

Varicella zoster és influenzavírus vakcinák alkalmazásának néhány fontos szempontja

Doktori értekezés

Dr. Sarkadi Júlia

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Gönczöl Éva, DSc, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Minárovits János, DSc, egyetemi tanár

Dr. Varga Marina, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Anderlik Piroska, PhD, professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Rozgonyi Ferenc, DSc, professzor emeritus

Dr. Rusvai Miklós, DSc, egyetemi tanár

Budapest
2017

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés, irodalmi háttér.....	7
2.1. Vakcináció hatékonyságának növelési lehetőségei	8
2.1.1. A védőoltások hatását befolyásoló tényezők.....	8
2.2. Varicella	12
2.2.1. Varicella zoster vírus (VZV).....	12
2.2.2. VZV-okozta betegségek	15
2.2.3. A <i>varicella</i> és <i>herpes zoster</i> betegségek immunológiai háttere	17
2.2.4. Vakcinák.....	18
2.3. Influenza.....	20
2.3.1. Influenzavírus.....	20
2.3.2. Influenzavírus okozta betegségek	21
2.3.3. Influenzavírus okozta betegségek immunológiai háttere	22
2.3.4. Influenza vakcinák	23
3. Célkitűzések	26
4. Módszerek	27
4.1. VZV-vakcináció immunológiai hatása intradermális alkalmazás esetén.....	27
4.1.1. Kísérleti állatok	27
4.1.2. Vakcinák és alkalmazási módjaik	27
4.1.3. Az intradermális oltáshoz használt készülék megfelelő működésének ellenőrzése	28
4.1.3.1. DNS-izolálás	28
4.1.3.2. VZV-DNS detektálása qPCR-módszerrel.....	28
4.1.4. Immunválasz mérése különböző VZV-vakcinák alkalmazását követően.....	29
4.1.4.1. VZV-antigén előállítás és lépsejtek stimulálása.....	30
4.1.4.2. RNS-izolálás és reverz-transzkripció	30
4.1.4.3. IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel	31
4.1.4.4. IFN- γ -fehérje koncentráció mérése stimulált lépsejtek felülúszójában ELISA-módszerrel, korreláció az IFN- γ -mRNS-kifejeződés és az IFN- γ -fehérje szint között...32	

4.1.4.5.	VZV-specifikus ellenanyagok mérése az immunizált állatok savójában, VZV-glikoprotein-specifikus ELISA- és vírusneutralizációs-módszerrel.....	32
4.1.5.	Statisztikai elemzések.....	33
4.2.	Influenza vakcináció védő hatása hemagglutinin és neuraminidáz szempontjából heterológ vírustörzsszel végzett fertőzéssel szemben; celluláris és humorális immunválaszok	34
4.2.1.	Kísérleti állatok	34
4.2.2.	Alkalmazott vakcinák és vírusok	34
4.2.3.	Immunizáció.....	35
4.2.3.1.	Aktív immunizáció és challenge fertőzés.....	35
4.2.3.2.	Passzív immunizáció és challenge fertőzés.....	36
4.2.4.	Hemagglutináció gátlás, Neuraminidáz gátlás, Vírusneutralizáció.....	37
4.2.5.	Vírusmennyiség meghatározása fertőzött egerek tüdejében	37
4.2.6.	Áramlási citometria	38
4.2.7.	IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel	38
4.2.8.	Statisztikai elemzések.....	39
5.	Eredmények	40
5.1.	VZV-vakcináció immunológiai hatása intradermális alkalmazás esetén.....	40
5.1.1.	VZV-DNS tartalom változása tengerimalac bőrbioopszia mintákban, az intradermális oltást követően.....	40
5.1.2.	IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés változása tengerimalac lépsejtekben 399-PFU-dózisú élő vagy hővel inaktivált VZV-vírustartalmú oltóanyaggal történt vakcinációt követően és az ismételt oltás hatása 399-PFU-dózisú inaktivált VZV-vakcina esetében.....	42
5.1.3.	IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés változása <i>in vitro</i> tengerimalac lépsejtekben 1995-PFU-dózisú élő- vagy inaktivált- VZV-vírustartalmú vakcinával intradermális vagy szubkután módon történt oltást követően	43
5.1.4.	IFN- γ -fehérje koncentráció mérése <i>in vitro</i> stimulált tengerimalac lépsejtekben, 1995-PFU-dózisú élő vagy hővel inaktivált VZV-vakcinával intradermális vagy szubkután módon történt oltást követően, korreláció az IFN- γ -mRNS-kifejeződés és IFN- γ -fehérje szint között.....	46

5.1.5.	VZV-glikoprotein-specifikus és vírus-neutralizáló ellenanyag szint változása, élő vagy hővel inaktivált VZV-vakcinával i.d.- vagy s.c.-módon történt immunizálást követően.....	47
5.2.	Influenza vakcináció védőhatása a hemagglutinin és neuraminidáz szempontjából heterológ vírustörzssel szemben.....	50
5.2.1.	TIV+AI- (Fluval AB) vakcina védőhatása NMRI egerekben, egérhez adaptált PR8-vírus letális dóziséval történt fertőzéssel szemben.....	50
5.2.2.	TIV+AI-vakcinával oltott egerek savójának védőhatása egér adaptált PR8-vírus letális dóziséval szemben	52
5.2.3.	A HAG-, NAG- és VN-aktivitástól független savó komponensek védő hatása	55
5.2.4.	IFN- γ - és granzim-B-termelődés mérése áramlási citometriás módszerrel, TIV+AI- (Fluval AB), valamint kontrollként TIV+AI+F- vagy PBS-tartalmú vakcinával immunizált NMRI egerek <i>in vitro</i> stimulált lépsejtjeiben	58
5.2.5.	IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel, TIV+AI- (Fluval AB), valamint kontrollként TIV+AI+F- vagy PBS-tartalmú vakcinával immunizált Balb/c egerek <i>in vitro</i> stimulált lépsejtjeiben	61
6.	Megbeszélés	62
7.	Következtetések	74
8.	Összefoglalás	75
9.	Summary	76
10.	Irodalomjegyzék	77
11.	Saját közlemények bibliográfiai adatai	98
12.	Köszönetnyilvánítás.....	100

1. Rövidítések jegyzéke

ADCC	ellenanyag-függő sejtközvetített citotoxicitás
Al	alumínium-foszfát
APC	antigén-bemutató sejt
Balb/c	beltenyésztett egér törzs
BPL	béta-propiolakton
CTL	citotoxikus T-limfocita
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
GM	geometriai átlag
HA	hemagglutinin
HAG	hemagglutinin gátló
i.d.	intradermális
IE	nagyon korai
IFN- γ	interferon-gamma
i.m.	intramuszkuláris
i.p.	intraperitoneális
LD50	letális dózis 50 (kísérleti állatok felét elpusztító dózis)
M	mátrix
MHC	fő hisztokompatibilitási génkomplex
MPR	mannóz-6-foszfát receptor
MRC-5	humán fibroblaszt sejtek
NA	neuraminidáz
NAG	neuraminidáz gátló
NMRI	nem beltenyésztett egér törzs
NP	nukleoprotein
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	foszfát pufferes fiziológiás sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PFU	plakk-képző egység
PPIA	peptidilprolil izomeráz A
PR8	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) influenzavírus törzs

qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
qRT-PCR	kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
RNázP	ribonukleáz P
s.c.	szubkután
TIV	trivalens inaktivált vakcina
TIV+AI	alumínium-foszfáttal adjuvált trivalens inaktivált influenza vakcina
TIV+AI+F	alumínium-foszfáttal és komplet Freund adjuvánsal adjuvált trivalens inaktivált influenza vakcina
TLR	toll-szerű receptor
VZV	varicella zoster vírus
VN	vírusneutralizáló
WHO	Egészségügyi Világszervezet

2. Bevezetés, irodalmi háttér

A fertőző betegségek terjedését a higiénés körülmények javításával, az egyének ellenállóképességének növelésével csökkenteni lehet, de a terjedés megakadályozásához kisszámú fertőzött egyén esetén teljes karatén bevezetésére, nagyobb számú fertőzött egyén esetén aktív immunizálásra van szükség.

Az aktív immunizálás immunprofilaxist jelent, melynek az a célja, hogy a vakcinációban részesülő személy védett legyen a fertőző ágenssel szemben akkor is, ha a vakcináció hosszú idővel a fertőző ágenssel való találkozás előtt történik. Tehát immunológiai memória kialakulása szükséges az immunvédelemhez. Bizonyos vakcinák hosszú, esetleg életre szóló (kanyaró), míg más vakcinák rövid (acelluláris pertussis) ideig tartó immunitást hoznak létre. Az immunválasz az antigén bemutatáson és a limfociták differenciálódásán alapszik.

Az ideális vakcinákkal szembeni elvárások közé tartozik:

- a vakcinációra adott immunválasz védelmet biztosítson a betegséggel szemben;
- a vakcina ne okozzon káros reakciókat;
- a védelem hosszú ideig tartson;
- a vakcinát alkotó antigének ismertek legyenek;
- az antigént egyszerűen és fájdalommentesen lehessen alkalmazni;
- olcsón előállítható legyen.

A jelenleg forgalomban lévő vakcinák biztonságosak és hatásosak, azonban sem a biztonságosságuk sem a hatásosságuk nem tökéletes. Az élő vírust tartalmazó vakcinák például a vakcinát alkotó vírus replikációjának rizikóját rejtik magukba, amely különösen veszélyes lehet immunológiailag károsodott egyéneknél (Kurstak E 1994).

Vizsgálataink céljából az élő attenuált vírust tartalmazó varicella-zoster vírus vakcinát (VZV vakcina, Varilrix, GlaxoSmithKline PLC, UK) és a szezonális, trivalens, inaktivált, teljes virionokat tartalmazó, alumínium foszfáttal adjuvált influenza vakcinát (Fluval AB) választottuk. Mindkét vakcina kereskedelmi forgalomban van Magyarországon, de nem tartozik a kötelező védőoltások közé, csak bizonyos populációk immunizálására javasolják őket. Az influenza vakcinát magyar cég (Omninvest Kft., jelenlegi neve Fluart Innovative Vaccines Kft.) állítja elő, a vakcinát

1995 óta használják Magyarországon és eddig több mint 20 millió dózis került alkalmazásra. Mind a VZV-, mind az influenza-vakcinák hatásosságának növelése a vakcinológiai kutatások középpontjába tartozik világszerte.

2.1. Vakcináció hatékonyságának növelési lehetőségei

Fehérje, vagy fehérjével konjugált antigének esetében az immunválasz akkor biztosít védelmet a betegséggel szemben, ha:

- a T- és a B-sejtek stimulálása memóriasejtek keletkezését eredményezi, tehát az antigén jelen van a limfoid szövetek csíráközpontjainak folliculáris dendritikus sejtjeiben, ahol a nagy affinitású B-sejt receptorral (BCR) rendelkező B-limfociták pozitív szelekciója végbemegy és kialakulnak a memória B-sejtek;
- aktiválja az antigén-bemutató sejtet (APC), így azok citokineket termelnek és bemutatják az antigént a T-sejteknek;
- a T-sejtek számos epitópra lesznek specifikusak, hogy leküzdjék a patogén antigénvariációit, és kivédjék a gazdaszervezet immunválaszának az MHC-polimorfizmusból adódó variabilitását (Erdei A. 2012, Plotkin SA 2015).

Szénhidrát antigének esetében T- és B-memóriasejtek nem alakulnak ki jelentős számban és a poliszacharid részei nem prezentálódnak klasszikus MHC-n a T-sejtek számára, azonban B-sejtek aktiválódnak és hosszú életű plazmasejteké alakulhatnak, amelyek ellenanyag termelésükkel akár több évig tartó védelmet is biztosíthatnak a kórokozókkal szemben (Mitchell R 2014).

2.1.1. A védőoltások hatását befolyásoló tényezők

Ezeket a tényezőket csak felsorolás szerűen említem, kivéve a vakcinációs utakat és a vakcina antigenitását, amely tényezőkhöz a mi munkánk is kapcsolódott.

- A szervezet immunválaszkészségének állapota
- Az immunizált személy életkora
- A beadott antigénre specifikus antitest jelenléte a szervezetben
- Az antigén specifitása, dózisa és hatástartama
- Az immunizálás időtényezői

– Vakcinációs utak

A vakcinációs utak szerint megkülönböztethetünk parenterális és nyálkahártya vakcinákat. A nyálkahártya vakcinák közé az orális és nazális vakcinák tartoznak. A parenterális vakcinák az intramuszkuláris (i.m.), szubkután (s.c.) és az intradermális (i.d.) módon alkalmazott vakcinák (Herzog C. 2014). A nyálkahártyákon át bejutott antigének a nyálkahártyához kapcsolódó limfoid rendszerben (gyomor-bél rendszer, légutak) kerülnek felismerésre. A nyálkahártyákon át adott vakcinák (pl. orális élő gyengített poliomyelitis vírust tartalmazó vakcina), elsősorban a szekretoros IgA ellenanyagok révén, már a behatolási kapuban gátolják a kórokozók szervezetbe jutását, míg a parenterálisan adott vakcinák után kialakuló immunválasz védelmet nyújt a szervezetbe behatoló kórokozóval szemben, de nem védi ki a behatolást. Parenterális vakcinációt követően a környéki nyirokcsomókban történik meg a T- és B-sejtek aktiválása. A parenterális vakcinációs utak közül leggyakrabban a s.c.- és i.m.-módot alkalmazzák. Azonban számos vizsgálatban az i.d. alkalmazási mód hatékonyabbnak bizonyult, illetve alacsonyabb antigén dózis mellett is azonos erősségű immunválaszt váltott ki, mint az i.m.- vagy s.c.-oltás (Belyakov IM 2009, Hickling JK 2011, Briggs DJ 2000, Levin Y 2015, Beals CR 2016). Ebben szerepe lehet annak, hogy a bőrben, - a bőr alatti zsír, vagy izomszövetből eltérően -, vannak csak állandó jelleggel (rezidensen) előforduló olyan dendritikus sejt típusok, mint a Langerhans sejtek (langerin/CD207⁺) vagy a bőr dendritikus sejtek, mint a CD14⁺- és CD1a⁺- (ezen belül a CD1c⁺ és CD141⁺ típusok) sejtek. A bőrben a rezidens dendritikus sejteken kívül, ahogyan a nyirokszervekben és a perifériás vérben is, vándorló dendritikus sejtek is vannak. Ezek a vándorló dendritikus sejtek lehetnek mieloid eredetű dendritikus sejt prekurzorok, melyek az antigénnel történt találkozást követően antigén-bemutató sejté (APC) differenciálódnak, illetve a vírusfertőzésekben az erőteljes I-típusú-IFN-válasszal fontos szerepet játszó plazmocitoid eredetű dendritikus sejtek (Romani N 2010, Boltjes A 2014). A bőrben található dendritikus sejtek és különösen a csak itt előforduló Langerhans sejtek hatékony APC-ek. A B-sejtek APC nélkül is képesek felismerni bizonyos epitópot, azonban a T-sejteket csak az APC által feldolgozott és bemutatott epitópok képesek aktiválni. A citotoxikus T-sejtek (CTL), a minden magvas sejt felszínén kifejeződő MHC-I-komplex segítségével bemutatott antigéneket ismerik fel, a segítő T-sejtek (Th) pedig a csak bizonyos immunsejtek (B-sejt, makrofág, dendritikus

sejtek) által kifejezett MHC-II-komplex segítségével bemutatott antigéneket. Élő vírustartalmú vakcina esetén, az antigén, mint endogén fehérje kerül bemutatásra az MHC-I-komplexen keresztül, azonban az inaktivált vakcinában található antigén, mint exogén fehérje csak az MHC-II-komplexen keresztül kerül bemutatásra. A dendritikus sejtek alkotják az egyetlen olyan sejtípust, melyek képesek a keresztprezentációra. Ennek során a külső környezetből endocitózissal, vagy pinocitózissal felvett antigéneket, mint például az inaktivált vírustartalmú oltóanyagból származó antigént, a feldolgozást követően mind az MHC-I-, mind az MHC-II-komplexen is bemutatja, így aktiválva egyszerre a Th- és a CTL-sejteket is (Murphy RB 2001, Joffre OP 2012). Különösen nagy jelentősége van az antigén bemutatásnak olyan betegségek elleni vakcinációban, ahol a védelemben elsősorban a citotoxikus T-sejtek vesznek részt. Ilyen a *herpes-zoster* megbetegedés is, ahol a vírus sejtről-sejtre terjedve jut el a bőr felszínéhez és hozza létre a hólyagos elváltozásokat. Ugyanígy nagy jelentősége van az APC által aktivált T-sejteknek az influenzavírus olyan epitópjai esetében is, amelyek nem a felszínen (pl. a B-sejtek számára felismerhető hemagglutinin (HA) és neuraminidáz (NA) változékony régiók) vannak jelen, hanem „rejtve” a vírusban, mint például a HA-fehérje konzervatív szár régiója, vagy a vírus belső fehérjei.

Jelenleg az influenza (IdFlu 9) és rabies (Verorab, Rabipur) vakcinák között van i.d.-úton alkalmazható vakcina. Az i.d.-vakcináció elterjedésének egyik akadály a beadásra használt megfelelő és olcsó eszköz hiánya. Az i.d.-influenza-vakcina a speciális mikrotűs rendszer miatt drágább, mint a hagyományos i.m.-úton alkalmazandó vakcina. Rabies esetében a magas költségek miatt nincs lehetőség könnyen kivitelezhető mikrotűs oltásra, pl. Indiában, így a hagyományos tűvel történő i.d.-oltást alkalmazzák, amelynek kivitelezése hosszadalmas és nagy gyakorlatot igénylő művelet az i.m.-oltáshoz viszonyítva. Számos klinikai vizsgálatban használtak tümentes i.d.-vakcinációs technikákat, melyeknél folyadék vagy por formájában nagy nyomás segítségével juttatták be az oltóanyagot a bőrbe (Nelson EA 2013, Soonawala D 2013, McAllister L 2014).

Vizsgálataink során a VZV-vakcina i.d.-immunizációs módszerét tengerimalacokon vizsgáltuk, mert bőrük legfelső rétegének, a stratum corneumnak, a vastagsága az emberével megegyező, 18,2 – 18,6 μm (Magnusson BM 2001). Az általunk alkalmazott liquid jet technológiánál, ahol nagy nyomás segítségével juttatjuk be az oltóanyagot a

bőr dermisz-epidermisz régiójába, ez az elvárás érvényesül, az oltóanyag átjut a stratum corneum rétegen. A Varilrix vakcinával végzett kísérleteink az i.d.-vakcinációs út immunológiai hatásosságát hasonlítják össze a s.c.-eljárással, a vakcina élő és inaktivált formában történő alkalmazása esetén.

– A vakcina antigenitása és a természetes fertőzésben játszott patogenetikai szerepe
Vírusfertőzések elleni védelemhez elegendő lehet annak a membránantigénnek a szervezetbe juttatása, amelyikkel a vírus a célsejtjeihez kötődik, például influenza-vírus HA-fehérje az aleggység vakcinában. Ez a megállapítás azonban csak HA-homológ influenza törzssel történt újrafertőzés esetén igaz. Nem pontosan ismert, hogy van-e védelem, az milyen fokú és milyen mechanizmus szerint történik HA-szemponjtából heterológ vírustörzssel történt újrafertőződés esetén. A Fluval AB-vakcinával végzett kísérleteink a HA-, neuraminidáz- (NA) és neutralizáló- (VN) epitópok szempontjából heterológ vírustörzssel szembeni védelem lehetőségeit vizsgálja.

– Vakcina adjuvánsok jellemzői

Főleg inaktivált kórokozót vagy tisztított fehérjét tartalmazó vakcinák esetében az adjuvánsoknak elengedhetetlen szerepük van az immunizálás hatékonnyá tételében, mivel az adjuvánsok teremtik meg a gyulladásszerű, stimuláló környezetet az adaptív immunválasz kialakulásához, valamint lehetővé teszik, hogy az antigén hosszabb ideig legyen jelen az oltás helyén. Emberben főleg az alumíniumszármazékokat alkalmazzák, amelyek precipitátumot képeznek a fehérjeantigénekkal és aktiválják az antigén prezentáló sejteket. Ma már ismert, hogy a legtöbb adjuváló hatású anyag a dendritikus sejtek patogén mintázat felismerő receptoraihoz kötődve fejti ki hatását. Ilyen receptorok többek közt a TLR (toll-szerű receptor), NLR (nod-szerű receptor), RLR (RIG-I-szerű receptor) és a C-típusú lektin receptorok (Leroux-Roels G 2010, Li H 2008). Az alumínium-sókat (alumínium-foszfát, -hidroxid) már több mint 80 éve használják humán vakcinákban adjuvánsként. Az utóbbi 20 évben azonban új adjuvánsokat is engedélyeztek, mint az MF59 (szkvalén, poliszorbát 80, szorbitán-trioleát), az AS03 (szkvalén, poliszorbát 80, alfa-tokoferol), az AS04 (alumínium-hidroxid, monofoszforsav lipid A) és még több más, még nem engedélyezett adjuvánst is vizsgálnak (Rappuoli R 2011). Azonban ezek az adjuvánsok csak i.m. oltóanyagként alkalmazhatóak, i.d.-módon nem, mert súlyos lokális mellékhatásokat okozhatnak (Chen X 2011).

A *Quillaja saponin* adjuváns hatása már régóta ismert, azonban engedélyezett humán vakcinákban még nem alkalmazzák. A szaponinok fokozzák nemcsak a humorális, hanem a celluláris immunválasz erősségét is, szemben az alumínium vagy a legtöbb olaj alapú (MF59, AS03) adjuvánsokkal melyeknél inkább a humorális immunválasz erősödik (Lövgren Bengtsson 2011). Számos biztató eredményt értek el állatkísérletekben különböző vírus (H5N1, H7N9) tartalmú vakcinákban (Pedersen G 2011, Cox RJ 2015, Liu YV 2015). Az Ebola-glikoprotein vakcina esetében csak a szaponin alapú adjuvánst (Matrix-M) tartalmazó vakcinával immunizált egerek éltek túl 100%-ban a letális fertőzést (Lövgren Bengtsson K 2016). I.d.-immunizálásra eddig még nem alkalmazták ezt az adjuvánst sem, azonban az OEK-ben (Országos Epidemiológiai Központ) nagyon jó eredménnyel végződött a Matrix-M i.d.-kipróbálása állatkísérletekben influenza, VZV- és rabies vírusokkal (közlemény összeállítás alatt).

2.2. Varicella

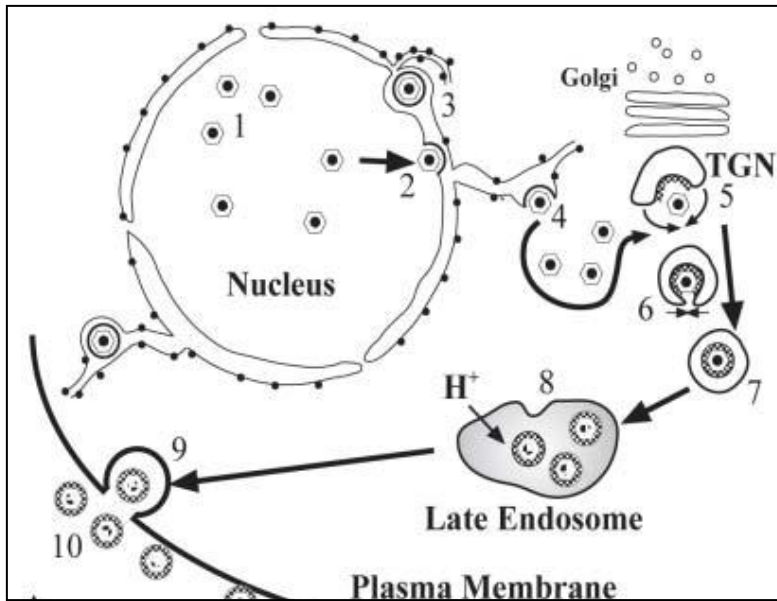
2.2.1. Varicella zoster vírus (VZV)

A varicella-zoster vírus a *Herpesviridae* családba, ezen belül az *Alphaherpesvirinae* alcsaládba tartozik a humán herpeszvírus -1, -2 (HHV-1, -2 vagy HSV-1, -2) típusával együtt. Az *Alphaherpesvirinae* alcsaládba tartozó vírusok DNS-szekvenciájára nagymértékű homológia jellemző, így a VZV- és HSV-glikoproteinek között is jelentős a hasonlóság. Jellemző ezekre a vírusokra az elsődleges fertőzést követő látencia. Ekkor a vírus a fertőzött sejtben jelen van, de nem replikálódik. A látens vírus reaktiválódhat, melynek következtében beindul a replikációs ciklus és jellegzetes klinikai kórképet hoz létre (Cohen JI 2008, Mueller NH 2008, Gilden D 2009, Oxman MN 2009).

A vírus felépítésére jellemző, hogy a duplaszálú DNS-t tartalmazó nukleokapszid körül egy lipid burok található, mely glikoproteineket tartalmaz. A VZV DNS nagyon hasonló a HSV-1 genomhoz, nagymértékű a komplementaritás köztük, azonban a VZV-DNS kisebb, bizonyos gének hiányoznak, így egyes HSV-1 fehérjék (pl. gD) nem termelődnek a VZV-vel fertőzött sejtekben (Arvin AM 1996). A VZV DNS legalább 69 nyitott leolvasási keretet tartalmaz (ORF), azonban a replikáció során csak 7 glikoprotein (gp) keletkezik: a gB (ORF31), a gC (ORF14), a gE (ORF68), a gH

(ORF37), a gI (ORF67), a gK (ORF5) és a gL (ORF60) (Kinchington PR 2000). Mindegyik gp ellen termelődik neutralizáló ellenanyag, azonban a legerősebb immunogenitással rendelkező glikoprotein a gE, valamint a nagyon korai (immediate-early, IE) 62-es fehérje (IE62), mely a VZV fertőzött sejtekben a legnagyobb mennyiségben termelődik és mind a humorális, mind pedig a celluláris immunválasznak a fő célpontja (Kinchington PR 2000, Arvin AM 1996).

