

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

**Sertés circovírus epitópot expresszáló rekombináns uborkamozaikvírus
immunogenitásának vizsgálata sertésben**

Zwillinger András

Témavezetők:

dr. Tombácz Kata

dr. Tuboly Tamás

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Budapest

2012

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Összefoglaló	5
3. Summary.....	6
4. Bevezetés	7
5. Irodalmi áttekintés.....	8
5.1 A sertés circovírusok.....	8
5.2 A védekezés lehetséges módjai	10
5.3 Antigén előállító rendszerek növény vírusok felhasználásával	11
5.4 Hogyan készült a rekombináns alegység vakcina?	12
6. Anyag és módszer	14
6.1 Sertések immunizálása	14
6.2 Immunfluoreszcens teszt	15
6.3 Kísérleti fertőzés vad vírussal	17
6.4 PCV2 DNS kimutatása a szerv- és bélsármintákból	17
7. Eredmények	19
8. Megbeszélés.....	21
9. Köszönetnyilvánítás	23
10. Irodalomjegyzék.....	24
11. Mellékletek	29

1. Rövidítések jegyzéke

BSA	<i>bovine serum albumin</i> szarvasmarha szérum albumin
CMV	<i>cucumber mosaic virus</i> uborkamozaik vírus
DNS	deoxiribonukleinsav
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> fluoreszcein-izotiocianát
IF	immunfluoreszcens
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> foszfát pufferolt sóoldat
PCV	<i>porcine circovirus</i> sertés circovírus
PCVAD	<i>porcine circovirus associated diseases</i> sertés circovírussal kapcsolatos betegségek
PDNS	<i>porcine dermatitis nephropathy syndrome</i> sertések dermatitisz nefropátiája
PMWS	<i>postweaning multisystemic wasting syndrome</i> választott malacok circovírus okozta sorvadása
PPV	<i>porcine parvovirus</i> sertés parvovírus
PRDC	<i>porcine respiratory disease complex</i> sertések légzőszervi betegség komplexe
PRRSV	<i>porcine respiratory and reproductive syndrome virus</i> sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa
qPCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

RCMV	<i>recombinant cucumber mosaic virus</i> rekombináns uborkamozzaik vírus
TCID ₅₀	<i>tissue culture infective dose 50%</i> szövettenyészetben 50% sejtkárosodást előidéző vírusedózis
SZIE-ÁOTK	Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

2. Összefoglaló

A kettes típusú sertés circovírus (porcine circovirus type 2, PCV2) világszerte, így Magyarországon is széles körben előforduló, súlyos gazdasági károkat előidéző kórokozó, ami jelen van a házi sertés és vaddisznó állományokban is. A PCV2 elleni védekezés jelenleg az általános járványvédelmen és vakcinázáson alapul.

Az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont és a SZIE-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak együttműködésével sikerült olyan, dohánynövényen szaporítható, rekombináns uborkamozzaik vírust (cucumber mosaic virus, CMV) (továbbiakban RCMV) létrehozni, amely a PCV2 egyik epitópját (224-233 aminosav) a kapszidján hordozza. A rekombináns vírus egéroltási kísérletekben PCV2-specifikus immunválasz kiváltására alkalmasnak bizonyult. Az RCMV növényekben nagy mennyiségben szaporítva olyan antigén előállításra kínál lehetőséget, mely egyszerű és könnyen gazdaságossá tehető, továbbá az antigén alkalmas lehet orális immunizálásra, így lokális immunitás kialakítására is. Az RCMV immunogenitásának tesztelésére irányuló sertés immunizálási kísérletek keretében 13, két hetesen választott malacot immunizáltunk, három csoportban. Az első csoportban öt malacot inkomplett Freund adjuvánssal kevert rekombináns CMV-vel, izomba oltottunk. A második, pozitív kontroll csoport öt malacát kereskedelmi forgalomban kapható, inaktivált vakcinával immunizáltuk (Circovac, Merial). A harmadik csoportban három malacot (negatív kontroll) foszfát pufferrel oltottunk. Az oltásokat 10 nap múlva ismételtük. A két hónapos vizsgálat alatt hetente mértük a vérszérum PCV2-specifikus ellenanyag titerét indirekt immunofluoreszcens módszerrel. A vakcinázás hatékonyságát PCV2-vel végzett ráfertőzési kísérlettel ellenőriztük. A vírusszaporodást az egyes csoportokban kvantitatív polimeráz láncreakció segítségével mértük bélsárból és exterminálást követően vett szervmintákból.

Az immunofluoreszcenciás vizsgálatok eredményei igazolták, hogy az RMCV-vel oltott csoport vérsavójában a második immunizálás után megjelent PCV2 specifikus ellenanyag, míg a pozitív kontroll csoportban ez már az első oltás után is mérhető volt. A kísérlet alatt egyetlen állat sem mutatott PCV2 fertőzésre utaló klinikai tünetet. A vírusszaporodás alacsonyabb mértékű volt a kísérleti csoportban, mint az immunizálatlan egyedekben. A pozitív kontroll csoportban nem detektáltunk vírus replikációt.

Az eredmények alapján az antigén immunogenitása elégségesnek bizonyult, ám a megfelelő koncentráció, formula és adjuváns kiválasztása további kísérleteket igényel.

3. Summary

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a common pathogen causing major economic losses worldwide and also in Hungary, infecting both wild boars and domestic pigs. The control of PCV2 is based on general epidemiological measures and vaccination.

A new recombinant cucumber mosaic virus (RCMV) has been developed in cooperation with the Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, the Agricultural Biotechnology Research Centre and the Szent István University, Faculty of Veterinary Science, Department of Microbiology and Infectious Diseases. The virus carries a PCV2 epitope (amino acids 224-233) on its capsid surface. The recombinant virus was able to trigger specific immune response against PCV2 during an experiment in mice. RCMV replication in high quantities using plants offers an inexpensive and easy way of antigen production. Furthermore, the antigen might also be used for oral immunization, inducing specific local immunity on mucosal surfaces.

To evaluate the immunogenicity of RCMV we performed an experiment using 13 piglets weaned at two weeks after birth and divided them into three groups. Five piglets in the first group were vaccinated intramuscularly using RCMV mixed with incomplete Freund's adjuvant. Another five pigs were immunized using commercially available, inactivated PCV2 vaccine (Circovac, Merial) as positive control. The immunizations were repeated after 10 days. The third group was mock immunized as a negative control. The serum antibody titers were measured weekly during the two-months-long experiment, using indirect immunofluorescence assay. The efficacy of the vaccinations was tested by challenge infection using wild type PCV2. The quantity of the virus was measured by real time polymerase chain reaction (qPCR) from fecal samples and the organ samples collected after extermination.

According to the results of the immunofluorescence tests, PCV2 specific antibodies appeared in the sera of pigs vaccinated with RCMV after the second immunization, in contrast to the positive control group, where they were detected after the first dosing. None of the animals showed clinical signs of PCV2 associated diseases after the challenge infection. Virus replication was less frequent in the piglets immunized with RCMV, than in mock immunized pigs. There was no detectable virus replication in the positive control group.

It was concluded that the immunogenicity of the recombinant antigen was satisfactory, although the selection of the perfect antigen concentration, formulation and adjuvant requires further experiments.

4. Bevezetés

A kettes típusú sertés circovírus (porcine circovirus type 2, PCV2) világszerte igen jelentős gazdasági károkat okoz a sertés állományokban. Több kórkép kialakításában is részt vesz, melyek közül a választott malacok circovírus okozta sorvadása (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) az egyik legjelentősebb. A fertőző betegségek, különösen a vírusfertőzések, így a PCV2 elleni védekezésnek egyik legfontosabb lehetősége a vakcinázás. A vírus változékonyságának köszönhetően új típusok megjelenésével a korábban kifejlesztett inaktivált és alegység vakcinák hatékonyságukból fokozatosan veszítenek, ezért egyre szükségesebbé válik új vakcinák kifejlesztése.

