	24.	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+
	K07	30.	+	+	++	+++	+	n/a	-	-
	K08	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	K09	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	K10	26.	+++	+	+++	+	++	+++	-	-

(9. táblázat folytatása)

Csoport	Állat	Elhullás napja	MDA+ kísérlet							
			Mandula	Lép	Nyelv alatti nyirokcsomó	Vékony bél	Bélfodri nyirokcsomó	Tüdő	Vese	Agyvelő
TG1	IM01	35.	+	-	-	-	-	-	-	-
	IM02	35.	+++	3	+++	+++	+++	++	++	-
	IM03	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM04	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM05	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM06	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM07	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM08	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM09	35.	-	-	-	-	-	-	-	n/a
	IM10	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM11	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM12	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM13	35.	-	-	n/a	-	-	-	-	-
	IM14	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	IM15	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
TG2	PO01	35.	-	-	n/a	-	-	-	-	-
	PO02	35.	+++	++	+++	++	++	+++	-	-
	PO03	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO04	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO05	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO06	24.	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+
	PO07	35.	-	-	-	-	-	-	-	-
	PO08	25.	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	PO09	35.	+	-	-	-	-	-	-	-
	PO10	29.	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
	PO11	26.	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	+
	PO12	30.	n/a	+++	+++	+++	+++	n/a	+++	+++
	PO13	35.	+	-	+	+	+	+	+	+
	PO14	28.	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	+
	PO15	32.	n/a	-	-	-	-	n/a	-	-



## 8) MEGBESZÉLÉS

Az EGK területén belül a jelenleg egyetlen, házisertések számára kereskedelmi forgalomban elérhető C-törzs alapú rekombináns markervakcina az a Suvaxyn<sup>®</sup> CSF Marker (Zoetis), amely a CP7\_E2alf-törzset tartalmazza. Ennek a vakcinának a 2015-ös sikeres centrális eljárásban lefolytatott regisztrációjához nagymértékben járultak hozzá a doktori értekezésemben részletesen tárgyalt állatkísérletek, és laboratóriumi vizsgálatok. A későbbi, európai regisztrációra szánt vakcinajelölt vírustörzsek biológiai tulajdonságait ugyanis (mint például a virulenciájuk, a szervezeten belüli megoszlásuk, illetve az általuk kiváltott immunválasz kinetikája), virulens vírustörzsekével összehasonlítva, rögzített körülmények között, fertőzőes állatkísérletekben vizsgáljuk.

### 8.1) Hatékonysági vizsgálatok követelményei

Jelen értekezésemben bemutatott két állatkísérlet elsődleges célja eltérő immunstátuszú házisertésekben a CP7\_E2alf-törzs hatékonyságának demonstrálása volt orális és intramuszkuláris alkalmazást követően. Az Európai Parlament és a Tanács 2001/82/EK számú irányelve alapján a regisztrációhoz szükséges hatékonysági vizsgálatokkal szemben támasztott követelmények az alábbiak:

- A laboratóriumi körülmények között végzett hatékonysági kipróbálásoknak kontroll állatokat is tartalmazó, ellenőrzött vizsgálatoknak kell lenniük.
- Az adott immunológiai állatgyógyászati készítmény hatékonyságát
  - o minden javasolt alkalmazási módon,
  - o minden javasolt célállat faj minden kategóriáján igazolni kell.
- Az anyai ellenanyagok és a passzív immunitás szerepét vizsgálni kell.
- A multivalens (kombinált) immunológiai állatgyógyászati készítmények minden komponensének hatékonyságát igazolni kell.
- Az immunitás kialakulásának idejét, és az immunitástartósság hosszát is meg kell határozni.
- A vakcina kísérlet során alkalmazott adagja: amelyet használatra ajánlanak, és amely a benyújtott kérelemben említett legkisebb titer/hatóértéket tartalmazza.
- A vizsgálatok során használt mintát a kérelemben leírt gyártási folyamat szerint készült tételből/tételekből kell venni.

- A hatékonyságot a célállat faj(ok)on, jól ellenőrzött laboratóriumi körülmények között, a vakcinának az ajánlott alkalmazása utáni fertőzéssel mutatják be.
- A fertőzés körülményeinek a természetes fertőződést kell utánozniuk.
- Meg kell határozni és dokumentálni kell a kialakuló immunmechanizmusokat.

Az im. alkalmazási mód mellett a p.o. vakcinázás kísérletes vizsgálatára az Unió projekt egyik célkitűzése, a korábban már említett, vaddisznók részére kifejlesztendő csali vakcina miatt volt igény. Fontos kiemelni, hogy vaddisznók, illetve bármilyen más vadon élő állatfaj állatkísérletekben való felhasználása komoly nehézségekbe ütközik. Vadállatok befogása, majd zárt tartása (a magas költségek mellett) aránytalanul nagy stresszt okoz az állatoknak, aminek következtében az általános egészségügyi státuszuk könnyen leromolhat, így homogén immunstátuszú kísérleti csoportok kialakítása nehezen valósítható meg. Mindezek miatt az ily módon beállított kísérletek során mért paramétereiből, majd a különböző diagnosztikai módszerekkel kapott eredményekből nehéz tudományosan megalapozott következtetéseket levonni. Ezeken kívül pedig az állatgondozók, illetve a vizsgálatban résztvevő szakemberek is fokozott veszélynek vannak kitéve.

## 8.2) Kísérleti beállítás

Annak érdekében, hogy a két kísérlet egymással összehasonlítható legyen, a kísérleti paramétereket az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur.) 7. kiadásának 0065-ös monográfiájával összhangban, az „*Anyagok és módszerek*” c. fejezetben részletezett módon állítottuk be. A két kísérlet közötti egyetlen eltérés a kísérleti állatok immunstátuszában volt: az MDA+ kísérletben Thiverval-törzzsel immunizált kocák malacait, azaz CSFV ellen termelt anyai ellenanyagokkal rendelkező állatokat használtuk. Immunizáláskor mindkét kísérletben a célállaton végzett hatékonysági vizsgálatok követelményének megfelelően a vizsgált vakcina minimum titerét alkalmaztuk adagonként. Az állatok immunizálása nem eredményezett sem helyi reakciót, sem pedig rövid, vagy hosszú távú nem várt mellékhatásokat – azonban a vizsgálataink fókuszában elsősorban a vakcinatörzs hatékonyságának demonstrálása volt, nem pedig az ártalmatlansági követelményeknek (ti. ekkor adagonként a vizsgált oltóanyag maximum titerének alkalmazása szükséges) való megfelelés. A fertőzéshez a magas virulenciájú Koslov CSF-vírus törzset használtuk, hogy az MDA- és MDA+ kísérlet oltott csoportjai közötti különbségek minél markánsabban jelenjenek meg – a fertőző törzsnek ugyanis át kellett törnie az anyai ellenanyagokkal rendelkező malacok védettségét ahhoz, hogy világossá váljon: az immunizált állatokban mennyivel tud többet nyújtani a vakcina az MDA-k indukálta védettségénél (Blome et al., 2014; Xia et al., 2015).

A kísérletekben használt malacok minimális életkorának meghatározásakor figyelembe vettük a vaddisznók és a házisertések élettani tulajdonságait. Az újszülött malacokban az ellenanyagok felezési ideje az IgG-k esetében 6, az IgM-ek esetében 4, míg az IgA-k esetében 3 nap (Soós és Tuboly, 2009c). Ezen kívül a vadmalacok már a születésük utáni harmadik héttől fogyasztanak szilárd táplálékot, a szopást jellemzően a negyedik hónap végére hagyják abba (Faragó, 2012). Gyakorlati szempontból tehát az MDA-k csökkenő mennyisége, illetve a kiszórt csali elfogyasztásának lehetősége miatt a 6 hetes vadmalacok a legkitettebbek a CSFV-fertőzésnek.

Figyelembe véve a CSF állategészségügyre és a gazdaságra gyakorolt hatásait, egy megfelelő, DIVA-tulajdonságú vakcina kifejlesztésére jelentős piaci igény mutatkozik (Moennig, 2000). A fertőzött területen élő állatok megelőző leölése kis vagy közepes sűrűségű sertéspopulációk esetében lehetséges, azonban ennek megvalósítása nagy állatsűrűségű állományok vonatkozásában erősen kérdéses (Moennig, 2000). A Meuwissen és munkatársai (2009) által elvégzett modellszámítások alapján világossá vált, hogy egy, a CSF-hez hasonló határokon átívelő betegség, mint a ragadós száj- és körömfájás megfékezésére kizárólag leölést, vagy a leölés mellett vészvakcinázást is bevető stratégiák közül ez utóbbi alkalmazása potenciálisan kevesebb leölt állatot eredményezhet. Mivel az optimális védekezési stratégia alapvető feltétele egy jó minőségű markervakcina (hiszen egy rossz vakcina elősegíti a vírus csendes terjedését), valamint az alkalmazásához szükséges DIVA-tesztek megléte (Blome et al., 2014; Xia et al., 2015), e téren intenzív kutatások zajlanak.

A „Célkitűzések” c. fejezetben tárgyalt projektcélok közül a vaddisznók orális immunizálására alkalmas csali kifejlesztése annak az igénynek tesz eleget, hogy az oltóanyagokkal ne csak a házisertéseket vakcinázzuk, hanem a CSF ellen egy vaddisznók száján át történő immunizálására is alkalmas, csaliban kiszórható markervakcinát is kifejlesszenek a hozzá kapcsolódó diagnosztikai rendszerrel együtt – hiszen a teljes európai CSF-mentesség eléréshez elengedhetetlen a rezervoár, azaz a vaddisznó-populáció elérése (Rossi et al., 2015). Olaszország Umbria régiójában terepi viszonyok között elvégzett összehasonlító kísérlet igazolta ugyan vaddisznókban a CP7\_E2alf-törzs hatékonyságát (Feliziani et al., 2014), azonban a markervakcina vaddisznók számára történő engedélyezése a megfelelő csali kifejlesztésének sikertelensége miatt egyelőre függőben van. A közelmúltban világossá vált, hogy a betegséggel érintett vaddisznó-populációk száján át történő vakcinázása segíthet kontrollálni a fertőzést, és megakadályozhatja a CSF behurcolását a házisertés-állományokba (Kaden et al., 2002; von Rüden et al., 2008), azonban a jelenlegi védekezési program egyik nagy hátránya, hogy a csali felvétele főleg a vadmalacok körében nem megfelelő, és így az utódok a betegségre fogékonyak maradnak.

### **8.3) A vaddisznók tömeges orális vakcinázásának nehézségei**

A tömeges orális vakcinázás során használt csalétkeknek ugyanis több szempontnak is meg kell felelniük. A fent már említett legfontosabb szempont tehát, hogy a célállatok azt észreveggyék, és hajlandók legyenek azt el is fogyasztani. A vaddisznók mindenevők, ugyanakkor előnyben részesítenek bizonyos táplálékokat, mint például a makkot (Ballesteros, et al., 2011). Különböző csalikkal zárt, illetve terepi körülmények között végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a vaddisznók a növényi alapú csalétket fogyasztották szívesebben, szemben az állati eredetű alapanyagokat tartalmazó csalikkal (Rossi et al., 2015). A csalikkal szemben támasztott másik fontos követelmény, hogy a vakcina felvételét később ellenőrizni lehessen, azaz általában a csali mátrix tartalmaz olyan markereket, amiket később a vaddisznó tetemekből könnyen és megbízhatóan ki lehet mutatni. Azonban például a tetraciklin (ami a róák orális veszettség elleni vakcinázása során biztonságosan és rutinszerűen alkalmazható a diagnosztikában), az iofenoxisav, vagy a rhodamin vaddisznók esetében már humán egészségügyi problémákat is felvethet, hiszen vadhúst is fogyasztanak emberek (Ballesteros et al., 2013; Sage et al., 2013). A csaliknak ezeken kívül ellenálónak kell bizonyulniuk a környezeti hatásokkal (például hőmérséklet, nedvesség) szemben, hogy a bennük foglalt oltóanyagoknak megfelelő védelmet biztosítsanak. Szintén nem elhanyagolható szempont a csali mérete és formája sem: ha túl nagy, a 4 hónaposnál fiatalabb malacok (amik a szilárd táplálék fogyasztása mellett még jellemzően szopnak is) nem képesek azt elfogyasztani, inkább csak játszanak vele, ha pedig túl kicsi, akkor a felnőtt egyedek egyben, rágás nélkül nyelik azt le. Ez utóbbi azért jelent problémát, mert a folyékony vakcinát tartalmazó PVC bliszter alumínium teteje így nem szakad át, és emiatt a vakcina nem a szájüregbe ürül, holott a CSFV elsődlegesen a mandulákban szaporodik (Rossi et al., 2015).