A sejt fertőzése a vírus és a sejtmembrán fúziójával kezdődik, melyben szerepet játszanak a vírus burokból található bizonyos glikoproteinek (gB, gE, gH, gI) mannóz-6-foszfát csoportjai, valamint a sejtemembrán mannóz-6-foszfát receptorai (MPR) és mielinel-kapcsolt glikoproteinjei. A nukleokapszid és a sejtmag membrán fúzióját követően a vírus burokból található IE62 is a sejtmagba kerül és elindítja a szabaddá vált vírus DNS-ről a transzkripciót (Zerboni L 2014). Először az IE mRNS-k íródnak át, majd a sejtmagból kilépve a citoplazmában a transláció során fehérje képződik róluk. Ezek az IE fehérjék a sejtmagba visszakerülve irányítják a korai (E) mRNS-ek átírását, végül az E transzkriptumokról képződött fehérjék a késői (L) mRNS-ek átíródását. A sejtmagban újonnan képződött VZV DNS körül a kapszid fehérjék összeépülnek, majd a vírus nukleokapszid a sejtmag belső membránjáról bimbózással kijut a citoplazmába. E folyamat alatt képződik a nukleokapszid körüli ideiglenes burok. A citoplazmában található transz-Golgi-készülékben (TGN) összeépített vírus glikoproteinek és burok fehérjék citoplazma vezikulumokba kerülnek. A vezikulumok az ideiglenes burokkal összeépülve alakítják ki a végleges, mannóz-6-foszfát csoportokat is tartalmazó vírus burkot, mely a citoplazmában található, MPR-tartalmú membránnal rendelkező, késői endoszómához köti a vírustartalmú vezikulumot. Az endoszómában létrejött savas közegben a vírusok nagy része degradálódik, infektivitását elveszti (1. ábra). Ez az oka annak, hogy a sejtenyészeti felülúszójában infektív vírusok nem, vagy alig mutathatók ki, de ugyanakkor a vírus képes sejtről sejtre terjedni (Chen JJ 2004). A szövetkultúra tápfolyadékában a defektív vírus: infektív vírus arány 10^4 - 10^6 :1 (Cohen JI 2008).



1. ábra A VZV érése és a burok kialakulásának útvonala a fertőzött sejtben.

(1) A nukleokapszid összeszerelődése a sejtmagban; (2) ideiglenes burok kialakulása a sejtmag membránból; (3) bimbózás a perinukleáris hálózatba (4) az ideiglenes burok fúziója a riboszomális endoplazmás retikulummal, amely mint nukleokapszid a citoszolba kerül; (5-6) a nukleokapszid és a burok kialakulása a transz-Golgi-készülékben (TGN); (7) transzport vezikula kialakulása; (8) vírus degradáció a késői endoszómában uralkodó savas közeg miatt; (9-10) degradált virionok kiszabadulása a sejtől exocitózissal (Chen JJ 2004).

Bőrbíopszia minták elektronmikroszkópos vizsgálatok megállapították, hogy az epidermisz bazális sejtjeiben sok degradált vírus képlet látható, azonban a legfelső réteg sejtjeiben nagy mennyiségű ép szerkezetű infektiós partikula van. Ugyanezekben a sejtekben az MPR cDNS-expressziót vizsgálva azt tapasztalták, hogy a felső réteg sejtjeiben csökken az MPR mennyisége. Az MPR-ek hiányában termelődött nagy mennyiségű infektiós partikula kiszabadulva a sejt lízisét okozza. Ez a magyarázata a varicella és herpes zoster során kialakult hólyagokban nagy mennyiségben kimutatható infektiós vírusnak (Chen JJ 2004).

2.2.2. VZV-okozta betegségek

Varicella/bárányhimlő

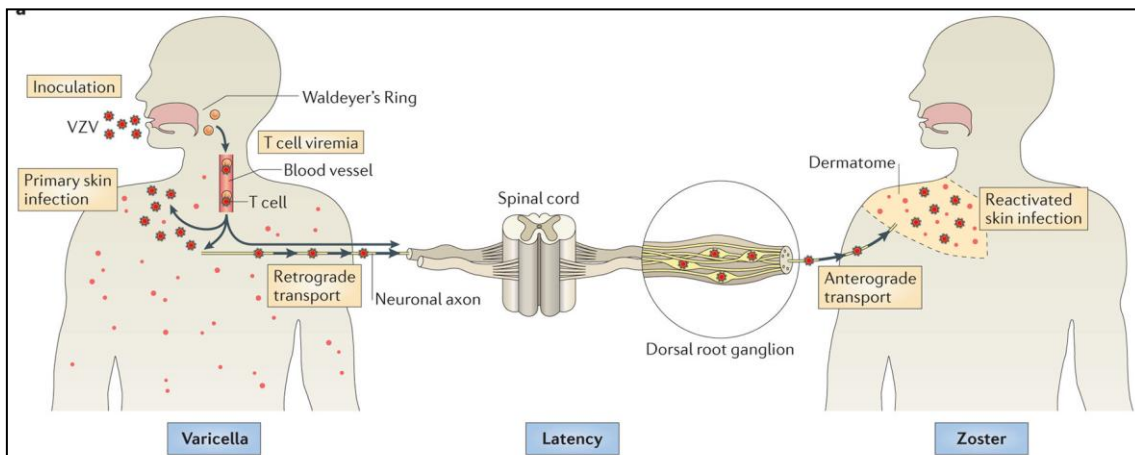
VZV-fertőzéskor a vírus a légutak nyálkahártyájának epiteliális sejtjeiben kezd el szaporodni, majd innen a megfertőzött dendritikus sejtek szállítják a nyirokcsomókba, ahol megtörténik a T-sejtek fertőzése (2. ábra). Ezekkel a fertőzött T-sejtekkel ($CD3^+/CD4^+$, $CD3^+/CD8^+$, $CD3^+/CD4^+CD8^+$) jut el a vírus az egész test területére. Ez az elsődleges virémiás szakasz. Ezt követően a májban és lépben történik vírus replikáció, majd a vírust a mononukleáris sejtek elszállítják a légutak nyálkahártyáihoz és a bőr epidermisz sejtjeihez, ahol ismét replikálódik, létrehozva így a hólyagos elváltozásokat. Ez a másodlagos virémiás időszak, mikor a beteg a légutakon keresztül és a hólyagfalak sérülésein keresztül nagy mennyiségű vírust ürít. A bőr epidermisz sejtjeinek fertőzése főként $CD4^+$ -memória T-sejteknek tulajdonítható, melyek „skin-homing” fehérjéket, pl. kután leukocita antigént, CC-kemokin receptor 4-et fejeznek ki felszínükön, így jutva el a bőr sejtjeihez. Az érző idegesejtek a fertőzött mononukleáris sejtekkel, vagy a bőr felől, axonjaikon keresztül fertőződnek meg, majd a vírus a gerincvelői hátsó gyöki érző idegdúcba és a fejlet beidegző háromosztatú idegdúcba (trigeminus ganglion) vándorol, ahol a továbbiakban látens formában van jelen (Arvin AM 1996, Zerboni L 2014).

A bárányhimlő általában gyermekkorban lezajló lázzal és kiütésekkel járó, nagy fertőzőképességgel jellemezhető endémiás megbetegedés. A nagy fertőzőképességet jelzi, hogy a felnőttek 99%-a szeropozitív. A VZV elsősorban cseppfertőzéssel terjed, de a bőrön kialakuló jellegzetes hólyagok nagy mennyiségben tartalmaznak fertőző vírus partikulákat, melyek kiszabadulva szoros kontaktus útján szintén fertőzhetnek. A 10-21 napos inkubációs és virémiás időszakot követően alakulnak ki a testszerte elterjedt vírustartalmú hólyagok. A hosszú virémiás idő erős sejtes és humorális immunválasz kialakulására teremt lehetőséget. A bárányhimlő megbetegedéssel szembeni hosszú távú védelemért $CD4^+$ -, $CD8^+$ -T-sejtek és neutralizáló ellenanyagok felelősek (Arvin AM 1996). A másodszori bárányhimlős megbetegedés nagyon ritka, sérült immunrendszerű egyéneknél fordul elő ismételt VZV-fertőzést követően. Ép immunrendszerű embereknél a másodszori fertőzés tünetmentes és booster hatással van az immunválaszra. Szeronegatív nők esetében az első trimeszter alatt történt infekció

következtében a magzat méhen belül fertőződhet és fejlődési rendellenességek alakulhatnak ki, míg a második vagy harmadik trimeszterben történt fertőződés esetében később, a gyermek vagy fiatal felnőtt kor idején a látens vírus reaktiválódhat és övsömör megbetegedést okozhat. A születés ideje előtt 1-2 héttel történt fertőződés következtében az újszülöttnél disszeminált bárányhimlő alakulhat ki (Cohen JI 2008, Mueller NH 2008, Gilden D 2009, Oxman MN 2009).

Herpes zoster/övsömör

A herpes zoster az idegdúcokban látens jelen lévő VZV-reaktivációja következtében alakul ki. Az övszerű elrendezésű hólyagos bőrkiütés a középvonal egyik oldalára korlátozódik és leggyakrabban a törzsön vagy az arcon jelentkezik, ritkábban a végtagokon, attól függően, hogy mely idegdúcban volt látenciában a reaktiválódott vírus. Immunszuprimált betegeknél előfordulhat disszemináció. A reaktiválódott vírus terjedése retrográd transzporttal történik az idegsejtől a bőrig, melyben nagy szerepe van a celluláris immunválasz csökkenésének.



2. ábra A VZV-életciklusának modellje.

Cseppfertőzéskor a vírus a légutak nyálkahártyájának epiteliális sejtjeiben kezd el szaporodni, majd a nyirokcsomókban T-sejteket fertőz, melyek a vérárammal testszerte elviszik a vírust, így többek között a bőr epiteliális sejtjeihez is, amelyet a vírus megfertőz és a replikáció következtében kialakulnak a jellegzetes hólyagos elváltozások. Az érző idegsejtek és a hátsó gyöki ganglionok a fertőzött mononukleáris sejtekkel, vagy a bőr felől, axonjaikon keresztül (retrográd transzport; axonvég felől) fertőződnek meg a vírussal. Reaktivációkor az újonnan replikálódott vírusok a hátsó

gyöki ganglionok felől (anterográd transzport; axonvég felé) az axonokon keresztül jutnak el ismét a bőr epiteliális sejtjeihez, létrehozva a *zosteres* hólyagokat (Zerboni L 2014).

A *zoster* betegség szövődményeként posztherpetikus neuralgia alakulhat ki, mely az érzőidegek gyulladására miatt hosszantartó, súlyos fájdalommal járó betegség. Egyes esetekben előfordulhat bőrkiütés nélküli VZV-reaktiváció is. A legtöbb beteg 60 év feletti. Immunhiányos személyeknél a T-sejtes immunválasz sérülése miatt magasabb a *zosteres* esetek száma az egészséges immunitásúakhoz viszonyítva. Ritkán egészséges 50 év alatti egyéneknél is kialakulhat *zoster*. Ebben szerepe lehet a stressznek, korábbi, VZV-vel nem összefüggő (pl. HIV) vírusfertőzésnek, illetve egyéb tényezőknek (transzplantáció, hematológiai tumorok), melyek a celluláris immunválasz csökkenéséhez vezetnek. Előfordulhat *zosteres* megbetegedés gyermekkorban, ha újszülött korban, vagy a terhesség későbbi szakaszában történik a *varicella* fertőződés (Cohen JI 2008, Mueller NH 2008, Gilden D 2009).

2.2.3. A *varicella* és *herpes zoster* betegségek immunológiai háttere

A *varicella* fertőzést követő hosszú virémiás idő alatt erős sejtes immunválasz alakulhat ki. Látencia alatt a VZV-DNS, IE és E mRNS-ek vannak jelen az idegsejtek magjában, azonban az L-gének transzkripciója szünetel (Arvin AM 1996, Zerboni L 2014). Ezekből a transzkriptumokból a látencia alatt is legalább 6-féle IE és E VZV-fehérje termelődik, melyek állandó antigén ingerként jelentenek az immunsejteknek, erős immunvédelmet, főleg celluláris immunitást biztosítva, így az élet folyamán csak egyszer, ritkán kétszer fordulhat elő reaktiváció. Feltételezik, hogy HSV (*herpes simplex vírus*) esetében a látencia állapotból történő reaktiváció azért gyakoribb, mert itt nincs fehérje termelés, csak a látencia asszociált transzkriptumok (LAT) keletkeznek (Cohen JI 2008, Roizman B 2013). Ezen kívül VZV esetében szintén antigén ingerként jelentenek az ismételt *varicella* fertőzések, melyek a cseppfertőzés miatt nagyon hatékonyak, így az immunvédelmet erősítik, míg HSV esetében a fertőzés szoros kontaktust igényel, így a reinfekciók ritkábbak (Oxman MN 2009).

2.2.4. Vakcinák

Varicella zoster vakcina

A vakcina alapjául szolgáló vad VZV-OKA-törzset (pOKA) Japánban izolálták egy OKA nevű bárányhimlős kisfiúból. Az izolálás humán embrionális tüdő fibroblaszt sejteken történt, ezt követően tengerimalac fibroblaszt szöveten, végül humán diploid sejteken (WI-38 és MRC-5) sorozatos átoltással attenuálták a vírust, létrehozva így a vakcina törzset (vOKA) (Takahashi M 1974). A pOKA- és a vOKA-törzsek molekuláris vizsgálatával megállapították, hogy csak 42 bázis eltérés van a két vírustörzs között. A 42 bázis eltérésből 15 az ORF62 szakaszon található. Az ORF62 nukleotid régió az IE62-fehérjét kódolja, melynek fontos szerepe van a replikáció során a szabaddá vált vírus DNS-ről történő transzkripció elindításában (Yamanishi K 2008). Az első VZV-vakcinát 1986-ban engedélyezték Japánban, ezt követően Dél-Koreában, USA-ban, Kanadában, Ausztráliában és számos európai országban a gyermekek kötelező oltási rendjébe beillesztették. A vakcinák *Varilrix* (GSK), valamint *Varivax* (Merck) néven vannak forgalomban. Az oltást kizárólag s.c.-úton alkalmazzák, i.d.-módon nem engedélyezett az adása, mert a vírus replikálódhat a bőr fibroblaszt sejtjeiben, így hólyagos elváltozásokat hozhat létre, valamint vírus transzport is létrejöhet. A replikációt és vírus transzportot igazolja az a vizsgálat, amelyben tengerimalacok i.d. élő VZV-oltását követően VZV-DNS-t detektáltak a hátsó gyöki ganglionokban és a belekben is (Chen JJ 2011). A vakcina egyszeri oltásával csak 80-85%-os védelem érhető el, emiatt bevezették a két oltási sorozatból álló vakcinációt, mely 98-99%-os védelmet biztosít (Takahashi M 2003, Marin M 2008). Az USA-ban jelenleg az első oltást 12-15 hónapos korban, a másodikat pedig 4-6 évesen, az MMR (morbilli+mumps+rubeola) vakcinával egy időben kapják a gyermekek (Marin M 2010). Magyarországon a *varicella* védőoltást csak bizonyos kockázati csoportok, pl. immunfunkció szempontjából károsodott gyerekek esetében javasolják. A vakcináció általános használatának akadálya egyrészt a betegség enyhe, többnyire szövődménymentes jellege, valamint az a tény, hogy a vakcinatörzs kevésbé infektiós, mint a vad típusú VZV, ezért feltételezik, hogy az idősebb korosztály a reaktivációt gátló, booster hatású ismételt fertőzést nem kaphatja meg az oltottaktól, így gyakoribb

lehet a *zoster* előfordulása az általános vakcináció bevezetése esetén (Marin M 2008, Brisson M 2002).

A vakcinációt követően is kialakulhat látencia az érző idegsejtekben, azonban a *zoster* előfordulása ritkább a vakcináció után – még immunkompromittált gyerekek esetében is –, mint varicella megbetegedés után. Ennek oka lehet a vakcina vírus korlátozott replikációja a bőrben, melynek következtében az idegsejteket kevésbé hatékonyan fertőzi (Arvin AM 2001, Hardy I 1991). Érdekes megfigyelés, hogy az oltottak körében előforduló *zoster* megbetegedésnél nem a vOKA-vakcina-törzs, hanem a vad típusú VZV-vírus-törzs volt kimutatható a hólyagokban, ami a vakcináció ellenére kialakult, vagy azt megelőzően lezajlott tünetmentes VZV-fertőzésre és ezt követő látenciára utal (Galea SA 2008).

Herpes zoster vakcina

A *herpes zoster* megelőzésére a *zoster* vakcinát (Zostavax, Merck) először 2006-ban az USA-ban engedélyezték a 60 évnél idősebbek oltására. Ez a vakcina szintén élő attenuált vOKA törzset tartalmaz, de a *varicella* vakcinához képest 14-szeres dózisban (Mitka M 2006). Az oltást követően a VZV-specifikus CD4⁺- és CD8⁺- T-sejtek száma megnő. Ismételt oltásra 5 évenként van szükség. A vakcináció 50%-al csökkentette a *zoster* előfordulását a 60-69 évesek körében, 41%-al a 70-79 és csak 18%-al a 80 év feletti korosztálynál. Az oltás ezen kívül csökkenti a – vakcina ellenére is kialakuló – *zoster* súlyosságát, valamint a lázas és szövődményes esetek számát (Oxman MN 2010, Oxman MN 2005, Harpaz R 2008, Schmader KE 2012). Immunkomprimált személyeknél az élő vírustartalmú vakcinák kockázatot jelentenek, ezért ígéretes vizsgálatokat folytatnak inaktivált vírustartalmú *zoster* vakcina kialakítására (Hata A 2002).

A *zoster* vakcina Magyarországon nincs kereskedelmi forgalomban, külföldről történő behozatala esetén kereskedelmi ára magas, 2017. februárban 176 Euro (kb. 53 000 Ft) volt. Ennek egyik oka, a megfelelő immunválasz kiváltásához szükséges nagy vírusedényesség az oltóanyagban, amelynek előállítása a vírus *in vitro* szaporításának tulajdonságai miatt nehéz és költséges. A Magyarországon forgalmazott *varicella* vakcinában (Varilrix, GSK) 1995-PFU (plakk-képző egység), az USA-ban forgalmazottban (Varivax, Merck) 1350-PFU az infektív vírus partikulák száma, míg a

zoster vakcinában (Zostavax, Merck) ezeknek 10-14-szerese (19400-PFU). A *varicella* vakcinához hasonlóan a *zoster* vakcinát is s.c.-módon alkalmazzák.

2.3. Influenza

2.3.1. Influenzavírus

Az influenza megbetegedést az *Orthomyxoviridae* családba tartozó influenzavírusok okozzák, amelyeket a nukleoprotein (NP) és matrix (M) fehérjék alapján A-, B-, C- és D-típusokra osztják. A D-genust a közelmúltban írták le, influenzaszerű megbetegedést követően sertésekből és szarvasmarhából izolálták, emberből eddig még nem sikerült izolálni. Az emberi fertőzöttséget eddig még csak szerológiailag tudták igazolni (Chiapponi C 2016, Lamb RA 2001). Genomjuk negatív, egyszálú 8, illetve a C-vírus esetén 7 szegmenset alkotó RNS. Két szegmens a külső lipidburokba ágyazódó hemagglutinin (HA) és neuraminidáz (NA) glikoproteineket kódolja. Hat szegmens a matrix (M1, M2), polimeráz (PA, PB1, PB2) és nukleoprotein (NP)-belső fehérjéket kódolja. A HA feladata a vírus hozzákapcsolása a fogékony sejten a sejt felszíni glikoproteinek szialinsav részéhez, elősegítve ezzel a sejtbe jutást. Az NA a vírus sejtből történő kiszabadulásában és a virionok aggregációjának gátlásában vesz részt. A HA- és az NA-fehérjék antigenitásbeli variációi alapján oszthatjuk a vírusokat szubtypusokba. Ez főleg az influenza A-vírusokra jellemző, a B-vírusokra kevésbé, a C-vírusokra pedig egyáltalán nem. A C-vírusok esetében a HA és NA egy fehérjeként a hemagglutinin-észteráz-fúziós fehérjeként van jelen. A HA- és NA-glikoproteinek rendkívül változékonyak. A változás lehet kismértékű, mely a nukleinsav sorrendben létrejött pontmutáció következménye, ez az antigén sodródás („antigen drift”), mely csupán néhány aminosavat érint, mégis elég nagy változás ahhoz, hogy az eredeti variáció ellen termelődött HA és NA elleni ellenanyagok már nem ismerik fel a vírust, így nem tudják megakadályozni a betegség kialakulását. Nagyobb fokú változás az antigén eltolódás („antigen shift”), mely új szubtypus kialakulását jelenti, az influenza A vírusokra jellemző. Ez akkor jön létre, ha legalább kétféle influenzatörzs egyszerre fertőzi meg ugyanazt a sejtet, és közöttük genetikai rekombináció jön létre (Lamb RA 2001). Jelenlegi ismereteink szerint 18-féle HA- és 11-féle NA-szubtypus létezik (Deng YM

2015). A HA két részből áll, egy fej (HA1) és egy szár (HA2) részből. A HA1-alegység a receptorkötő domén, amely a sejt szialsav csoportjához köti a vírust, elindítva ezzel a sejt fertőzését, továbbá a neutralizáló ellenanyagok szempontjából a vírus legfontosabb antigénje, mely 5 antigén domént tartalmaz. A HA2 a vírus lipidburkába ágyazódik és fúziós fehérjeként szintén szerepe van a vírus sejtbe juttatásában. A vírus receptor mediált endocitózissal, endoszóma formában kerül be a sejtbe. Az endoszóma savas közege megnyitja az M2-transzmembrán fehérje által képzett ion-csatornát, valamint a HA2-n konformáció változást hoz létre, így az a fúziós peptid doménjével az endoszóma membránjához kapcsolódik, felnyitva a vírusburkot. A folyamat következményeként a nukleokapszidon belül is savas pH alakul ki. A savas közeg hatására a virális ribonukleoprotein komplex (NP, PA, PB1, PB2, vírus RNS) elválik az M1-fehérjétől és bejut a sejt citoplazmájába, majd a sejtmagba az NS-szegment által kódolt nukleáris transzport fehérje (NEP) segítségével (O'Neill RE 1998). A sejtmagban a vírus saját RNS-dependens RNS-polimeráza szintetizálja a negatív RNS-ről a pozitív kiegészítő szálat. A citoplazmában szintetizálódnak a vírus fehérjék. Az infektív víruspartikula bimbózással válik le a sejtről, e folyamat alatt kapja meg a HA-, NA- és M2-fehérjéket tartalmazó sejtmembrán által a vírus burkot. A sejtmembránról történő leválásban az NA-fehérjéknek van szerepük, melyek levágják a szialsav maradékokat a HA-molekulákról, a többi NA-molekuláról és a sejtmembrán glikoproteinjeiről és glikolipidjeiről. E folyamat nélkül a vírus nem tudna leválni a sejtről és újabb sejteket fertőzni (Lamb RA 2001).

2.3.2. Influenzavírus okozta betegségek

Az influenzavírus cseppfertőzéssel terjed, az esetek többségében a betegség lefolyása enyhe vagy közepesen súlyos. Gyakran izomfájdalmak vezetnek be, majd hirtelen kezdetű hidegrázás, rossz közérzet, levertség, magas, akár 39-40°C-t is elérő láz jellemzi. A betegek nagy része 1-2 héten belül teljesen meggyógyul, azonban előfordulhat elsődleges virális tüdőgyulladás, gyakran bakteriális tüdőgyulladás illetve kevert vírusos és bakteriális tüdőgyulladás is, melyeknek következtében a betegség sokkal súlyosabb lefolyású, nem ritkán halálos kimenetelű lehet. Továbbá agyvelőgyulladás, szívizom- és szívburokgyulladás, valamint Reye-szindróma

(agyduzzanat, májelégtelenség) is előfordulhat az influenza megbetegedés kapcsán. A betegséget súlyosbítják egyéb krónikus betegségek, főként a szív- és tüdőbetegségek megléte (Morishima T 2002, Monto AS 2000).

2.3.3. Influenzavírus okozta betegségek immunológiai háttere

A cseppfertőzést követően a légutak nyálkahártyájának immunsejtjei és a fertőzött epiteliális sejtek lokálisan citokineket (IL-1 α/β , TNF- α/β , IL-6, IFN- α/γ , IL-8, MIP-1 α) termelnek, valamint a vírussal kapcsolatba került immunsejteknek, főként fagocita sejteknek köszönhetően szisztémás citokin termelés is létrejön. Az influenza betegséggel együtt járó klinikai tünetekért (izomfájdalom, láz, levertség érzés) elsősorban ez az elsődleges citokinválasz tehető felelőssé. A fertőzést követően 4-7 hét múlva a legmagasabb az ellenanyagok (anti-HA, -NA, -M, -NP) szintje és ezeket évekkal a fertőzést követően is ki lehet mutatni szerológiai módszerekkel. A HA elleni ellenanyagoknak neutralizáló hatásuk van, az NA- és az M2-fehérjékkel szembeni ellenanyagok a vírusnak a fertőzött sejtéből történő kiszabadulását gátolják (Treanor JJ 2004). A betegség elleni védelemben tehát elsődleges szerepük van a HA- és az NA-fehérjék működését gátló HAG- és NAG-ellenanyagoknak, azonban ez a két fehérje tartalmazza a vírus legváltozékonyabb részeit. Ezek a változások („antigen drift”) nem befolyásolják a vírus infektivitását, azonban a meglévő HAG- és NAG-ellenanyagok már nem nyújtanak védelmet az újabb vírusváltozatokkal szemben. A HA- és az NA-fehérjék konzervatív régiókat is tartalmaznak, de a változékony fehérje szakaszok jelenlétében ezek szerepe sokkal kisebb a védelemben. Ugyanígy a vírus konzervatív, belső fehérjéivel szemben termelődő ellenanyagok is háttérbe szorulnak a HAG és a NAG mellett. A konzervatív fehérjékkel szembeni ellenanyagok azonban képesek keresztreakcióra és így keresztvédelmet biztosíthatnak a különböző influenza szubtypusok között is, melyekre a HAG- és NAG-ellenanyagok nem alkalmasak (Osterholm MT 2012, van Els C 2014, Trombetta CM 2016). Az ellenanyagoknak továbbá szerepük van az ellenanyag-függő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) létrejöttében is. A humorális mellett a celluláris immunválasznak is szerepe van a védelemben, különösen idősök esetében (McElhaney JE 2012). Az influenzavírus specifikus citotoxikus CD8⁺-T-sejtek (CTL) lehetnek szubtypus specifikusak (pl. HA

variabilis epitópra specifikus), azonban a belső fehérjéket felismerve képesek keresztreakcióra a különböző influenza A szubtypusok között is. Állatkísérletben CTL-transzfer módszer segítségével bizonyították szerepét a fertőzést követően a betegség súlyosságának csökkentésében és a felépülésben (YAP KL 1978, Mbawuike IN 2007). A CTL-sejtek mellett a CD4⁺-T-sejtek is részt vesznek a védekezésben direkt citotoxikus válasszal, vagy a B-, illetve a CD8⁺-sejtek segítségével (Furuya Y 2010, Budimir N 2012, Sridhar S 2013, Altenburg AF 2015).