A korábbi baculovírusos expressziós rendszer mellett gazdaságos technológiának ígérkezik a növényi vírus vektor segítségével történő expresszió, mivel ezek a vektorok növényeken nagy mennyiségben szaporíthatóak. Egy így előállított vakcinajelölt immunogenitásának tesztelése egereken sikeresnek bizonyult, így megkezdődtek a sertés immunizálási kísérletek, melyekbe én is bekapcsolódtam.

A kísérlet lényege sertések immunizálása a vakcinajelölttel pozitív és negatív kontrollcsoportok mellett, és kísérleti fertőzése vad vírussal, miközben a vészérum PCV2-specifikus ellenanyag titerét és a bélsárral történő vírusürítést rendszeresen mérjük. Exterminálást követően pedig szervmintákban is meghatározzuk a vírus mennyiségét.

Reményeink szerint a növény vírus alapú expressziós rendszer antigén előállításra alkalmasnak bizonyul és a létrehozott rekombináns vírus elégséges immunválaszt indukál ahhoz, hogy a tünetek kialakulását megelőzze, és takarmányban adagolva a nyálkahártyákon is ki tud alakítani helyi védettséget.

5. Irodalmi áttekintés

5.1 A sertés circovírusok

A sertés circovírus (porcine circovirus, PCV) a legkisebb méretű állati vírusok egyike, mely a *Circoviridae* családba, azon belül a *Circovirus* genusba tartozik. Szimpla szálú, megközelítőleg 1,76 kilobázis méretű DNS genomja cirkuláris (a család és a genus neve is innen ered) melyet fehérjeburok, kapszid vesz körül. Virionja köbös szimmetriájú, burka nincs, átmérője 17 nm (Crowther és mtsai., 2003; Mankretz és mtsai., 1997; Meehan és mtsai., 1997). Fertőzést követően a sejtek magjában replikálódik és ehhez a sejt enzimeit használja. Fertőtlenítő szerekkel szemben igen ellenálló: mivel burka nincs, a zsíroló szerek nem tesznek benne kárt, az alacsony, pH 3-as kémhatásnak, és relatíve magas, 70°C-os hőmérsékletnek is ellenáll (Allan, 1994). Oxidálószerekkel, lúgokkal szemben *in vitro* kevésbé ellenálló, de gyakorlati alkalmazásuk nem megoldható, ugyanis ezek a berendezésekben is kárt tesznek, és nem lehet működésükhöz kellő körülményeket megteremteni (Royer és mtsai., 2001).

Ma a vírusnak két típusa ismert. Először 1974-ben izolálták Németországban az egyes típusú sertés circovírust (porcine circovirus type 1, PCV1) permanensen fertőzött PK-15 sertésvese sejtvonalból (Tischer és mtsai., 1974). Kísérleti körülmények között a PCV1 vírussal fertőzött sertéseken nem mutatkoztak betegség klinikai tünetei (Tischer és mtsai., 1986), habár újabb kutatások szerint 55. napon fertőzött sertés embriókban 21 nappal később tapasztalták a vírus szaporodását, és leziók kialakulását a tüdőben (Saha és mtsai., 2011). Ezzel szemben a kettes típusú sertés circovírus bizonyítottan patogén, fertőző betegséget, és jellemző klinikai tüneteket okoz. Először Nyugat-Kanadában izolálták 1991-ben, a választott malacok circovírus okozta sorvadása (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) kórkép kórokozójaként, majd később publikálták is (Harding és Clark, 1996).

Mára kiderült, hogy a PCV2 világszerte előfordul a házi sertés és vaddisznó állományokban, súlyos gazdasági károkat idézve elő (Kiss és mtsai., 2000; Cságola és mtsai., 2006). Hazai házi és vaddisznók közt 95% fölé rúgó szeropozitivitást állapítottak meg. Felmerült a kérdés, hogy a kórokozó mióta van jelen a sertések között. Régi mintákat vizsgálva 1969-ben Belgiumban vett szérummintákból PCV specifikus ellenanyagokat (Sanchez és mtsai., 2001), 1986-os szövetmintából PCV nukleinsavat (Rosell és mtsai., 2000, Rodriguez-Arrioja és mtsai., 2003) mutattak ki, de angliai mintákban egészen 1970-ig visszamenőleg találtak bizonyítékot a vírus jelenlétére. Megállapították, hogy a vírus már régebb óta jelen van a sertések közt, annak ellenére,

hogy a PMWS kórképre csak 1991 után figyeltek föl. Ennek egyik oka lehet, hogy korábban kisebb volt a betegség gyakorisága (Rosell és mtsai., 2000b), továbbá a kórképre vélhetőleg azért sem lettek figyelmesek korábban, mert tüneteit könnyen összekeverhették más, például a PRRS vírus (porcine respiratory and reproductive syndrome virus, PRRSV) vagy a sertés parvovírus (porcine parvovirus, PPV) okozta betegség tüneteivel (Segalés és Domingo 2002). A felismerést nehezíthette az is, hogy leggyakrabban kevert fertőzés esetében alakulnak ki a súlyosabb klinikai tünetek. A PCV2 erősen immunosuppresszív, ezáltal számos betegség kialakulásában hajlamosító tényezőként játszik szerepet, valamint további jelentős kártételt okoz azáltal, hogy más kórokozók elleni immunizálásra a fertőzött egyedek nem reagálnak kellőképpen, így nem alakul ki megfelelő védettség a vakcinázás után. A sertés circovírussal kapcsolatos megbetegedésekben (porcine circovirus associated diseases, PCVAD) több kórkép is ismert:

1. PMWS (Harding és Clark, 1996). Általában választás után a 6-15 hetes malacok betegszenek meg, fogékony állományokban körülbelül 5-20%-os morbiditással (Harding és mtsai., 1998.) Folyamatos súlyvesztéssel, senyvességgel járó aspecifikus tünetek vannak jelen (köhögés, anémia, dyspnoe, cianózis, láz, bágyadtság, étvágytalanság, hasmenés, sárgaság, idegrendszeri tünetek, főleg a lágyéki és bélfóri nyirokcsomók megnagyobbodása) (Harding és mtsai., 1998; Ellis és mtsai., 1998; Harms, 1999). A betegség kórfejlődésében kulcsszerepe van a vírus immunosuppresszív hatásának (Darwich és mtsai., 2004) és másodlagos fertőzéseknek.
2. Sertések légzőszervi betegség komplexe (porcine respiratory disease complex, PRDC, melynek kialakításában (Halbur, 1998, Thacker, 2001, Kim és mtsai., 2003) a PCV2 mellett más vírusok és baktériumok is részt vehetnek, többek között a PRRSV, a sertés influenza vírus, a *Mycoplasma hyopneumoniae*, a *Bordetella bronchiseptica* és az *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
3. Sertések dermatitisz nefropátiája (porcine dermatitis nephropathy syndrome, PDNS, Segalés és mtsai., 1998, Rosell és mtsai., 2000a). A kórkép leginkább 1,5-4 hónapos korú, 20-65 kg közötti malacokat érint (Done és mtsai., 2001; Duran és mtsai., 1997). A betegség lényege III. típusú hiperszenzitivitási reakció, melyet a PCV2 indukál (Sierra és mtsai., 1997). A vérsavó extrém magas PCV specifikus ellenanyagok immunkomplexek formájában rakódnak le a vese glomerulusaiban és a kapillárisok endotheljén, ezért testszerte savókilépés következik be. Mortalitása magasabb, mint 95% (Segalés 2006).
4. Reproductív rendellenességek és magzati miokarditisz (West és mtsai., 1999, O'Connor és mtsai., 2001). A magzatokba placentán át átjutó PCV2 a 70. napig visszaivarzást és magzatelhalást, mumifikálódást okozhat, mivel még immunkompetencia nem alakult ki. Telepi körülmények közt kicsi a gazdasági jelentősége, mert a kocák nagyrészt immunológiailag már áthangelődtek (Maldonado és mtsai., 2005).