Az optimális kiszórási stratégiák figyelembe veszik többek között a földrajzi sajátosságokat, a természetben előforduló táplálék mennyiségét és szezonális megoszlását, mivel ez utóbbi „konkurálhat” a kiszórt csalival (Sage et al., 2011). Ez a fajta immunizálási gyakorlat ugyanakkor feltételez egy erős állategészségügyi támogatást, amelynek során az állatorvosok szorosan együttműködnek a helyi vadásztársaságokkal, a természetvédelmi szolgálatokkal, valamint az erőfelügyeleti szervekkel is (Rossi et al., 2015).

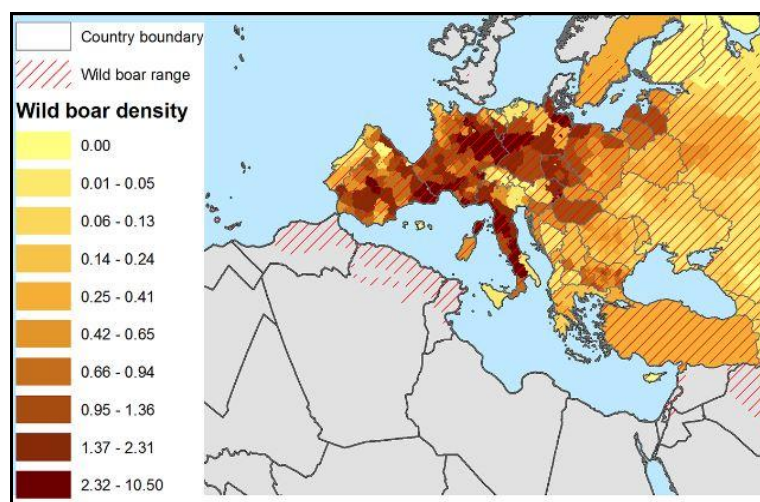
A vaddisznók szájon át történő tömeges immunizálására Európában kereskedelmi forgalomban jelenleg csupán egyetlen C-törzs alapú csali vakcina érhető el: az IDT Biologika PESTIPORC ORAL nevű készítménye. Egyes luxemburgi, németországi, és franciaországi vakcinázott régiók terepi vadászati adatait elemző retrospektív kutatások 1-6 év alatt a szeroprevalencia 60%-os szignifikáns növekedését, míg a CSFV gyakoriságának 1%-os

szintig történő gyors esését mutatták ki (Kaden et al., 2002 és 2003; Rossi et al., 2010; von Rüden et al., 2008), azonban az immunizálás ellenére a vírus tovább terjedt az összefüggő erdőborítottságú területeken (Kaden et al., 2002). Ez utóbbi jelenséget a szakértők az EFSA 2008-as jelentésében (Control and eradication of CSFV, 2008) az alábbiakkal magyarázták:

- i) a kiszórási terület túlságosan kicsi volt a CSF által veszélyeztetett területhez képest,
- ii) a CSFV fertőződés szempontjából kritikus korú fiatal egyedek immunizálása nem volt megfelelő,
- iii) a vakcinázást nem folytatták elég hosszú ideig (ugyanis a C-törzs alapú csalivakcinák DIVA-képesség híján nem alkalmasak arra, hogy elkülöníthetővé tegyék a vakcinázott egyedeket a természetes úton fertőzöttektől, ezáltal megnehezítik a vakcinázási kampány befejező időpontjának meghatározását (Blome et al., 2017b)).

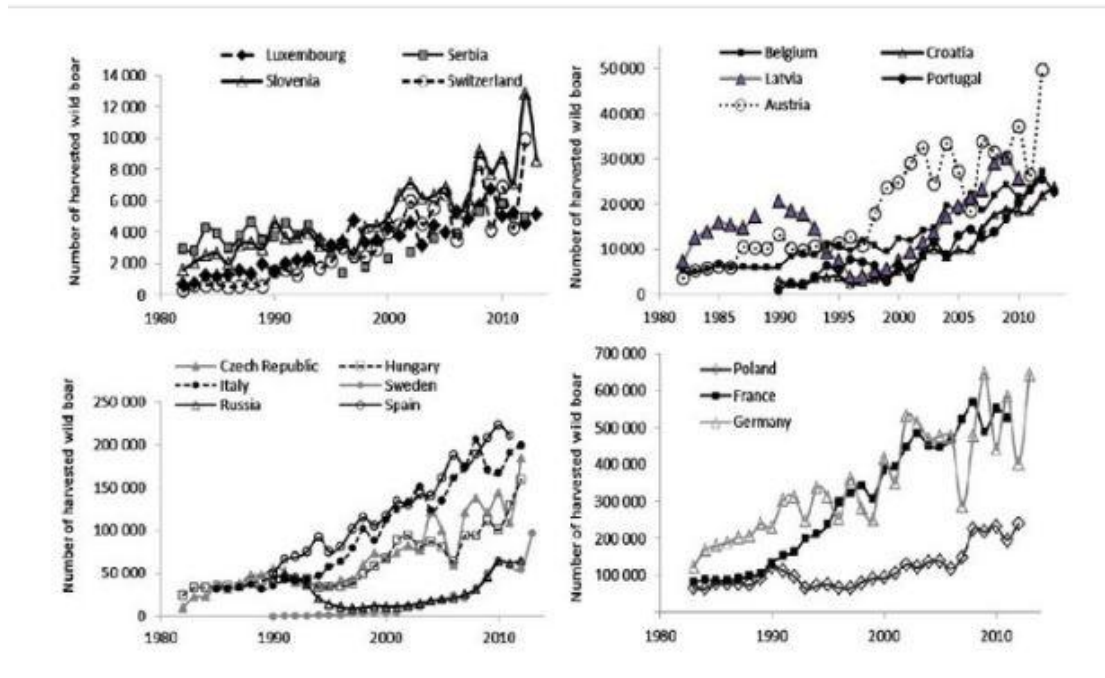
A fertőzött és vakcinázott területek pontos meghatározása (amely figyelembe veszi a régió földrajzi és erdőborítottsági sajátosságait, és a meglévő természetes határokat is), kritikus a CSF vaddisznók körében történő megfékezése szempontjából (Rossi et al., 2015).

A CSF járványtanában a rezervoár mivoltuk következtében kulcsszerepük van a vaddisznó-populációknak (Depner et al., 1995; Laddomada, 2000), jelenlétük komolyan hozzájárul a CSF-járványkitörésekhez. A **6. képen** az eurázsiai területek a vaddisznó-populációinak eloszlása látható (Pittiglio et al., 2018). Magyarország elhelyezkedése és gazdag vadállománya folytán a határokon átívelő járványos állatbetegségek tekintetben különösen veszélyeztetett, így a hazai állategészségügy számára ezen vakcinák elérhetősége szintén lényeges kérdés.

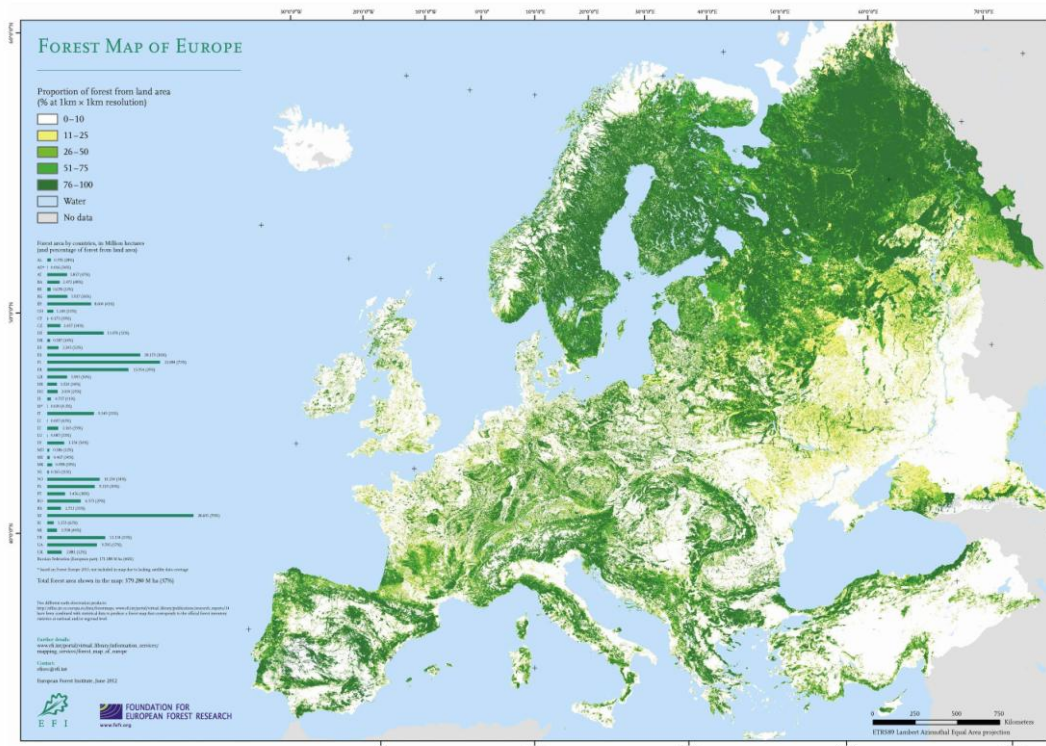


**6. kép:** Az európai vaddisznó-populáció denzitása. (Pittiglio et al., 2018)

A kutatások szerint a vaddisznók ráadásul kiválóan alkalmazkodtak az ember által átalakított környezethez, és az európai vaddisznó-populációk száma annak ellenére nő (3. diagram), hogy az európai erdős területek aránya az utóbbi évtizedekben tovább csökkent (7. kép).



3. diagram: A terütekre került vaddisznók számának alakulása néhány európai országban az 1980-as évek közepétől. (Massei et al., 2014)



7. kép: Európa erdőborítottsága. (<http://www.fefr.org/portal/publications/>)

Az EU új klímavédelmi politikája, amely az erdős területek növelését tűzte ki céljául ([https://ec.europa.eu/environment/forests/eu\\_comm\\_2019.htm](https://ec.europa.eu/environment/forests/eu_comm_2019.htm)) különös jelentőséget és aktualitást adhat a markervakcinának, hiszen amennyiben a vadászati politika és kvóta-emelés nem tart lépést az erdősítés mértékével, ez az európai vaddisznó-állomány növekedésével együtt (a vaddisznók fentebb említett járványügyi szerepéből adódóan) növekvő CSF járványkockázatot vetíthet előre (Massei et al., 2014).

#### **8.4) A rekombináns vakcinajelölt tulajdonságai**

König és munkatársai (2011) kísérletesen bizonyították a vakcinajelölt ártalmatlanságát célállat (házisertés, vaddisznó), és a vizsgált nem célállat (szarvasmarha, kecske, juh, házi nyúl) fajokban. Többen leírták továbbá a törzs hatékonyságát szájon át történő, illetve intramuszkuláris alkalmazást követően (Blome et al., 2012 és 2014; Eble et al., 2012 és 2014; Gabriel et al., 2012; König et al., 2007a és 2007b; Leifer et al., 2009b; Rangelova et al., 2012). A CP7\_E2alf-törzs emellett teljesen avirulensnek bizonyult vaddisznók orális immunizálását követően (König et al., 2007a), és többen igazolták a vírustörzs elsődlegesen a mandulákban észlelt korlátozott mértékű szaporodását (Dräger et al., 2015; Tignon et al., 2010). Mindezek mellett publikálták továbbá, hogy a CP7\_E2alf-törzs mind *in vivo* és *in vitro* körülmények között is stabil genetikailag (Goller et al., 2015; Leifer et al., 2009b; Reimann et al., 2004), valamint hogy az immunizált kanokból sem bélsárral, sem vizelettel, sem pedig örökítőanyaggal nem ürül (Dräger et al., 2015).

Több más szerzővel együtt mi is megerősítettük, hogy a CP7\_E2alf-vakcinatörzs egyszeres adagjának izomba oltását követően az immunválasz egy héten belül, vagy akár már korábban kialakulhat, és az immunitástartósság legalább hat hónapig fennáll (Eble et al., 2012; Gabriel et al., 2012; Leifer et al., 2009b; Reimann et al., 2004; Renson et al., 2013). Orális vakcinázás esetén a szerokonverzió 11-21 nap között alakul ki (König et al., 2007a; Tignon et al., 2010), és szerológiai választ a vakcinázást követő 98. napon is igazoltak (Tignon et al., 2010). Ezt a kialakult védelmet különböző CSFV genotípusokkal szemben (Blome et al., 2014), és a már meglévő BVDV-1 elleni ellenanyagok jelenléte mellett is (Dräger et al., 2016) demonstrálták. Az im. oltás során kapott eredmények abból a szempontból mindenképpen figyelemreméltók, hogy ennek a kiméra vírustörzset tartalmazó vakcinának az immunológiai tulajdonságai összemérhetők az EU-ban jelenleg forgalomba hozatali engedéllyel rendelkező CSF-elleni oltóanyagával (**10. táblázat**).