2.3.4. Influenza vakcinák

Az influenza betegség ellen a leghatékonyabb védelmet a vakcináció biztosítja. Sokféle engedélyezett szezonális, pandémiás és prepandémiás influenza vakcina létezik (1. táblázat). A legtöbb vakcina esetében az oltó vírust (seed vírus) egy magas hozamú (high-yield) influenzavírus-törzs és a legutóbbi járványt okozó influenzavírus-törzs reasszortációjával állítják elő. Szezonális vakcinák az adott évben várhatóan megbetegedéseket okozó influenzavírus törzseket tartalmazzák, a pandémiás vakcinák a már egyszer világmjárványt okozott törzset, a prepandémiás vakcinák pedig egy potenciálisan világmjárványt létrehozható influenzatörzset tartalmazzák (World Health Organization, 2014). A reasszortáns seed vírust a high-yield A/Puerto Rico/8/34 (PR8) törzs PB1-, PB2-, PA-, NP-, M-, NS-szegmensei és a legutóbbi járványt okozó törzs HA- és NA-szegmensei alkotják. Az inaktivált vakcinák közé tartozik a teljes virionokat tartalmazó, a detergensenel kezelt vírustól származó hasított vagy „hasított” és a tisztított, csak HA-fehérjéket tartalmazó alegység vagy „alegység” vakcina. Egyes országokban (USA, Kanada) engedélyezték az élő attenuált vírustartalmú (LAIV) vakcina (FluMist/Medimmune) használatát is, azonban a 2013-2016 közötti időszakot vizsgálva azt tapasztalták, hogy alacsony a vakcina hatékonysága, ezért a 2016/2017-es influenza szezonra már nem ajánlják (Centers for Disease Control and Prevention 2016). Állatkísérletekkel igazolták továbbá, hogy az élő influenzavírustartalmú vakcina növeli a klinikai szempontból fontos bakteriális patogének (*Streptococcus pneumoniae* (19F és 7F szerotípus), *Staphylococcus aureus* (Newman és Wright törzsek) kolonizációját a felső légutakban (Mina MJ 2014). A szezonális vakcinák többsége influenza A és B törzseket tartalmaz. A legtöbb vakcinát i.m. úton alkalmazzák, de van

i.d.-módon (Intanza, IdFlu, Fluzone) alkalmazott influenza vakcina is, illetve az élő vírustartalmú vakcinát (Fluenz, Flumist) intranazális (i.n.) módon alkalmazták. A HA és az NA változékonysága miatt minden évben újra meg kell adni az adott évi vakcina összetételét. Új influenza vakcina törzskönyvezéséhez a hatóságok (Európában az Európai Gyógyszerügynökség, EMA; az USA-ban az Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet, FDA) felé a vakcina hatékonyságát és ártalmatlanságát kell bizonyítani. A hatékonyságot szerológiai vizsgálatokkal kell alátámasztani. A 2014-ben bevezetett új irányelvek szerint, a törzskönyvezett, engedélyezett oltóanyagoknál ezt követően az ártalmatlansági és hatékonysági vizsgálatokat a vakcináltak egy részénél követéses vizsgálatokkal kell elvégezni minden évben, a szerológiai vizsgálat már nem előírás (Wijnans L 2016). Az új vakcina hatékonyságát a megfelelő mértékű humorális immunválasz létrejöttével támasztják alá. Ekkor, mint „gold standard”, a HAG-ellenanyagok mennyiségét mérik az oltás előtti és utáni immunsavókban. A minimum 1:40-es HAG-titert, vagy a négyszeres titer emelkedést, illetve a minimum 1:8-as neutralizáló ellenanyag titert tartják megfelelően protektívnek az influenza megbetegedéssel szemben. Az oltóanyag megfelelő, ha az oltott felnőttek (18-60 év) 70%-a és az idősek (>60 év) 60%-a eléri az 1:40-es HAG-titert. Ezzel a módszerrel azonban nem kapunk információt az egyéb, védelemben szerepet játszó ellenanyagok szintjéről, vagy a celluláris immunválaszról (Wijnans L 2016, van Els C 2014). A Fluval AB egy Magyarországon gyártott, engedélyezett, teljes vírusokat tartalmazó inaktivált, trivalens (H1N1, H3N2, B) vakcina amelyhez adjuvánsként alumínium-foszfátot kötöttek. A Fluval AB-t 1995 óta használják szezonális influenza elleni oltásra Magyarországon. A vakcina által kiváltott HAG-ellenanyag választ a vakcina immunogenitási vizsgálat kapcsán mérték (Vajo Z 2008, 2010, 2012), azonban a celluláris immunválaszt, valamint a vakcináció protektív hatását kísérleti állatokban eddig még nem vizsgálták.

A vírus változékonysága miatt világszerte vizsgálatok folynak a konzervatív fehérjéket tartalmazó univerzális influenza vakcinák előállítására (Egorov AY. 2016).

1. táblázat Engedélyezett szezonális és (pre)pandémiás influenza vakcinák

Vakcina céltörzs	Vakcina típus	Adjuváns	Immunitási mód	Kereskedelmi név (gyártó)
Szezonális adott évi törzsek	IIV teljes vírus	AIPO4	im	Fluval AB (Omninvest)
	IIV hasított	- - - - - - -	im im im im im id im	FluLaval (ID Biomedical) Fluarix, Fluviral (GlaxoSmithKline) Enzira (Pfizer) Vaxigrip, Fluzone (Sanofi Pasteur) Afluria (Merck) GC FLU (Green Cross Corporation) Intanza, IdFlu, Fluzone Intradermal (Sanofi Pasteur) Fluvax (bioCSL)
	IIV alegység	- - - MF59C.1 - virozóma lipid	im im im im im im	Influvac, Imuvac, Fluvaccinol (Abbott) Agriflu, Agrippal, Fluvirin, Optaflu (Novartis) Mutagrip (Sanofi Pasteur) Fluad (Novartis) FluCelvax (Novartis) Inflexal® V (Berna Biotech, Crucell)
	LAIV	-	in	Fluenz, Flumist seasonal (MedImmune)
	Recombináns fehérje	-	im	Flublok® (Protein Sciences)
Pandémiás 2009 H1N1 A/Cal7/2009	IIV teljes vírus	- AIPO4	im im	Celvapan H1N1 (Baxter) Fluval P (Omninvest)
	IIV hasított	- - - AS03	im im im im	Panvax (Merck) Panenza (Sanofi Pasteur) Green Flu-S (Green Cross Corporation) Pandemrix (GlaxoSmithKline)
	IIV alegység	- MF59C.1	im im	Fluvirin-H1N1 (Novartis) Celtura, Focetria (Novartis)
	LAIV	- -	in in	Fluenz, Flumist pandemic (Medimmune) Nasovac (Serum Institute of India)
Pre-pandémiás különböző avian törzsek	IIV teljes vírus	AIPO4 AIOH3/PO4 -	im im im	Fluval H5N1 (Omninvest) Daronrix (GlaxoSmithKline) Celvapan H5N1, Vepace (Baxter)
	IIV hasított	AS03	im	Prepandrix, Adjupanrix (GlaxoSmithKline)
	IIV alegység	MF59C.1	im	Foclivia, Aflunov (Novartis)

(van Els C 2014)

3. Célkitűzések

Kutatómunkánk célja az volt, hogy a VZV- és influenzavírus-vakcinák hatásosságának és biztonságosságának növelésére javaslatokat tegyünk. Munkánk során az alábbi hipotéziseket kívántuk megvizsgálni:

1. Az immunválasz hatékonysága inaktivált VZV-vakcina estében növelhető intradermális oltási mód alkalmazásával.
2. Az influenza megbetegedés elleni humorális védelem elérhető az elsődleges fontosságúnak tartott vírus epitópok elleni antitestek (HAG, NAG, VN) hiányában is.
3. Fluval AB-vakcinációt követően celluláris immunválasz is kialakul, a humorális immunválasz mellett.

4. Módszerek

4.1. VZV-vakcináció immunológiai hatása intradermális alkalmazás esetén

4.1.1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során összesen 60 db, 6-8 hetes nőstény Hartley tengerimalacot (LAB-ÁLL Bt., Budapest, Magyarország) használtunk. A kísérleteket az állatvédelmi törvények betartásával és az etikai bizottsági engedélyek birtokában végeztük.

4.1.2. Vakcinák és alkalmazási módjaik

Az állatok immunizálásához használt VZV-vakcina (Varilrix, GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium), MRC-5 humán diploid sejtvonalon (MRC-5) szaporított, élő gyengített vírust tartalmaz, $10^{3.3}$ (1995) PFU/0,5 ml dózisban. A Varilrix vakcinát embereknél csak s.c.-módon lehet alkalmazni. A kísérletek során a vakcina eredeti élő gyengített, valamint az inaktivált formáját is használtuk. Az inaktivációhoz a vakcinát 56°C-os vízfürdőben tartottuk 30 percig. Az inaktiváció hatékonyságának ellenőrzésére MRC-5 sejteket (Medical Research Council, London, United Kingdom) fertőztünk inaktivált, vagy élő gyengített vírussal. A VZV-antigén kifejeződést VZV-nukleokapszid specifikus monoklonális ellenanyag (LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, WA) vagy VZV-pozitív humán savó (Virologiai Főosztály, OEK), valamint fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelzett anti-egér (Trinity Biotech, Wicklow, Ireland) vagy anti-humán (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) ellenanyag használatával, immunfluoreszcencia (IF) módszerrel vizsgáltuk. Az inaktivált vírussal fertőzött sejtek teljesen negatívak voltak, míg az élő gyengített vírussal fertőzött sejtekben VZV-antigének kifejeződését detektáltuk.

Az immunizáció során 1/5 (399-PFU) vagy teljes (1995-PFU) humán dózist használtunk élő vagy inaktivált formában, melyet i.d.- vagy s.c.-úton alkalmaztunk. A s.c.-oltáshoz megfelelő oltótűt, míg az i.d.-oltáshoz tümentes belövő készüléket használtunk, melyet Dr. Jankovics István fejlesztett ki (OEK, Virologiai Főosztály,

Nemzeti Influenza Referencia Laboratórium). A készülék a folyadékot nyomás hatására a bőr epidermisz rétegébe préseli.

4.1.3. Az intradermális oltáshoz használt készülék megfelelő működésének ellenőrzése

Intradermálisan 13 db tengerimalacot oltottunk 0,1 ml (399-PFU) élő és 11 db állatot ugyanolyan mennyiségű hővel inaktivált vakcinával. Az oltást követő 0., 2., 4., 7. és 14. napon az oltás helyén bőrbioopszia-mintavevővel 5 mm átmérőjű mintákat vettünk, időpontonként és csoportonként 2-3 állattól. A mintákban mértük a VZV-DNS relatív mennyiségét kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) módszer alkalmazásával.

4.1.3.1.DNS-izolálás

A bőrbioopszia mintákat dörzsmozsárban folyékony nitrogén és piztillus használatával homogenizáltuk, majd 600 µl RLT-Plus puffert (Allprep DNA/RNA kit; Qiagen) adtunk a homogenizátumhoz, 1 percig rázattuk vortex segítségével, majd centrifugáltuk 3 percig, 12000 g-vel. A felülúszóból a DNS-izolálás a gyártó protokollja alapján történtek (Allprep DNA/RNA kit; Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

4.1.3.2.VZV-DNS detektálása qPCR-módszerrel

A qPCR-reakcióhoz mások által korábban közölt (Pevenstein SR, 1999) nukleotid szekvenciákat használtunk, melyek a VZV-DNS ORF 29-es korai DNS-kötő fehérje egy szakaszát kódolják. A forward primer szekvenciája 5'-CGT ACA CGT ATT TTC AGT CCT CTT-3'; a reverse primer szekvenciája 5'-GGC TTA GAC GTG GAG TTG ACA-3'a próba szekvenciája pedig FAM-CCC GTG GAG CGC GTC GAA A-TAMRA volt. Referenciaként az RNázP génjét (GenBank szám XM_005000167.1) használtuk, melynek primer próba szekvenciáit mi terveztük. A forward primer szekvenciája 5'-GGA TTT AGA CCT AAG AGC G-3'; a reverse primer szekvenciája 5'-GAG CGG CAG TTT CCA CCA TT-3'a próba szekvenciája pedig FAM-TTC TGA TCT GAA GGC TTT GCG TG-TAMRA volt. Az RNázP specifikus primerek által amplifikált PCR-termék nukleotid sorrendjének megfelelőségét szekvenálással igazoltuk. A qPCR-

reakcióhoz 10 µl végtérfogatban a következő mennyiségeket mértük össze: 2,5 µl DNS minta; 0,4 µl (10 µM) forward primer; 0,4 µl (10 µM) reverse primer; 0,2 µl (20 µM) próba; 5 µl PCR master mix (LightCycler 480 Probes Master; Roche, Mannheim, Germany) és 1,5 µl RNáz-mentes desztillált víz. Az amplifikációt a következő protokoll alapján végeztük, LightCycler 480 II készüléken (Roche, Rotkreuz, Switzerland): 95°C-os aktiválás 15 percig, majd 50 cikluson keresztül 95°C 10 másodperc denaturáció, 50°C 20 másodperc anelláció és 72°C 10 másodperc lánchosszabbítás. Az adatok elemzését a LightCycler 480 II rendszerrel végeztettük, mely a mintákban található DNS-tartalmat áttörési pontban (Ct) jeleníti meg. A Ct azt a ciklus számot jelenti, melynél a termék mennyisége eléri a detektálási küszöböt. A VZV- és RNázP-specifikus primerek hatékonyságát és dinamikai tartományát oly módon határoztuk meg, hogy hígítási sort készítettünk az izolált DNS-ből, majd a PCR-reakciót követően ábrázoltuk a ΔCt ($Ct_{VZV} - Ct_{RNázP}$) értékeket a hígítási értékek logaritmusának függvényében és a kapott pontokra egyenest illesztettünk. Az egyenes meredeksége a 0-hoz közelített, ezért megállapíthattuk, hogy a VZV- és RNázP-specifikus primer rendszerek hatékonysága és dinamikája hasonló, így a komparatív Ct módszert alkalmazhatjuk az eredmények számolásánál. A VZV-DNS-tartalom emelkedését ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) az adott időpontban vett mintákban a 0. időponthoz képest a következő képlet segítségével számoltuk ki: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{VZV} - Ct_{RNázP})_{X. \text{ időpontban}} - (Ct_{VZV} - Ct_{RNázP})_{0. \text{ időpontban}}$ (Livak KJ, 2001).

4.1.4. Immunválasz mérése különböző VZV-vakcinák alkalmazását követően

Csoportonként 4-6 tengerimalacot immunizáltunk az élő gyengített vagy inaktivált formájú oltóanyag 399- vagy 1995-PFU-dózisával i.d.- vagy s.c.-módon. Oltatlan állatokat használtunk kontrollként. Négy héttel a vakcinációt követően az állatokat altatással eutanáziában részesítettük, majd vér és lép mintákat vettünk, kivéve 6 állatot, melyek az inaktivált vakcina 399-PFU-dózisát kapták i.d.-módon. Ez a 6 tengerimalac 23 héttel később kapott egy újabb oltást melynek dózisa, formája, beadási módja az első oltással megegyezett. Ezzel vizsgáltuk az ismételt oltás hatékonyságát inaktivált oltóanyag esetében. A celluláris immunválasz a VZV-antigénnel stimulált lépsejtekből mért IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés megállapításával

és a lépsejt felülúszójában mért IFN- γ -fehérje mennyiségének meghatározásával jellemeztük. A humorális immunválaszt VZV-glikoprotein-specifikus ELISA-val és vírusneutralizációs módszerrel mértük.

4.1.4.1.VZV-antigén előállítás és lépsejtek stimulálása

A lépsejtek stimulálásához használt antigén előállítása korábban leírt módon történt (Harper DR, 1998), kisebb módosítással: 28 napos Hartley tengerimalac embrió fibroblaszt sejtjeit az élő gyengített vírustartalmú vakcinával fertőztük, majd inkubáltuk szövettenyésztő palackban 10% inaktivált tengerimalac savót tartalmazó RPMI 1640-es tápfolyadékban (Sigma, St Louis, MO). Citopátiás hatás a fertőzést követő 3. napon vált láthatóvá, amely az 5. napra a sejtek 60-70 %-ra ráterjedt. A fertőzést követő 5. napon 10% inaktivált tengerimalac savót tartalmazó foszfát-szukróz-glutamát pufferben lekapartuk a szövetet. A sejtuszuspenzió egy kisebb részéből IF-vizsgálatot végeztünk VZV-pozitív humán savó felhasználásával. A maradék sejtuszuspenzióban a sejteket jeges vízben történt hűtés közben, ultrahang segítségével feltártuk. A művelethez használt Vibracell 72434 ultrahangos készülékkel 3x15 másodpercig kezeltük a sejtuszuspenziót. Az így kapott szuszpenziót 4°C-on 3000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk, majd a kapott felülúszót -80°C-ra lefagyasztottuk. A stimuláció napján a felülúszót felolvasztottuk, majd a fehérjetartalmának mérését (BCA protein assay kit Pierce Cat.23225) követően 2×10^6 lépsejtet 10 $\mu\text{g/ml}$ fehérjetartalmú VZV-antigén preparátummal stimuláltunk 24 órán keresztül.

4.1.4.2.RNS-izolálás és reverz-transzkripció

A stimulált lépsejtekből a totál RNS-t RNeasy Plus kit, valamint az RNase-Free DNase kit segítségével tisztítottuk a gyártó előírása alapján (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Az 50 μl RNáz-mentes vízben eluált totál RNS-t és a Transcriptor First Strand cDNA synthesis kitet használva szintetizáltunk mRNS-ből cDNS-t, a gyártó leírása alapján (Roche, Mannheim, Germany). Az így elkészült cDNS-t felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.1.4.3. IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel

A qRT-PCR-kivitelezését korábban leírt (4.1.3.2.) qPCR-szerint végeztük, azonban mintánként 2,5 μ l cDNS-t mértünk a csövekbe, illetve a ciklusoknál az anelláció 60°C-on történt. Az IFN- γ -primerek és próba szekvenciái egy korábban közölt publikációból származnak (Kawahara M, 2002). Az IFN- γ -forward primer szekvenciája 5' - CAT GAA CAC CAT CAA GGA ACA AAT - 3'; reverse primer szekvenciája, 5' - TTT GAA TCA GGT TTT TGA AAG CC - 3'; a próba szekvenciája pedig FAM - TTC AAA GAC AAC AGC AGC AAC AAG GTG C - TAMRA) volt. A granzim-B (GenBank accession no. XM_003460665.1) és perforin (XM_003473749.1) primerek és próba szekvenciáit mi terveztük, a PCR-termék nukleotid sorrendjének megfelelőségét szekvenálással igazoltuk. A granzim-B forward primer szekvenciája 5' - TCC AGA GGG AAC ATA CCC AG - 3'; reverse primer szekvenciája, 5' - GTA AGA GTT CCT CAC ACT TCT C - 3'; a próba szekvenciája pedig FAM - CAC TGC AGG AAG TGG AGA TGA TAG T - TAMRA) volt. A perforin forward primer szekvenciája 5' - CAG CAG AAG AGG CCC AAT GA - 3'; reverse primer szekvenciája, 5' - TGG ACA ATG GTC ACC GTC AG - 3'; a próba szekvenciája pedig FAM - TGC CAC GGC TCA GCA GTC ATC ACC - TAMRA) volt. Referenciaként ismét az RNázP-gént használtuk. A keletkezett termékek hossza minden esetben kisebb volt 150 bázispárnál. Az IFN- γ -, granzim-B-, perforin- és RNázP-specifikus primerek hatékonyságát és dinamikai tartományát meghatároztuk a 4.1.3.2. résznél leírtak szerint. A hígítási értékek logaritmusában ábrázolt Δ Ct értékek alkotta pontokra illesztett egyenes meredeksége ez esetben is a nullához közelített, így itt is a komparatív Ct módszert alkalmaztuk az eredmények kiértékeléséhez. A méréseket minden esetben 3 párhuzamossal végeztük. Az adott célgén (IFN- γ , granzim-B, perforin) mRNS-kifejeződésének emelkedését ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) az immunizált állatból származó mintákban az immunizálatlan állatból származó mintához képest, a következő képlet segítségével számoltuk ki: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{Célgén}} - Ct_{\text{RNázP}})_{\text{Immunizált állat}} - (Ct_{\text{Célgén}} - Ct_{\text{RNázP}})_{\text{Nem immunizált állat}}$ (Livak KJ, 2001).

4.1.4.4. IFN- γ -fehérje koncentráció mérése stimulált lépsejtek felülúszójában ELISA-módszerrel, korreláció az IFN- γ -mRNS-kifejeződés és az IFN- γ -fehérje szint között

Az IFN- γ -fehérje szint és az mRNS-kifejeződés korrelációjának vizsgálata céljából a lépsejtek stimulálását két párhuzamossal végeztük. A stimulált lépsejtek felülúszóját az ELISA-kit (Guinea Interferon γ ELISA kit; BlueGene Biotech, Shanghai, China) gyártójának utasításai szerint vizsgáltuk. A minták optikai denzitását (OD) 450 nanométeren ELISA-lemez leolvasóval (PR 3100; Bio-Rad, Budapest, Magyarország) mértük. Pearson módszerrel meghatároztuk a korrelációt a stimulált lépsejtekben kifejeződött IFN- γ -mRNS és a lépsejtek felülúszójában mérhető IFN- γ -fehérje szint között. mRNS szempontjából reaktívnek vettük azt a mintát, melyben az IFN- γ -mRNS-kifejeződés 10x nagyobb volt, mint a nem immunizált állat mintájában mért IFN- γ -mRNS. Fehérje szempontjából azt a mintát tekintettük reaktívnek, melyben az IFN- γ -fehérje koncentráció (pg/ml) magasabb volt, mint a nem immunizált állat mintájában mért fehérje koncentráció + 3 interkvartilis terjedelem (IQR).

4.1.4.5. VZV-specifikus ellenanyagok mérése az immunizált állatok savójában, VZV-glikoprotein-specifikus ELISA- és vírusneutralizációs-módszerrel

Csoportonként 4-6 állat különböző hígítású savójában, két párhuzamos mérésével határoztuk meg a VZV-glikoprotein-specifikus IgG-ellenanyag szintet. A vizsgálathoz nagy tisztaságú VZV-glikoproteinnel fedett ELISA-lemezt (EUROIMMUN anti-VZV glycoprotein ELISA kit; EUROIMMUN Ag, Lübeck, Germany), torma-peroxidázzal konjugált anti-tengerimalac IgG-ellenanyagot (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) és tetrametilbenzidin- H_2O_2 -szubsztrátot használtunk. Az OD-értékeket 450 és 620 nm-en mértük. Az adott savóban mért ellenanyag szintet azon legnagyobb hígítás reciprok értékében adtuk meg, melyben a háttér korrekció után az OD-értéke meghaladta a 0,2-es küszöb értéket. Ennek a küszöbértéknek a megállapításához 10 oltatlan állat savóját használtuk, ezek párhuzamos mérésével megállapítottunk egy átlag OD-értéket, melyhez a standard deviáció háromszorosát hozzáadva állapítottuk meg a 0,2-es küszöbértéket. A negatív kontroll savók OD-értéke minden esetben kisebb volt

0,05-nél. A neutralizáló ellenanyagszint meghatározása a már korábban leírt (Keller PM, 1984), de itt kis mértékben módosított plakk-redukciós neutralizációs próbával történt. A VZV-vakcina előállítására MRC-5-sejteken történik, így a vakcina tartalmazhat MRC-5-fehérjéket, amelyek ellenanyagválaszt indukálnak az immunizált állatokban. Ezért a vizsgálat megkezdése előtt az MRC-5-sejtek elleni ellenanyagok mérésének elkerülése érdekében a tengerimalac savókat MRC-5 -ejtekkel kimerítettük. A kimerített tengerimalac savókból hígítási sort készítettünk, majd 10% komplement jelenlétében azonos térfogatú VZV-vakcina hígítással összekevertük és 37°C-on 1 órán át inkubáltuk. A VZV-vakcina hígítása úgy lett kiszámítva, hogy az infektív vírusszámuk 45-50 PFU volt. Az inkubációt követően az ellenanyag-vírus keveréket MRC-5-sejt monolayer-t tartalmazó 8-lyukú szövettenyésztő lemezekre (Asahi Glass Co. Ltd., Tokyo, Japan) pipettáztuk. Az 5. napon IF-módszerrel, VZV-nukleokapszid specifikus egér monoklonális- (Anti-VZV / Varicella Zoster Virus Antibody LS-C76850, Lifespan Biosciences, USA), valamint FITC-jelzett anti-egér ellenanyag (Bartels VRK Anti-Mouse IgG F(ab')₂ FITC Conjugate B1029-86B, Trinity Biotech, USA) használatával megszámláltuk a képződött plakkokat. Ellenanyag titerként a savónak azt a legnagyobb reciprok hígítási értékét tekintettük, amely a plakkok számát 50%-kal csökkentette.