5. Elhalásos tüdőgyulladás (Pesch és mtsai., 2000) és elhalásos tracheitisz (Candotti és mtsai., 2001).
6. Exszudatív epidermitis (Kim és Chae 2004, Watrang és mtsai., 2002), melynek kapcsolata a PCV2-vel még nem bizonyított.
7. Kongenitális tremor (Stevenson és mtsai., 2001, Choi és mtsai., 2002), melynek kialakulásában a PCV2 szerepe szintén vitatott.

A PCV2-nek két genotípusa ismert, melyek pathogenitásukban és elterjedésükben is különböznek. Megkülönböztetésükre jelen dolgozatban Hesse és mtsai (2008) nyomán a PCV2A (1768 bázis hosszúságú genom) és PCV2B (1767 bázis hosszúságú genom) megjelölést használom.

A PCV2A genom volt az elsőként izolált PCV2 szekvencia. Kanadában és az Egyesült Államokban 2004-ig kizárólag ez a genotípus volt kimutatható (Carman és mtsai. 2006). A PCV2B egy újabb genotípus, mely 2003 és 2004 körül gyors terjedést mutatott Európában, így arányaiban háttérbe szorítva a PCV2A-t (de Boisseson és mtsai., 2004, Dupont és mtsai., 2008). Az észak-amerikai kontinensen való terjedésével 2005 második felében a PCV járvány erősödését, és a PCVAD esetek számának emelkedését eredményezte (Carman és mtsai., 2006, Gagnon és mtsai., 2007, Cheung és mtsai., 2007).

Kísérleti körülmények közt malacokat különböző PCV2 típussal PCV 2a/2b, 2b/2a, 2a/2a, és 2b/2b fertőzve modellezték a kombinált fertőződést. A két fertőzés közt 7 nap eltolódást hagytak. A csak PCV2A-val fertőzött egyedek egyikében sem tapasztaltak a PCVAD-re jellemző klinikai tünetet, míg a vegyesen fertőzött kilenc egyed közül ötben súlyos betegség tünetei, nyolcban thymus atrophia, és mindegyikben ascites vagy oedema alakult ki. A csak PCV2B-vel fertőzött öt malac közül egyben alakult ki bronchopneumonia és pleurális folyadékgyülem. A kialakult laesiók a vegyesen fertőzött egyedekben súlyosabbak voltak, mint a tisztán PCV2B vel fertőzöttekben (Harding és mtsai., 2010).

5.2 A védekezés lehetséges módjai

A PCV2 elleni védekezés leghatékonyabb módszere az általános járványvédelmi szabályok betartása mellett a betegség megelőzése vakcinázással. A jelenleg kereskedelmi forgalomban lévő vakcinák (1. melléklet) inaktivált, vagy alegység vakcinák, melyek mind a PCV2A genotípuson alapulnak.

Az inaktivált vakcinákban a kórokozó, jelen esetben a sertés circovírus általában formaldehiddel, vagy etilén iminnel előlt formában van jelen, a szervezet immunrendszerének válaszát adjuvánsok hozzáadásával fokozzák. Előnye, hogy a teljes vírust, így minden

immunogenitásért felelős részletét, epitópját tartalmazza. Ilyen a Circovac (Merial), mely elölt PCV2-t tartalmaz és a FosterTM PCV (Pfizer Animal Health Inc.) vakcina, mely a régebbi Suvaxyn[®] PCV2 One DoseTM (Fort Dodge Animal Health Inc.) vakcinának új formulája, attenuált vírust tartalmaz inaktív formában. Az attenuálás során az apatogén PCV1 genetikai vázára a PCV2 immunogenitásért felelős epitópját ültették génszabványi módszerekkel (Beach és mtsai., 2011).

A jelenlegi inaktivált PCV2 vakcinák hatásossága az immunizált sertések átlagos napi súlygyarapodásán és mortalitási rátáján alapuló vizsgálatok alapján még korlátozott, de egyértelműen mindkét mutatót javította (Kristensen és mtsai., 2011). Mivel a vírus sejtenyészeten nehezen szaporítható, az inaktivált vakcinák gyártása költséges, gazdaságosabb alternatívát jelent az alegység vakcinák előállítására.

Az alegységvakcinák nem tartalmazzák a teljes vírust, és annak teljes antigén készletét, rendszerint annak csak egy fehérjét, vagy néhány epitópját, mégpedig olyat, ami a protektív immunitás kialakításáért felelős, így a szervezet immunrendszere aktív immunitást nyer a kórokozóval szemben. Az epitópok aminosav szekvenciáját előállíthatjuk például transzgenikus rovarpatogén baculovírusokkal. Ilyen módszerrel készülnek a következő vakcinák (Beach és mtsai., 2011):

- Ingelvac CircoFLEX[®] (Boehringer Ingelheim)
- Circumvent[®] (Intervet/Merck)
- Porcilis[®] PCV (Schering-Plough/Merck).

5.3 Antigén előállító rendszerek növény vírusok felhasználásával

Az antigén expresszió lehetséges növényekben is. Ennek egyik módszere a kiválasztott antigént kódoló gén bevitele a növény genomjába, azaz genetikailag módosított, transzgenikus növények létrehozása (Tiwari és mtsai., 2009).

Egy másik lehetőség az antigének mesterséges előállítására a növényvírusok segítségével történő expresszió (Koprovski és Yusibov, 2001), melyek számos ígéretes tulajdonsággal rendelkeznek: viszonylag gyorsan kifejleszthető egy új vakcina, mivel nem kell transzgenikus növényeket előállítani, a transzgén eltűnésére is kisebb esély van, továbbá a termelhető fehérje mennyisége is jóval nagyobb lehet (Warzecha és Mason, 2003).