**10. táblázat.** A házisertések és vaddisznók számára az EGK területén jelenleg érvényes forgalomba hozatali engedéllyel rendelkező CSF-elleni vakcinák immunológiai tulajdonságai

	<b>Coglapest (Ceva-Phylaxia Zrt.)</b> <i>Thiveral-törzs</i>	<b>Porcilis® Pesti (MSD)</b> <i>E2 alegység</i>	<b>Suvaxyn® CSF Marker (Zoetis)</b> <i>kiméra</i>	<b>Pestiporc Oral (IDT Biologika)</b> <i>C-törzs</i>
<b>Javallat</b>	egészséges sertések aktív immunizálására a CSF ellen	sertések aktív immunizálására, 5 hetes kortól a CSF ellen	Sertések 7 hetes kortól történő aktív immunizálására a CSF ellen	vaddisznók szájon át történő aktív immunizálására a CSF ellen
<b>Immunitás kialakulása</b>	vakcinázást követő 5-7 nap	2 héttel az oltás után	14 nap	vakcinázást követő 10 nap
<b>Immunitás-tartósság</b>	legalább 18 hónap	6 hónap	legalább 6 hónap	legalább 10 hónap

Azok a virális vektorok ugyanis, amiket a génmódosítási eljárások során alkalmaznak, jellemzően rosszul, vagy egyáltalán nem képesek a célsejtekben, szövetekben szaporodni. Ez utóbbiak lehetnek ún. géndeléciós, vagy üres vektorok, illetve erősen attenuált törzsek, amelyek olyan mutációt tartalmaznak, ami megakadályozza az eredményes szaporodást. Peeters szerint (Peeters, 2005) egyik vírus sem alkalmas teljes mértékben arra, hogy génszakaszokat sikeresen prezentáljon a különböző célsejtek felé, így a kutatások fókuszában főleg ezen vektorok sejt-, szövet-, illetve gazdaszervezet-specifitásának megváltoztatása áll, szélesítve vagy akár limitálva a vírustropizmust. Ami a CP7\_E2alf-törzset illeti, Reimann és munkatársai (2004) hatékony növekedést sertés eredetű sejtvonalakon tudtak ugyan demonstrálni, azonban a BVDV vektor ellenére szarvasmarha eredetű sejtvonalakon a kiméra vírustörzs csupán gyengén volt képes szaporodni.

A szájon át történő immunizálás, és fiatal állatok esetén az anyai ellenanyagok csökkenthetik a kiméra vakcinatörzs hatékonyságát (Eble et al., 2014). Erőteljes virulenciájú CSFV-törzsszel végzett korai fertőzés esetén a vertikális szóródást a kiméra vakcina csupán részlegesen akadályozta meg (Blome et al., 2017b).

Ami a markervakcinához kapcsolódó diagnosztikai rendszereket illeti, több, a CP7\_E2alf-törzs genomjára specifikus real-time RT-PCR módszert fejlesztettek már ki (Leifer et al., 2009a; Liu et al., 2009), a szerológiai marker rendszerek pedig a CSFV Erns felszíni fehérjéjére specifikus ellenanyagok kimutatásán alapulnak. Ahogyan azt a „Bevezetés” c. fejezetben már említettem, a CP7\_E2alf-törzsszel történt immunizálás után a vakcinázott állatokban csak a vírus E2 glikoproteinje ellen termelődnek ellenanyagok, míg a természetes módon fertőződött sertések szervezetében a CSFV Erns-re specifikus antitestek is megjelennek. Jelenleg két, kereskedelmi forgalomban kapható ellenanyag ELISA kit érhető el, amelyek minden olyan marker rendszerrel kompatibilisek, amelyek a CSFV E2 felszíni fehérjéjén alapulnak (Blome et al., 2017b). Az egyik ilyen a Termofisher (korábban



Prionics) PrioCHECK CSFV Erns kitje, a másik pedig a Qiagen pigtype CSF Marker ELISA-ja. A PrioCHECK ELISA kittel lezajlott körvizsgálat alapján a teszt érzékenysége CSFV-vel fertőzött sertések vérének vizsgálva 90-98% között volt, míg vakcinázott állatok szérummintáit elemezve a specificitása 89-96% közé esett. Immunizált, majd később fertőzött állatok savómintáit vizsgálva a teszt érzékenysége 82-94%-nak bizonyult. Ugyanakkor mind BDV, mind pedig BVDV-törzsekkel szemben számottevő mértékű keresztreakciókat tapasztaltak, és az ismételt vakcinázás, valamint a minták gyenge minősége csökkentette a szerológiai teszt specificitását (Meyer et al., 2017; Pannhorst et al., 2015).

Ahogy az korábban már említettem, egy CSFV-vel fertőzött állomány időben történő felderítése kritikus a járvány későbbi kezelhetősége szempontjából, emiatt magas érzékenységre van szükség. A rutin diagnosztikában emellett nagy hangsúlyt kap az is, hogy a vizsgálat gyorsan és olcsón legyen kivitelezhető. A fent említett Erns-en alapuló szerológiai módszerek megfelelően reagálnak ezekre az igényekre, és alkalmasak az ellenanyagok kimutatására akár már a fertőzés korai szakaszában, azonban a limitált specificitásukból adódóan alkalmatlanok a sertések egyedi vizsgálatára (Meyer et al., 2017). Ugyanakkor az esetlegesen előforduló fals pozitív reakciók kiszűrése érdekében sertésállományok vizsgálatokor ajánlott egy alternatív Erns-en alapuló teszt elvégzése is (Meyer et al., 2017; Pannhorst et al., 2015; Postel et al., 2017). Mindezek következtében komoly erőfeszítéseket tesznek további ELISA-n, vagy Luminex technológián alapuló, megbízhatóbb diagnosztikai rendszerek kifejlesztésére (Aebischer et al., 2013; Luo et al., 2015; Xia et al., 2015).

### **8.5) A kapott eredmények kiértékelése**

Amíg az MDA- kísérletben a fertőzést követő 4-5. naptól minden kontroll állatban megjelentek a betegségekre jellemző klinikai tünetek, és közülük az összes állat a kísérlet lezárása előtt elhullott, addig az MDA+ kísérlet kontroll malacai közül a tizből csupán hat állat mutatta 6 nappal a fertőzés után a CSF jellegzetes klinikai tüneteit, és a kísérlet lezárása előtt a kontroll állatok csupán 70%-a hullott el. Emellett az MDA+ kísérlet egyik kontroll állatának testhőmérséklete sem emelkedett 41,0°C fölé. Rangelova és munkatársai (2012) hasonlóan enyhe klinikai tüneteket és csökkent mortalitást figyeltek meg egy korábbi kísérletükben a kontroll csoport egyedénél, amelyben C-törzset tartalmazó vakcinával immunizált kocák utódait vizsgálták. A mérsékelt klinikai tünetek és a kis arányú mortalitás magyarázható az anyai ellenanyagok védőhatásával.

Az MDA- kísérlet kontroll állataiban szerológiai áthangolódást az elhullásukig nem tapasztaltunk, a fertőzést követő egy hét elteltével a még életben lévő hat kontroll malacból csupán négy állat szérummintájának neutralizációs titere emelkedett meg (**4. táblázat**).

Mindez magyarázható azzal, hogy nagy valószínűséggel nem volt elég idő ahhoz, hogy az IgG/IgM-ek mennyisége a malacokban a VNT számára detektálható szintig megemelkedhessen. A fertőzés sikerességét jelezte, hogy az összes kontroll állat fertőzés után vett vérmintája pozitívnak bizonyult antigén ELISA teszttel (**3. ábra**), kettő kivételével vírusizolálással (**2. ábra**), valamint a megvizsgált öt RT-qPCR-rel is (**6. táblázat**). A kontroll állatokon elvégzett *post mortem* vizsgálatok minden esetben igazolták a CSF-re jellemző elváltozásokat, illetve minden minta esetében az immunhisztokémiai vizsgálatok során erősen pozitív immunfestődést tapasztaltunk (**8. táblázat**).

Fontos megállapítás, hogy az MDA+ kísérlet három kontroll malaca szerológiailag áthangelődött: 10-14 nappal a fertőzést követően megjelentek bennük az E2 glikoproteinre specifikus ellenanyagok (**1. ábra**), illetve a fertőzés után 10 nappal vett szérummintáiknak neutralizációs titer is enyhén megemelkedett (**4. táblázat**). A hét spontán elhullott kontroll állat fertőzés után vett vérmintája pozitívnak bizonyult antigén ELISA teszttel (**3. ábra**), egy kivételével vírusizolálással (**2. ábra**), valamint RT-qPCR-rel is (**7. táblázat**). A kontroll állatokon elvégzett *post mortem* vizsgálatok a hét elhullott malac esetében igazolták a CSF-re jellemző elváltozásokat, illetve bennük az immunhisztokémiai vizsgálatok során négy esetben erősen, három esetben pedig mérsékelt pozitív immunfestődést tapasztaltunk (**9. táblázat**). A három életben maradt kontroll malac fertőzés után vett összes vérmintája azonban mind antigén ELISA teszttel, mind vírusizolálással, mind pedig az immunhisztokémiai vizsgálatok során negatívnak bizonyultak. Ezek a kapott eredmények azzal együtt, hogy három kontroll malac a kísérlet végéig életben maradt, jól szemléltetik a passzív védettség és a védetlen állatok közötti különbséget, illetve igazolják, hogy a kísérleti modellünket jól választottuk meg, hiszen megfelelő mennyiségű anyai ellenanyag volt jelen az MDA+ kísérletbe vont malacokban.

Az MDA- kísérletben az immunizált malacok közül öt izomba oltott, és hat szájon át vakcinázott állat esetében a fertőzés után 4-5 nappal pár napig mérsékelt klinikai elváltozásokat figyeltünk meg – kivéve egy szájon át vakcinázott malacot, ami olyan súlyos, a CSF-re jellemző klinikai tüneteket mutatott, hogy azt állatjóléti megfontolásból hét nappal a fertőzést követően végleg elaltattuk. Ennek a p.o. kezelt malacnak az esetében a szerológiai vizsgálatok negatív, illetve az antigén-detektáló módszerek pozitív eredményeit is figyelembe véve valószínűsíthető, hogy az immunizálás kivitelezése technikailag nem volt kielégítő: az állat nem vett fel megfelelő mennyiségű vakcinát ahhoz, hogy benne protektív immunválasz alakulhasson ki. Az im. vakcinázott malacok szerológiai áthangelődését az orálisan immunizáltakhoz képest egy héttel korábban, már a 14. naptól megfigyeltük (**1. ábra**), és az intramuszkuláris alkalmazást követően a neutralizációs titerértékek is hamarabb, már a 18. naptól elkezdtek emelkedni (**4. táblázat**). A kezelt állatok vakcinázás utáni, és a fertőzést

követően vett vérmintái vírusizolálással és antigén ELISA teszttel is (egy malac kivételével) mind negatívnak bizonyultak (**2. és 3. ábrák**). Az oltott malacok (a már említett egyed kivéve) nem mutattak súlyos kórbonctani elváltozásokat, és kettő szájon át vakcinázott malac kivételével egyik oltott állat sem mutatott pozitív immunfestődést (**8. táblázat**).

Az MDA- kísérlet eredményeire tett fenti megállapítások alapján kijelenthető, hogy a vizsgált vakcinatörzs hatékony, valamint hogy a kísérletben résztvevő összes malac esetében a vakcinázás, a klinikai tünetek, a kórbonctani és kórszövettani elváltozások, valamint az immunhisztokémiai eredmények összhangban voltak egymással. Mindezek arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott kísérleti elrendezés, ideértve a fertőzéshez használt vírustörzset és annak titerét is, megfelelt egy potenciális vakcinajelölt későbbi regisztrációjához szükséges hatékonyságának a vizsgálatára.