4.1.5. Statisztikai elemzések

Minden statisztikai számítást a Microsoft Excel 2007 rendszerrel végeztünk. Az eredmények közötti eltérések, szignifikanciák számolásához Mann-Whitney tesztet, a korrelációs koefficiens meghatározásához Pearson tesztet használtunk.

4.2. Influenza vakcináció védő hatása hemagglutinin és neuraminidáz szempontjából heterológ vírustörzssel végzett fertőzéssel szemben; celluláris és humorális immunválaszok

4.2.1. Kísérleti állatok

Nőstény 6-8 hetes nem beltenyésztett NMRI (Országos Epidemiológiai Központ, Budapest) és beltenyésztett Balb/c (Charles River Research Models and Services, Germany GmbH) egereket használtunk a kísérletekhez.

4.2.2. Alkalmazott vakcinák és vírusok

Az immunizáció a Fluval AB- (2014/2015) vakcinát (Omninvest Kft., Magyarország) alkotó vírustörzsekkel történt, melyek a következők: H1N1 A/California/07/2009-szerű NYMC X-179A reasszortáns törzs (min. 15 µg HA); H3N2 A/Texas/50/2012-szerű NYMC X-223A reasszortáns törzs (min. 15 µg HA); B/Massachusetts/2/2012 vad típusú törzs (min. 15 µg HA). Az A/California/07/2009-szerű NYMC X-179A reasszortáns törzsnek a HA, NA és PB1 génjei a H1N1 pandémiás A/California/07/2009 törzsből (A(H1N1)pdm09), míg egyéb belső génjei a H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) vírustörzsből származnak. A vakcinában a három vírustörzs formalinnal inaktivált formáját (TIV), adjuvánsként pedig alumínium-foszfátot használtunk (National Institute of Pharmacy and Nutrition, Hungary, 2015). Az egerek immunizálásához az alumínium-foszfáttal adjuvált trivalens inaktivált vakcina (TIV+Al vagy Fluval AB) mellett, a következő összetételű kontrollokat használtuk: adjuváns nélküli TIV-et (TIV), alumínium-foszfátot és Freund adjuvánst tartalmazó TIV-et (TIV+Al+F), formalinnal inaktivált egerhez adaptált PR8-törzset (PR8), inaktivált és alumínium-foszfáttal adjuvált PR8-törzset (PR8+Al), valamint PBS-t tartalmazó vakcinákat. Minden vírust tojásban szaporítottunk. A tojás fertőzését követően 48 óra múlva az allantoisz folyadékban megmértük a vírushatóanyagát hemagglutináció vizsgálattal (Klimov A 2003), valamint a fertőzőképességét Madin-Darby canine kidney (MDCK) sejteken (Klimov A 2012). A challenge fertőzésnél alkalmazott élő H1N1 A/Puerto Rico/8/34 vírust és a lépesejtek stimulálásához használt élő H1N1 A/California/07/2009 szerű

NYMC X-179A reassortáns törzset, az influenzavírus törzskollekcióból a Nemzeti Influenza központ Referencia laborja (Országos Epidemiológiai Központ, Budapest) biztosította.

4.2.3. Immunizáció

4.2.3.1. Aktív immunizáció és challenge fertőzés

NMRI egerek immunizálása, immunsavó nyerése passzív immunizálás céljából, challenge fertőzés:

Száznyolc NMRI egeret 6 csoportban (18 egér/csoport) i.m.-an oltottunk három alkalommal, az oltások között 3 hetes szünettel. A vakcinák összetétele alapján a következő csoportokat állítottunk össze:

1. TIV; 45 µg HA- (vírus törzsenként 15 µg) tartalmú vakcina
2. TIV+Al; alumínium-foszfáttal adjuvált TIV-vakcina mely megfelel a Fluval AB-vakcinának
3. TIV+Al+F; Freund adjuvánsal kombinált TIV+Al-vakcina
4. PR8; inaktivált PR8 vírus vakcina, 15 µg HA-tartalommal
5. PR8+Al; alumínium-foszfáttal adjuvált PR8-vakcina
6. PBS

Az utolsó oltás után 2 héttel, csoportonként 5 egértől altatást követően szívpunkcióval vért vettünk. A savókban meghatároztuk az egyedi egerek HAG-titerét a vakcinában található 3 vírustörzs ellen, majd a savók csoportonkénti összemérését követően a savókeverékek HAG-, NAG- és VN-titereit a reassortáns A/California- illetve a PR8-vírustörzs ellen. A savópoolokat 0,5 ml-enként szétosztva -80°C-on tároltuk. A savókeverékek használtuk a későbbiekben a passzív immunizálási kísérletekhez. A csoportonként megmaradt 13 egeret ketamin és xylazin (Bayer Animal Health, Germany) összetételű altatószerrel elaltattuk, majd intranazálisan fertőztük 50 µl, 5 LD₅₀ tartalmú élő PR8-vírussal. Az LD₅₀ meghatározása korábbi kísérletben történt, 1:4000-es HA-titerű PR8-vírus különböző hígításait (1:500, 1:5000, 1:10000, 1:50000) használva. A fertőzést követő 6. napon csoportonként 3 egeret elaltattunk és a tüdejükben meghatároztuk a vírusedményiséget. A csoportonként megmaradt 10 állatnál

naponta súlyt mértünk. A fertőzés napján (0. nap) mért súlyt vettük 100 százaléknak és ehhez viszonyítottuk a továbbiakban mért értékeket. Az állatok klinikai állapotát pontszámokkal is értékeltük:

0 pont – nincsenek klinikai tünetek

1 pont – felborzolt szőrzet

2 pont - felborzolt szőrzet, passzív viselkedés

3 pont - felborzolt szőrzet, passzív viselkedés, összegömbölyödött testtartás

4 pont - felborzolt szőrzet, teljes válaszképtelenség, összegömbölyödött testtartás

Amennyiben a súlyvesztés elérte a 30 százalékot, az állatot eutanáziában részesítettük, ketamin – xylazin összetételű altatószerrel.

NMRI egerek immunizálása, celluláris immunválasz:

10 NMRI egeret háromszor oltottunk TIV+AI-vakcinával a 0., 4. és 8. héten. Pozitív kontroll nyerése céljából további 10 egeret a 0. és 4. héten TIV+AI-vakcinával, majd a 8. héten TIV+AI+F-tartalmú vakcinával immunizáltuk. Negatív kontrollként 6 egeret PBS-sel oltottunk. A 9. héten az állatokat elaltattuk, a lépüket feldolgoztuk és áramlási citometriával vizsgáltuk.

Balb/c egerek immunizálása, immunsavó nyerése passzív immunizáció céljából, celluláris immunválasz:

Balb/c egerek 3 csoportját az előbb felsorolt TIV+AI-; TIV+AI+F- és PBS-tartalmú vakcinákkal oltottuk 3 alkalommal, 3 hetes időközökkel. A TIV+AI+F-oltóanyagot pozitív, a PBS-tartalmú oltóanyagot pedig negatív kontrollként használtuk. A 3. oltást követő 14. napon az egereket elvéreztettük, csoportonként savókeveréket készítettünk, majd a keverékek HAG-, NAG- és VN- titerét meghatároztuk és passzív immunizálási kísérletekhez használtuk. Az egerek lépét az IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés méréséhez használtuk.

4.2.3.2. Passzív immunizáció és challenge fertőzés

Az egerek aktív immunizálását követően keletkezett savókeverékeket használtuk passzív immunizációhoz. NMRI egerek esetében állatonként 300 μ l, Balb/c egerek esetében 100-200 μ l savót egészítettünk ki 500 μ l-re PBS-el, majd intraperitoneális injekcióval kezeletlen, recipiens egerekbe juttattuk. A savó transzfert követően 24 óra

múlva a recipiens egereket elaltattuk, a retroorbitális plexusból vért vettünk, majd intranazálisan fertőztük 50 µl, 5 LD₅₀ tartalmú élő PR8-vírussal. A recipiens egerekből származó savók HAG-titerét meghatároztuk, majd összehasonlítottuk a donor savók titerével. A fertőzést követően az állatoknál 18 napon keresztül naponta súlyt mértünk és az állapotukat pontszámokkal is értékeltük az előző bekezdésnél (4.2.3.1.) leírtak szerint.

4.2.4. Hemagglutináció gátlás, Neuraminidáz gátlás, Vírusneutralizáció

Az egérsavókban a vírus hemagglutinin ellen termelt antitestek mennyiségét a korábban leírt standard HAG-módszerrel vizsgáltuk, csirke vörösvérsejt szuszpenziót használva (Klimov A 2003).

A savók vírus neuraminidáz gátló titerét szintén már leírt módszerrel határoztuk meg (Lambre CR 1990).

A savók vírusneutralizációs vizsgálatát MDCK-sejteket használva végeztük 96 lyukú sejttenyésztő lemezen lyukanként 100 TCID₅₀ mennyiségű vírussal (World Health Organization, 2010). A vírusok méréséhez, csirke vörösvérsejt szuszpenziót használva a standard heagglutinációs vizsgálatot választottuk (Klimov A 2003).

4.2.5. Vírusmennyiség meghatározása fertőzött egerek tüdejében

Az aktív immunizálásban részesített egereknél csoportonként 3 egér tüdejét kivettük a fertőzést követő 6. napon. A tüdőt lemértük, RPMI-1640 tápfolyadékban, kvarchomok felhasználásával homogenizáltuk, majd centrifugálást követően a felülúszóból hígítási sort készítettünk. A hígítási sort MDCK-sejt monolayeren, 96 lyukú sejttenyésztő lemezre tettük. A tápfolyadék 2 µg/ml mennyiségben tartalmazott TPCK-tripszint (Sigma), mely szükséges a HA-fehérje aktivációjához. Hetvenkét órás inkubációt követően a sejttenyésztő lemezen a citopátiás elváltozást mutató lyukakat megszámloltuk, majd a vírusmennyiséget és a TCID₅₀ értéket meghatároztuk. A vírustitert TCID₅₀/g tüdő értékben fejeztük ki (Sgarbanti R 2011, Reed LJ 1938).

4.2.6. Áramlási citometria

NMRI egereket háromszor oltottunk TIV+Al- vagy TIV+Al+F-tartalmú vakcinával, illetve negatív kontrollként PBS-el. Az utolsó oltást követő 7. napon kivettük az állatok lépét, feldolgoztuk és a lépsejt szuszpenziót 48 lyukú lemezre tettünk. Lyukanként 2×10^6 sejtet élő H1N1 A/California/07/2009 szerű NYMC X-179A reasszortáns törzsszel (2 MOI) stimuláltuk 24 órán keresztül. A stimulálás utolsó 12 órájára Brefeldin A-t (Beckton Dickinson, USA) adtunk a rendszerhez, 1 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban a fehérje transzport gátlása céljából. A különböző sejtpopulációk azonosítására fluorokrómmal jelölt monoklonális ellenanyagokat használtunk, melyek a következők voltak: CD3-FITC, CD4-PerCP, CD8-PE, IFN γ -Alexa Fluor és Granzim-B-eFluor (eBioscience, USA). FACS Calibur (Beckton Dickinson, USA) készülékkel 5000-10000 élő sejtet leszámolva CELLQuest pro software segítségével határoztuk meg a pozitív sejtek arányát.

4.2.7. IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel

Oltott (TIV+Al vagy TIV+Al+F vagy PBS) Balb/c egerekből a harmadik oltás után 14 nappal kivettük a lépét, majd az előző fejezetben (4.2.6.) leírtak szerint a lépsejt szuszpenziót stimuláltuk, brefeldin A nélkül. A qRT-PCR kivitelezése a 4.1.4.3. pontban leírtak szerint történt, kisebb módosításokkal. Az alábbiakban csak a módosításokat említjük.

Az mRNS-ek átírása cDNS formába RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, UK) alkalmazásával történt a gyártó utasításai szerint. Az általunk használt IFN- γ -primereket és próbát korábban közölték (forward primer, 5'-GAT ATC TGG AGG AAC TGG CAA AA-3'; reverse primer, 5'-CTT CAA AGA GTC TGA GGT AGA AAG AGA TAA T-3'; próba, FAM-TGG TGA CAT GAA AAT CCT GCA GAG CCA-TAMRA) (Lin W 2005). A granzim-B (GenBank accession no. NM_013542.2) primereket és próbát mi terveztük; forward primer, 5'-CCA TCG TCC CTA GAG CTG AG-3'; reverse primer, 5'-GGA CAG AGC TGG TCC TTG TG-3'; próba, FAM-AGG ACT GCA AAG ACT GGC TTC ATG TCC-TAMRA. A granzim-B primerek által amplifikált PCR-termék nukleotid sorrendjének megfelelőségét

szekvenálással igazoltuk. Az adatok normalizálásához a peptidil-prolil izomeráz (PPIA) háztartási gént használtuk, melyhez a primereket és próbát korábban közölték; forward primer: 5'- GGCCGATGACGAGCCC -3'; reverse primer: 5'- TGTCTTTGGAAC TTTGTCTGCAA -3'; próba, FAM-TGGGCCGCGTCTCCTTCGA -TAMRA (RTPrimerDB 2015). Az adott célgén (IFN- γ , granzim-B) mRNS-kifejeződésének emelkedését ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) az immunizált állatból (TIV+AI vagy TIV+AI+F) származó mintákban a PBS-tartalmú vakcinával oltott állatból származó mintához képest, a következő képlet segítségével számoltuk ki: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{Célgén}} - Ct_{\text{PPIA}})_{\text{TIV+AI; TIV+AI+F}} - (Ct_{\text{Célgén}} - Ct_{\text{PPIA}})_{\text{PBS}}$ (Livak KJ, 2001).

4.2.8. Statisztikai elemzések

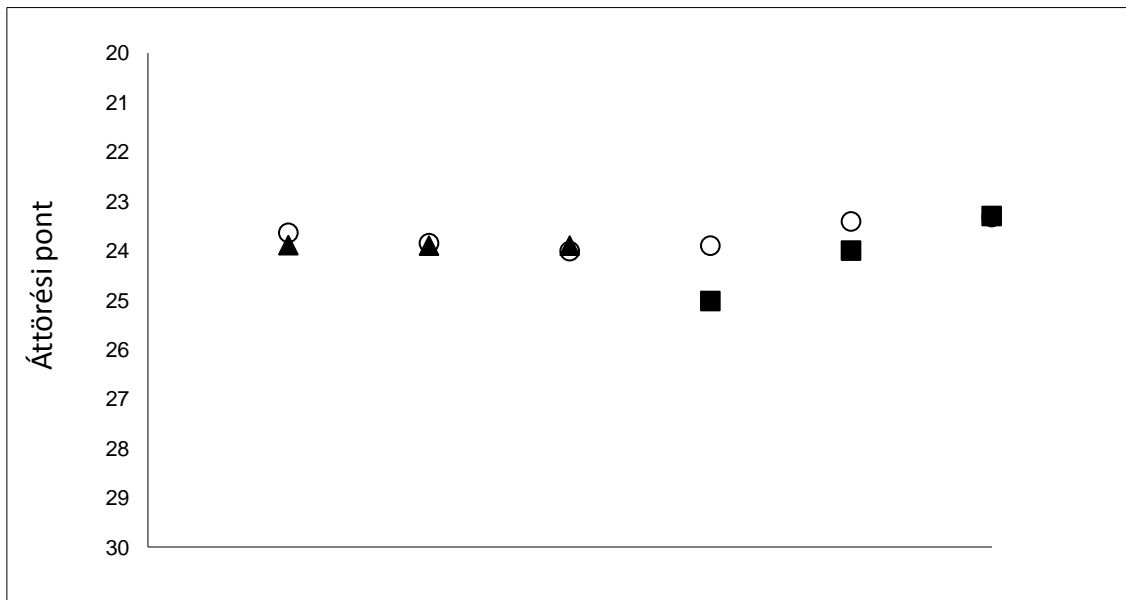
Minden statisztikai számítást a Microsoft Excel 2007 rendszerrel végeztünk. A testsúly és a klinikai pontszám esetében is az egyes megfigyelési napokon kapott értékekből görbe alatti területet (AUC) számoltunk, majd a kapott AUC-értékeket minden egyes állatnál összegeztük és a statisztikai számításnál ezekkel az összegzett AUC-értékekkel kalkuláltunk. A fertőzést követően elhullott állatoknál az utolsó értéket továbbvittük a megfigyelési idő végéig, így számolva ezekben az esetekben az összegzett AUC-t. Az eredmények közötti eltérések, szignifikanciák számolásához Mann-Whitney tesztet használtunk, a korrelációs koefficiens meghatározásához Pearson tesztet.

5. Eredmények

5.1. VZV-vakcináció immunológiai hatása intradermális alkalmazás esetén

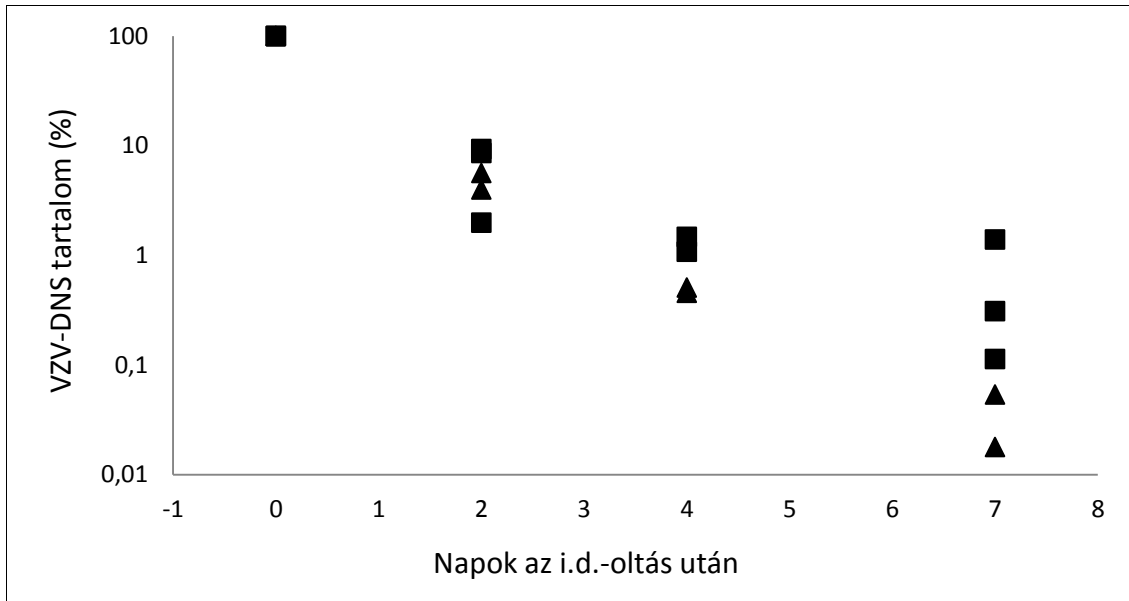
5.1.1. VZV-DNS tartalom változása tengerimalac bőrbioopszia mintákban, az intradermális oltást követően

Az i.d.-oltáshoz használt készülék megbízhatóságának megállapítására tengerimalacok két csoportját oltottuk i.d.-módon és vizsgáltuk a VZV-DNS bőrben történő kimutathatóságát az oltást követő különböző időpontokban. Az egyik csoportot az élő gyengített (13 db tengerimalac), a másik csoportot az inaktivált (11 db tengerimalac) 399-PFU vírust tartalmazó VZV-vakcinával oltottuk, majd bőrbioopszia mintákat vettünk azonnal az oltás után (0. nap), valamint a 2., 4., 7. és 14. napokon. Hat tengerimalactól közvetlenül az oltás után vett bőrmintákban a VZV-DNS és RNázP referencia gén DNS-mennyisége hasonló volt, függetlenül attól, hogy élő-, vagy inaktivált vírussal voltak-e oltva az állatok; a legnagyobb eltérés is kevesebb volt két ciklus értéknél (3. ábra).



3. ábra VZV- és RNázP-DNS (○) tartalom bőrbioopszia mintákban, közvetlen a 399-PFU-dózisú élő (■), vagy inaktivált (▲) vírust tartalmazó vakcina i.d.-oltása után (0. nap).

Az oltást követően minden választott időpontban 2-3 tengerimalac bőrmintájának feldolgozása után megállapítottuk, hogy a VZV-DNS tartalom idővel csökkent a mintákban. A 4. és 7. napon a VZV-DNS mennyisége magasabb volt az élő vírussal oltott állatok mintáiban az inaktivált vírussal oltottakéhoz képest, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns ($p > 0,05$) (4. ábra). A 14. napon a VZV-DNS-tartalom nagyon alacsony volt minden mintában. Ezt az időpontot nem ábrázoltuk.



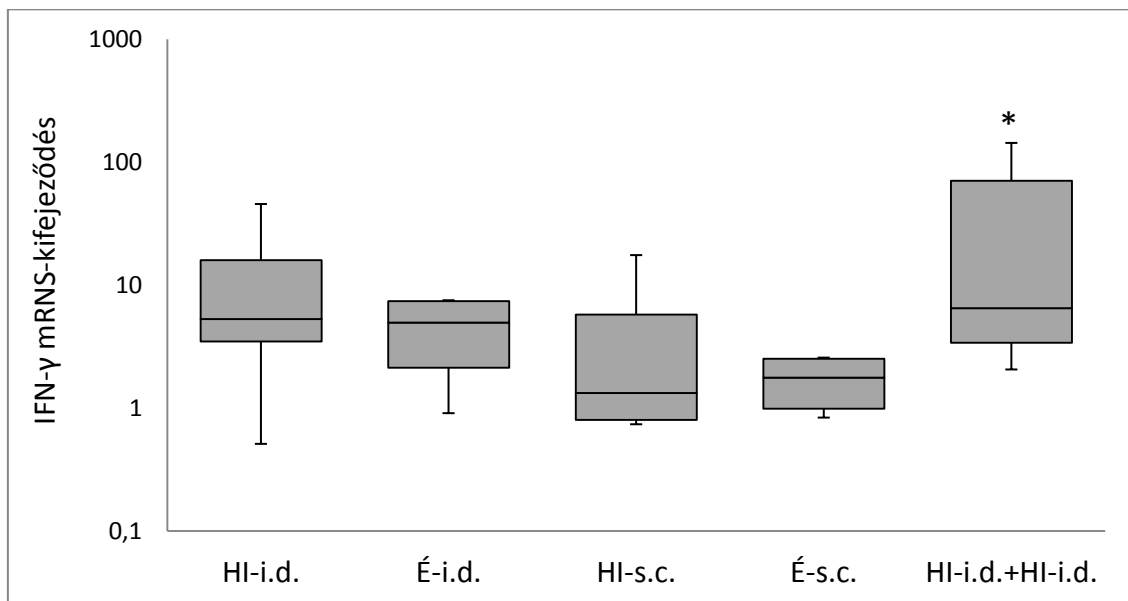
4. ábra Bőrszövet minták VZV-DNS tartalmának időbeni változása az i.d.-oltást követően.

Az értékek a 0. időpont százalékában vannak kifejezve. Egyik időpontban sincs szignifikáns különbség az élő (■), illetve inaktivált (▲) oltóanyag között.

Az eredmények azt mutatják, hogy az oltáshoz használt készülék megbízható, i.d.-vakcinációra alkalmas. Az így bejuttatott élő vírustartalmú vakcina esetében a 4. és 7. napon kismértékű replikációt figyelhettünk meg.

5.1.2. IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés változása tengerimalac lépsejtékben 399-PFU-dózisú élő vagy hővel inaktivált VZV-vírus tartalmú oltóanyaggal történt vakcinációt követően és az ismételt oltás hatása 399-PFU-dózisú inaktivált VZV-vakcina esetében

A sejtes immunválasznak fontos szerepe van a látens VZV-reaktivációjában, ezért vizsgáltuk az IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződést élő és inaktivált vakcinával történt, i.d.- és s.c.-oltást követően. IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés szempontjából nem találtunk különbséget a 399-PFU-dózisú élő vagy hasonló dózisú inaktivált vakcinák illetve i.d.- vagy s.c.-oltási módok között, azonban az inaktivált vakcina ismételt i.d. oltása szignifikánsan ($p = 0,004$) megemelte az IFN- γ -mRNS-kifejeződést az oltatlan állatok eredményéhez képest; az egyszeri inaktivált i.d.-oltáshoz képest ez az emelkedés már nem bizonyult szignifikánsnak ($p > 0,05$) (5. ábra). Granzim-B és perforin esetében az ismételt oltás sem emelte meg szignifikánsan az mRNS-kifejeződést az oltatlan állatok eredményeivel összehasonlítva.