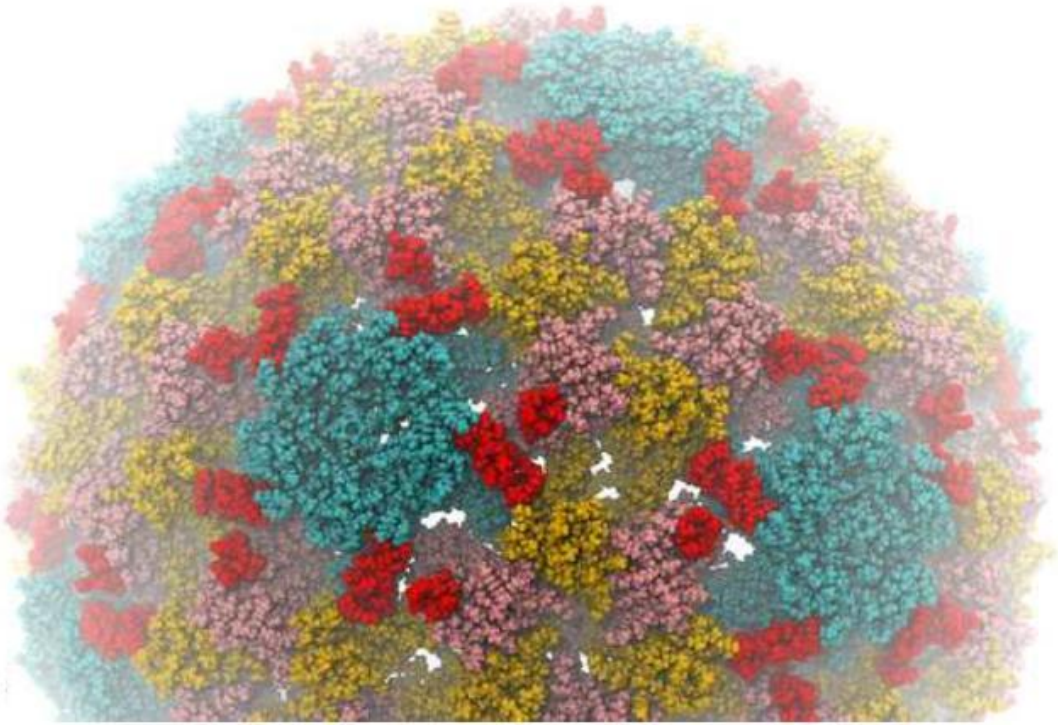
Az eljárás során olyan mesterségesen létrehozott, előre megtervezett vírussal fertőzik a növényeket, melyek genomja tartalmazza az expresszálni kívánt fehérje kódját, erről állítódik elő a vírus sokszorozódásakor a termelni kívánt fehérje a növény sejtjeiben. Ennek hátránya, hogy a vírus stabilitása és szaporodóképességének megtartása mellett korlátozott a beépíthető szekvencia hossza. (Koprowski és Yusibov, 2001). Ha mégis sikerül nagyobb génszakaszt inzertálni, az nem marad

feltétlenül a genomban, mert a replikáció során könnyedén elveszhet. A vírus életsiklusa számára nélkülözhető egyik saját burokfehérjének helyén is expresszálnak a kívánt epitóp. Így is csak korlátozott méretű epitóp expresszálnak, de tisztítás és adjuvánsok hozzáadása után alegységvakcinaként alkalmaznak. Az így termelt antigének előnye, hogy a termelés egyszerű és könnyen gazdaságossá tehető. Olcsó, nagy tömegben való előállítása szántóföldi növényekben alkalmas lehet orális immunizálásra, így lokális immunitás kialakítására is (Streatfield, 2006). Ez az alkalmazás még várat magára, hiszen a megfelelő védetség kialakításához szükséges antigén dózis szabályozása és ellenőrzése technikailag még nem teljesen megoldott.

5.4 Hogyan készült a rekombináns alegység vakcina?

A Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézete, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont és a SZIE-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak együttműködésével egy konzorciális pályázat keretében, dohánynövényen szaporítható, rekombináns uborkamozzaik vírust (recombinant cucumber mosaic virus, RCMV) sikerült létrehozni, amely a PCV2 egyik epitópját (224-233 aminosavak) kapszidjában expresszálnak (1. ábra).

A PCV2 kapszidjának modellezése számítógépes programok segítségével, grafikus módszerekkel történt. A modell alapján vizuálisan határozták meg a lehetséges immunogén epitópokat. A rekombináns gén sikeres expresszióját Northern blot technikával vizsgálták, az RCMV felszínén az epitóp jelenlétét pedig ELISA módszerrel lehetett igazolni. Mivel a növényi vírus tartalmazza a PCV2-vel szembeni protektív immunitásért felelős fehérje részletet, alkalmas lehet vakcina készítésére. A tisztított és adjuvánssal kevert vírus szuszpenzió egéroltási kísérletekben PCV2-specifikus immunválasz kiváltására alkalmasnak bizonyult (Gellért és mtsai., nem publikált eredmények). Mivel a PCV2 járványtanában az egerek is fontos szerepet játszanak, fertőződnek, és terjesztik is a vírust (Cságola és mtsai., 2008, Lőrincz és mtsai., 2010) a modell alkalmas a vakcinák előzetes tesztelésére.



1. Ábra. A rekombináns uborkamozzaik vírus modellje. A CMV A, B és C alegységei kék, rózsaszín és sárga színnel, a beillesztett PCV2 epitóp piros színnel jelölve.

6. Anyag és módszer

6.1 Sertések immunizálása

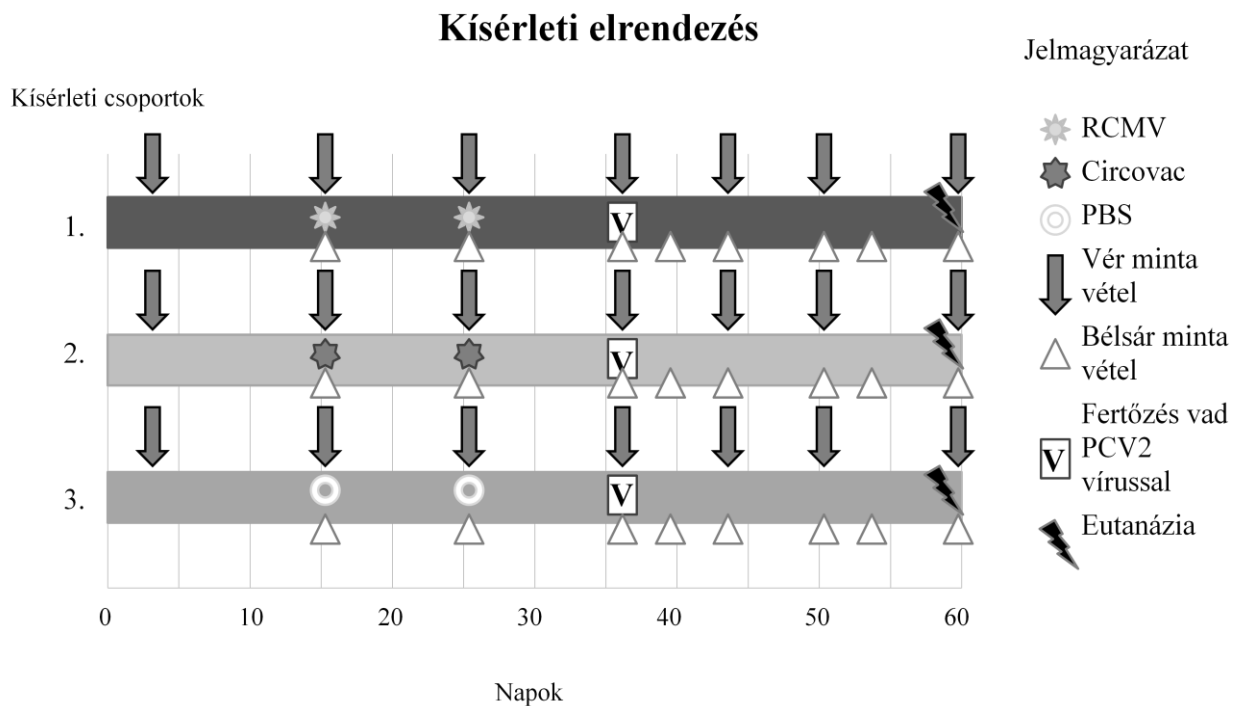
A vakcinajelölt immunogenitásának tesztelésére irányuló sertés immunizálási kísérletekbe kapcsolódtam be munkám során. Az állatkísérletet a 2010/63/EU számú direktíva és a Szent István Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelveinek betartásával végeztük.

A kísérlet keretében tizenhárom, konvencionális, két hetesen választott kismalacot használtunk. A malacok olyan sertésállományból származtak, ahol a malacokat a választás után vakcinázzák. Az állatok egyedi megjelöléséhez tartós állatjelölő festéket alkalmaztunk. A malacokat három csoportra osztottuk, és a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék kísérleti állatházában, csoportonként elkülönítve helyeztük el (2. ábra).