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

Azt megállapíthatjuk, hogy az im. alkalmazott vakcina megfelelő védelmet nyújtott, hiszen megelőzte a mortalitást, szignifikánsan csökkentette a klinikai tünetek megjelenését és a vírus mennyiségét a vérben azáltal, hogy megnövelte az E2 glikoproteinre specifikus ellenanyagok szintjét. Azonban kilenc szájon át immunizált malac szérummintáit ellenanyag ELISA-teszttel még a vakcinázás után két héttel is negatívnak találtuk, és hat állat közülük az elhullásukig negatív is maradt (**1. ábra**). Az ellenanyag ELISA-val kapott eredményeket összehasonlítottuk a vírusneutralizációs próbával kapott eredményekkel, és ezek között sok helyen ellentmondást állapítottuk meg, így emiatt a fertőzés napján, valamint az azt követő negyedik, illetve tizedik napon vett szérummintákat a Friderich-Loeffler Intézetben újrvizsgálták. Az **5 táblázat**ban bemutatott eredmények már inkább korreláltak az ellenanyag ELISA-val kapott eredményekkel. Korábbi vizsgálatok (Control and eradication of CSFV, 2008) alapján megállapítható, hogy a CSF diagnosztikában használt E2 ellenanyag ELISA a vírusneutralizációs próbáéhoz hasonló érzékenységet mutat – habár a mi eredményeink alapján az ELISA valamivel érzékenyebbnek bizonyult. Ez utóbbi specificitása általában elég magas: 98-99,5% közé tehető, azonban a kérődzők egyéb pestivirusaival (főleg a BDV-vel) szemben tapasztalt keresztreakciók ezt ronthatják. A minták minőségére mindkét szerológiai módszer igen érzékeny, ami fals-pozitív vagy negatív reakciókat eredményezhet. A mi esetünkben ez különösen igaz volt a VNT-re: az MDA+ kísérletben a kapott valószínűtlenül magas neutralizációs titerértékek, illetve a fertőzést követően vett minták esetében a szövetet érintő kiterjedt pusztulás miatt a savókat újra kellett vizsgálnunk,

azonban a minták szövetre gyakorolt ismeretlen eredetű toxikus hatása miatt továbbra is nehéz volt a vírusneutralizációs eredmények kiértékelése.

Érdemes itt is kiemelni, hogy az MDA+ kísérletben elhullott, szájon át vakcinázott malacok vérmintái vírusizolálással, antigén ELISA teszttel, és RT-qPCR-rel is pozitívnak bizonyultak, azaz igazoltuk bennük a vírus jelenlétét (**2. és 3. ábrák, 7. táblázat**).

## **8.6) Az orális alkalmazás technikai nehézségei**

Mindezeket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy az Eble és munkatársai (2014) által publikált eredményekhez hasonlóan a szájon át alkalmazott vakcina MDA+ malacokban csak részleges védettséget volt képes nyújtani a fertőzéssel szemben, ugyanakkor az izomba oltott állatok mindegyikében teljes védettséget biztosított. Ezek az eredmények meglepőek lehetnek, mivel a szájon vagy orron át felvett CSFV elsődlegesen a mandulákban szaporodik el, emiatt a szájon át történő vakcinázást hatékonyabb alkalmazási módnak vártuk. Az orális vakcinázás kivitelezése a mi kísérleti körülményeink között azonban az im. alkalmazáshoz képest nehezebb volt (mivel nem egy csaliba inkorporált oltóanyagot etettünk meg a malacokkal), és emiatt a vakcina pontos adagolása, illetve az oltóanyag szájüregből való visszafolyásának elkerülése kevésbé volt garantálható.

Az, hogy a szervezetben egy adott kórokozóval szemben megfelelő védelmet lehessen kialakítani, illetve hogy sikeresen tudjunk kezelni egy járványhelyzetet, csak részben függ az alkalmazott vakcina hatékonyságától. Természetesen egy sikeres mentesítési program nélkülözhetetlen része a megfelelő minőségű vakcina, de emellett átfogó oltási programra, alaposan kidolgozott immunizálási stratégiára, és fejlett technológiai háttérre is szükség van. Ez utóbbi a kiszórás megvalósításán kívül magában foglalhatja az adatok tárolását, vagy akár a vakcinázási folyamat valós idejű nyomon követhetőségét is. Legalább ennyire fontos volna tehát, ha a gyártók nem csupán az oltóanyagot, hanem például a szájon át történő alkalmazással együtt olyan oltóberendezést, illetve szakmai/technikai támogatást is kínálnának, ami standardizálhatná az immunizálást, és növelhetné a vakcinafelvétel sikerét (Chase et al., 2008). Érdekes módon ezek a standardizált vakcinázást segítő eszközök (ilyen például a Desvac, a Smartvac, vagy a Medi-Jet) az amúgy is precízebben kivitelezhető im. vagy bőrbe történő (intradermális) tömegoltásokra specializálódtak, tehát éppen a sertések orális applikációját elősegítő berendezésekben mutatkozik piaci hiány.

A fent említett technikai nehézségeken túl a szájon át történő alkalmazás esetén a protektív immunválasz kialakulása MDA+ malacok esetében hosszabb ideig is eltarthat, ami még bizonytalanabbá teszi a p.o. vakcinázásra adott reakciót. Ahogyan azt Tignon és munkatársai (2010) is megerősítették (mivel a szájon át történő alkalmazás hasonlóságot

mutat a természetes oronasalis fertőzéssel), a vakcinajelölt elsődlegesen a mandulákban szaporodott el.

A jobb áttörés oka lehet még, hogy az im. oltás, illetve az ehhez kapcsoló IgM, majd IgG dominálta humorális immunválasz jellemzően erősebb reakciót ad, mint a nyálkahártyák védelmét ellátó IgA-k. Mindezek mellett további kutatást igényelne, hogy az im. oltás esetén a humorális immunválasz mellett milyen mértékben jelenik meg a sejtes immunitás, hiszen ezek is mind hozzájárulhattak ahhoz, hogy az izomba történő applikációt követően a vakcina nagyobb mértékben volt képes áttörni a maternális immunitást.

Kritikus kérdés tehát a fiatal állatok vakcinázásához a megfelelő életkor megválasztása, hogy a lehető legrövidebbre csökkentsük azt az időszakot, amikor az anyai ellenanyagok szintje a malacokban már a védettséget biztosító szint alá esik, de még nem alakult ki bennük az aktív immunválasz. Mindemellett az MDA-knak a vakcinázás hatékonyságára gyakorolt negatív hatását sem hagyhatjuk figyelmen kívül.

### **8.7) Újszülött malacok immunológiai jellemzői**

A vakcinázás elsődleges célja, hogy a lehető leghamarabb (jelen esetben a CSFV iránti fogékonyság minél korábbi szakaszában) aktív immunitást alakítson ki. Mivel a sertések placentája syndesmochorialis szerkezetű, az újszülött malacok a kocától csak az első szopáskor, az ún. főcstejjel képesek felvenni az anyai ellenanyagokat, melyek az első pár hétben a kórokozótól való védelmüket látják el. Az MDA-k hatása kettős. Védelmet nyújtanak egyrészt a fiatal, korukból adódóan még korlátozottan immunkomptenens állatoknak a különböző fertőzésekkel szemben, ugyanakkor az anyai ellenanyagok jelenléte gátolja az újszülöttek aktív IgM és IgG-termelését, illetve interferálhat az oltóanyag által kiváltott saját immunitással (Klinkenberg et al., 2002; Suradhat és Damrongwatanapokin., 2003).

Kísérleti eredmények szerint a parenterálisan vagy enterálisan bejuttatott antigénekre már képes immunválaszt adni, az újszülött malac túlélése a főcstejjel felvett anyai ellenanyagoktól függ (Tuboly és Bernáth, 2002). A kocatej a fialást követő 4-5 napig kolosztrumnak minősül: magas Ig-tartalma miatt különösen fontos az újszülött egyedek immunállapotának alakítása céljából. A kolosztrummal a kocából az újszülöttbe főleg IgG-k, de IgM-ek és IgA-k is átkerülnek. A malacok ezeket az ellenanyagokat a születésüket követő mindössze 6 óráig képesek nagy mennyiségben felszívni, mivel a bélnyálkahártyájuk e nagy molekulájú fehérjék számára (habár az idő előrehaladtával rohamosan csökkenő mértékben) ekkor még szabadon átjárható. Az újszülött állatok bélnyálkahártyájának szelektivitása és permeabilitása fajoként eltérő: sertések esetében az IgG-k és az IgM-ek a tej

megemésztését követően az enterocitákon átjutva 24 órával később már a malac vérkeringésében jelennek meg, az IgA-k ugyanakkor a bél lumenében maradnak (Soós és Tuboly, 2009c). Fontos kiemelni, hogy ez az átjárhatóság az egyed születését követő órákban a legnagyobb – a 36. órától amúgy is erősen csökken a koca tejének Ig-tartalma. Ezért is nagyon fontos, hogy az újszülött malacok azonnal és folyamatosan hozzájussanak a főcstejhez (Horn, Pászthy, Bene, 2011). Az újszülött malacok szisztémás és lokális immunvédelmét jelenlegi tudásunk szerint ezek az anyagi ellenanyagok látják el, ugyanakkor a főcstejben az immunglobulinok mellett jelentős mennyiségben vannak jelen T- és B-limfociták is. Ezek a sejtek olyan, a bakteriális és virális antigénekre reaktív memóriasejtek, amelyek proliferációra és citokintermelésre is képesek. A kolosztrumban lévő B-sejtek a bélhám sejteken átjutva a bélfodri nyirokcsomókban, illetve onnan a véráram segítségével terjedve további más szervekben telepednek meg.

A jelenlévő anyai IgA és IgG alapú ellenanyagok miatt az MDA- kísérletben megfigyelték képest az MDA+ kísérlet valamennyi malacában kevesebb, és mérsékeltebb klinikai tünet fejlődött ki, ami szintén arra enged következtetni, hogy az említett keresztreakció kialakulásával párhuzamosan a CSFV fertőzéssel szemben ezek az anyai ellenanyagok képesek a malacokban bizonyos fokú védelmet is nyújtani. Ezek a megállapítások is további vizsgálatokat igényelnének, azonban éppen az MDA+ kísérlet kontroll csoportjában tapasztaltak alapján kimondhatjuk, hogy egy erős virulenciával rendelkező CSFV törzssel szemben az anyai ellenanyagok nem képesek teljes mértékű védelmet nyújtani, mindenképpen szükséges a természetes immunfolyamatokat vakcinázás útján segíteni.

A CP7\_E2alf vakcinajelölt hatékonyságát pestivírusok elleni anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokban ugyanakkor több csoport is vizsgálta korábban (Eble et al., 2014; Rangelova et al., 2012), ezek elrendezése azonban nem felelt meg az Európai Gyógyszerkönyv előírásainak.

### **8.8) A vakcinajelölt hatékonyságának mérése**

Ahogy az korábban már említettem, a vakcina hatékonysága anyai ellenanyagok hiányában az im. csoportban 100%, a p.o. csoportban pedig 93,34% volt. Az MDA- kísérlet eredményeit összefoglalva tehát 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 CSFV hatékony legyőzésében.

A fenti megállapítások azonban csak részben érvényesek, amennyiben anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokat immunizálunk, az MDA-k ugyanis negatívan befolyásolták a markervakcina-jelölt hatékonyságát, a vakcinának a korábban ismertetett képlet alapján számolt hatékonysága anyai ellenanyagok jelenlétében a p.o. csoportban csupán 33,34% volt. Ez utóbbi érték sajnos távol áll a kívánatostól (túl alacsony), 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 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.

Ez a negatív hatás ugyanakkor nagyban függött a vakcina alkalmazási módjától, hiszen az izomba oltott MDA+ állatok esetében a vizsgált készítmény teljes mértékben megakadályozta az elhullást (azaz a vakcina hatékonysága ebben az esetben is 100%-os volt), szignifikánsan csökkentette a klinikai tüneteket és a vírus mennyiségét a vérben azáltal, hogy a kísérleti állatokban megnövelte a vakcina ellen termelt ellenanyagok szintjét. Annak az esélye, hogy az Európai Unió területén egy jövőbeli CSF járványkitörés MDA+ házisertéseket érintsen, elenyésző. Tekintettel arra azonban, hogy a betegség az OIE 2018 júliusa és decembere közötti időszakra vonatkozó jelentése szerint több régióban (Dél-Amerikában, Dél- és Délkelet-Ázsiában) is jelen van, és a Föld számos olyan országában okoz problémát, ahol a házisertés, illetve a különböző vadon élő sertésfélék fontos élelmiszertermelő fajokként komoly gazdasági jelentőséggel bírnak, a hatékony markervakcinák hozzáférhetősége nélkülözhetetlen.