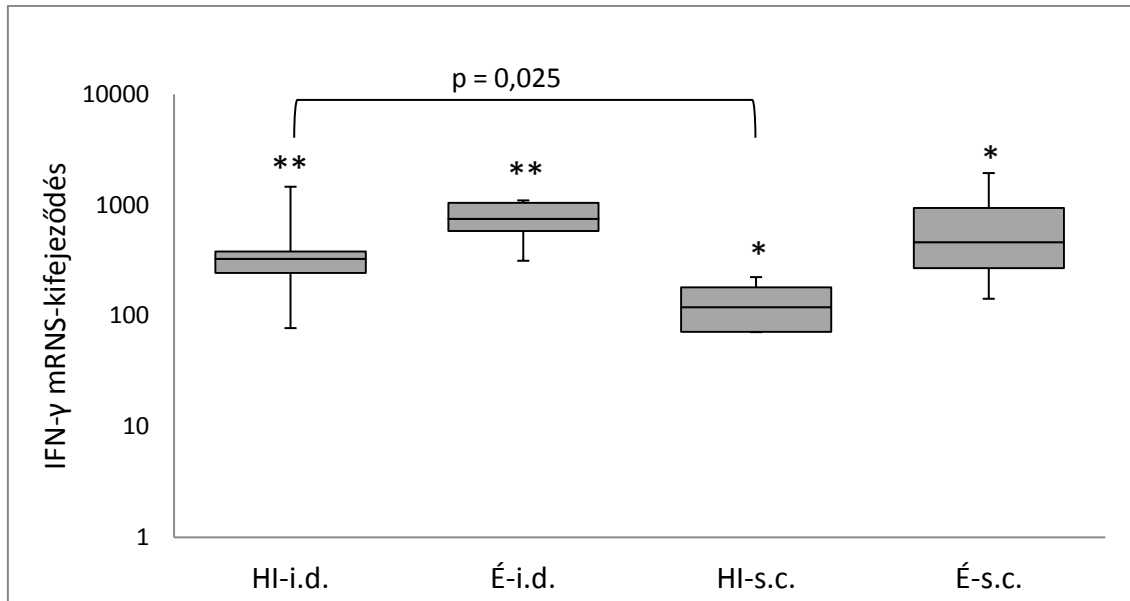
5. ábra IFN- γ -mRNS-kifejeződése tengerimalacok *in vitro* stimulált lépsejtjeiben.

Csoportonként 4-6 állatot oltottunk 399-PFU-dózisú élő (É) vagy hővel inaktivált (HI) vírust tartalmazó VZV vakcinával i.d.- vagy s.c.-módon. Az állatokat négy héttel az oltást követően altatással megöltük és a lépeket feldolgoztuk. Az ábrán az oltatlan állatok eredményeihez viszonyított IFN- γ -mRNS-kifejeződés látható, az oltatlan állatok

medián értékét 1-nek tekintettük. Az értéktömb alsó és felső határa az értékek 25-75%-os tartományát adja meg, a tömbön belüli vízszintes vonal pedig a medián értéket. Az értéktömbön túlnyúló jelölőkkel a maximum és minimum értékeket adtuk meg. Csillaggal jelöltük az oltatlan állatok eredményéhez képest szignifikáns ($p = 0,004$) IFN- γ -mRNS-kifejeződést az inaktivált vírustartalmú vakcinával i.d.-módon kétszer oltott állatok esetében.

5.1.3. IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés változása *in vitro* tengerimalac lépsejtekben 1995-PFU-dózisú élő- vagy inaktivált- VZV-vírustartalmú vakcinával intradermális vagy szubkután módon történt oltást követően

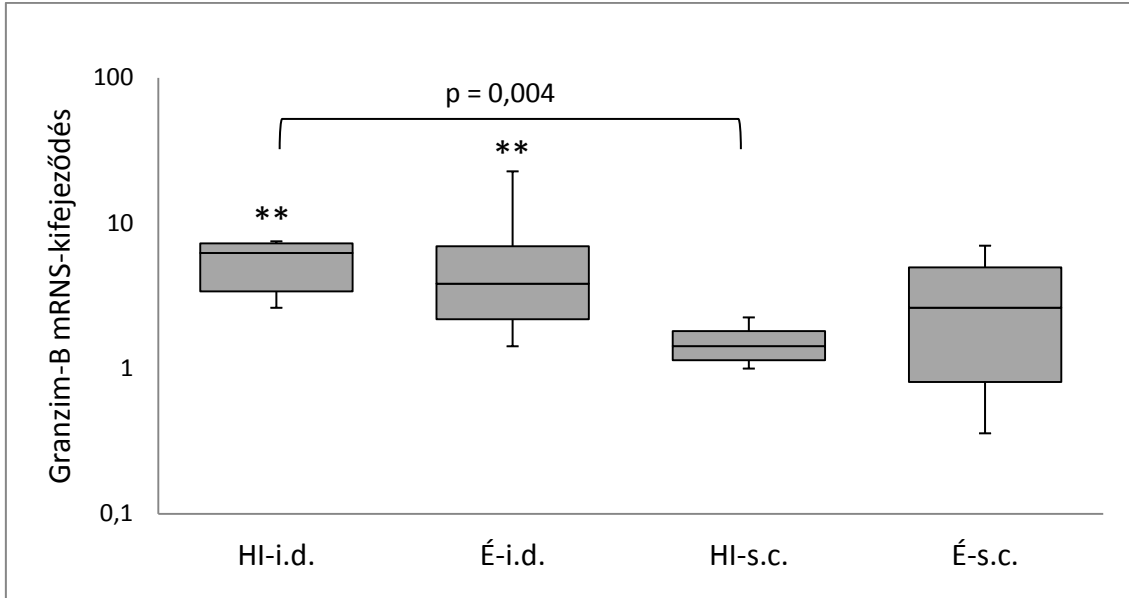
Csoportonként 4-6 állatot oltottunk, az állatokat négy héttel az oltást követően altatással megöltük és a lépeket feldolgoztuk. A 399-PFU-dózis alkalmazásától eltérően az 1995-PFU-dózisú vakcina használata után az IFN- γ -mRNS-kifejeződés minden oltott csoportban szignifikánsan magasabb volt, az oltatlan állatokhoz viszonyítva, azonban a szignifikancia foka erősebb volt az i.d.- ($p = 0,005$) oltottaknál, mint az s.c.- ($p = 0,05$) oltottak csoportjánál (6. ábra). Az élő vakcina mindkét (i.d., s.c.) esetben magasabb IFN- γ -választ eredményezett, mint az inaktivált vakcina, de ez a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns. Fontos megfigyelés, hogy az inaktivált vakcinával i.d.-módon oltott állatoknál szignifikánsan magasabb IFN- γ -mRNS-kifejeződést értünk el, mint s.c.-úton oltottaknál ($p = 0,025$).



6. ábra IFN- γ -mRNS-kifejeződés az i.d.- vagy s.c.-módon, 1995-PFU-dózisú hővel inaktivált (HI) vagy élő (É) vírust tartalmazó VZV-vakcinával immunizált tengerimalac lépsejtekből, *in vitro* stimulálást követően.

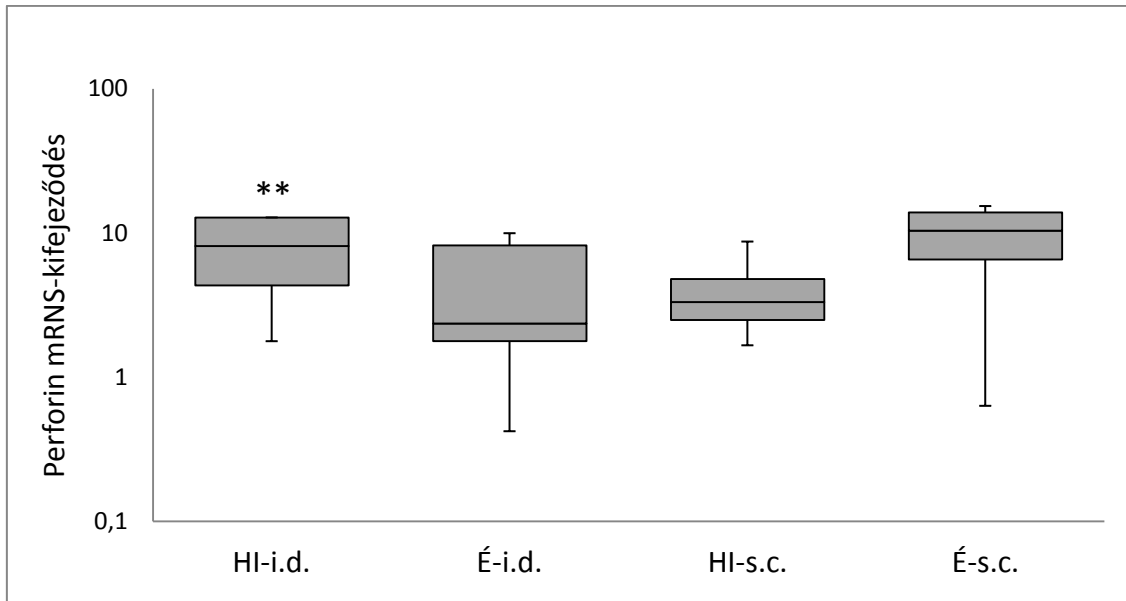
Az oltatlan állatok medián értékét 1-nek tekintettük. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

A granzim-B mRNS-kifejeződés az oltatlan állatoknál kapott értékekhez képest csak az i.d.-módon immunizált állatoknál volt szignifikánsan magasabb ($p = 0,005$), a s.c.-oltott tengerimalacok esetében nem (7. ábra). Hasonlóan az IFN- γ eredményhez, az inaktivált vírustartalmú oltóanyag esetében a granzim-B mRNS-kifejeződés szignifikánsan magasabb volt az i.d.-vakcinációs útnál az s.c.-úthoz képest ($p = 0,004$).



7. ábra Granzim-B mRNS-kifejeződés az i.d.- vagy s.c.-módon, 1995-PFU-dózisú hővel inaktivált (HI) vagy élő (É) vírust tartalmazó VZV-vakcinával immunizált tengerimalac lépsejteken, *in vitro* stimulálást követően. ** $p < 0,005$.

A perforin mRNS-kifejeződés csak az inaktivált oltóanyaggal i.d.-módon oltott állatoknál volt szignifikánsan magasabb ($p = 0,005$), mint a nem immunizált állatoknál (8. ábra).



8. ábra Perforin mRNS-kifejeződés az i.d.- vagy s.c.-módon, 1995-PFU-dózisú hővel inaktivált (HI) vagy élő (É) vírust tartalmazó VZV-vakcinával immunizált tengerimalac lépsejtekből, *in vitro* stimulálást követően. ** $p < 0,005$.

5.1.4. IFN- γ -fehérje koncentráció mérése *in vitro* stimulált tengerimalac lépsejtekből, 1995-PFU-dózisú élő vagy hővel inaktivált VZV-vakcinával intradermális vagy szubkután módon történt oltást követően, korreláció az IFN- γ -mRNS-kifejeződés és IFN- γ -fehérje szint között

Mivel az mRNS-kifejeződésből nem tudunk feltétlenül következtetni a fehérje termelés mértékére, ezért a stimulált lépsejtek felülúszójában ELISA-módszerrel megmértük az IFN- γ -fehérje mennyiségét. Ahogy az mRNS-kifejeződés esetében, úgy a fehérje termelés is szignifikánsan magasabb volt minden oltott csoportban, az oltatlanhoz képest ($p < 0,05$) (2. táblázat). A hővel inaktivált i.d.-immunizált csoportnál szignifikánsan magasabb volt az IFN- γ -mRNS-kifejeződés a s.c.-oltottakhoz képest (6. ábra), azonban fehérje esetében - bár szintén magasabb értékeket kaptunk - a különbség nem volt szignifikáns. A korreláció számításánál a Pearson tesztet alkalmaztuk a 2. táblázatban feltüntetett szempontok alapján. Az IFN- γ mRNS illetve fehérje reaktív állatokat összehasonlítva erős pozitív korreláció tapasztaltunk. A korrelációs koefficiens értéke 0,88 volt.

2. táblázat. 1995-PFU-dózisú hővel inaktivált vakcinával i.d.- vagy s.c.-módon oltott, illetve élő vakcinával s.c.-módon oltott tengerimalacok stimulált lépsejtjeiben mért IFN- γ -mRNS és -fehérje termelődés közötti korreláció.^a

Vakcina	IFN- γ -fehérje pg/ml medián (tartomány; IQR)	IFN- γ -fehérje- reaktív állat szám/összes állatszám	IFN- γ mRNS- kifejeződés növekedése medián (tartomány; IQR)	IFN- γ mRNS- reaktív állat szám/összes állatszám
HI-i.d.	291 (264-328; 18) ^b	5/5	326 (77-1461; 137) ^c	6/6
HI-s.c.	273 (209-300; 73) ^b	5/5	119 (71-223; 109) ^{b,d}	5/5
É-s.c.	353 (273-401; 42) ^b	4/4	461 (142-1941; 674) ^b	4/4
N	154 (145-163 ;9)	NA ^e	1	NA

^a IFN- γ -mRNS illetve -fehérje reaktív állatok kritériumának leírása a Módszerek részénél (4.1.4.4.) található. HI, hővel inaktivált; É, élő; N, nem immunizált állatok

^b $p < 0,05$ a nem immunizált állatokhoz viszonyítva.

^c $p < 0,005$ a nem immunizált állatokhoz viszonyítva.

^d $p < 0,05$ i.d. vakcinációhoz viszonyítva.

^e NA, nem alkalmazható

5.1.5. VZV-glikoprotein-specifikus és vírus-neutralizáló ellenanyag szint változása, élő vagy hővel inaktivált VZV-vakcinával i.d.- vagy s.c.-módon történt immunizálást követően

A VZV-glikoprotein-specifikus ellenanyagok termelődését minden oltott csoportnál megvizsgáltuk ELISA alapú módszerrel (3. táblázat). Az 1995-PFU-dózissal immunizált állatok által termelt VZV-glikoprotein-specifikus ellenanyag titerek között nem volt szignifikáns különbség, még a legmagasabb értéket elért É-s.c.-immunizált állatok eredményeihez viszonyítva sem. A hővel inaktivált vakcina i.d.-oltva magasabb

ellenanyag szintet eredményezett 399- és 1995-PFU-dózis esetében is, mint s.c.-oltva, de ez a különbség egyik dózis esetében sem bizonyult szignifikánsnak. Az 1995-PFU-dóziót tartalmazó hővel inaktivált vakcina i.d.-módon adva szignifikánsan magasabb ellenanyagszintet eredményezett, mint ugyanezen vakcina egyszeri ($p < 0,005$) illetve kétszeri 399-PFU-dózisa ($p < 0,05$). Kétszer i.d.-oltott 399-PFU-dózisú hővel inaktivált vakcina szignifikánsan magasabb ellenanyagszintet hozott létre az egyszeri oltáshoz képest ($p < 0,005$). Az 1995-PFU-dózissal immunizált állatok által termelt neutralizáló ellenanyagok között – hasonlóan a VZV-glikoprotein-specifikus ellenanyagokhoz – nem volt szignifikáns különbség. A 399-PFU-dózissal immunizált állatoknál nem volt mérhető neutralizáló ellenanyagszint, azonban ugyanez a dózisú hővel inaktivált vakcina kétszer oltva már 1:32-es titert eredményezett (3. táblázat).

3. táblázat. VZV-gpELISA és vírusneutralizáló ellenanyag szintek az immunizált tengerimalacokban.^a

Dózis (PFU)	Vaksinák	VZV-glikoprotein-specifikus ellenanyagok végpont titerei	Neutralizáló ellenanyagok titerei
399	HI-i.d.	200	<4
	HI-s.c.	168	<4
	É-i.d.	159	<4
	É-s.c.	425	4
	HI-i.d. + HI-i.d.	21 544 ^b	32
1995	HI-i.d.	131 950 ^{b, c}	128
	HI-s.c.	83 255	64
	É-i.d.	100 000	80
	É-s.c.	263 901	138

^a A VZV-glikoprotein elleni ellenanyagok titere a savó legnagyobb hígításának a reciprok értéke, amelynél az OD-értéke még nagyobb volt mint 0,2. A neutralizáló ellenanyagok titereként a savó legnagyobb hígításának a reciprok értékét adtuk meg, amely a plakkok számában legalább 50%-os csökkenést eredményezett. HI, hővel inaktivált; É, élő.

^b $p < 0,005$ a 399-PFU-dózissal egyszer (HI-i.d.) immunizált állatokhoz viszonyítva.

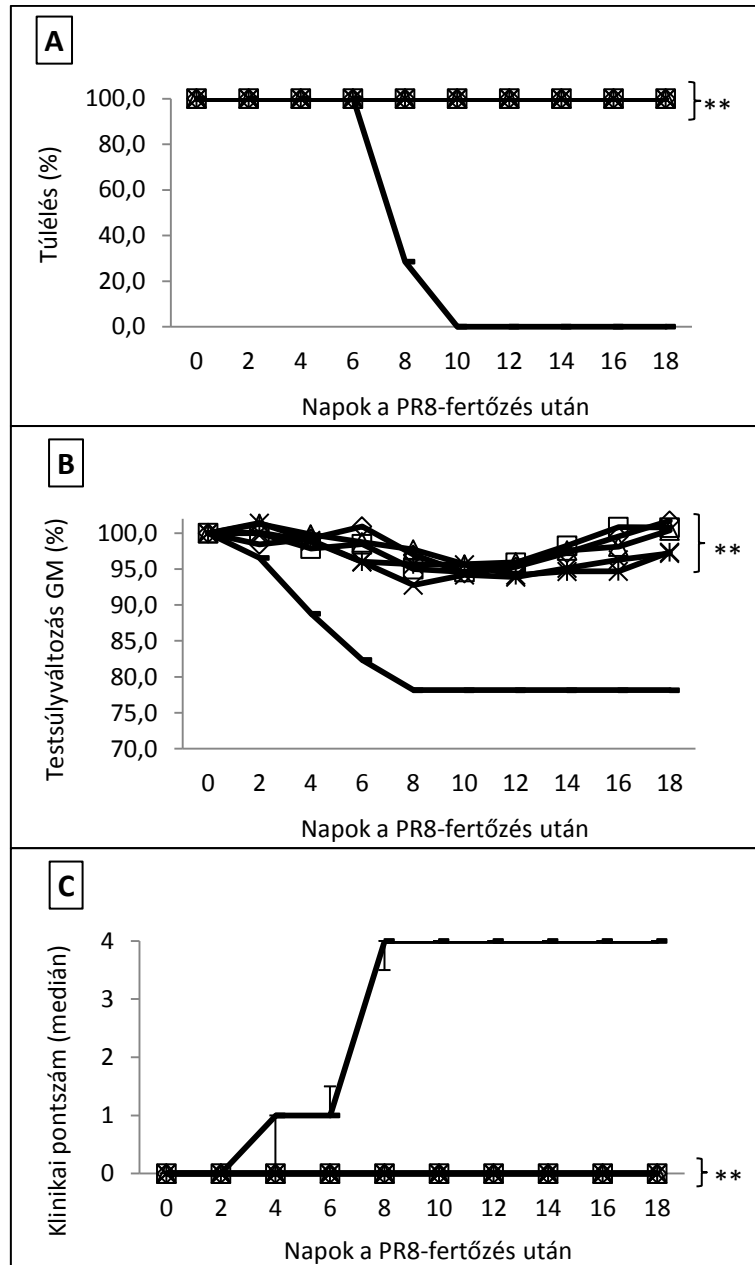
^c $p < 0,05$ a 399-PFU-dózissal kétszer (HI-i.d. + HI-i.d.) immunizált állatokhoz viszonyítva.

5.2. Influenza vakcináció védőhatása a hemagglutinin és neuraminidáz szempontjából heterológ vírustörzssel szemben

5.2.1. TIV+AI- (Fluval AB) vakcina védőhatása NMRI egerekben, egérhez adaptált PR8-vírus letális dóziséval történt fertőzéssel szemben

NMRI egereket immunizáltunk, majd fertőztünk 5LD₅₀ dózisú egérhez adaptált PR8-törzssel, a Módszerek 4.2.3.1. részénél leírtak szerint. A PBS-el oltott állatok mind elpusztultak 10 napon belül a PR8-fertőzést követően. Az összes többi állat, függetlenül a vakcina összetételétől, túlélte a fertőzést (9. ábra A). Ezen állatoknál az alacsony morbiditást jelzi, hogy a testsúlyváltozás 7%-on belül volt (9. ábra B), szignifikáns különbség nélkül ($p > 0,05$), valamint a klinikai pontszámok (9. ábra C) nem emelkedtek 0 fölé a PR8-vírus-törzssel történt fertőzést követően. Azonban mind a testsúlyváltozásnál, mind pedig a klinikai pontszámok esetében szignifikáns különbség volt a PBS-sel oltott és a különböző vakcinákkal immunizált állatok között ($p < 0,01$).

A fertőzött állatok tüdejében meghatároztuk a fertőzésre használt PR8-törzs szaporodását. A fertőzést követő 6. napon eltávolított tüdő mintákban a PR8-tartalmú vakcinákkal immunizált egerek esetében nem volt detektálható fertőző vírus. A TIV-, TIV+AI- és TIV+AI+F-immunizált egerek tüdejében hasonló volt a fertőző vírus partikulák mennyisége, $3,7 \pm 0,4 - 4,4 \pm 0,2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$, statisztikai különbség nélkül ($p > 0,05$). A PBS-sel oltott egerek tüdejében ez az érték ($5,1 \pm 0,3 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$) szignifikánsan magasabb volt a különböző TIV-tartalmú vakcinákkal immunizált állatok eredményeihez viszonyítva ($p < 0,05$).



9. ábra A TIV+AI-immunizáció védelmet biztosított az NMRI egerekben az A/PR/8/34 (H1N1)-vírusfertőzéssel szemben.

A csoportok jelölése: TIV- (ж), TIV+AI- (×), TIV+AI+F- (Δ), PR8- (□), PR8 +AI- (◇), PBS-immunizált egerek (-). A védőoltás háromszori alkalmazását követően az egereket 5 LD₅₀ PR8-vírussal fertőztük. A fertőzést követő százalékos túléléseket (A), a testsúlyváltozások geometriai átlag (GM) értékeit (B) és a klinikai pontszámok medián értékeit (C) ábrázoltuk. A C ábrán a hibasávok az interkvartilis tartományt jelölik.

** $p < 0,01$ a szignifikancia mértéke, az összes immunizált csoportban a PBS-oltott csoporthoz viszonyítva, túlélés, testsúlyváltozás és klinikai pontszámok tekintetében.

5.2.2. TIV+Al-vaksinával oltott egerek savójának védőhatása egér adaptált PR8-vírus letális dóziséval szemben

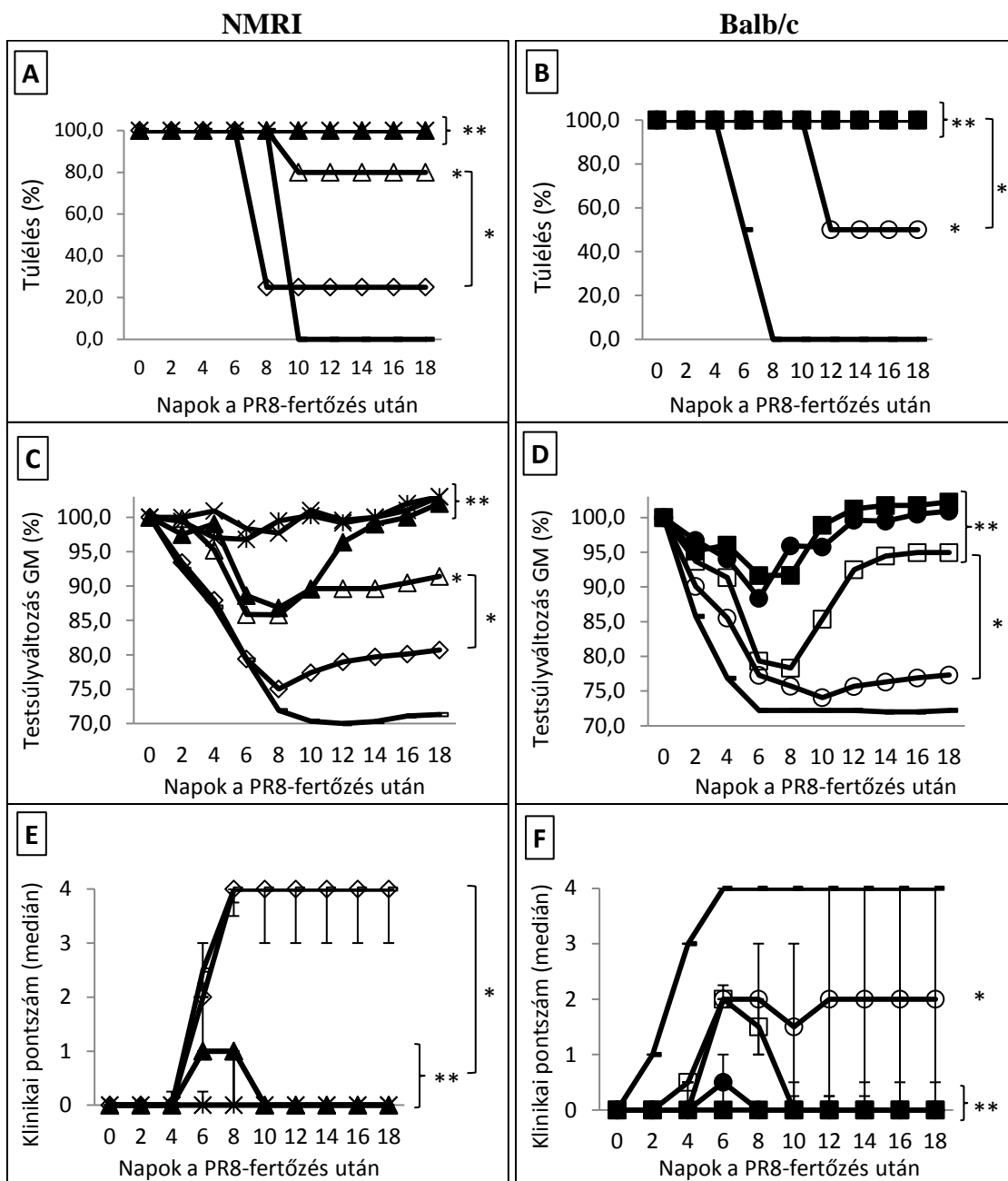
A munka célja volt, hogy megvizsgáljuk milyen mértékben játszott szerepet a humorális immunválasz, az előzőekben ismertetett, különböző összetételű vakcinákkal aktív immunizálásban részesült állatok védelmében. A kísérletekben az NMRI mellett a Balb/c egértörzset is bevontuk, annak vizsgálatára, hogy a passzív immunizálás védőhatása több egértörzsen érvényesül-e és annak mi a mechanizmusa. Aktív immunizálásban részesült NMRI és Balb/c egerek savóit oltottuk i.p.-módon NMRI (300 µl savó/egér) és Balb/c (100 – 200 µl savó/egér) naiv recipiens egerekbe, majd fertőztük az állatokat a PR8-törzs letális dóziséval. A továbbiakban a recipiens egereket „(r)” jelzéssel látjuk el. Így megkülönböztetünk (r)PR8, (r)PR8+Al, (r)TIV+Al+F, (r)TIV+Al, (r)TIV és (r)PBS recipiens egereket, melyeket a PR8- vagy PR8+Al- vagy TIV+Al+F- vagy TIV+Al- vagy TIV- vagy PBS-oltott donor egerek savóival inokuláltunk i.p. a challenge fertőzés előtt.