2. Ábra. Az egyik csoport malacai kutricájukban.

Az első csoportban 5 malacot 2 mg rekombináns CMV-vel, 1 ml inkomplett Freund adjuvánszal (Sigma-Aldrich) 2 ml-re kiegészítve izomba oltottunk. A második csoport 5 egyedét pozitív kontrollnak kereskedelmi forgalomban kapható, inaktivált vakcinával (Circovac, Merial), a használati utasítás szerint immunizáltuk. A harmadik csoport 3 malacát, mint negatív kontroll csoportot, 2 ml foszfát pufferrel (phosphate buffered saline, PBS) izomba oltottuk. Az oltásokat 10 nap múlva ismételtük. A kísérleti elrendezést a 3. ábra szemlélteti.



3. Ábra. A kísérlet időbeosztása.

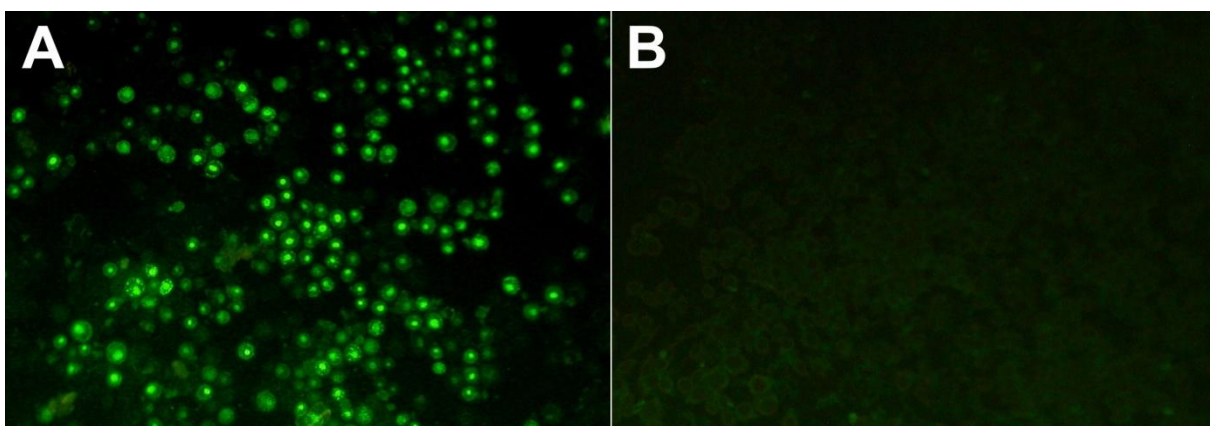
6.2 Immunfluoreszcens teszt

A két hónapos vizsgálat alatt hetente mértük a vérsavó PCV2-specifikus IgG ellenanyag titerét indirekt immunfluoreszcens (IF) módszerrel. A vért a bőr fertőtlenítése után a *vena cava cranialis*ból vettük 10 ml-es zárható, üres vérvételi csövekbe. Alvadás után az alvadékot steril tűvel elválasztottuk a cső falától, majd 5000/perc fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk. Az alvadékról így pipettával könnyen leszívható szérum már megfelelt a szerológiai tesztek elvégzéséhez.

Az indirekt IF-hez antigénként PCV2 kapszidot expresszáló rekombináns baculovírusal fertőzött *Spodoptera frugiperda* (Sf) rovar sejtenyészeteket használtunk. A sejteket 96 lyukú szövettenyésztő lemezre vittük fel, melyeket párhuzamos oszlopokban rekombináns baculovírusal, és vad baculovírusal (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus) felváltva fertőztünk. Ez

utóbbi negatív kontrollként használtuk. Mindkét vírussal olyan koncentrációban fertőztük a sejtenyészetet, hogy egy sejtre egy vírus essen. A rekombináns baculovírust a BacPAK™ 25 Expression System (Clontech) segítségével dr. Cságola Attila készítette el. 72 órás, 27 °C-os inkubáció után a sejtenyészeteket lyukanként 200 µl, etanol és aceton 1:1 arányú keverékével fixáltuk. Tíz perc fixálási idő után a folyadékot elöntve és a tenyészeteket szárítva azok készen álltak az indirekt IF teszt elvégzésére, vagy mélyhűtőben -20 °C fokon tárolva később is felhasználhatóak voltak.

A malacokból nyert szérumból mintáinként két felező hígítási sort készítettünk 1:5 hígítással kezdve. A mintákat 1% szarvasmarha szérumból albumint (bovine serum albumin, BSA) tartalmazó PBS-ben hígítottuk. A biztosabb elbírálás érdekében minden minta hígítási sorából egyet rekombináns, egyet vad baculovírral fertőzött oszlopra helyeztünk, lyukanként 100-100 µl-t. A lemezeket nedves kamrában, 37 °C-on inkubáltuk. Az egy órás inkubációs idő elteltével a lemezeket háromszor 5 percig mostuk PBS-ben, hogy a nem specifikusan kötődő ellenanyagokat eltávolítsuk, majd hozzáadtuk a sertés IgG-re specifikus fluoreszcein-izotiocianáttal (*fluorescein isothiocyanate*, FITC) jelölt konjugátumot (Sigma-Aldrich). A konjugátumból lyukanként 0,25 µl-t használtunk 100 µl BSA-s PBS-ben feloldva. Újabb egy órás, 37°C-os inkubációs idő elteltével a készítményt háromszor 5 percig mostuk, majd fluoreszcens mikroszkóppal UV fényben bíráltuk az eredményeket. Azokon a lyukakon, ahol fluoreszcenciát láttunk a sejtek mintázatát kirajzolva, ott pozitívként bíráltuk a reakciót (4. ábra), és titer értéknek azt a legnagyobb hígítást állapítottuk meg, ahol még pozitív reakció volt látható.



4. Ábra. Pozitívként (A) és negatívként (B) bírált hígítás fényképe. A zölden fluoreszkáló, FITC-tal jelölt konjugátum a PCV2 antigénhez specifikusan kapcsolódott ellenanyagokat rajzolja ki.

6.3 Kísérleti fertőzés vad vírussal

A vakcinázás hatékonyságát ráfertőzéses kísérlettel ellenőriztük. Ennek során az R15-ös számú, élő PCV2 törzzsel fertőztük valamennyi kísérleti állatot. A második immunizálás után 10 nappal egyszerre fertőztük őket 2×10^3 TCID₅₀ dózisban hasüregbe oltva és 5×10^3 TCID₅₀ dózisban szájon át, takarmányba keverve, azt egyedileg, minden malaccal maradéktalanul megetetve. A challenge fertőzés után a vírusürítés polimeráz láncreakcióval történő méréséhez hetente többször vettünk bélsár mintákat a kísérlet alatt.

A kísérlet 60. napján általános anaesthesiában, euthanasiával extermináltuk az állatokat. A hullákat a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának bonctermébe szállítottuk, ahol a szívből, tüdőből, lépből, mesenterialis, mediastinalis és inguinalis nyirokcsomókból, mandulákból, májból és veséből szervmintákat vettünk. Az így nyert mintákat -20°C-ra fagyasztva tároltuk a feldolgozásig: kvantitatív polimeráz láncreakció segítségével határoztuk meg a vírusszaporodás mértékét az egyes szervekben.

6.4 PCV2 DNS kimutatása a szerv- és bélsármintákból

A mintákból körülbelül fél köbcentiméter nagyságú darabot 1 ml desztillált vízben TissueLyser II (Quiagen) segítségével homogenizáltunk, majd a vírus DNS-t az InnuPREP Virus DNA/RNA Kit (Analytik Jena AG) segítségével kivontuk a használati utasításban található protokoll alapján. Az így előkészített mintákból kvantitatív polimeráz láncreakció (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) segítségével határoztuk meg a PCV2 DNS koncentrációját.