Mindezek fényében egyértelmű, hogy a hatékony oltóanyagok iránti kereslet legnagyobb része ezekből az ún. „international zone” (IZ) országokból jön: így az oltóanyaggyártók egy-egy termékükkel jellemzően nem csupán Európát, vagy az USA-t célozzák meg, hanem ezeket a régiókat is, ahová az EMA, vagy az USDA által kiadott forgalomba hozatali engedélyekkel piacra tudnak lépni. Figyelembe kell azonban azt is venni, hogy ezekben az országokban a vakcinákra az európai, vagy az amerikai állategészségügyi viszonyoktól merőben eltérő, azoknál jellemzően sokkal súlyosabb, ún. első-vonalbeli járványhelyzetek kezeléséhez van szükség. Mivel ezek az országok a washingtoni székhelyű Világbank összjövedelem alapú összesítése szerint (<https://datahelpdesk.worldbank.org/knowledgebase/articles/906519-world-bank-country-and-lending-groups>) ún. alacsony jövedelmű országoknak minősülnek, kiemelten fontos lenne,

hogy a CSF elleni markervakcinák tömeggyártása megvalósuljon, azaz korszerű, de olcsó eszközként a szerényebb anyagi lehetőségekkel bíró országok rendelkezésére álljon. Mindezek mellett a CSF elleni markervakcinák esetleges európai felhasználása sem zárható ki, hiszen Európa földrajzilag nem izolált, emiatt a védekezés folyamatos fenntartása mellett a keleti határok mentén előfordulhat, hogy ez, vagy akár egyéb járványos betegségek (mint például az afrikai sertéspestis, vagy a veszettség) újra felbukkannak.

## **8.9) Konklúzió**

Napjainkban, amikor a CSF-hez egy nagyon hasonló járványtanú (szűk gazdaspektrum, vaddisznó-populációk kiemelt szerepe), és hasonló járványvédelmi stratégiát megkövetelő betegség, az afrikai sertéspestis (ASP) jelent meg, kifejezetten sürgető probléma egy, a vaddisznók számára elérhető vakcina kifejlesztése. Ilyen jellegű immunológiai állatgyógyászati készítmények csak abban az esetben születhetnek meg, ha a gyártók és a fejlesztők állami vagy/és Uniós támogatást kapnak, mert sajnos az ehhez hasonló fejlesztések anyagilag nem kifizetődők – még akkor sem, ha nagy gazdasági kártételtől mentenék is meg a sertésipart.

Értekezésemben kitértem arra is, hogy milyen nehézségekkel kell szembenézni egy vaddisznók számára alkalmas, csali alapú (marker)vakcina fejlesztése során. Még abban az esetben is, ha rendelkezésünkre áll egy ígéretes jelölt (visszautalva a „Megbeszélés c. fejezet „Hatékonysági vizsgálatok követelményei” részben leírtakra, illetve a Ph. Eur. vonatkozó monográfiájára), a regisztrációhoz roppant mennyiségű állatkísérletet is el kell végezni.

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



## 9) ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A CSF ellen újonnan kifejlesztett kiméra CP7\_E2alf vakcinajelölt hatékonyságát elsőként demonstráltuk szuboptimális dózisban.

A pestivírusok ellen termelt anyai ellenanyagoktól mentes malacokban a CP7\_E2alf vakcinajelölt mindkét alkalmazási mód mellett megfelelő védettséget biztosított, míg a pestivírusokra specifikus anyai ellenanyagokkal rendelkező malacokban az im alkalmazással szemben a szájon át történő immunizálás csupán részleges védelmet nyújtott.

Vizsgálataink során megfelelően demonstráltunk, hogy az újonnan kifejlesztett kiméra CP7\_E2alf vakcinajelölt jó megoldást kínál az élő, attenuált CSF elleni C-törzs alapú vakcinák legnagyobb hátrányának kiküszöbölésére: a DIVA-potenciál teljes hiányára.

## 10) IRODALOMJEGYZÉK

1. Aebischer, A., Muller, M., & Hofmann, M. A.: **Two newly developed E(rns)-based ELISAs allow the differentiation of Classical Swine Fever virus-infected from marker-vaccinated animals and the discrimination of pestivirus antibodies.** *Vet. Microbiol.*, 161. 274-285, 2013.
2. Andrew, M.E., Morrissy, C.J., Lenghaus, C., Oke, P.G., Sproat, K.W., Hodgson, A.L., Johnson, M.A., Coupar, B.E.: **Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55.** *Vaccine*, 18. 1932-1938, 2000.
3. Andrew, M., Morris, K., Coupar, B., Sproat, K., Oke, P., Bruce, M., Broadway, M., Morrissy, C., Strom, D.: **Porcine interleukin-3 enhances DNA vaccination against classical swine fever.** *Vaccine*, 24. 3241-3247, 2006.
4. Aynaud, J.M., Lejolly, J.C., Bibard, C., Galicher, C.: **Studies of the properties of cold induced classical swine fever virus mutants. Application to vaccination.** *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 75. 654-659, 1971.
5. Baker, J.A.: **Serial passage of hog cholera virus in rabbits.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 63. 183-187, 1946.
6. Baker, J.A.: **Attenuation of hog-cholera virus by serial passage in rabbits.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 111. 503-505, 1947.
7. Ballesteros, C., Vicente, J., Morriss, G., Jockney, I., Rodríguez, O., Gortázar, C., De La Fuente, J.: **Acceptance and palatability for domestic and wildlife hosts of baits designed to deliver a tuberculosis vaccine to wild boar piglets.** *Prev. Vet. Med.*, 98. 198-203, 2011.
8. Ballesteros, C., Sage, M., Fisher, P., Massei, G., Mateo, R., De La Fuente, J., Rossi, S., Gortázar, C.: **Iophenoxic acid as a bait marker for wild mammals: efficacy and safety considerations.** *Mamm. Rev.*, 43. 156-166, 2013.
9. Beer, M., Reimann, I., Hoffmann, B., Depner, K.: **Novel marker vaccines against classical swine fever.** *Vaccine*, 25. 5665-5670, 2007.
10. Belák K, Koenen, F., Vanderhallen, H., Mittelholzer, C., Feliziani, F., De Mia, G.M., Belák S.: **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.*, 50. 34, 2008.
11. Biront, P., Leunen, J.: **Vaccines.** In: *CSF and Related Viral Infections*. Szerk.: Liess, B. Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, The Netherlands, 181-198, 1988.

12. Blome, S., Gabriel, C., Staubach, C., Leifer, I., Strebelow, G., Beer, M.: **Genetic differentiation of infected from vaccinated animals after implementation of an emergency vaccination strategy against classical swine fever in wild boar.** *Vet. Microbiol.*, 153. (3-4) 373-376, 2011.
13. Blome, S., Aebischer, A., Lange, E., Hofmann, M., Leifer, I., Loeffen, W., Koenen, F., Beer, M.: **Comparative evaluation of live marker vaccine candidates CP7\_E2alf and flc11 along with C-strain Riems after oral vaccination.** *Vet. Microbiol.*, 158. 42-59, 2012.
14. Blome, S., Gabriel, C., Beer, M.: **Possibilities and limitations in veterinary vaccine development using the example of classical swine fever.** *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 126. 481-490, 2013.
15. Blome, S., Gabriel, C., Schmeiser, S., Meyer, D., Meindl-Böhmer, A., Koenen, F., Beer, M.: **Efficacy of marker vaccine candidate CP7\_E2alf against challenge with classical swine fever virus isolates of different genotypes.** *Vet. Microbiol.*, 169. 8-17, 2014.
16. Blome, S., Staubach, Ch., Henke, J., Carlson, J., Beer, M.: **Classical Swine Fever – An Updated Review.** *Viruses*, 9. 86-113, 2017a.
17. Blome, S., Moss C., Reimann, I., König, P., Beer, M.: **Classical swine fever vaccines-state-of-the-art.** *Vet. Microbiol.*, 201-204, 2017b
18. Bouma, A., de Jong, M.C.M., Kimman, T.G.: **The influence of maternal immunity on the transmission of pseudorabies virus and on the effectiveness of vaccination.** *Vaccine*, 15. 287-294, 1997.
19. Bouma, A., de Smit, A.J., de Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J.: **Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus.** *Vet. Microbiol.*, 66. 101-114, 1999.
20. Cabezon, O., Colom-Cadena, A., Munoz-Gonzalez, S., Perez-Simo, M., Bohorquez, J.A., Rosell, R., Marco, I., Domingo, M., Lavin, S., Ganges, L.: **Post-natal persistent infection with classical swine fever virus in wild boar: A strategy for viral maintenance?** *Transbound. Emerg. Dis.*, 64. 651-655, 2017.
21. Chase, C., Daniels, C., Garcia, R., Milward, F.: **Needle-free injection technology in swine: Progress toward vaccine efficacy and pork quality.** *Journal of Swine Health and Production*, 16. 2008.
22. **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, 2002.

23. **Control and eradication of Classical Swine Fever in wild boar. Scientific opinions of the Panel on Animal Health and Welfare** (Question No. EFSA-Q-2007-200). Adopted on 12th December 2008. EFSA J. 932. 1-18, 2008.
24. Council of Europe: **Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera [chapter 5.2.7]**. European Pharmacopoeia, Strasbourg, 7th Ed. 538, 2010a
25. Council of Europe: **Swine-fever vaccine (live, prepared in cell cultures), classical [vaccines for veterinary use]**. European Pharmacopoeia, Strasbourg, 7th Ed. 940-941, 2010b.
26. Dahle, J., Liess, B.: **A review on a classical swine fever infections in pigs: epizootology, clinical disease and pathology**. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 15. 203-211, 1992.
27. Dahle, J., Liess, B.: **Assessment of safety and protective value of a cell culture modified strain C vaccine of hog cholera/classical swine fever virus**. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 108. 20-25, 1995.
28. de Smit, A.J., Bouma, A., de Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J.: **Prevention of transplacental transmission of moderate-virulent classical swine fever virus after single or double vaccination with an E2 subunit vaccine**. Vet. Q., 22. 150-153, 2000.
29. de Smit, A.J., Bouma, A., de Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J.: **Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination**. Vet. Microbiol., 78. 307-317, 2001a.
30. de Smit, A.J., Bouma, A., van Gennip, H.G., de Kluijver, E.P., Moormann, R.J.: **Chimeric (marker) C-strain viruses induce clinical protection against virulent classical swine fever virus (CSFV) and reduce transmission of CSFV between vaccinated pigs**. Vaccine, 19. 1467-1476, 2001b.
31. Depner, K., Bauer, T., Liess, B.: **Thermal and pH stability of pestiviruses**. Rev. Sci. Tech., 11. 885-893, 1992.
32. Depner, K.R., Müller, A., Gruber, A., Rodriguez, A., Bickhardt, K., Liess, B.: **Classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa*) – Experimental infections and viral persistence**. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 102. 381-384, 1995.
33. Dewulf, J., Laevens, H., Koenen, F., Vanderhallen, H., Mintiens, K., Deluyker, H., de Kruijff, A.: **An experimental infection with classical swine fever in E2 subunit marker-vaccine vaccinated and in non-vaccinated pigs**. Vaccine, 19. 475-482, 2000.
34. **Diagnostic techniques and vaccines for footand-mouth disease, classical swine fever, avian influenza and some other important OIE List A Diseases**. Report of

- the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. European Commission, Directorate-General for Health and Consumer Protection, 1-150, 2003.
35. Dietze, K., Milicevic, V., Depner, K.: **Prospects of improved classical swine fever control in backyard pigs through oral vaccination.** Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 126. 476-480, 2013.
  36. Dong, X.N., Wei, K., Liu, Z.Q., Chen, Y.H.: **Candidate peptide vaccine induced protection against classical swine fever virus.** Vaccine, 21. 167-173, 2002.
  37. Dong, X.N., Chen, Y., Wu, Y., Chen, Y.H.: **Candidate multi-peptide-vaccine against classical swine fever virus induced potent immunity with serological marker.** Vaccine, 23. 3630-3633, 2005.
  38. Dong, X.N., Chen, Y.H.: **Candidate peptide-vaccines induced immunity against CSFV and identified sequential neutralizing determinants in antigenic domain A of glycoprotein E2.** Vaccine, 24. 1906-1913, 2006.
  39. Dong, X.N., Qi, Y., Ying, J., Chen, X., Chen, Y.H.: **Candidate peptide-vaccine induced potent protection against CSFV and identified a principal sequential neutralizing determinant on E2.** Vaccine, 24. 426-434, 2006.
  40. Dong, X.N., Chen, Y.H.: **Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines.** Vaccine, 25. 205-230, 2007.
  41. Donis, R.O.: **Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host.** Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract., 11. 393-423, 1995.
  42. Dortmans, J.C., Loeffen, W.L., Weerdmeester, K., van der Poel, W.H., de Bruin, M.G.: **Efficacy of intradermally administered E2 subunit vaccines in reducing horizontal transmission of classical swine fever virus.** Vaccine, 26. 1235-1242, 2008.
  43. Dr. Bíró J.: **Immunizálási kísérletek a sertéspestis elleni kristályibolya-vakcinával.** MÁL, 16. 242-245, 1947.
  44. Dräger, C., Petrov, A., Beer, M., Teifke, J.P., Blome, S.: **Classical swine fever virus marker vaccine strain CP7\_E2alf: shedding and dissemination studies in boars.** Vaccine, 33. 3100-3103, 2015.
  45. Dräger, C., Schröder, C., König, P., Tegtmeyer, B., Beer, M., Blome, S.: **Efficacy of Suvaxyn CSF Marker (CP7\_E2alf) in the presence of pre-existing antibodies against Bovine viral diarrhea virus type 1.** Vaccine, 34. 4666-4671, 2016.
  46. Eble, P.L., Geurts, Y., Quak, S., Moonen-Leusen, H.W., Blome, S., Hofmann, M.A., Koenen, F., Beer, M., Loeffen, W.L.: **Efficacy of chimeric Pestivirus vaccine candidates against classical swine fever: protection and DIVA characteristics.** Vet. Microbiol., 162. 437-446, 2012.