A letális dózisé PR8 vírussal történt fertőzés után 100%-ban életben maradtak az (r)PR8, (r)PR8+Al, (r)TIV+Al+F ($p < 0,01$), 80%-ban az (r)TIV+Al ($p < 0,05$) és 20%-ban az (r)TIV ($p = 0,174$) NMRI egerek. Az (r)PBS NMRI egerek mind elpusztultak. Az (r)TIV egereknél a túlélés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az (r)TIV+Al ($p = 0,047$) egereknél (10. ábra A). A Balb/c csoportban 100%-ban túléltek a PR8-fertőzést a 100 vagy 200 µl savót kapott (r)TIV+Al+F és a 200 µl savót kapott (r)TIV+Al egerek. A 100 µl savót kapott (r)TIV+Al Balb/c egerek esetében ez a védelem csak 50%-os volt ($p = 0,021$), az (r)PBS egerekhez viszonyítva ($p < 0,01$). A 100 vagy 200 µl savót kapott (r)TIV+Al Balb/c egerek között a túlélés szignifikánsan különbözött ($p = 0,025$) (10. ábra B).

A betegség súlyosságát jelző testsúlycsökkenés szignifikánsan alacsonyabb volt az (r)PR8, (r)PR8+Al, (r)TIV+Al+F ($p = 0,009$), valamint az (r)TIV+Al ($p = 0,028$) NMRI egereknél, az (r)PBS egerekhez viszonyítva (10. ábra C). Az (r)TIV állatok esetében a testsúlycsökkenés megközelítette az (r)PBS egerekét ($p = 0,117$), valamint szignifikánsan súlyosabb volt, mint az (r)TIV+Al egereknél mért értékek ($p = 0,047$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az immunválasz humorális komponensei, melyek a TIV-vakcina alumínium-adjuvánssal történő kombinálása eredményezett, nem

csak a túlélés növelésében, de a betegség súlyosságának mérséklésében is nagy szerepet játszanak (10/A és C ábrák). A Balb/c egereknél mért testsúlycsökkenés (10. ábra D) a 100 vagy 200 μ l savóval oltott (r)TIV+Al+F, valamint a 200 μ l savóval oltott (r)TIV+Al egereknél szignifikánsan kisebb volt, mint az (r)PBS egerek testsúlycsökkenése ($p = 0,0017$). Hasonlóan a túlélési eredményekhez (10. ábra B), a 100 μ l savóval oltott (r)TIV+Al Balb/c egerek esetében a testsúlycsökkenés is megközelítette az (r)PBS egereknél mértet (10. ábra D) és szignifikánsan magasabb volt, mint a 200 μ l savóval oltott (r)TIV+Al egerek esetében ($p = 0,035$).

A fertőzést követő 6. nap után az állatok állapotát jelző klinikai pontszámok az (r)TIV és (r)PBS NMRI egereknél magasak (4 pont) voltak, az (r)TIV+Al+F (1-2 pont) és az (r)PR8, valamint az (r)PR8+Al (0 pont) egerekhez viszonyítva. Az (r)TIV+Al NMRI egereknél az egyedi klinikai pontszámok eltérőek voltak (1-4 pont) a csoporton belül. A pontszámok tekintetében az (r)PR8, (r)PR8+Al, (r)TIV+Al+F valamint az (r)TIV+Al szignifikánsan különbözött az (r)PBS NMRI egerektől (10. ábra E). Hasonlóan a túlélési (10. ábra A) és testsúlycsökkenési (10. ábra C) eredményekhez, a klinikai pontszámok (10. ábra E) esetében is szignifikáns a különbség az (r)TIV és (r)TIV+Al csoportok között ($p = 0,028$). A klinikai pontszámok a 0- vagy 100%-os védettséget elért NMRI és Balb/c egereknél hasonlóan alakultak. A 300 μ l savóval oltott (r)TIV+Al NMRI, valamint a 200 μ l savóval oltott (r)TIV+Al Balb/c egereknél a pontszámok medián értéke a 10. nap után 0-ra csökkent, azonban a 100 μ l savóval oltott (r)TIV+Al Balb/c egereknél ez az érték a megfigyelési periódus végéig 2 maradt, széles interkvartilis tartománnyal. Ez a csoporton belüli nagy eltérés jelzi, hogy a 100 μ l savóval oltott (r)TIV+Al Balb/c egereknél nagyobb számú állat érte el a magas klinikai pontszámot (4), mint az előző két csoport esetében (10/E és F ábrák).



10. ábra TIV-specifikus immunsavó védelmet biztosított PR8-fertőzéssel szemben, NMRI és Balb/c egerekben.

Csoportok jelölése:

NMRI recipiens egerek (r), melyek 300 μ l savót kaptak aktívan immunizált donor NMRI egerektől: \diamond (r)TIV; Δ (r)TIV+Al; \blacktriangle (r)TIV+Al+F; \times (r)PR8; \times (r)PR8+Al; - (r)PBS

Balb/c recipiens egerek (r), melyek 200 μ l savót kaptak aktívan immunizált donor Balb/c egerektől: \square (r)TIV+Al; \blacksquare (r)TIV+Al+F; - (r)PBS;

Balb/c recipiens egerek (r), melyek 100 µl savót kaptak aktívan immunizált donor Balb/c egerektől: ○ (r)TIV+AI; ● (r)TIV+AI+F.

A fertőzést követő százalékos túléléseket (A és B), a testsúlyváltozások geometriai átlag (GM) értékeit (C és D) és a klinikai pontszámok medián értékeit (E és F) ábrázoltuk. Az E és F ábrákon a hibasávok az interkvartilis tartományt jelölik.

A csillag jelölések szignifikáns különbséget jelentenek az (r)PBS csoporthoz viszonyítva.

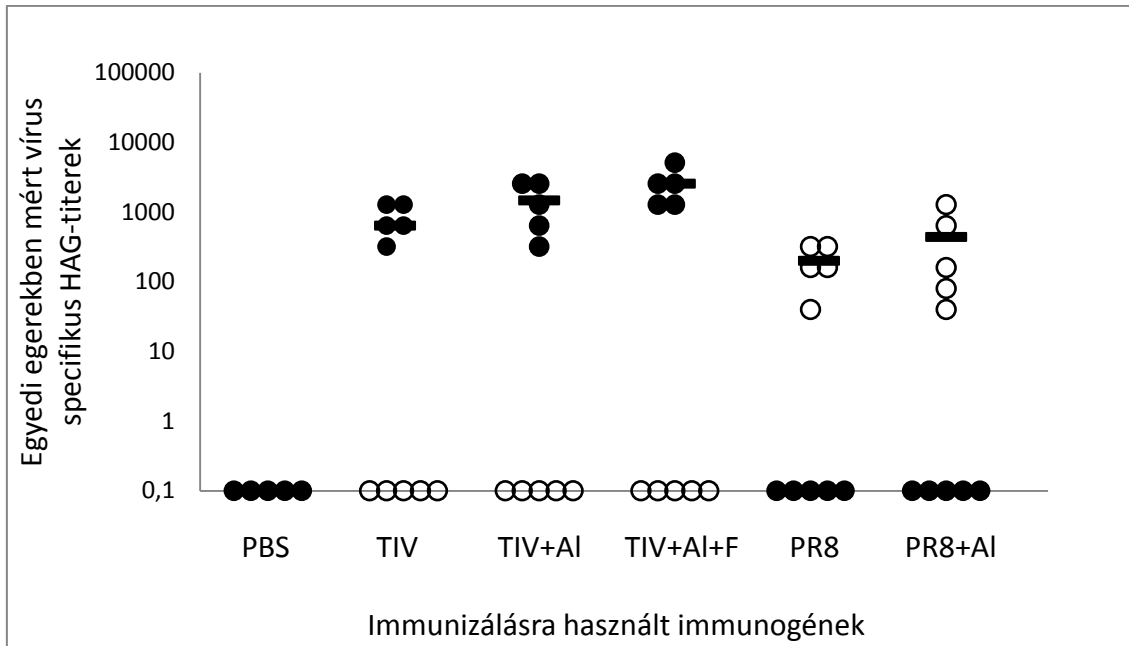
** jelölésnél a szignifikancia mértéke: $p < 0,01$

* jelölésnél a szignifikancia mértéke: $p < 0,05$

Külön jelöltük a szignifikáns különbséget (* $p < 0,05$) NMRI egerek esetében az (r)TIV+AI és (r)TIV csoportok között a százalékos túlélésre, a testsúlyváltozásra és a klinikai pontszámokra vonatkozóan, Balb/c egerek esetében pedig a 100 és 200 µl savót kapott (r)TIV+AI egereknél a százalékos túlélésre, a testsúlyváltozásra vonatkozóan.

5.2.3. A HAG-, NAG- és VN-aktivitástól független savó komponensek védő hatása

A passzív immunizációs kísérlet során tapasztalt védőhatás mechanizmusának vizsgálata céljából, a transzferhez használt savókat megvizsgáltuk HAG-, NAG- és VN-tesztekkel. Először megvizsgáltuk egyedi egerekben a TIV három vírustörzsével szembeni, valamint a fertőzéshez használt PR8-vírus törzssel szembeni HAG-ellenanyag szinteket. A különböző kombinációjú TIV-immunizált egerekben (TIV, TIV+AI, TIV+AI+F) mindhárom vakcinatörzssel szemben tudtunk ellenanyagot detektálni ($\geq 1:40$), azonban a PR8-törzssel szemben nem. Ehhez hasonlóan, a PR8-tartalmú vakcinákkal immunizált egerekben a PR8-elleni HAG-ellenanyag volt detektálható ($\geq 1:40$), a vakcina törzsekkel szembeni azonban nem. Tehát HAG-ellenanyag szempontjából - keresztreakció a kétféle H1N1 (A/California/7/2009 (H1N1)-szerű reassortáns és A/PR/8/34 (H1N1) vírustörzs között (11. ábra).



11. ábra HAG-ellenanyag szempontjából nincs keresztreakció az A/PR/8/34 (H1N1) és az A/California/7/2009 (H1N1)-szerű reasszortáns influenzavírus törzsek között.

○ A/PR/8/34 (H1N1) elleni HAG-titer; ● A/California/7/2009 (H1N1)-szerű reasszortáns elleni HAG-titer.

Miután az egyedi egerektől származó savókból csoportonként savó keveréket készítettünk, megvizsgáltuk ezeket is HAG-, NAG- és VN-tesztekkel. Ahogy az egyedi savóknál, úgy a savó keverékeknél sem találtunk keresztreakciót a kétféle H1N1 törzs között HAG-teszttel, de ugyanerre az eredményre jutottunk NAG- és VN-tesztekkel is (4. táblázat). A passzív immunizációhoz NMRI egereknél 300 μ l, Balb/c egereknél 100-200 μ l savót használtunk. 24 órával a savó transzfer után a recipiens egerektől vett mintákban is megmértük a HAG-ellenanyag szintet. Az NMRI recipiens egerekben 16-21x, a Balb/c recipiens egerekben 8-32x alacsonyabb volt a HAG-titer, mint a donor savó keverékben. Azokban a recipiens egerekben, ahol magas volt az A/California reasszortáns vakcinatörzs-elleni HAG-ellenanyag szint (egyedi NMRI recipiens egerek geometriai átlag titere: 126-253; Balb/c recipiens egerek savó pool titere: 160-320), ott az egerek 80-100%-a túlélte a fertőzést, annak ellenére, hogy a PR8-törzs elleni HAG-ellenanyag nem volt kimutatható az egerekben. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a savó HAG-, NAG- és VN-elleni ellenanyagoktól független komponensei fontos szerepet játszottak a PR8-fertőzéssel szembeni védelemben. Amennyiben feltételezzük,

hogy egy inaktivált teljes vírust tartalmazó vakcinával történő immunizációt követően a különböző vírusfehérjék elleni antitestek arányosan termelődnek, akkor a védelemben fontos szerepet játszó nem HAG- (és nem NAG-, illetve VN-) ellenanyagok mennyisége a HAG-ellenanyag szinttel együtt változik, azzal korrelál. A feltevést alátámasztja, hogy a recipiens NMRI és Balb/c egerek eredményeit együttesen vizsgálva, a korrelációs koefficiens a védettség és HAG-titer esetében 0,77; testsúlycsökkenés és HAG-titer esetében pedig 0,71. Ez a pozitív korreláció azt sugallja, hogy a homológ törzs elleni magas HAG-titer bizonyos fokú védelmet jelez egy heterológ vírussal történő fertőzés esetén, de a HAG-ellenanyagok valószínűleg nem játszanak szerepet a vírus elleni védekezésben.

4. táblázat Ellenanyag szintek a passzív immunizációhoz használt donor savókban és a recipiens egerekben; a recipiens egerek védettsége (túlélés %-a) a challenge fertőzés után.

A donorok esetében a passzív immunizációhoz használt savó keverékekben mértük meg a HAG-, NAG- és VN-ellenanyag szinteket. NMRI egereknél 300 µl, Balb/c egereknél 200 µl (++) vagy 100 µl (+) savó poolt használtunk egerenként. NMRI recipiens egerek esetében az egyedileg mért HAG-titerek geometriai átlagát (GM), Balb/c recipiens egereknél pedig az adott csoportba tartozó recipiens egerek savó keverékének HAG-titerét adtuk meg.

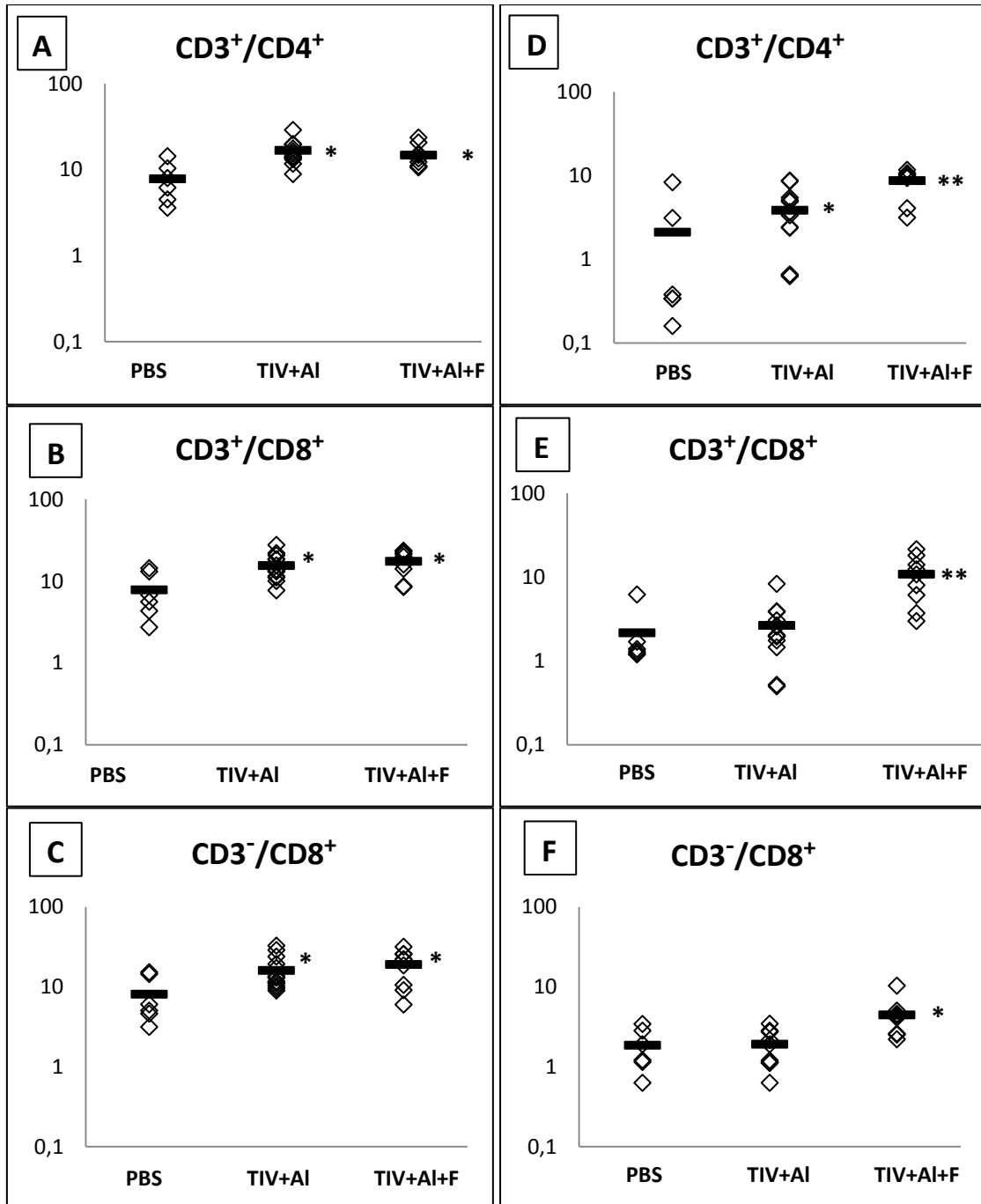
Egerek Immunogének	A/California/7/2009 (H1N1) reasszortáns törzs elleni titerek					A/PR/8/34 (H1N1) törzs elleni titerek			
	Donorok			Recipiensek		Donorok			Recipiensek
	HAG	NAG	VN	HAG	Túlélés %-a	HAG	NAG	VN	HAG
NMRI									
PBS	<10	<40	<10	<10	0	<10	<40	<10	<10
TIV	1280	2560	2560	50	25	<10	<40	<10	<10
TIV+AI	2560	>5120	3840	126	80	<10	<40	<10	<10
TIV+AI+F	5120	>5120	7680	253	100	<10	<40	<10	<10
PR8	<10	<40	<10	<10	100	320	320	1280	20
PR8+AI	<10	<40	<10	<10	100	640	640	2560	40
Balb/c									
PBS (++)	<10	ND	ND	<10	0	<10	ND	ND	<10
TIV+AI (++)	2560	ND	ND	320	100	<10	ND	ND	<10
TIV+AI (+)	2560	ND	ND	80	50	<10	ND	ND	<10
TIV+AI+F(++)	5120	ND	ND	320	100	<10	ND	ND	<10
TIV+AI+F (+)	5120	ND	ND	160	100	<10	ND	ND	<10

5.2.4. IFN- γ - és granzim-B-termelődés mérése áramlási citometriás módszerrel, TIV+AI- (Fluval AB), valamint kontrollként TIV+AI+F- vagy PBS-tartalmú vakcinával immunizált NMRI egerek *in vitro* stimulált lépsejtjeiben

A humorális mellett a sejtes immunválaszt is vizsgáltuk az alumínium-adjuvált TIV-vakcinációt követően NMRI egerekben. Kontrollként TIV+AI+F- vagy PBS-oltott egereket használtunk. A sejtes immunválaszt IFN- γ - és granzim-B-termelődés mérésével vizsgáltuk az oltott egerek lépsejtjeiben, melyeket *in vitro* stimuláltunk élő A/California reasszortáns vakcinatörzsszel. Meghatároztuk a CD3⁺/CD4⁺-helper-T-

sejtekben, a $CD3^+/CD8^+$ -citotoxikus-T-sejtekben és a $CD3^-/CD8^+$ -NK-sejtekben az IFN- γ - illetve granzim-B-termelő sejtek százalékát (12. ábra). A TIV+AI-immunizáció szignifikánsan megemelte ($p < 0,05$) az IFN- γ -termelő sejtek százalékát a $CD3^+/CD4^+$ -, $CD3^+/CD8^+$ - és $CD3^-/CD8^+$ -populációkban (12. ábra A-C), valamint a granzim-B-termelő sejtek százalékát a $CD3^+/CD4^+$ -populációban (12. ábra D), a PBS-sel oltott egerek mintáihoz képest. A TIV+AI+F-immunizált egereknél minden sejtpopulációban szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,005$) az IFN- γ - illetve granzim-B-termelő sejtek százaléka a PBS-sel oltott egerek mintáihoz képest (12. ábra A-F).

IFN- γ pozitív sejtek százaléka (GM) Granzim-B pozitív sejtek százaléka (GM)



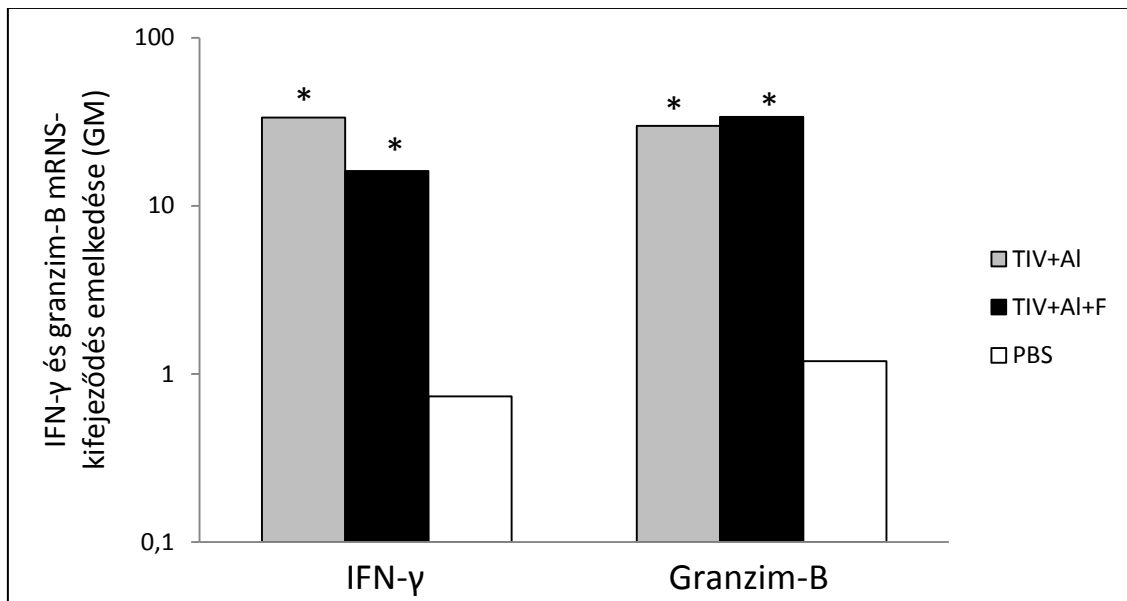
12. ábra TIV+AI- vagy TIV+AI+F- vagy PBS-oltott NMRI egerek *in vitro* stimulált lépsejtjeiben mért IFN- γ + vagy granzim-B+ sejtek százaléka a T-sejtek CD4⁺- vagy CD8⁺- populációjában, illetve az NK-sejtekben.

Immunizált NMRI egerek lépsejtjeit *in vitro* stimuláltuk élő A/California reasszortáns vírussal, vagy tápfolyadékkal, majd áramlási citometriás vizsgálattal meghatároztuk az IFN- γ vagy granzim-B termelő sejtek százalékát. A szimbólumok egyedi egereket

jelölnek. A vízszintes vonalak az adott csoport számtani átlag értékét jelölik. * $p < 0,05$ és ** $p < 0,005$ a PBS-sel oltott állatok értékéhez viszonyítva.

5.2.5. IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel, TIV+AI- (Fluval AB), valamint kontrollként TIV+AI+F- vagy PBS-tartalmú vakcinával immunizált Balb/c egerek *in vitro* stimulált lépsejtjeiben

Immunizált Balb/c egerek lépsejtjeit *in vitro* stimuláltuk élő A/California reassortáns vakcinatörzzsel és az IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződést mértük qRT-PCR-módszerrel. A stimulációt követően az IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés is szignifikánsan megemelkedett a TIV+AI- és a kontrollként használt TIV+AI+F-immunizált egerek lépsejtjeiben is ($p < 0,05$). Szignifikáns különbség a TIV+AI- és a TIV+AI+F-eredmények között sem az IFN- γ sem a granzim-B esetében nem volt ($p > 0,05$) (13. ábra).



13. ábra TIV+AI- vagy TIV+AI+F- vagy PBS-immunizált Balb/c egerek *in vitro* stimulált lépsejtjeiben mért IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés.

Az élő A/California reassortáns vírussal stimulált mintákban mért mRNS-kifejeződés emelkedését a tápfolyadékkal kezelt mintákhoz viszonyítva adtuk meg. A tápfolyadékkal kezelt mintában mért mRNS-kifejeződést 1-nek tekintettük. * $p < 0,05$ a PBS-sel oltott állatok értékéhez viszonyítva.

6. Megbeszélés

Munkánk során a VZV- és influenzavírus vakcinákkal történő immunizálás hatékonyságának növelési lehetőségeivel foglalkoztunk.