A primereket (KCV-F: 5'-AAGTAGCGGGAGTGGTAGGA-3' és KCV-R: 5'-GGGCTCCAGTGCTGTTATTC-3') valamint a TaqMan probe-ot (KCV-P: 5'-FAM-TCCCGCCATACCATAACCCAGC-3'BHQ1) specifikusan a PCV2-R15 törzs kapszid génjének szekvenciájára terveztük on-line szoftverrel (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>). A vírus nukleinsavak kópiaszámának megállapításához standardként a PCV2 kapszid génjét tartalmazó, ismert anyagmennyiségű pET6xHN (Clontech) plazmidből készített hígítási sort használtunk. A reakciókat összesen 50 µl teljes mennyiséggel végeztük mintánként. Ez 36,3 µl kétszer desztillált vizet, 5 µl DreamTaq puffert (Fermentas), 1 µl (0,5 mM) MgCl₂-t (Fermentas), 1 µl (0,2mM) dNTP keveréket (Fermentas) tartalmazott, 0,5 µl-t mindkét primerből és a probe-ból, 0,2 µl-t (1 egységet) Taq polimerázból (DreamTaq, Fermentas), és 5 µl kivont DNS mintát.

A reakciókat a *Mastercycler Realplex Thermocycler* (Eppendorf) gépben végeztük, a következő programmal: előmelegítés 94 °C-on 2 percig, majd 30 cikluson át 94 °C 30 másodpercig, 60 °C 30 másodpercig, majd 72 °C, 45 másodpercig, végül a ciklusok után hűtés 25 °C-ra. Az egyes

minták kópiaszámát a hígítási sor alapján a számítógép határozta meg a PCR géphez tartozó programmal (Realplex, Eppendorf).

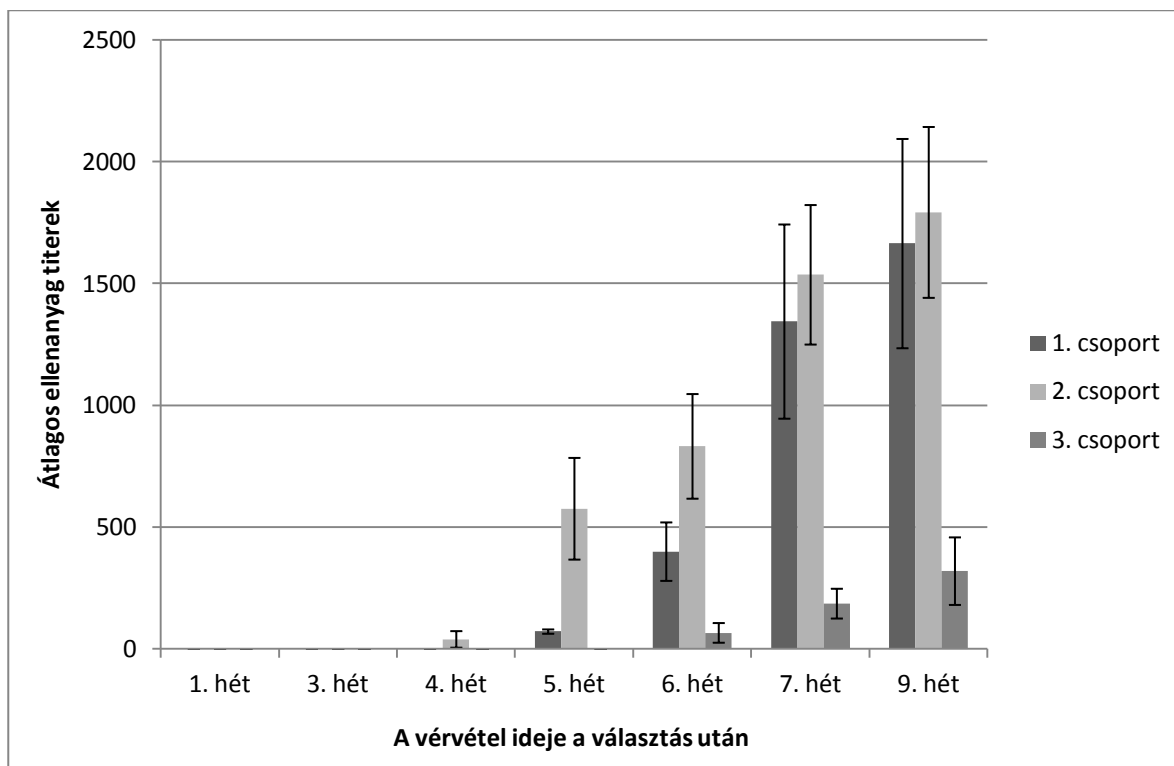
7. Eredmények

Az eredmények alapján az új vakcinajelölt által kiváltott immunválasz hatékonyságára következtethetünk. Az állatok a kísérlet egésze alatt egészségesek maradtak, betegség tünetei vagy szervi elváltozások nem voltak megfigyelhetők sem a klinikai, sem a makroszkópos kórbonctani vizsgálatok során.

A PCV2-specifikus ellenanyagok az inaktivált vakcinával oltott csoportban alacsony titerben már az első immunizálásnál megjelentek, a RCMV-vel oltott csoportban csak a második immunizálás után voltak jelen kimutatható mennyiségben. A harmadik csoport állatainak vérében PCV2-specifikus ellenanyag csak a ráfertőzést követően termelődött (1. táblázat és 5. ábra).

1. Táblázat. Az egyes állatokban mért ellenanyag titer értékek.

Az állat sorszáma	3. nap	15. nap	25. nap	36. nap	44. nap	50. nap	60. nap
1. csoport							
1	0	0	0	40	320	1280	1280
2	0	0	0	80	640	320	640
3	0	0	0	80	80	1280	1280
4	0	0	0	80	640	2560	2560
5	0	0	0	80	320	1280	2560
2. csoport							
6	0	0	160	320	640	1280	2560
7	0	0	0	640	320	1280	1280
8	0	0	0	1280	1280	2560	2560
9	0	0	20	320	640	1280	1280
10	0	0	20	320	1280	1280	1280
3. csoport							
11	0	0	0	0	20	160	160
12	0	0	0	0	160	320	640
13	0	0	0	0	20	80	160



5. Ábra. Az egyes csoportok indirekt IF módszerrel mérhető PCV2-specifikus IgG titer átlagai.

A pozitív kontroll csoportban PCV2 DNS a vizsgált szervekben nem volt kimutatható. Az RCMV-vel vakcinázott állatok közül két állat összesen három szervében volt detektálható vírusszaporodás, szemben a negatív kontroll csoporttal, ahol minden állatban, összesen 15 szervben mutattunk ki PCV2 szaporodást (2. táblázat és 2. melléklet). A qPCR-rel vizsgált bélsár minták egyikében sem találtunk a módszerrel kimutatható mennyiségű PCV2 DNS-t.

2. Táblázat. Pozitív minták az egyes csoportokban.

	szív	tüdő	mandula	mediastinális nyirokcsomó	inguinalis és mesenterialis nyirokcsomó	máj	lép	vese
1. csoport	0/5	1/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2. csoport	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3. csoport	2/3	2/3	1/3	3/3	1/3	2/3	3/3	1/3

8. Megbeszélés

A szerológiai vizsgálat alapján elmondható, hogy a malacok kettő és négy hetes korában vett vérében nem volt kimutatható mennyiségű, PCV2-specifikus ellenanyag, így maternális eredetű passzív immunitás jelenléte nem zavarta a kísérletet.