47. Eble, P.L., Quak, S., Geurts, Y., Moonen-Leusen, H.W., Loeffen, W.L.: **Efficacy of CSF vaccine CP7\_E2alf in piglets with maternally derived antibodies.** Vet. Microbiol., 174. 27-38, 2014.
48. Edwards, S., Fukusho, A., Lefevre, P.C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehe, P., Westergaard, J.: **Classical swine fever: The global situation.** Vet. Microbiol., 73. 103-119, 2000.
49. Elber, A.R., Stegeman, A., Moser, H., Ekker, H.M., Smak, J.A., Pluimers, F.H.: **The classical swine fever epidemic 1997-1998 in The Netherlands: descriptive epidemiology.** Prev. Vet. Med., 42. 157-184, 1999.
50. Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rumenapf, T., Thiel, H.J.: **Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7.** J. Virol., 70. 4131-4135, 1996.
51. **Az Európai Parlament és a Tanács 2001/82/EK számú irányelve az állatgyógyászati készítmények kzss gi kódexéről.** Az Európai Kzss gek Hivatalos Lapja, 13/27. L 311/1, 2001.11.28.
52. **Az Európai Parlament és a Tanács 726/2004/EK rendelete az emberi, illetve állatgyógyászati felhasználásra szánt gyógyszerek engedélyezésére és felügyeletére vonatkozó kzss gi eljárások meghatározásáról és az Európai Gyógyszerügynökség létrehozásáról (2004. március 31.)** Hivatalos Lap L136, 30/04/2004 o. 0001-0033, 2004.
53. **Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről.** Az Európai Kzss gek Hivatalos Lapja, L276/33, 2010.
54. Everett, H.E., Crooke, H.R., Gurrula, R., Dwarka, R., Kim, J., Botha, B., Lubisi, A., Pardini, A., Gers, S., Vosloo, W., Drew, T.: **Experimental infection of common warthogs (*Phacochoerus africanus*) and bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) with classical swine fever virus. I: Susceptibility and transmission.** Transbound. Emerg. Dis., 58. 128-134, 2011.
55. Everett, H.E., Crudgington, B.S., Sosan-Soule, O., Crooke, H.R.: **Differential detection of classical swine fever virus challenge strains in C-strain vaccinated pigs.** BMC Vet. Res., 10. 281, 2014.
56. Farag S.: **Vad szati  llattan.** Mezgazda Kiadó, 2012.
57. Farez, S. and Morley, R.S.: **Potential animal health hazards of pork and pork products.** Rev. Sci. Tech., 16. 65-78, 1997.
58. Feliziani, F., Blome, S., Petrini, S., Giammarioli, M., Iscaro, C., Severi, G., Convito, L., Pietschmann, J., Beer, M., De Mia, G.M.: **First assessment of classical swine fever**

- marker vaccine candidate CP7\_E2alf for oral immunization of wild boar under field conditions.** *Vaccine*, 32. 2050-2055, 2014.
59. Fletcher, S.P., Jackson, R.J.: **Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function.** *J. Virol.*, 76. 5024-5033, 2002.
  60. Floegel-Niesmann, G., Bunzenthal, C., Fischer, S., Moennig, V.: **Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs.** *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.*, 50. 214-220, 2003.
  61. Floegel-Niesmann, G., Blome, S., Gerss-Dülmer, H., Bunzenthal, C., Moennig, V.: **Virulence of classical swine fever virus isolates from Europe and other areas during 1996 until 2007.** *Vet. Microbiol.*, 139. 165-169, 2009.
  62. Frey, C.F., Bauhofer, O., Ruggli, N., Summerfield, A., Hofmann, M.A., Tratschin, J.D.: **Classical swine fever virus replicon particles lacking the Erns gene: a potential marker vaccine for intradermal application.** *Vet. Res.*, 37. 655-670, 2006.
  63. Gabriel, C., Blome, S., Urniza, A., Juanola, S., Koenen, F., Beer, M.: **Towards licensing of CP7\_E2alf as marker vaccine against classical swine fever – Duration of immunity.** *Vaccine*, 30. 2928-2936, 2012.
  64. Ganges, L., Barrera, M., Nunez, J.I., Blanco, I., Frias, M.T., Rodriguez, F., Sobrino, F.: **A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge.** *Vaccine*, 23. 3741-3752, 2005.
  65. Gilbert, M., Conchedda, G., Van Boeckel, T.P., Cinardi, G., Linard, C., Nicolas, G., Thanapongtharm W., D'Aiotti, L., Wint, W., Newman, S.H., Robinson, T.P.: **Income Disparities and the Global Distribution of Intensively Farmed Chicken and Pigs.** *PLoS ONE* 10(7): e0133381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133381>, 2015.
  66. Goller, K.V., Dräger, C., Höper, D., Beer, M., Blome, S.: **Classical swine fever virus marker vaccine strain CP7\_E2alf: genetic stability in vitro and in vivo.** *Arch. Virol.*, 160. 3121-3125, 2015.
  67. Gong, Y., Trowbridge, R., Macnaughton, T.B., Westaway, E.G., Shannon, A.D., Gowans, E.J.: **Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus.** *J. Gen. Virol.*, 77. 2729-2736, 1996.
  68. Graham, S.P., Everett, H.E., Haines, F.J., Johns, H.L., Sosan, O.A., Salguero, F.J., Clifford, D.J., Steinbach, F., Drew, T.W., Crooke, H.R.: **Challenge of pigs with classical swine fever viruses after C-strain vaccination reveals remarkably rapid protection and insights into early immunity.** *PLoS One* 7, e29310, 2012.

69. Gray, E.W., Nettleton, P.F.: **The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses.** J. Gen. Virol., 68. 2339-2346, 1987.
70. Greiser-Wilke, I., Moennig, V.: **Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies.** Anim. Health Res. Rev., 5. 223-226, 2004.
71. Hahn, J., Park, S.H., Song, J.Y., An, S.H., Ahn, B.Y.: **Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2 protein.** J. Virol. Methods, 93. 49-56, 2001.
72. Hammond, J.M., Jansen, E.S., Morrissy, C.J., Hodgson, A.L., Johnson, M.A.: **Protection of pigs against 'in contact' challenge with classical swine fever following oral or subcutaneous vaccination with a recombinant porcine adenovirus.** Virus Res., 97. 151-157, 2003.
73. Hammond, J.M., Johnson, M.A.: **Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics.** Vet. J., 169. 17-27, 2005.
74. Harada, T., Tautz, N., Thiel, H.J.: **E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies.** J. Virol., 74. 9498-9506, 2000.
75. Horn P., Pászthy Gy., Bene Sz.: **Sertéstenyésztés.** „E-tananyag”, Kaposvári Egyetem – Nyugat-Magyarországi Egyetem – Pannon Egyetem, 2011.
76. 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., 16. 207-214, 1997.
77. Hulst, M.M., Westra, D.F., Wensvoort, G., Moormann, R.J.: **Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera.** J. Virol., 67. 5435-5442, 1993.
78. Hulst, M.M., van Gennip, H.G., Vlot, A.C., Schooten, E., de Smit, A.J., Moormann, R.J.: **Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: Role for virus replication in vivo and virulence.** J. Virol., 75. 9585-9595, 2001.
79. Je, S.H., Kwon, T., Yoo, S.J., Lee, D., Lee, S., Richt, J.A., Lyoo, Y.S.: **Classical Swine Fever Outbreak after Modified Live LOM Strain Vaccination in Naive Pigs, South Korea.** Emerg. Infect. Dis., 24. 798-800, 2018.
80. Jenckel, M., Blome, S., Beer, M., Höper, D.: **Quasispecies composition and diversity do not reveal any predictors for chronic classical swine fever virus infection.** Arch. Virol., 162. 775-786, 2017.
81. Kaden, V., Lange, B.: **Oral immunisation against classical swine fever (CSF): onset and duration of immunity.** Vet. Microbiol., 82. 301-310, 2001.
82. Kaden, V., Heyne, H., Kiupel, H., Letz, W., Kern, B., Lemmer, U., Gossger, K., Rothe, A., Bohme, H., Tyrpe, P.: **Oral immunisation of wild boar against classical swine**



- fever: concluding analysis of the recent field trials in Germany.** Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr., 115. 179-185, 2002.
83. Kaden, V., Renner, C., Rothe, A., Lange, E., Hänel, A., Gossger, K.: **Evaluation of the oral immunisation of wild boar against classical swine fever in Baden-Württemberg.** Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr., 116. 362-367, 2003.
  84. Kaden, V., Steyer, H., Schnabel, J., Bruer, W.: **Classical swine fever (CSF) in wild boar: The role of the transplacental infection in the perpetuation of CSF.** J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health., 52. 161-164, 2005.
  85. Kaden, V., Lange, E., Steyer, H., Lange, B., Klopffleisch, R., Teifke, J.P., Bruer, W.: **Classical swine fever virus strain C protects the offspring by oral immunisation of pregnant sows.** Vet. Microbiol., 130. 20-27, 2008.
  86. Kaden, V., Lange, E., Kuster, H., Muller, T., Lange, B.: **An update on safety studies on the attenuated “RIEMSER Schweinepestoralvakzine” for vaccination of wild boar against classical swine fever.** Vet. Microbiol., 143. 133-138, 2010.
  87. Klinkenberg, D., Moormann, R.J., de Smit, A.J., Bouma, A., de Jong, M.C.: **Influence of maternal antibodies on efficacy of a subunit vaccine: transmission of classical swine fever virus between pigs vaccinated at 2 weeks of age.** Vaccine, 20. 3005-3013, 2002.
  88. Koprowski, H., James, T.R., Cox, H.R.: **Propagation of Hog Cholera Virus in Rabbits.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 63. 178-183, 1946.
  89. König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R., Thiel, H.J.: **Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins.** J. Virol., 69. 6479-6486, 1995.
  90. König, P., Hoffmann, B., Depner, K.R., Reimann, I., Teifke, J.P., Beer, M.: **Detection of classical swine fever vaccine virus in blood and tissue samples of pigs vaccinated either with a conventional C-strain vaccine or a modified live marker vaccine.** Vet. Microbiol., 120. 343-351, 2007b.
  91. König, P., Lange, E., Reimann, I., Beer, M.: **CP7\_E2alf: a safe and efficient marker vaccine strain for oral immunisation of wild boar against Classical swine fever virus (CSFV).** Vaccine, 25. 3391-3399, 2007a.
  92. König, P., Blome, S., Gabriel, C., Reimann, I., Beer, M.: **Innocuousness and safety of classical swine fever marker vaccine candidate CP7\_E2alf in non-target and target species.** Vaccine, 30. 5-8, 2011.
  93. Laddomada, A.: **Incidence and control of classical swine fever in European wild boar.** Vet. Microbiol., 73. 121-130, 2000.