A VZV-vakcinával végzett kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy az i.d.-vakcináció milyen mértékben képes növelni az immunizálás hatékonyságát VZV-oltóanyag esetében. Az i.d.-vakcinációt embereknél a *Mycobacterium bovis*-t tartalmazó *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) oltásnál és bizonyos influenza oltóanyagoknál (Intanza, IdFlu, Fluzone) rutinszerűen alkalmazzák. Rabies oltóanyag (Verorab, Rabipur) esetében a WHO által javasolt i.d.-oltási sorozatot lehet alkalmazni (Verma R 2011), ha az adott ország (pl. India) nemzeti egészségügyi hatósága jóváhagyja (National Centre for Disease Control 2007). Egyéb vírus vakcináknál is vannak ígéretes eredmények. A humán papillomavírus vakcinákat (Cervarix, Gardasil) és az inaktivált poliovírus vakcinát i.d.-módon alkalmazva dóziscsökkenés érhető el az i.m.-alkalmazáshoz viszonyítva (Nelson EA 2013; Soonawala D 2013). A hepatitisz B vírus vakcina esetében ellentmondásos klinikai vizsgálati eredmények születtek az i.d.-alkalmazással kapcsolatban (Leonardi S 2012; Gomber S 2004). Az eredményekből készült közleményünk (Sarkadi J 2015) megjelenéséig nem volt tudomásunk a VZV-vakcina i.d.-alkalmazásáról, illetve az azt követő immunválasz méréséről, azonban egy évvel később megjelent egy közlemény, melyben az emberben s.c.-alkalmazandó *zoster* vakcina hatékonyságát párhuzamosan i.d.-alkalmazás esetén is vizsgálták. Teljes (19400-PFU) és 1/3 dózis (6467-PFU) esetében a gpELISA-ellenanyag mérésekor az i.d.-alkalmazás hatékonyabbnak bizonyult, mint az s.c. (Beals CR 2016). Az i.d.-alkalmazási móddal elérhető dózis csökkentés nagyon fontos a *herpes zoster* vakcina esetében, amelynek előállítása a vírus *in vitro* szaporításának tulajdonságai miatt nehéz és költséges. Mint már a bevezetőben említettem, a szövettenyészet felülúszójában nem lehet fertőző vírust kimutatni, továbbá a sejten belül található víruspartikulák nagy része defektív. A szövettenyészetben 4×10^4 - 10^6 defektív partikula mellett egy infektív partikula mutatható ki (Cohen JI 2008, Chen JJ 2004).

A VZV-specifikus bőrtesztet, melynél a DTH- (delayed-type hypersensitivity; késői-típusú hiperszenzitivitási) reakcióval lehet a celluláris immunválaszra következtetni, már korábban bevezették az átvészelttség vagy a vakcinációt követő immunválasz

vizsgálatára (Kamiya H 1977, Takahashi M 2003, Shiraki K 1984). Továbbá a VZV-specifikus celluláris immunválasz jellemzéseként, az oltás helyén a CD4⁺Fox3⁺-T-sejtek felszaporodását is megfigyelték (Vukmanovic-Stejic M 2013). A VZV-specifikus celluláris immunválasz jellemezhető még az immunsejtek IFN- γ -fehérje termelésének mérésével ELISPOT-módszerrel (enzyme-linked immunospot assay), áramlási citometriával (Mullane KM 2013, Svahn A 2003, Shirane R 2017) vagy ELISA-val *ex vivo* stimulált limfocitákat használva (Otani N 2012). Annak ellenére, hogy a qRT-PCR-módszer nagy érzékenységgel képes kimutatni adott gének mRNS-kifejeződésének változását (Nolan T 2006, Harrington NP 2007), eddig még nem használták a celluláris immunválasz szabályozásában fontos szerepet játszó IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződésének mérésére VZV-vakcinációt követően. Az IFN- γ az NK-, Th1- és CTL-sejtek, valamint makrofágok és a nyálkahártya epiteliális sejtjei által termelt citokin melynek direkt vírus replikáció gátló hatása mellett sokrétű immunstimuláló és -moduláló hatása is van. A granzim-B-t és a perforint az NK- és CTL-sejtek termelik. A vírussal fertőzött sejten a perforin pórust képez, melyen keresztül a sejtbe jut a granzim-B, mely egy szerin proteáz és a sejt apoptózisát indukálja.

Kísérleteink során az IFN- γ -mRNS-kifejeződésének mérésére a qRT-PCR-módszert alkalmaztunk. Az eredmények azt mutatták, hogy a teljes dózisú (1995-PFU) VZV-vakcina i.d.-oltva szignifikánsan magasabb celluláris immunválasz választ hoz létre, mint s.c.-oltva, melyet az IFN- γ -mRNS-kifejeződés emelkedésével mértünk. A kísérletben résztvevő tengerimalacok lépsejtjeinek vizsgálatakor kapott, az IFN- γ -fehérje és -mRNS-termelődésére vonatkozó Pearson féle korrelációs koefficiens értéke hasonlít, az aktív tuberkulózisban szenvedő betegeknél (Kim S 2013), valamint *M. bovis* fertőzést követően az állatokban (Harrington NP 2007) vizsgált IFN- γ -fehérje és -mRNS-termelődés vizsgálatakor kapott korrelációs koefficiens értékéhez.

VZV-specifikus-CTL, illetve egyéb granzim-B termelő immunsejtek VZV-fertőzőskor játszott szerepére vonatkozóan ellentmondásos eredményeket találhatunk az irodalomban. NK- és CD8⁺-sejtek által termelt granzim-A és -B fehérjék magasabb koncentrációban termelődtek súlyos *varicella* megbetegedésben szenvedő gyerekeknél, mint enyhébb lefolyású betegség esetében (Vossen MT 2005), míg más vizsgálatok szerint a CD8⁺-T-sejtek nem, vagy csak nagyon kis gyakorisággal voltak jelen VZV-

fertőzéskor, vagy egészséges egyének oltását követően, ellentétben a VZV-specifikus CD4⁺-T-sejtekkel (Weinberg A 2010). Más vizsgálatban viszont azt találták, hogy egészséges egyének élő gyengített *varicella* vakcinával történt oltását követően a VZV-fehérjék felismerését mind a CD4⁺-, mind a CD8⁺-T-sejtek végzik (Sharp M 1992).

VZV-fertőzéskor, vagy immunizációt követően termelődött perforin mérésére vonatkozó irodalmat nem találtunk, azonban *herpes simplex* specifikus CD4⁺-CTL-sejtekben végeztek perforin mRNS-méréseket igen. HSV-stimulálás hatására a perforin mRNS és az áramlási citometriával mért sejten belüli perforin fehérje termelés is megnövekedett a HSV-specifikus CD4⁺-CTL-sejtekben, melyek a HSV-fertőzött sejtek direkt lízisét okozzák (Yasukawa M 1999).

Vizsgálataink során az élő vagy hővel inaktivált VZV-vakcinával immunizált tengerimalac lépsejtekben fokozott granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződést mértünk, ami VZV-specifikus CTL-válaszra utal. Mások granzim-B és perforin fokozott kimutathatóságát tapasztalták CD8⁺-sejtek intracelluláris festését követően áramlási citometriás vizsgálattal emberi PBMC mintákban, melyeket a *varicella* megbetegedést követően 2 éven keresztül gyűjtöttek a vizsgálatban résztvevőktől (Vossen MT 2005). A mi vizsgálatainkban az IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés emelkedés egyik esetben sem volt szignifikánsan magasabb az élő vírussal immunizált állatokban a hővel inaktivált vírussal történő immunizációhoz viszonyítva, azonos oltási mód esetén. Az i.d.-immunizálás a legtöbb esetben magasabb mRNS-kifejeződést eredményezett, mint a s.c., azonban az emelkedés mértéke csak az IFN- γ - és granzim-B-mRNS esetében volt szignifikáns a hővel inaktivált vakcina i.d.-alkalmazásakor. A már említett emberi kipróbálás alkalmával az élő zoster vakcina i.d.-alkalmazását követően nem találták magasabbnak az IFN- γ -fehérje termelődését a s.c.-oltáshoz hasonlítva ELISPOT-vizsgálatban, de egy kisebb mintaszám áramlási citometriás vizsgálata a VZV-specifikus CD4⁺-memóriasejtek számának növekedését mutatta i.d.-oltás hatására (Beals CR 2016).

A tengerimalac bőrében található APC-k fagocitózissal veszik fel az inaktivált vakcina VZV-fehérjéit, majd az MHC-k közreműködésével aktiválják a T-sejteket, ezzel elindítva a fokozott IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződést. Vizsgálataink során nem beltenyésztett Hartley tengerimalacokat használtunk. Nem beltenyésztett állatoknál az APC-k MHC-struktúrájában eltérések lehetnek, melynek következtében

bizonyos egyedek kevésbé ismerik fel a VZV-fehérjéket és aktiválják a CD8⁺-sejteket, így gyengébb celluláris immunválaszt hoznak létre. Vizsgálataink során mi is megfigyeltünk csoporton belüli, de nem szignifikáns eltéréseket. Az MHC-től függő T-sejt válasz, fertőzést korlátozó szerepéről a VZV-vakcinával s.c.-oltott tengerimalacoknál már korábban közöltek eredményeket (Hayward AR 1991). Mindemellett a VZV-vakcina a szintén „nem beltenyésztett” emberi populáció számára készül, így hasonló vizsgálatokat nem lenne hasznos beltenyésztett állatokon végezni.

A VZV-specifikus ellenanyagok szerepe a vírus reaktivációjában, illetve a *zoster* betegség kifejlődése esetén elhanyagolható, azonban elsődleges fertőzéskor fontos. Ezt igazolja, hogy az anyai ellenanyagok, valamint a VZV-specifikus ellenanyagok passzív átvitele a frissen fertőzött egyénbe védelmet nyújt a fertőzést követően a súlyosabb betegség kialakulásával szemben (Pinquier D 2011, Koren G 2002). Ezért a vakcinációval elérhető magas ellenanyag szint hasznos nem csak a csökkent értékű, de az egészséges immunállapotú egyéneknél is. A *varicella* megbetegedéssel szembeni védelem megállapítására gyakran a vírus membrán antigénjei elleni ellenanyagot mérik IF-módszerrel, melynek szintje korrelál a neutralizáló ellenanyagok szintjével (Breuer J 2008), ez pedig korrelál a VZV-gpELISA-módszerrel meghatározott értékekkel (Krah DL 1997). Vizsgálataink szerint a VZV-gp-specifikus ellenanyagok minden oltott tengerimalacnál kimutathatóak voltak. A hővel inaktivált kis dózisú (399-PFU) vakcina ismételt oltása szignifikánsan ($p < 0,005$) megemelte a VZV-gp-specifikus ellenanyag szintet az egyszeri oltáshoz képest, a teljes dózissal (1995-PFU) elért ellenanyag szint pedig még az ismételt oltáshoz viszonyítva is szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,05$). A neutralizáló ellenanyagok szintje összhangban állt a gpELISA-eredményekkel, ahogyan azt már korábbi vizsgálatoknál is megállapították (Krah DL 1997). Fontos megállapításunk volt, hogy a hővel inaktivált vakcina i.d.-alkalmazása szignifikánsan erősebb celluláris immunválaszt váltott ki a s.c.-oltáshoz viszonyítva, azonban az ellenanyag szinteknél ezt a szignifikanciát nem tudtuk kimutatni.

Az i.d.-alkalmazott hővel inaktivált VZV-vakcina hasznos lehet sérült immunrendszerrel rendelkező felnőttek és gyermekek oltására, illetve az idősebb korosztály számára.

A vizsgálati eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük.

- A tengerimalac jól használható állatfaj az i.d.-immunizáció vizsgálatára.

- Az oltáshoz használt készülék megbízható, kísérleti i.d.-vakcinációra alkalmas.
- Az IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés mérése alkalmas a VZV-specifikus celluláris immunválasz vizsgálatára.
- A hővel inaktivált VZV-vakcina i.d.-módon alkalmazva magasabb celluláris immunválaszt indukál, mint s.c. alkalmazva.
- A VZV-glikoprotein-specifikus és a vírus-neutralizáló ellenanyagok szintje hasonló a hővel inaktivált vakcinával i.d.- vagy s.c.-módon oltott állatokban.

Eredményeink ráirányíthatják a figyelmet a hővel inaktivált VZV-vakcina i.d.-alkalmazásának további vizsgálatára. Szükséges például a vakcina optimális dózisának meghatározása, valamint a vakcina egyszeri, illetve ismételt alkalmazását követő immunválasz időbeni változásának mérése is. Ezen kívül a vakcináció hatékonyságának növelésében szerepet játszó adjuvánsok intradermális alkalmazásának vizsgálata is fontos lehet.

A VZV-vakcinával végzett vizsgálatok hiányosságai közé tartoznak.

- Az IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződés mértéke az immunizációt követően időben változhat, ahogyan az immunrendszer - lépsejteken kívüli - egyéb szöveteiben is eltérő lehet. Ilyen szöveti eltéréseket figyeltek meg az IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződésben, influenzavírussal fertőzött egerek tüdő, nyirokcsomó és lép szöveteiben, aktivált CD8⁺-T-sejtek vizsgálatokor (Johnson BJ 2003). A lépsejtek *in vitro* stimulációját követően egy adott időpontban határoztuk meg az IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződést is, azonban az optimális időpont eltérő lehet az egyes mRNS-ek tekintetében.
- Az *in vitro* stimuláció során termelődött IFN- γ -mRNS és -fehérje méréséhez az optimális időpont eltérő lehet (Kim S 2013), melyet mi nem vizsgáltunk. Ennek meghatározása további vizsgálatokat igényel.
- Nem végeztünk intracelluláris citokin festést, majd ezt követően áramlási citometriás vizsgálatot annak megállapítására, hogy melyek azok az immunsejtek, amelyek részt vettek a stimuláció által kiváltott VZV-specifikus celluláris immunválasz létrehozásában. Korábbi vizsgálatokban azt találták, hogy a CD4⁺-sejtek proliferációja jól korrelál a *zoster* elleni védelemmel (Plotkin SA 2010), azonban érdemes volna a CD4⁺- mellett az egyéb IFN- γ -,

granzim-B- és perforin-termelő immunsejteket is bevonni a vizsgálatba, például a CD8⁺- és NK-sejteket.

Az influenza vakcinával végzett kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy az alumínium adjuvált inaktivált teljes influenzavírust tartalmazó Fluval AB-val végzett vakcinációt követően kialakul-e védelem egy HA- és NA-gének szempontjából különböző challenge vírusfertőzéssel szemben és a humorális komponensek milyen mértékben vesznek részt a védelemben. Megvizsgáltuk továbbá a vakcinációt követő celluláris immunválasz néhány jellemzőjét. A Magyarországon forgalomban lévő Fluval AB vakcinával mostanáig nem végeztek ilyen irányú vizsgálatokat (Sarkadi J 2017).

Kísérleteinkben a TIV+Al- (Fluval AB) immunizált egerek 100%-a védett volt az egér patogén PR8-vírus letális dóziséval szemben és ezen egerek ellenanyag tartalmú savóinak 200-300 µl mennyisége a recipiens egerek 80-100%-t megvédte az elhullástól és csökkentette a betegség súlyosságát a PR8-vírussal végzett challenge fertőzés esetén. A TIV-vakcinát alkotó három vírustörzsből (H1N1, H3N2, B) kettő (H1N1 és H3N2) reasszortáns vírus, mely a fertőzéshez is használt PR8-vírus belső génjeit tartalmazza. A reasszortáns H1N1- és H3N2-törzsek HA- és NA-génjeik azonban a PR8-vírustól eltérőek, a WHO által megadott, az utolsó szezonális járványban szerepet játszó vírusokból származnak, pl. az általunk használt vakcinában az A/California/07/2009(H1N1) és az A/Texas/50/2012(H3N2) törzsekből. A HA- és NA-fehérjék az influenzavírus legváltozékonyabb részei, mivel az ezekhez tartozó génszakaszokon a leggyakoribbak a pont mutációk, melynek következtében oly mértékű lesz a fehérje szerkezetében bekövetkezett változás („antigen drift”), hogy az ellenanyagok már nem nyújtanak védelmet az új szubtypussal szemben. Így például a munkánk során is alkalmazott, két H1N1-vírus, az A/PuertoRico/8/1934- és az A/California/07/2009-törzs között HAG-ellenanyag szempontjából nem találtak keresztreakciót (Huang SS 2013). Ugyanezt tapasztaltuk az immunizált egerek savójának HAG- (11. ábra), továbbá NAG- és VN-vizsgálatokor is. A két törzs HA-gén variabilis régiójának (HA135-295) szekvencia analízise során kapott eredmény 68% homológiát mutatott. Két influenzavírus-törzs közötti HAG-keresztreakció létrejöttéhez minimum 94%-os homológia szükséges az előbb említett HA-régió belül. A 91-93%-nál alacsonyabb homológia esetében is létrejöhet keresztreakció, de kisebb

gyakorisággal (Huang SS 2013). A passzív immunizálásban részesített egerek fertőzés elleni védelemében ezért csak a közös belső vírus fehérjék és egyéb konzervatív epitópok ellen képződött nem neutralizáló ellenanyagok játszhattak szerepet, a neutralizáló (HAG, NAG) ellenanyagok nem.

Az influenza A vírus belső fehérjéi konzervatív epitópokat tartalmaznak (Vandervan HA 2016), így ezeket a fehérjéket felismerő ellenanyagok védelmet biztosíthatnak egyéb, nem homológ influenza A vírustörzsekkel szemben is. A vírus matrix 2 (M2e) belső fehérjéjét alumínium hidroxiddal adjuvált, vagy rekombináns vakcinaként alkalmazva a vakcinációt követően ELISA-módszerrel mért M2e-specifikus ellenanyagok termelődtek. Az immunizáció következtében a H1N1- vagy H3N2- vagy H5N1-challenget követően csökkent a testsúlyvesztéssel mért betegség súlyossága, valamint a vírusrészecskék mennyisége a tüdőben (Wibowo N 2014, Stepanova LA 2015, Rappazzo G 2016). Az M2e-specifikus ellenanyagok védőhatását bizonyította, hogy a passzív transzferrel átvitt savó is 100%-os védelmet biztosított a H1N1 PR8-fertőzéssel szemben (Rappazzo G 2016). Az influenzavírus egy másik belső fehérjéjével, a nukleoproteinnel (NP) végzett immunizálás esetében az egyik vizsgálatban a sejt immunválaszt (Wang W 2014), míg egy másik kísérletben a NP-specifikus, nem neutralizáló ellenanyagokat hozták összefüggésbe a védelemmel (Carragher DM 2008, LaMere MW 2011). A belső fehérjékhez hasonlóan a HA-fehérje szár részét alkotó epitópok is konzervatívok, így a HA variábilis részében eltérő epitópokkal rendelkező PR8-vírussal szembeni védelemben ezek a HA-szár rész elleni antitestek is részt vehettek (Yassine HM 2015, Klausberger M 2016, Zhong W 2016). A HA-konzervatív szár részében az aminosav szekvencia 87,8%-ban azonos az A/PuertoRico/8/1934- és az A/California/04/2009-törzsek között (Miller MS 2013). Állatkísérletben a HA-szár régiójának fúzió előtti konformációja alapján készült polipeptid vakcina a H1-, H5- és H3-vírusok letális dóziséval szemben is védelmet biztosított (Valkenburg S 2016).

A nem neutralizáló ellenanyagok részt vesznek az ellenanyag-függő fagocitózis, -komplement aktiválás és -sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) létrejöttében (Jegaskanda S 2016). ADCC-t közvetítő ellenanyagok az influenzavírus konzervatív epitópjaival szemben is termelődnek, míg neutralizáló ellenanyagok nem termelődnek ezek ellen. Egészséges fiatal felnőtteknél nem volt kimutatható neutralizáló ellenanyag az 1968-ban járványt okozó H3N2 influenza törzssel (A/Aichi/2/1968) szemben, azonban ADCC-t

közvetítő ellenanyagok detektálhatóak voltak ezzel és más influenza törzsekkel (A/California/04/2009(H1N1), A/Anhui/01/2005(H5N1)) szemben is. Az ADCC-ellenanyagok jelenlétét ELISA-lemezhez kötött teljes vírus, vagy tisztított influenza HA-fehérje, valamint egészséges donoroktól származó PBMC alkalmazásával vizsgálták. Ekkor az ADCC-t közvetítő ellenanyagok jelenlétében az NK-sejtek aktiválódnak és az aktiváció mértékét a CD107a- (lizoszóma kapcsolt membrán protein 1, LAMP1) kifejeződésének valamint az IFN- γ -termelődésének áramlási citometriás mérésével határozzák meg (Jegaskanda S 2013). Laboratóriumiilag igazolt influenzavírus fertőzésen átesett személyek savóját vizsgálva azt találták, hogy magas ADCC-t közvetítő ellenanyag titer mellett alacsony volt a vírus replikáció és csökkent a klinikai tünetek mértéke (Jegaskanda S 2016).

Ahogy azt a bevezetőben kifejtettem (2.1.1. fejezet), a dendritikus sejteknek központi szerepük van a T-sejtes válasz elindításában és szabályozásában. A tüdőben lokálisan jelen lévő, influenzavirussal fertőzött dendritikus sejtek az influenzavírus fehérjéit, mint endogén fehérjét az MHC-I komplexen keresztül bemutatják a CD8⁺-T-sejteknek, továbbá a fertőzött epiteliális sejtek szétesésekor kiszabaduló vírus antigéneket endocitózissal felveszik és mint exogén fehérjéket bemutatják az MHC-II komplexen keresztül a CD4⁺-T-sejteknek a nyirokcsomókban. Egerekkel végzett vizsgálatokban azt találták, hogy bizonyos dendritikus sejtek (CD103⁺) a megnövekedett I-típusú IFN-receptor kifejező képességük miatt nem fertőződnek meg influenzavirussal és így a vírus replikáció hiányában nem tudnak aktiválni a CD8⁺-T-sejteket, azonban a kereszt-prezentáció mechanizmusával mégis képesek a vírus antigéneket az MHC-II-n keresztül bemutatni a CD8⁺-T-sejteknek (Helft J, 2012). A teljes influenza virionokat tartalmazó inaktivált (WIV) H5N1-vírustartalmú vakcina esetében a keresztvédelemmel rendelkező citotoxikus T limfocitákat tették felelőssé a PR8-vírussal szembeni védelemért (Budimir N 2012), ugyanis CD8⁺-depléciót követően ez a védelem megszűnt. HAG- és VN-ellenanyagoknál - a mi kísérletünkhöz hasonlóan - nem volt mérhető keresztreakció a vakcina törzs (H5N1) és a fertőzéshez használt vírus törzs (PR8) között, azonban ebben a kísérletben nem vizsgálták az egyéb, pl. konzervatív epitopokkal szembeni ellenanyagok védő hatását passzív immunizáció módszerével (Budimir N 2012).

Vizsgálatokat végeztek arra vonatkozóan is, hogy hogyan hat a védelemre a vírus inaktiválás módja. A β -propiolaktonnal (BPL) inaktivált WIV védelmet biztosított a

letális fertőzéssel és a megbetegedéssel szemben is, míg a formaldehiddel (FA) inaktivált vakcinával oltott állatok túléltek ugyan a fertőzést, de megbetegedtek és testsúlyvesztésük szignifikánsan nagyobb volt, mint a BPL-inaktivált vakcinával immunizált állatoknak. A vírus membránfüziós aktivitását vizsgálva azt találták, hogy a FA-inaktiváció nagyobb mértékben csökkenti azt, mint a BPL-inaktiválás (Budimir N 2012).

Az alumínium sókat tartalmazó adjuvánsok főként a $CD4^+$ -sejtek T-helper 2 (Th2) típusú differenciálódását segítik elő, kis mértékben pedig a $CD8^+$ -sejteket aktiválják (Bungener L 2008, Ehrlich HJ 2008, Aimaniananda V 2009). Alumínium sókkal adjuvált influenza fehérjék, vagy az A/H3N2-vírusból készített hasított (hasított) vakcina a $CD8^+$ - és $CD4^+$ -T-sejtek proliferációját és $IFN-\gamma$ -termelést indukált, védelmet biztosítva letális dózisú H1N1- és H2N2-fertőzéssel szemben (Dillon SB 1992, Mohr B 2010, Baz M 2012). A szezonális trivalens inaktivált influenza oltóanyagok többnyire hasított vagy alegység (alegység) vakcinák, melyek különböző adjuvánsokat tartalmazhatnak, pl. az MF59, AS03, AS04, melyek fokozzák a humorális és celluláris immunválaszt (van Els C 2014, Frey SE 2014, Couch RB 2014, Lee YN 2014, Trombetta CM 2016). Azonban az AS03-alkalmazása kapcsán biztonsági problémák merültek fel, az oltást követően a narkolepszia kockázatának növekedése miatt (Miller E 2013). A celluláris immunválasz mégsem látszik megfelelőnek a hasított vagy alegység vakcinák alkalmazásakor. Például a vakcinák összehasonlításakor azt találták, hogy a teljes vírustartalmú vakcina sokkal hatékonyabban stimulálta a dendritikus sejteket és a vírus specifikus $CD8^+$ -memória-T-sejteket, mint a hasított vakcina, ezért szezonális és pandémiás influenza vakcinák esetében egyes szerzők a teljes inaktivált vírust tartalmazó vakcinákat a hatékonyabbnak tartják (Halbroth BR 2014). Azt feltételezik, hogy a teljes vírus vakcinákban található vírus RNS mintegy beépített adjuvánsként működik a Toll-szerű receptorok (TLR) és Rig-szerű receptorokon (RLR) keresztüli szignál útvonalak ($NF-\kappa B$ és I. típusú IFN) beindításával, befolyásolva ezzel az immunválaszt (Szabo A 2013, Tetsutani K 2012).