Az inaktivált vakcinával oltott csoportban már az első immunizálás után, az RCMV-vel immunizált csoportban csak a második oltás után jelentek meg a PCV2-specifikus ellenanyagok, ám a ráfertőzés időpontjában ugyan alacsony titerben, de már jelen voltak. A 2. csoportba tartozó malacokénál későbbi ellenanyag titer emelkedés lehet annak az eredménye, hogy az antigén dózisa még nincs megfelelően beállítva, de okozhatja az inaktivált vakcináénál gyengébb immunogenitást az is, hogy míg a vakcinán valamennyi epitóp megtalálható, a RCMV felszínén csak egy PCV2 epitóp van jelen.

A harmadik csoport állatainak vérében PCV2-specifikus ellenanyag csak a ráfertőzést követően termelődött, a vírussal való első találkozás következményeképpen.

A pozitív kontroll csoportban vírusszaporodás a vizsgált szervekben nem volt kimutatható, az inaktivált vakcina a kísérlet körülményei között képes volt a vírus multiplikációt meggátolni az állatokban. Az RCMV-vel vakcinázott állatok közül két állat összesen három szervében volt tetten érhető vírusszaporodás, szemben a vakcinázatlan csoporttal, ahol minden állatban, összesen 15 szervben detektáltunk PCV2 szaporodást. Az uborkamozaik vírusban expresszált egyetlen epitóp tehát elég volt részleges védelem biztosítására.

A qPCR módszerrel mért kópiaszámokat az egyes szervekben (2. melléklet) azért nem vetettük alá statisztikai analízisnek, mert ahhoz a mintaszám nem volt elegendő. A kísérlet során arra voltunk kíváncsiak, hogy az előállított egy epitóp képes-e házi sertésekben protektív immunitást kiváltani, nagyobb egyedszámú kísérletbe akkor érdemes kezdeni, ha már elég információval rendelkezünk például a megfelelő adjuvánssal, az adagolással, a gyógyszerformával kapcsolatban.

A vakcinajelölt hatása a PCVAD-k kórfejlődésére nem volt megítélhető ebben a kísérletben, mert mesterséges, laboratóriumi körülmények között a betegséget nehéz előidézni egyedül PCV2-vel történő fertőzéssel (Segalés, 2012). A PCV2-vel kapcsolatos kórfolyamatokat ugyanis más kórokozókval történő társfertőzések, vagy vakcinázások immunrendszert aktiváló hatása indítja be (Gilpin és mtsai., 2003).

A malacokból gyűjtött bélsármintákból az egész kísérlet alatt nem tudtunk PCV2 DNS-t kimutatni a qPCR módszerrel, annak ellenére, hogy legalább két csoport egyedeiben a vírus

bizonyítottan szaporodott. Ezt magyarázhatja az, hogy az állatokat nem érte radikális immunmoduláló hatás a kísérlet körülményei között, így nem volt lehetőség a vírus olyan fokú multiplikációjára, hogy nagy mennyiségben ürüljön a bélsárral, de előfordulhat az is, hogy a fertőzés során használt élő vírus mennyisége, bár a PCV2 ráfertőzőési kísérleteknél ez az általánosan elterjedt dózis, mégsem volt megfelelően magas, ahhoz, hogy ilyen rövid idő alatt a bélsárban mérhető mennyiségű titerben jelenjen meg.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a CMV alapú expressziós rendszer alkalmas állatok immunizálásához szükséges antigének előállítására, azonban a helyes vakcina formula kialakításához további vizsgálatokra van szükség. A gyakorlati hasznosíthatósághoz további epitópok expresszióját kell megoldani az erősebb immunogenitás elérése érdekében. Azt is vizsgálni kell még, hogy a rekombináns vírus tisztított formában, vagy az azzal fertőzött növényvel együtt szájon át etetve képes-e lokális, PCV2-specifikus immunitást kiváltani az állatok nyálkahártyáin. Az erre irányuló egér és sertés kísérletek jelenleg is folynak.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, hogy részt vehettem a munkájukban, megtanulhattam vezetésük alatt a laboratóriumi munka fortélyait, és a segítséget, amit munkám és dolgozatom elkészítése közben kaptam tőlük.

A kutatás az Országos tudományos kutatási alapprogramok OTKA-NKTH 78317, 78675, 78608 számú konzorciális pályázata, valamint a TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-011 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen” c. pályázat támogatásával valósult meg.

10. Irodalomjegyzék

- ALLAN G.M., PHENIX K.V., TODD D., McNULTY M.S.: Some biological and physico-chemical properties of Porcine Circovirus. *J Vet Med B* 1994. 41 (1), p.: 17-26.
- BEACH N.M., MENG X.J.: Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research* 2011. 164 p.:33-42
- CANDOTTI P., PINONI C., LAVAZZA A., CANTONI A.M., Di LECCE R., FERRARI M.: Necrotizing tracheitis: is it a new PCVII pathological form? *Proc. ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates*, Saint-Malo 2001. ZOPOLE developpement (ISPAIA), France, p.: 90.
- CARMAN S., MCEWEN B., DELAY J., VAN DREUMEL T., LUSIS P., CAI H., FAIRLES J.: Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can Vet J* 2006. 47 (8), p.: 761-762.
- CHEUNG A.K., LAGER K.M., KOHUTYUK O.I., VINCENT A.L., HENRY S.C., BAKER R.B., ROWLAND R.R., DUNHAM A.G.: Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol.* 2007. 152 (5), p.: 1035-1044.
- CHOI C., STEVENSON G.W., KIUPEL M., HARRACH B., ANOTHAYANONTHA L., KANITZ C.L., MITTAL S.K.: Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 2002. 66 (4), p.: 217-224.
- CROWTHER R.A., BERRIMAN J.A., CURRAN W.L., ALLAN G.M., TODD D.: Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol* 2003. 77 (24), p.: 13036-13041.
- CSÁGOLA A., KECSKÉMETI S., KARDOS G., KISS I., TUBOLY T.: Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol* 2006. 15 (1), p.: 495-507.
- CSÁGOLA A., CADAR D., TUBOLY T.: Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. *Acta Vet Hung* 2008. 56 (3), p.: 421-427.
- DARWICH L., SEGALÉS J., MATEU E.: Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch Virol* 2004. 149 (5), p.: 857-874.
- DE BOISSESON C., BEVEN V., BIGARRE L., THIERY R., RORE N., EVENO E., MADEC F., JESTIN A.: Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol* 2004. 85 (2), p.: 293-

DONE S., GRESHAM A., POTTER R., CHENNELLS D.: PMWS and PDNS - two recently recognised diseases of pigs in the UK. *Practice* 2001. 23, p.: 14-21.

DUPONT K., NIELSEN E.O., BAEKBO P., LARSEN L.E.: Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 2008. 128 (1-2), p.: 56-64.

DURAN C.O., RAMOS-VARA J.A., RENDER J.A.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *Swine Health and Production* 1997. 5, p. 241–245.

ELLIS J., HASSARD L., CLARK E., HARDING J., ALLAN G., WILLSON P., STROKAPPE J., MARTIN K., McNEILLY F., MEEHAN B., TODD D., HAINES D.: Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 1998. 39 (1), p.: 44-51.

GAGNON C.A., TREMBLAY D., TIJSSEN P., VENNE M.H., HOUDE A., ELAHI S.M.: The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* 2007. 48 (8), p.: 811-819.

GILPIN D.F., MCCULLOUGH K., MEEHAN B.M., MCNEILLY F., MCNAIR I. et al.: In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immun Immunopathol* 2003. 94, p.: 149-161.

HALBUR, P.G.: Porcine respiratory disease. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress 15*, 1998. p.: 1-10.

HARDING, J. C. S., CLARK E.G.: Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod* 1996. (5), p.: 201-203.