94. Laevens, H., Koenen, F., Deluyker, H., de Kruif, A.: **Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus: Transmission of the virus, course of the disease and antibody response.** *Vet. Rec.*, 145. 243-248, 1999.
95. Lange, M, Kramer-Schadt, S, Blome, S, Beer, M, Thulke, H.H.: **Disease severity declines over time after a wild boar population has been affected by classical swine fever – legend or actual epidemiological process?** *Prev. Vet. Med.* 106. 185-195, 2012.
96. Leifer, I., Depner, K., Blome, S., Le Potier, M.F., Le Dimna, M., Beer, M., Hoffmann, B.: **Differentiation of C-strain Riems or CP7\_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR.** *J. Virol. Methods*, 158. 114-122, 2009a.
97. Leifer, I., Lange, E., Reimann, I., Blome, S., Juanola, S., Duran, J.P., Beer, M.: **Modified live marker vaccine candidate CP7\_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization.** *Vaccine*, 27. 6522-6529, 2009b.
98. Leslie, E.E., Geong, M., Abdurrahman, M., Ward, M.P., Toribio, J.A.: **A description of smallholder pig production systems in eastern Indonesia.** *Prev. Vet. Med.*, 118. 319-327, 2015.
99. Li, H., Gao, R., Zhang, Y.: **A promising trigene recombinant human adenovirus vaccine against classical swine fever virus.** *Viral Immunol.*, 29. 244-251, 2016.
100. Li, W., Mao, L., Zhou, B., Liu, X., Yang, L., Zhang, W., Jiang, J.: **The swine CD81 enhances E2-based DNA vaccination against classical swine fever.** *Vaccine*, 33. 3542-3548, 2015.
101. Liang, D.L., Sainz, I.F., Ansari, I.H., Gil, L., Vassilev, V., Donis, R.O.: **The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses.** *J. Gen. Virol.*, 84. 1269-1274, 2003.
102. Liess, B.: **Pathogenesis and epidemiology of hog cholera.** *Ann. Rech. Vet.* 18. 139-145, 1987.
103. Lim, S.I., Jeoung, H.Y., Kim, B., Song, J.Y., Kim, J., Kim, H.Y., Cho, I.S., Woo, G.H., Lee, J.B., An, D.J.: **Impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus-2 infection on the potency of the classical swine fever vaccine (LOM strain).** *Vet. Microbiol.*, 193. 36-41, 2016a.
104. Lim, S.I., Song, J.Y., Kim, J., Hyun, B.H., Kim, H.Y., Cho, I.S., Kim, B., Woo, G.H., Lee, J.B., An, D.J.: **Safety of classical swine fever virus vaccine strain LOM in pregnant sows and their offspring.** *Vaccine*, 34. 2021-2026, 2016b.

105. Lipowski, A., Drexler, C., Pejsak, Z.: **Safety and efficacy of a classical swine fever subunit vaccine in pregnant sows and their offspring.** *Vet. Microbiol.*, 77. 99-108, 2000.
106. Liu, L., Hoffmann, B., Baule, C., Beer, M., Belak, S., Widen, F.: **Two real-time RT-PCR assays of classical swine fever virus, developed for the genetic differentiation of naturally infected from vaccinated wild boars.** *J. Virol. Methods*, 159. 131-133, 2009.
107. Liu, S., Tu, C., Wang, C., Yu, X., Wu, J., Guo, S., Shao, M., Gong, Q., Zhu, Q., Kong, X.: **The protective immune response induced by B cell epitope of classical swine fever virus glycoprotein E2.** *J. Virol. Methods*, 134. 125-129, 2006a.
108. Liu, S., Yu, X., Wang, C., Wu, J., Kong, X., Tu, C.: **Quadruple antigenic epitope peptide producing immune protection against classical swine fever virus.** *Vaccine*, 24. 7175-7180, 2006b.
109. Luo, Y., Li, S., Sun, Y., Qiu, H.J.: **Classical swine fever in China: a minireview.** *Vet. Microbiol.*, 172. 1-6, 2014.
110. Luo, Y., Li, L., Austermann-Busch, S., Dong, M., Xu, J., Shao, L., Lei, J., Li, N., He, W.R., Zhao, B., Li, S., Li, Y., Liu, L., Becher, P., Sun, Y., Qiu, H.J.: **Enhanced expression of the Erns protein of classical swine fever virus in yeast and its application in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for antibody differentiation of infected from vaccinated animals.** *J. Virol. Methods*, 222. 22-27, 2015.
111. Massei, G., Kindberg, J., Licoppe, A., Gačić, D., Šprem, N., Kamler, J., Baubet, E., Hohmann, U., Monaco, A., Ozoliņš, J., Cellina, S., Podgórski, T., Fonseca, C., Markov, N., Pokomy, B., Rosell, C., Náhlik A.: **Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe.** *Pest Manag. Sci.*, 71. 492-500, 2015.
112. Maurer, R., Stettler, P., Ruggli, N., Hofmann, M.A., Tratschin, J.D.: **Oronasal vaccination with classical swine fever virus (CSFV) replicon particles with either partial or complete deletion of the E2 gene induces partial protection against lethal challenge with highly virulent CSFV.** *Vaccine*, 23. 3318-3328, 2005.
113. Mebus, C.A., House, C., Ruiz-Gonzalvo, F.R., Pineda, J.M., Tapiador, J., Pire, J.J., Bergada, J., Yedloutschnig, R.J., Sanchez-Vizcaino, J.M.: **Survival of foot-and-mouth disease, African swine fever, and hog cholera viruses in Spanish Serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins.** *Food Microbiol.*, 10. 133-143, 1993.

114. Mészáros J.: **Az állatállományok fertőző betegségektől való mentesítésének lehetőségei.** Akadémiai székfoglaló 1983. február 24. Akadémiai Kiadó, Budapest 1985.
115. Meuwissen, M.P.M., van Asseldonk, M.A.P.M., Mourits, M.C.M., Huirne, R.B.M.: **Epidemic disease risk financing in a protective vaccination framework.** Rev. Espanola Estud. agrosociales Pesq., 221. 151-173, 2009.
116. Meyer, D., Fritsche, S., Luo, Y., Engemann, C., Blome, S., Beyerbach, M., C.-Y. Chang, H.-J. Qiu, P. Becher, Postel, A.: **The double-antigen ELISA concept for early detection of Erns-specific classical swine fever virus antibodies and application as an accompanying test for differentiation of infected from marker vaccinated animals.** Transbound. Emerg. Dis., <https://doi.org/10.1111/tbed.12611>, 2017.
117. Meyers, G., Rümenapf, T., Thiel, H.J.: **Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus.** Virology, 171. 555-567, 1989.
118. Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.J., Kummerer, B.M.: **Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs.** J. Virol., 71. 1735, 1997.
119. Milicevic, V., Dietze, K., Plavsic, B., Tikvicki, M., Pinto, J., Depner, K.: **Oral vaccination of backyard pigs against classical swine fever.** Vet. Microbiol., 163. 167-171, 2013.
120. Mittelholzer, C., Moser, C., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A.: **Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains.** Vet. Microbiol., 74. 293-308, 2000.
121. Mocsári E., Molnár T.: **Újabb ismeretek a sertéspestisről.** MÁL, 49. 134-139, 1994.
122. Moennig, V.: **Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy.** Vet. Microbiol., 73. 93-102, 2000.
123. Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., Greiser-Wilke, I.: **Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge.** Vet. J. 165. 11-20, 2003.
124. Moennig, V., Becher, P.: **Pestivirus control programs: How far have we come and where are we going?** Animal Health Research Reviews, 16. 83-87, 2015.
125. Monger, V.R., Stegeman, J.A., Dukpa, K., Gurung, R.B., Loeffen, W.L.: **Evaluation of oral bait vaccine efficacy against classical swine fever in village backyard pig farms in Bhutan.** Transbound. Emerg. Dis., 63. 211-218, 2015.
126. Moormann, R.J., van Gennip, H.G., Miedema, G.K., Hulst, M.M., van Rijn, P.A.: **Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus.** J Virol., 70. 763-770, 1996.

127. Moormann, R.J., Bouma, A., Kramps, J.A., Terpstra, C., De Smit, H.J.: **Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test.** *Vet. Microbiol.*, 73. 209-219, 2000.
128. Munoz-Gonzalez, S., Perez-Simo, M., Munoz, M., Bohorquez, J.A., Rosell, R., Summerfield, A., Domingo, M., Ruggli, N., Ganges, L.: **Efficacy of a live attenuated vaccine in classical swine fever virus postnatally persistently infected pigs.** *Vet. Res.*, 46. 78, 2015.
129. **OIE general disease information sheets. Classical swine fever.** [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/CSF-EN.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/CSF-EN.pdf) [site accessed 30.05.2014].
130. Overby, E., Eskildsen, M.: **Transplacental infection in susceptible gilts after inoculation with: I. Lapinized swine fever vaccine, II. Bovine viral diarrhoea virus strains.** Vol EUR 5904. Commission of the European Communities, DG Scientific and Technical Information and Information Management, 1977.
131. Ősz Gy.: **Visszatekintés a sertéspestis elleni küzdelem történetére a jubiláló szaklapunk tükrében. I.** *MÁL*, 33. 741-745, 1978.
132. Ősz Gy.: **Visszatekintés a sertéspestis elleni küzdelem történetére a jubiláló szaklapunk tükrében. II.** *MÁL*, 34. 197-202, 1979.
133. Pannhorst, K., Frohlich, A., Staubach, C., Meyer, D., Blome, S., & Becher, P.: **Evaluation of an Erns-based enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish Classical swine fever virus-infected pigs from pigs vaccinated with CP7\_E2alf.** *J. Vet. Diag. Invest.*, 27. 449-460, 2015.
134. Peeters, B., Bienkowska-Szewczyk, K., Hulst, M., Gielkens, A., Kimman, T.: **Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever.** *J. Gen. Virol.*, 78. 3311-3315, 1997.
135. Peeters, B.: **Recombinant and chimeric viruses: Evaluation of risks associated with changes in tropism. A Report.** Animal Sciences Group, Wageningen University and Research Centre, Division of Infectious Diseases, 2005.
136. Pehl, K.H.: **Erfahrungen im laborversuch bei der impfung mit riemser kristallviolettvakzine gegen schweinepest.** *Archiv für Experimentelle Tiermedizin Bd.*, VIII. 478-485, 1954.
137. Petrov, A., Blohm, U., Beer, M., Pietschmann, J., Blome, S.: **Comparative analyses of host responses upon infection with moderately virulent classical swine fever virus in domestic pigs and wild boar.** *Virol. J.*, 11. 134, 2014.
138. Pirtle, E.C., Mengeling, W.L.: **Antigenic differences in two hog cholera virus strains.** *Am. J. Vet. Res.*, 32. 1473-1477, 1971.

139. Pittiglio, C., Khomenko, S., Beltran-Alcrudo, D.: **Wild boar mapping using population-density statistics: From polygons to high resolution raster maps.** PLoS One, 13. e0193295. doi: 10.1371/journal.pone.0193295. eCollection, 2018.
140. Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Pejsak, Z.: **Evaluation of humoral and antigen-specific T-cell responses after vaccination of pigs against pseudorabies in the presence of maternal antibodies.** Vet Microbiol, 144. 450-454, 2010.
141. Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Pejsak, Z.: **Effect of age and maternally-derived antibody status on humoral and cellular immune responses to vaccination of pigs against Erysipelothrix rhusiopathae.** Veterinary J., 194. 128-130, 2012.
142. Postel, A., Austermann-Busch, S., Petrov, A., Moennig, V., Becher, P.: **Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent developments and future challenges.** Transbound. Emerg. Dis., 65. Suppl 1. 248-261, 2018.
143. Pyo, H.M., Hlasny, M., Zhou, Y.: **Influence of maternally-derived antibodies on live attenuated influenza vaccine efficacy in pigs.** Vaccine, 33. 3667-3672, 2015.
144. Rangelova, D., Nielsen, J., Strandbygaard, B., Koenen, F., Blome, S., Uttenthal, A.: **Efficacy of marker vaccine candidate CP7\_E2alf in piglets with maternally derived C-strain antibodies.** Vaccine, 30. 6376-6381, 2012.
145. Rasmussen, T.B., Uttenthal, A., Reimann, I., Nielsen, J., Depner, K., Beer, M.: **Virulence, immunogenicity and vaccine properties of a novel chimeric pestivirus.** J. Gen. Virol., 88. 481-486, 2007.
146. Reimann, I., Depner, K., Trapp, S., Beer, M.: **An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus.** Virology, 322. 143-157, 2004.
147. Renson, P., Le Dimna, M., Keranflech, A., Cariolet, R., Koenen, F., Le Potier, M.F.: **CP7\_E2alf oral vaccination confers partial protection against early classical swine fever virus challenge and interferes with pathogeny-related cytokine responses.** Vet. Res., 44. 9, 2013.
148. **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, 1994.
149. Risatti, G.R., Borca, M.V., Kutish, G.F., Lu, Z., Holinka, L.G., French, R.A., Tulman, E.R., Rock, D.L.: **The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine.** J. Virol., 79. 3787-3796, 2005.
150. Risatti, G.R., Holinka, L.G., Sainz, I.F., Carrillo, C., Lu, Z., Borca, M.V.: **N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine.** J. Virol., 81. 924-933, 2007.

151. Rossi, S., Pol, F., Forot, B., Rigaux, N. Masse-provin S., Bronner, A., Le Potier, M.-F.: **Preventive vaccination contributes to control classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa* sp.).** *Vet. Microbiol.*, 142. 99-107, 2010.
152. Rossi, S., Staubach, C., Blome, S., Guberti, V., Thulke, H.H., Vos, A., Koenen, F., Le Potier, M.F.: **Controlling of CSFV in European wild boar using oral vaccination: A review.** *Front. Microbiol.*, 6. 1141, 2015.
153. Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R., Thiel, H.J.: **Molecular characterization of hog cholera virus.** In: *Ruminant Pestivirus Infections*. Szerk.: Liess, B., Moennig, V., Pohlenz, J., Trautwein, G. *Archives of Virology (Supplementum 3)*, Vol 3. Springer, Vienna, 1991a.
154. Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G., Thiel, H.J.: **Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity.** *J. Virol.*, 65. 589-597, 1991b.
155. Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H., Thiel, H.J.: **Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses.** *J. Virol.*, 67. 3288-3294, 1993.
156. Sage, M., Hubert, P., Rossi, S.: **Evaluation of bait acceptance by wild boar and non-target species – test of different distribution modalities and seasonal variations – implication for oral vaccination efficiency against classical swine fever virus.** *Julius-Kühn-Archiv*, 432. 213-214, 2011.
157. Sage, M., Fourel, I., Lahoreau, J., Siat, V., Berny, P., Rossi, S.: **Iophenoxic acid derivatives as markers of oral baits to wildlife.** *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20. 2893-2904, 2013.
158. Sandbulte, M.R., Platt, R., Roth, J.A., Henningson, J.N., Gibson, K.A., Rajao, D.S., Loving, C.L., Vincent, A.L.: **Divergent immune responses and disease outcomes in piglets immunized with inactivated and attenuated H3N2 swine influenza vaccines in the presence of maternally-derived antibodies.** *Virology*, 464-465. 45-54, 2014.
159. Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y., Furuuchi, S.: **Field experiments of hog cholera live vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture.** *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, (Tokyo) 9. 83-91, 1969.
160. Siegrist, C.A.: **Neonatal and early life vaccinology.** *Vaccine*, 19. 3331-3346, 2001.
161. Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Hellen, C.U.: **Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs.** *J. Virol.*, 72. 4775-4782, 1998.
162. Smith, D.B., Meyers, G., Bukh, J., Gould, E.A., Monath, T., Scott Muerhoff, A., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Stapleton, J.T., Simmonds, P., Becher, P.: **Proposed revision to**

- the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae.** J. Gen. Virol., 98. 2106-2112, 2017.
163. Soós T., Tuboly S.: **Az immunprophylaxis módszerei. (Vakcinológia).** A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft., 30-62, 2009a.
164. Soós T., Tuboly S.: **A vakcinák törzskönyvezése és ellenőrzése. (Vakcinológia).** A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft., 268-279, 2009b.
165. Soós T., Tuboly S.: **Az immunitás biológiai alapjai. (Vakcinológia).** A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft., 62-88, 2009c.
166. Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S.: **The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection.** Vet. Microbiol., 92. 187-194, 2003.
167. Stewart, W.C., Carbrey, E.A., Kresse, J.I.: **Transplacental hog cholera infection in immune sows.** Am. J. Vet. Res., 33. 791-798, 1972.
168. Stewart, W.C., Carbrey, E.A., Kresse, J.I.: **Transplacental hog cholera infection in susceptible sows.** Am. J. Vet. Res., 34. 637-640, 1973.
169. Sun, Y., Li, H.Y., Tian, D.Y., Han, Q.Y., Zhang, X., Li, N., Qiu, H.J. **A novel alphavirus replicon-vectored vaccine delivered by adenovirus induces sterile immunity against classical swine fever.** Vaccine, 29. 8364-8372, 2011a.
170. Sun, Y., Li, H.Y., Zhang, X.J., Chang, T.M., He, F., Wang, X.P., Liu, D.F., Qiu, H.J.: **Comparison of the protective efficacy of recombinant adenoviruses against classical swine fever.** Immunol. Lett., 135. 43-49, 2011b.
171. **A Tanács 2001/89/EK irányelve a klasszikus sertéspestis elleni védekezésre irányuló közösségi intézkedésekről.** Az Európai Közösségek Hivatalos Lapja, 03/34. kötet, L 316/5, 2001.
172. Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., Thiel, H.J.: **Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites.** J. Virol., 71. 5415-5422, 1997.
173. Terpstra, C., Woortmeyer, R., Barteling, S.J.: **Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain.** Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 97. 77-79, 1990.
174. Terpstra, C.: **Hog cholera: an update of present knowledge.** Br. Vet. J., 147. 397-406, 1991. (Special review series)
175. Thiel, H.J., Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T., Meyers, G.: **Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus.** J. Virol., 65. 4705-4712, 1991.
176. Tignon, M., Kulcsár G., Haegeman, A., Barna T., Fábrián K., Lévai R., Van der Stede, Y., Farsang A., Vrancken, R., Belák K., Koenen, F.: **Classical swine fever: comparison of oronasal immunisation with CP7E2alf marker and C-strain vaccines in domestic pigs.** Vet. Microbiol., 142. 59-68, 2010.



177. Tuboly S., Bernáth S.: **Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn animals.** Adv. Exp. Med. Biol., 503. 107-114, 2002.
178. van Aarle, P.: **Suitability of an E2 subunit vaccine of classical swine fever in combination with the E(rns)-marker-test for eradication through vaccination.** Dev. Biol. (Basel), 114. 193-200, 2003.
179. van Gennip, H.G.P., van Rijn, P.A., Widjoatmodjo, M.N., de Smit, A.J., Moormann, R.J.M.: **Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E-RNS or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response.** Vaccine, 19. 447-459, 2000.
180. van Gennip, H.G., Bouma, A., van Rijn, P.A., Widjoatmodjo, M.N., Moormann, R.J.: **Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV.** Vaccine, 20.1544-1556, 2002.
181. van Oirschot, J.T.: **Emergency vaccination against classical swine fever.** Dev. Biol. (Basel), 114. 259-267, 2003a.
182. van Oirschot, J.T.: **Vaccinology of classical swine fever: from lab to field.** Vet. Microbiol., 96. 367-384, 2003b.
183. van Rijn, P.A., Bossers, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J.: **Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge.** J. Gen. Virol., 77. 2737-2745, 1996.
184. van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A., Moormann, R.: **Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera.** J. Virol., 65. 2761-2765, 1991.
185. Vandeputte, J., Chappuis, G.: **Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas.** Rev. Sci. Tech., 18. 638-647, 1999.
186. Varga J., Rusvai M., Fodor L.: **A klasszikus sertéspestis.** In: *A háziállatok fertőző betegségei.* Magyar Állatorvosi Kamara Kft., Budapest, 2018.
187. Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J.: **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., 136. 309-323, 1994.
188. von Rosen, T., Rangelova, D., Nielsen, J., Rasmussen, T.B., Uttenthal, A.: **DIVA vaccine properties of the live chimeric pestivirus strain CP7\_E2gif.** Vet. Microbiol., 170. 224-231, 2014.
189. von Rüden, S., Staubach, C., Kaden, V., Hess, R.G., Blicke, J., Kühne, S., Sonnenburg, J., Fröhlich, A., Teuffert, J., Moennig, V.: **Retrospective analysis of the**

- oral immunisation of wild boar populations against classical swine fever virus (CSFV) in region Eifel of Rhineland-Palatinate.** *Vet. Microbiol.*, 132. 29-38, 2008.
190. Wang, Z., Nie, Y., Wang, P., Ding, M., Deng, H.: **Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry.** *Virology*, 330. 332-341, 2004.
191. Weesendorp, E., Landman, W.J., Stegeman, A., Loeffen, W.L.: **Detection and quantification of classical swine fever virus in air samples originating from infected pigs and experimentally produced aerosols.** *Vet. Microbiol.*, 127. 50-62, 2008.
192. Weesendorp, E., Stegeman, A., Loeffen, W.L.: **Quantification of classical swine fever virus in aerosols originating from pigs infected with strains of high, moderate or low virulence.** *Vet. Microbiol.*, 135. 222-230, 2009.
193. Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G., Thiel, H.J.: **Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfidelinked heterodimer.** *J. Virol.*, 64. 3563-3569, 1990.
194. Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., Thiel, H.J.: **A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus.** *J. Virol.*, 66. 3677-3682, 1992.
195. Wengler, G., Bradley, D. W. et al.: Flaviviridae. In: Murphy, F. A., Fauquet, C. M. et al. (szerk.): **Virus taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Springer Verlag, New York, 415–427, 1995.
196. Widjojatmodjo, M.N., van Gennip, H.G., Bouma, A., van Rijn, P.A., Moormann, R.J.: **Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: transcomplementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines.** *J. Virol.*, 74., 2973-2980, 2000.
197. Wienhold, D., Armengol, E., Marquardt, A., Marquardt, C., Voigt, H., Buttner, M., Saalmuller, A., Pfaff, E.: **Immunomodulatory effect of plasmids coexpressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2-DNA vaccination.** *Vet. Res.*, 36. 571-587, 2005.
198. World Organisation for Animal Health (OIE). **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.** 6th ed. Paris: OIE; 2008.
199. Wu, Z., Wang, Q., Feng, Q., Liu, Y., Teng, J., Yu, A.C., Chen, J.: **Correlation of the virulence of CSFV with evolutionary patterns of E2 glycoprotein.** *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, 1. 204-220, 2010.
200. Xia, H., Wahlberg, N., Qiu, H.J., Widen, F., Belak, S., Liu, L.: **Lack of phylogenetic evidence that the Shimen strain is the parental strain of the lapinized Chinese**

- strain (C-strain) vaccine against classical swine fever.** Arch. Virol., 156. 1041-1044, 2011.
201. Xia, H., Harimoorthy, R., Vijayaraghavan, B., Blome, S., Widen, F., Beer, M., Belák S., Liu, L.: **Differentiation of classical swine fever virus infection from CP7\_E2alf marker vaccination by a multiplex microsphere immunoassay.** Clin. Vaccine. Immunol., 22. 65-71, 2015.
202. Yu, X., Tu, C., Li, H., Hu, R., Chen, C., Li, Z., Zhang, M., Yin, Z.: **DNA-mediated protection against classical swine fever virus.** Vaccine, 19. 1520-1525, 2001.
203. Zhang, X.J., Han, Q.Y., Sun, Y., Zhang, X., Qiu, H.J.: **Development of a triplex TaqMan real-time RT-PCR assay for differential detection of wild-type and HCLV vaccine strains of classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus 1.** Res. Vet. Sci., 92. 512-518, 2012.
204. Zhao, J.J., Cheng, D., Li, N., Sun, Y., Shi, Z., Zhu, Q.H., Tu, C., Tong, G.Z., Qiu, H.J.: **Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus.** Vet. Microbiol., 126. 1-10, 2008.
205. Zhu, S., Guo, X., Keyes, L.R., Yang, H., Ge, X.: **Recombinant encephalomyocarditis viruses elicit neutralizing antibodies against PRRSV and CSFV in mice.** PLoS One, 10. e0129729, 2015.
206. Ziegler, U., Kaden, V.: **Vaccination of weaner pigs against classical swine fever with the subunit vaccine Porcilis Pesti: influence of different immunization plans on excretion and transmission of challenge virus.** Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 115. 267-273, 2002.

## 11) A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

### 11.1) Lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk (szakcikkek)

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

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

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

Renson, P., Le Dimna, M., Gabriel, C., Lévai, R., Blome, S., Kulcsár, G., Koenen, F., Le Potier, M.F.: **Cytokine and immunoglobulin isotype profiles during CP7\_E2alf vaccination against a challenge with the highly virulent Koslov strain of classical swine fever virus.** Res. Vet. Sci. 96. 389, 2014.

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

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

## 11.2) Konferencia prezentációk

Lévai R., Tignon, M., Belák K., Barna T., Fábíán K., Farsang A., Kulcsár G., Koenen, F.: **The biological features of the classical swine fever virus: comparing a vaccine candidate with other strains in domestic pigs.** Acta Microbiol. Immunol. Hung., 56. 1. Suppl., 2009.

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

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

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

## 11.3) A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények listája

Balka Gy. Hornyák Á., Lévai R., Barna T., Kulcsár G., Rusvai M.: **Transmission of Modified Live Virus Vaccine from Vaccinated to Non-vaccinated Pigs.** Acta Microbiol. Immunol. Hung., 54. 5. Suppl., 2007.

Aldon, Y., McKay, P.F., Allen, J., Ozorowski, G., Lévai R., Tolazzi, M., Rogers, P., He, L., de Val, N., Fábíán K., Scarlatti, G., Zhu, J., Ward, A.B., Crispin, M., Shattock, R.J.: **Rational Design of DNA-Expressed Stabilized Native-Like HIV-1 Envelope Trimers.** Cell Rep., 24. 3324-3338, 2018.

## 12) KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

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

Minden egyéb segítséget a Családomnak és a Barátaimnak köszönök meg.