HARDING, J.C.S., CLARK E.G., STROKAPPE J.H., WILLSON P.I., ELLIS J.A.: Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod* 1998. 6 p.: 249-254.

HARDING J.C.S., ELLIS J.A., MCINTOSH K.A., KRAKOWKA S.: Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs *Vet Microbiol* 2010. 145 (3–4), p.: 209–219.

HARMS P.A.: Post-weaning multisystemic wasting syndrome-case investigations. *Proc Seventh Annual Swine Disease Conference of Swine Practitioners*, Ames 1999. Iowa State University, Iowa, p.: 43-47.

- HESSE R., KERRIGAN M., ROWLAND R.R.: Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res* 2008. 132 (1-2), p.: 201-207.
- KIM J., CHAE C.: Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *The Veterinary Journal* 2004. 167(1), p.: 104-106.
- KIM J., CHUNG H.K., CHAE C.: Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 2003. 166 (3), p.: 251-256.
- KISS I., KECSKEMÉTI S., TUBOLY T., BAJMÓCY E., TANYI J.: New pig disease in Hungary: postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Vet Hung* 2000. (48), p.: 469-475.
- KOPROWSKI H., YUSIBOV V.: The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 2001. (19) p.: 2735–2741.
- KRISTENSEN C.S., BAADSGAARD N.P., TOFT N.: A meta-analysis comparing the effect of PCV2vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. 2011. *Prev Vet Med* 98 p.: 250-258.
- LŐRINCZ M., CSÁGOLA A., BIKSI I., SZEREDI L., DÁN A., TUBOLY T.: Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Vet Hung* 2010. 58 (2), p.: 265-268.
- MALDONADO J., SEGALES J., MARTÍN-RZ-PUIG D., CALASMIGLIA M., RIERA P., DOMINGO M., ARTIGAS C.: Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal* 2005. 169 (3), p.: 454-456.
- MANKERTZ A., PERSSON F., MANKERTZ J., BLAESS G., BULK H.J.: Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 1997. 71 (3), p.: 2562-2566.
- MEEHAN B.M., CREELAN J.L., McNULTY M.S., TODD D.: Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 1997. 78 (1), p.: 221-227.
- O'CONNOR B., GAUVREAU H., WEST K., BOGDAN J., AYROUD M., CLARK, E.G., KONOBY C., ALLAN G., ELLIS J.A.: Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J* 2001. 42 (7), p.: 551-553.
- PESCH S., SCHMIDT U., OHLINGER V.F.: Proliferative necrotizing pneumonia: a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Pig Progress* 2000. p.: 28-29.

- RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., SEGALES J., ROSELL C., ROVIRA A., PUJOLS J., PLANA-DURAN J., DOMINGO M.: Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med. B Infect Dis Vet Public Health* 2003. 50 (2), p.: 99-101.
- ROSELL C., SEGALES J., RAMOS-VARTA J.A., FOLCH JM., RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., DURAN O., BALASCH M., PLANA-DURAN J., DOMINGO M.: Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 2000a. 146 (2), p.: 40-43.
- ROSELL C., SEGALES J., ROVIRA A., DOMINGO M.: Porcine circovirosis in Spain. *Vet Rec* 2000b. 146 (20), p.: 591-592.
- ROYER R.L., NAWAGITGUL P., HALBUR P.G., PAUL P.S.: Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Swine Health Prod.* 2001. 9, p.: 281-284.
- SAHA D., LEFEBVRE D. J., DUCATELLE R., DOORSSELAERE J. V., NAUWYNCK H.J.: Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine fetuses. *BMC Vet. Res* 2011. 7 (1), p.: 64
- SANCHEZ Jr. R.E., NAUWYNCK H.J., PENSAERT M.B.: Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig population in Belgium. *Proceedings of the ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates. European Society of Veterinary Virology* 2001. p.: 122.
- SEGALÉS J., PIELLA J., MARCO E., MATEU-DE-ANTONIO E.M., ESPUMA E., DOMINGO M.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec* 1998. 142 (18), p.: 483-486
- SEGALÉS J., DOMINGO M.: Postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. A review. *Vet Q* 2002. 24 (3), p.: 109-124.
- SEGALÉS J.: PCVD Diagnosis. Porcine Circovirus Disease (PCVD): Towards improved food quality and safety within EU New Member States and Associated Candidate Countries, Brno, *NMSACC - PCVD WORKSHOP* 22-24 MARC, 2006.
- SEGALÉS, J.: Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 2012. 164: p.:10-19.
- SIERRA M.A., MULAD J.M., MOLENBEEK R.F., MAAREN VAN C., VOS J.H., QUEZADA M., GRUYS E.: Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Eur J Vet Pathol* 1997. 3, p.: 63-70.
- STEVENSON G.W., KIUPEL M., MITTAL S.K., CHOI J., LATIMER K.S., KANITZ C.L.: Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 2001. 13 (1), p.: 57-62.

- STREATFIELD, S.J.: Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* 2006. 38. p.: 150-157.
- THACKER E.L.: Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem? *The Pig Journal* 2001. 48, p.: 66-70.
- TISCHER I., RASCH R., TOCHTERMANN G.: Characterization of papovavirus- and picornavirus- like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zbl Bakteriol A* 1974. 226, p.: 153-167.
- TISCHER I., MIELDS W., WOLFF D., VAGT M., GRIEM W.: Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 1986. 91 (3-4), p.: 271-276.
- TIWARI S., VERMA P.C., SINGH P.K., TULI R.: Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv.* 2009. 27 (4), p.: 449-467.
- WARZECHA H., MASON H.S., Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J Plant Physiol* 2003. 160 p.: 755-764.
- WATTRANG E., McNEILLY F., ALLAN G.M., GREKO C., FOSSUM C., WALLGREN P.: Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. *Vet Microbiol* 2002. 86 (4), p.: 281-293.
- WEST K.H., BYSTROM J.M., WOJNAROWICZ C., SHANTZ N., JACOBSON M., ALLAN G.M., HAINES D.M., CLARK E.G., KEAKOWKA S., McNEILLY F., KONOBY C., MARTIN K., ELLIS J.A.: Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 1999. 11 (6), p.: 530-532.

11. Mellékletek

1. Melléklet. Jelenleg forgalomban lévő vakcinák és azok főbb jellemzői. (Beach, 2011 nyomán.)

Vakcina	Gyártó	Antigén típusa	Használat
Circovac®	Merial	Inaktivált PCV2A vírus	tenyészkocák és malacok >3 hó
Ingelvac CircoFLEX®	Boehringer Ingelheim	rekombináns PCV2A kapszid fehérje	malacok >3 hó
Circumvent®	Intervet (Merck)	rekombináns PCV2A kapszid fehérje	malacok >3 hó
Porcilis® PCV	Schering-Plough (Merck)	rekombináns PCV2A kapszid fehérje	malacok >3 hó
Fosteratm PCV (régén: Suvaxyn® PCV2 One DoseTM)	Pfizer	inaktivált PCV1 és PCV2A kiméra vírus	malacok >3 hó

2. Melléklet. A PCV2 DNS kópiaszáma az egyes szervekben.

Az állat sorszáma	Vírus mennyisége (kópiaszám/5µl) az egyes szervekben							
	szív	tüdő	mandula	mediastinális nyirokcsomó	inguinalis és mesenterialis nyirokcsomó	máj	lép	vese
1. csoport								
1.	-	1578	-	29620	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	7234	-	-	-	-
4.	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	-	-	-	-	-	-	-	-
2. csoport								
6.	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	-	-	-	-	-	-	-	-
3. csoport								
11.	3288	12422	-	85778	-	2584	6483	-
12.	-	-	-	7064	-	-	2194	2342
13.	1742	1368	4014	6099	2613	763	2919	-