Vizsgálati eredményeink azt mutatták, hogy míg a PR8-specifikus immunsavó használatakor alacsony PR8-elleni HAG-titer (1:20) is elegendő volt a védelemhez, a vakcina törzsekre specifikus immunsavónál azonban csak a magasabb A/California reasszortáns elleni HAG-titerrel (1:126, 1:160, 1:253, 1:320) rendelkező állatok éltek túl

a fertőzést. Mivel ez utóbbi esetben a védelmet nem a HAG-, NAG- vagy VN-ellenanyagokon biztosították, ezeknek a pontosan nem definiált vírusfehérjéjéssel szembeni ellenanyagoknak a meghatározására új vizsgálati módszerekre lenne szükség. Az általunk mért HAG-titert csak az ellenanyag szintek indikátoraként tudjuk alkalmazni a naív egerekkel végzett kísérletekben. Az eredményekből az is kiderül, hogy az alumínium adjuváns szükséges volt ahhoz, hogy magasabb ellenanyag szint alakuljon ki, biztosítva ezzel a védelmet és a megbetegedés súlyosságának csökkenését. A TIV+Al-immunizált állatok savója 80-100% halálozás elleni védelmet biztosított, szemben a TIV-immunizált donor savóval, mellyel csak 25%-os védelem volt elérhető. Ahogy a túlélési százalékban, úgy a megbetegedést jelző testsúlycsökkenésben és a klinikai pontszámokban is szignifikáns különbséget mértünk ($p < 0,05$) a fertőzést követően a TIV+Al és TIV csoportok között. Aktív immunizálást követően a TIV+Al-immunizált állatokban nagyon magas ellenanyag szint alakult ki (1:2560 HAG titer), ugyanakkor az ellenanyagok mellett a celluláris immunválasznak is szerepe lehetett az alacsony morbiditási (testsúlyváltozás, klinikai pontszámok) eredményekben (9. ábra B és C).

Ugyanezzel az immunsavóval (TIV+Al) passzívan immunizált állatoknál az alacsonyabb ellenanyag szintnek, valamint a celluláris immunválasz hiányának is tulajdonítható a magasabb morbiditási eredmény (10. ábra C és E) illetve az elhullással szembeni gyengébb védelem (4. táblázat). A TIV+Al-immunizált egerek lépsejtjeiben *in vitro* stimulálást követően szignifikánsan megnőtt az IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés (13. ábra). Azonban előzetes eredményeink szerint a TIV+Al- vagy a TIV+Al+F-immunizált Balb/c egerek lépsejtjei nem biztosítottak védelmet a recipiens egerekben a fertőzés ellen, mikor passzív lépsejt transzfert és PR8-fertőzést alkalmaztunk. Ezeket az eredményeket nem közöltük, igazolásukra további vizsgálatok szükségesek.

Egy összefoglaló közleményben publikált meta-analízis során 34 randomizált klinikai vizsgálatból, illetve 47 influenza szezon alatt 94821 személy vizsgálatából származó adatokat elemezték. Az analízis eredménye azt mutatta, hogy ha a vakcina törzs nem volt teljesen azonos az adott időszakban megbetegedéseket okozó influenza törzsszel, a TIV akkor is 54%-al csökkentette az influenza fertőzés kockázatát felnőttekben, rávilágítva a teljes virionokat tartalmazó nem homológ vakcinák hasznosságára (Tricco

AC 2013). Ehhez a megfigyeléshez kapcsolódik egyik korábban megjelent közleményünk (Sarkadi J 2013). Fűrjek egyszeri alacsony dózisú (6 µg HA) inaktivált teljes virionokat tartalmazó H5N1 vakcinával történt oltása a homológ vakcina törzssel szemben alacsony, míg a challenge fertőzéshez használt heterológ H5N1-törzssel szemben nem vagy csak minimális szintű HAG és mikroneutralizációban mért ellenanyagok termelődését indukálta, mégis minden egyed 100%-ban védett volt a homológ és heterológ vírussal végzett challenge fertőzéssel szemben is (Sarkadi J 2013).

A Fluval AB-vakcinával végzett vizsgálatainkhoz hasonló, passzív immunizáláson alapuló kísérletben, a viroszóma alapú trivalens influenza alegység vakcinát (Inflexal V) hatékonynak találták a heterológ H5N1-vírusfertőzéssel szemben. Háromszori passzív immunizálás az egereknek 80%-os védelmet biztosított, mely védelemért a HA-konzervatív epitópok feleltek (Roos A 2015). Azonban e két engedélyezett vakcinával (Inflexal V és Fluval AB) végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása nehéz, mert különbözik a vakcina és a challenge fertőzéshez használt vírus törzsek típusa és dózisa is, valamint a passzív immunizációhoz használt savó mennyisége, illetve a savóban mérhető ellenanyag szintek is, melyek mind szerepet játszhattak az elért védelemben.

Eredményeink azt mutatják, hogy egy alumínium-adjuvált trivalens inaktivált teljes vírust tartalmazó vakcinával elérhető a megfelelő ellenanyag szint, mely védelmet nyújthat olyan influenza A törzsekkel szemben is, melyekkel a HAG-, NAG- és VN-ellenanyagok mérésekor nincs keresztreakció. A több típussal vagy szubtípussal szemben védelmet biztosító univerzális influenza vakcina kifejlesztése előtt a Fluval AB, vagy egyéb, hatékony és biztonságos adjuvánst tartalmazó inaktivált teljes vírus vakcinákat nem csak a szezonális immunizálásra lehet használni, de védelmet nyújthatnak a HA- és NA-szemponthoz a vakcina törzstől eltérő influenza A vírusfertőzésekkel szemben is. Az adjuvált TIV-vakcina, erős booster hatása miatt (Trombetta CM 2016) hasznos lehet olyan egyének immunizálására, akik alacsony, vagy közepes immunitással rendelkeznek. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy mely konzervatív influenzavírus fehérjék és azok mely epitópjai szükségesek a heterospecifikus védelmet biztosító ellenanyagok termeléséhez. Ezek

ismeretében hatásos heterospecifikus védelmet is biztosító influenza vakcinák lesznek előállíthatóak a modern vakcinológia lehetőségeinek felhasználásával.

A vizsgálati eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük.

- A Fluval AB-immunizálás 100%-os védelmet biztosított a HA-, NA- és VN-szemponyjából heterológ egér patogén PR8-vírus letális dóziséval szemben.
- A Fluval AB-immunizált egerek ellenanyag-tartalmú savója a recipiens egerek 80-100%-t megvédte az elhullástól és csökkentette a betegség súlyosságát a PR8-vírussal végzett challenge fertőzést követően. Az influenzafertőzéssel szembeni humorális védelem a szezonális trivalens, inaktivált teljes virionokat tartalmazó vakcinával, megfelelő adjuváns jelenlétében elérhető a HAG, NAG és VN ellenanyagok hiányában is.
- A Fluval AB-immunizálást követően celluláris immunválasz is kialakul, melyet az immunizált egerek lépsejtjeiben *in vitro* stimulálást követően szignifikánsan megnövekedett IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés mérésével támasztottunk alá.

A Fluval AB- vakcinával végzett kísérleteink hiányosságai közé tartoznak.

- Az immunsavó passzív átvitele után, HA- és NA-szemponyjából megfelelő homológ törzzsel nem végeztünk challenge fertőzést. A homológ challenge alkalmazásakor minden bizonnyal teljes védelmet tapasztaltunk volna, mivel a homológ védelemért elsődlegesen a HAG-ellenanyagok felelősek, melyek magas titerben voltak jelen a recipiens egerekben. Kísérleteinkben a PR8-immunsavót kapott recipiens egerek teljes mértékben védettek voltak a PR8-challenge fertőzéssel szemben.
- ADCC-módszerrel nem vizsgáltuk a passzív transzferhez használt immunsavókat, így az ADCC-ben résztvevő ellenanyagok titere és a védelem foka közötti összefüggésre nem tudunk adatokat nyújtani. Az ADCC-módszer beállítását tervezzük laboratóriumunkban.

7. Következtetések

1. Alacsony dózisu (399-PFU) inaktivált VZV-vakcina i.d.-oltásával erősebb sejtes és humorális immunválasz érhető el tengeri malacban, mint s.c.-oltással, de a különbség nem szignifikáns.

Teljes dózisu (1995-PFU) inaktivált VZV-vakcina i.d.-oltásával szignifikánsan jobb sejtes immunválasz érhető el tengeri malacban, mint s.c.-oltással. A humorális immunválasz is erősebb az i.d.-oltás esetében, de a különbség itt nem szignifikáns.

2. A Fluval AB-vakcina alkalmazását követően egérben az influenza megbetegedés elleni humorális védelem elérhető az elsődleges fontosságúnak tartott vírus epitópok elleni antitestek (HAG, NAG, VN) hiányában is, azonban a protektív ellenanyag szint eléréséhez szükséges az alumínium adjuváns jelenléte a vakcinában.

3. A Fluval AB-vakcina vírusspecifikus sejtes immunválaszt is kivált.

8. Összefoglalás

A fertőző betegségek megelőzésének leghatékonyabb módja a vakcináció.

A vakcináció hatékonyságának növelési lehetőségei közül az intradermális (i.d.) immunizálási eljárást vizsgáltuk, élő gyengített VZV-vakcina alkalmazásával. Az immunizáláshoz tengerimalacokat használtunk és egy liquid jet jellegű eszközt. A VZV-DNS relatív mennyiségi meghatározása a bőrbioopszia mintákban qPCR-módszerrel történt, az eredmények szerint a tengerimalac megfelelő állatmodell az i.d.-immunizáció vizsgálatára, valamint az általunk alkalmazott eszköz használatával pontos i.d.-oltást lehet kivitelezni. Az IFN- γ -, granzim-B- és perforin-mRNS-kifejeződést qRT-PCR-módszerrel mérve a lépsejtekben megállapítottuk, hogy a hővel inaktivált VZV-vakcina 1995-PFU-dózisa i.d.-alkalmazva magasabb celluláris immunválaszt indukál, mint szubkután, azonban a VZV glikoprotein-specifikus és a vírus-neutralizáló ellenanyagok szintje hasonló a két féle immunizációt követően. Az inaktivált VZV-vakcina i.d.-alkalmazásával növelhető a vakcina hatásossága és biztonságossága.

Megállapítottuk, hogy egerek inaktivált trivalens teljes vírustartalmú influenza vakcinával (Fluval AB) végzett immunizálása után nyert immunsavó átvitele naive egerekbe védelmet biztosít egy hemagglutinin (HA) és neuraminidáz (NA) szempontjából heterológ influenza A szubtipussal végzett challenge fertőzéssel szemben. A fertőzéssel szembeni védelem a challenge vírusra specifikus hemagglutináció gátló (HAG), neuraminidáz gátló (NAG) és vírusneutralizáló (VN) ellenanyagok hiányában jön létre. A védelemben szerepet játszó ellenanyagok antigén-specificitását nem ismerjük. A védelem eléréséhez magas ellenanyag szint, így az adjuváns jelenléte szükséges. A Fluval AB-vakcina alkalmazását követően vírusspecifikus sejtes immunválasz is kialakul, amelyet az IFN- γ - és granzim-B-mRNS-kifejeződés emelkedett szintje és az IFN- γ - és granzim-B-fehérjét tartalmazó lépsejtek százalékanak áramlási citometriával mért emelkedése jelzett. A Fluval AB, valamint egyéb, hatékony és biztonságos adjuvánszt tartalmazó inaktivált teljes vírus vakcinákat nem csak a szezonális immunizálásra lehet használni, de védelmet nyújthatnak HA- és NA-szempontjából a vakcina törzstől eltérő influenza A vírusfertőzésekkel szemben is.

9. Summary

To prevent the spread of infectious diseases, vaccination is the most effective approach. As a possibility for increasing the effectiveness of a vaccine, the intradermal (i.d.) administration of the live attenuated VZV vaccine was investigated. Guinea pigs and a liquid jet type device were used for the i.d. immunization. The examination of the viral DNA by qPCR in the skin biopsy samples, obtained immediately after the i.d. administration of the vaccine, demonstrated that the guinea pig is a suitable species to investigate the i.d. immunization, and the applied device ensured reliable vaccine administration by i.d. route. A heat inactivated VZV vaccine, at a dose of 1995-PFU before inactivation, administered i.d., induced a higher level of cellular immune responses, as measured by qRT-PCR of the expression of IFN- γ , granzim-B and perforin mRNA than the same vaccine given subcutaneous, but the VZV glycoprotein-specific and virus neutralizing antibody responses were similar after the two different immunization routes. Administration of the inactivated VZV vaccine by the i.d. route may increase the efficacy and safety of the vaccine.

The role of the humoral components in the protection against a challenge infection was investigated after vaccination of mice with the inactivated, trivalent whole virion influenza vaccine (Fluval AB). Passive transfer of the immune serum from actively immunized mice into naive mice demonstrated protection against a challenge infection with a heterosubtypic influenza A virus in the absence of hemagglutination inhibition (HI), neuraminidase inhibition (NI) and virus neutralization antibodies against the challenge virus. The antigen-specificity of the protective antibodies has not been defined. Vaccination with Fluval AB vaccine also produced virus specific cellular immune responses, as determined by the mRNA expression of IFN- γ and granzim-B in the splenocytes by qRP-PCR assay, and by the percentages of splenocytes harboring IFN- γ and granzim-B proteins, as measured by flow cytometry. Fluval AB, or other inactivated whole virion influenza vaccines containing efficient adjuvants could be used not only for seasonal vaccination, but also for prevention at the beginning of the outbreaks of influenza infections caused by HA and NA mismatched influenza A viruses.

10. Irodalomjegyzék

Aimanianda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. (2009). Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci* 30: 287-295.

Altenburg AF, Rimmelzwaan GF, de Vries RD. (2015). Virus-specific T cells as correlate of (cross-) protective immunity against influenza. *Vaccine* 33:500-506.

Arvin AM. (1996). Varicella-zoster virus. *Clin Microbiol Rev.* 9(3): 361–381.

Arvin AM. (2001). Varicella vaccine: genesis, efficacy, and attenuation. *Virology* 284:153–158.

Baz M, Samant M, Zekki H, Tribout-Jover P, Plante M, Lanteigne AM, Hamelin ME, Mallett C, Papadopoulou B, Boivin G. (2012). Effects of different adjuvants in the context of intramuscular and intranasal routes on humoral and cellular immune responses induced by detergent-hasított A/H3N2 influenza vaccines in mice. *Clin Vaccine Immunol* 19:209-2018.

Beals CR, Railkar RA, Schaeffer AK, Levin Y, Kochba E, Meyer BK, Evans RK, Sheldon EA, Lasseter K, Lang N, Weinberg A, Canniff J, Levin MJ. (2016). Immune response and reactogenicity of intradermal administration versus subcutaneous administration of varicella-zoster virus vaccine: an exploratory, randomised, partly blinded trial. *Lancet Infect Dis.* 16: 915–22.

Belyakov IM, Ahlers JD. (2009). What Role Does the Route of Immunization Play in the Generation of Protective Immunity against Mucosal Pathogens? *J Immunol* 183:6883-6892.

Boltjes A, van Wijk F. (2014). Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Front Immunol.* 5: 131.

Breuer J, Schmid DS, Gerson AA. (2008). Use and limitation of varicellazoster virus-specific serological testing to evaluate breakthrough disease in vaccines and to screen for susceptibility to varicella. *J Infect Dis* 197:S147– 151.

Briggs DJ, Banzhof A, Nicolay U, Sirikwin S, Dumavibhat B, Tongswas S, Wasi C. (2000). Antibody response of patients after postexposure rabies vaccination with small intradermal doses of purified chick embryo cell vaccine or purified Vero cell vaccine. *Bull World Health Organ* 78: 693-8.

Brisson M, Gay NJ, Edmunds WJ, Andrews NJ. (2002). Exposure to varicella boosts immunity to herpes-zoster: implications for mass vaccination against chickenpox. *Vaccine*. 20(19-20):2500-7.

Budimir N, Huckriede A, Melierhof T, Boon L, Gostick E, Price DA, Wilschut J, de Haan A. (2012). Induction of heterosubtypic cross- protection against influenza by a whole inactivated virus vaccine: the role of viral membrane fusion activity. *PLoS One* 7(1):e30898.

Bungener L, Geeraedts F, ter Veer W, Medema J, Wilschut J, Huckriede A. (2008). Alum boosts TH2-type antibody responses to whole-inactivated virus influenza vaccine in mice but does not confer superior protection. *Vaccine* 26:2350-2359.

Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD. (2008). A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J Immunol* 181:4168-76.

Centers for Disease Control and Prevention. (2016). ACIP votes down use of LAIV for 2016-2017 flu season. Retrieved from:

<https://www.cdc.gov/media/releases/2016/s0622-laiv-flu.html>

Chen JJ, Gershon AA, Li Z, Cowles RA, Gershon MD. (2011). Varicella zoster virus (VZV) infects and establishes latency in enteric neurons. *J Neurovirol* 17:578–589.

Chen JJ, Zhu Z, Gershon AA, Gershon MD. (2004). Mannose 6-phosphate receptor dependence of varicella zoster virus infection in vitro and in the epidermis during varicella and zoster. *Cell*. 119(7):915-26.

Chen X, Wu MX. (2011). Laser vaccine adjuvant for cutaneous immunization. *Expert Rev Vaccines* 10: 1397-1403.

Chiapponi C, Faccini S, De Mattia A, Baioni L, Barbieri I, Rosignoli C, Nigrelli A, Foni E. (2016). Detection of Influenza D Virus among Swine and Cattle, Italy. *Emerg Infect Dis*. 22(2): 352–354.

Cohen JI. (2008). Strategies for zoster vaccination in immunocompromised patients. *J Infect Dis* 197:S237–S241.

Couch RB, Bayas JM, Caso C, Mbawuiké IN, Lopez CN, Claeys C, EL Idrissi M, Herve C, Laupeze B, Oostvogels L, Moris P. (2014). Superior antigen-specific CD4+ T-cell response with ASO3-adjuvantation of a trivalent influenza vaccine in a randomized trial of adults aged 65 and older. *BMC Inf Dis* 14:425.

Cox RJ, Major D, Pederson G, Pithirana RD, Hoschler K, Guilfoyle K, Roseby S, Bredholt G, Assmus J, Breakwell L, Campitelli L, Sjursen H. (2015). Matrix M H5N1 vaccine induces cross-H5 clade humoral immune responses in randomized clinical trial and provides protection from highly pathogenic influenza challenge in ferrets. *PLoS ONE* 10(7): e0131652.

Dendouga N, Fochesato M, Lockman L, Mossman S, Glannini SL. (2012). Cell-mediated immune responses to a varicella-zoster virus glycoprotein E vaccine using both a TLR agonist and QS21 in mice. *Vaccine* 30:3126 – 3135.

Deng YM, Spirason N, Iannello P, Jelley L, Lau H, Barr IG. (2015). A simplified Sanger sequencing method for full genome sequencing of multiple subtypes of human influenza A viruses. *J Clin Virol.* 68:43-8.

Dillon SB, Demuth SG, Schneider MA, Weston CB, Jones CS, Young JF, Scott M, Bhatnagar PK, LoCastro S, Hanna N. (1992). Induction of protective class I MHC-restricted CTL in mice by a recombinant influenza vaccine in aluminium hydroxide adjuvant. *Vaccine* 10:309-318.

Doerr HW. (2013). Progress in VZV vaccination? Some concerns. *Med Microbiol Immunol* 202:257–258.

Egorov Y. (2016). The challenges of creating a universal influenza vaccine. *MIR-Journal* Vol.3 Number 1.

Ehrlich HJ, Müller M, Oh HM, Tambyah PA, Joukhadar C, Montomoli E, Fischer D, Berezuk G, Fritsch S, Löw-Baselli A, Vartian N, Bobrowsky R, Pavlova BG, Pöllabauer EM, Kistner O, Barrett PN; Baxter H5N1 Pandemic Influenza Vaccine Clinical Study team. (2008). A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Eng J Med* 358:2573-84.

Erdei A. (2012). A kórokozók ellen kialakuló immunválasz és a vakcináció. *Immunológia*, 417.-448. oldal, Erdei Anna, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.

Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA, Iskander JK, Wortley PM, Shay DK, Bresee JS, Cox NJ. (2010). Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), *MMWR Recomm. Rep* 59: 1-62.

Frey SE, Reyes MR, Reynales H, Bernal NN, Nicolay U, Narasimhan V, Forleo-Neto E, Arora AK. (2014). Comparison of the safety and immunogenicity of an MF59^R-

adjuvanted with a non-adjuvanted seasonal influenza vaccine in elderly subjects. *Vaccine* 32:5027-5034.

Furuya Y, Chan J, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Kok T, Manavis J, Li P, Möllbacher A, Alsharifi M. (2010). Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by {gamma}-irradiated influenza A viruses. *J Virol* 84:4212-4221.

Galea SA, Sweet A, Beninger P, Steinberg SP, Larussa PS, Gershon AA, Sharrar RG. (2008). The safety profile of varicella vaccine: a 10-year review. *J Infect Dis.* 1;197 Suppl 2:S165-9.

Gilden D, Nagel MA, Mahalingam R, Mueller NH, Brazeau EA, Pugazhenti, Cohrs RJ. (2009). Clinical and molecular aspects of varicella zoster virus infection. *Future Neurol.* 4, 103-117.

Gomber S, Sharma R, Ramachandran VG. (2004). Immunogenicity of low dose intradermal hepatitis B vaccine and its comparison with standard dose intramuscular vaccination. *Indian Pediatr* 41:922–926.

Halbroth BR, Heil A, Distler E, Dass M, Wagner EM, Plachter B, Probst HC, Strand D, Hartwig UF, Karner A, Aichinger G, Kistner O, Landfester K, Herr W. (2014). Superior in vitro stimulation of human CD8+ T-cells by whole virus versus hasított virus influenza vaccines. *PLoS ONE*, 9:e103392.

Hardy I, Gershon AA, Steinberg SP, LaRussa P, Varicella Vaccine Collaborative Study Group. (1991). The Incidence of Zoster after Immunization with Live Attenuated Varicella Vaccine — A Study in Children with Leukemia. *N Engl J Med* 325:1545-1550.

Harpaz R, Ortega-Sanchez IR, Seward JF; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008).

Prevention of herpes zoster: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 6;57(RR-5):1-30; quiz CE2-4.

Harper DR, Mathieu N, Mullarkey J. (1998). High-titre, cryostable cellfree varicella zoster virus. *Arch Virol* 143:1163–1171.

Harrington NP, Surujballi OP, Waters WR, Prescott JF. (2007). Development and evaluation of a real-time reverse transcription-PCR assay for quantification of gamma interferon mRNA to diagnose tuberculosis in multiple animal species. *Clin Vaccine Immunol* 14:1563–1571.

Hata A, Asanuma H, Rinki M, Sharp M, Wong RM, Blume K, Arvin AM (2002). Use of an inactivated varicella vaccine in recipients of hematopoietic cell transplants. *N. Engl. J. Med.* 347 (1), 26–34.

Hayward AR, Burger R, Scheper R, Arvin AM. (1991). Major histocompatibility complex restriction of T-cell responses to varicella-zoster virus in guinea pigs. *J Virol* 65:1491–1495.

Helft J, Manicassamy B, Guernonprez P, Hashimoto D, Silvin A, Agudo J, Brown BD, Schmolke M, Miller JC, Leboeuf M, Murphy KM, García-Sastre A, Merad M. (2012). Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection. *J Clin Invest.* 122(11):4037–4047.

Herzog C. (2014). Influence of parenteral administration routes and additional factors on vaccine safety and immunogenicity: a review of recent literature. *Expert Rev Vaccines.* 13(3):399-415.

Hickling JK, Jones KR, Friede M, Zehrung D, Chen D, Kristensen D. (2011). Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. *Bulletin of the World health Organization,* 89:221-226.

Huang SS, Lin Z, Banner D, León AJ, Paquette SG, Rubin B, Rubino S, Guan Y, Kelvin DJ, Kelvin AA. (2013). Immunity toward H1N1 influenza hemagglutinin of historical and contemporary strains suggests protection and vaccine failure. *Scientific Reports* 3:1698.

Jegaskanda S, Job ER, Kramski M, Laurie K, Isitman G, de Rose R, Winnall WR, Stratov I, Brooks AG, Readingand PC, Kent SJ. (2013). Cross-Reactive Influenza-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Antibodies in the Absence of Neutralizing Antibodies. *J Immunol.* 190 (4) 1837-1848.

Jegaskanda S, Luke C, Hickman HD, Sangster MY, Wieland-Alter WF, McBride JM, Yewdell JW, Wright PF, Treanor J, Rosenberger CM, Subbarao K. (2016). Generation and protective ability of Influenza virus-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity in humans elicited by vaccination, natural infection, and experimental challenge. *J Infect Dis.* 214:945–52

Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* 12, 557-569

Johnson BJ, Costelloe EO, Fitzpatrick DR, Haanen JB, Schumacher TN, Brown LE, Kelso A. (2003). Single-cell perforin and granzim expression reveals the anatomical localization of effector CD8 T cells in influenza virus-infected mice. *Proc Natl Acad SciUSA* 100:2657–2662.

Kamiya H, Ihara T, Hattori A, Iwasa T, Sakurai M, Izawa T, Yamada A, Takahashi M. (1977). Diagnostic skin test reactions with varicella virus antigen and clinical application of the test. *J Infect Dis* 136:784 –788.

Kawahara M, Nakasone T, Honda M. (2002). Dynamics of gamma interferon, interleukin-12 (IL-12), IL-10, and transforming growth factor mRNA expression in primary *Mycobacterium bovis* BCG infection in guinea pigs measured by a real-time fluorogenic reverse transcriptionPCR assay. *Infect Immun* 70:6614 –6620.

Keller PM, Neff BJ, Ellis RW. (1984). Three major glycoprotein genes of varicella-zoster virus whose products have neutralization epitopes. *J Virol* 52:293–297.

Kim S, Kim YK, Lee H, Cho JE, Kim HY, Uh Y, Kim YM, Kim H, Cho SN, Jeon BY, Lee H. (2013). Interferon gamma mRNA quantitative real time polymerase chain reaction for the diagnosis of latent tuberculosis: a novel interferon gamma release assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:68 – 72.

Kinchington PR, Cohen JI. (2000). Viral proteins, p. 74-104. *In* A. M. Arvin and A. A. Gershon (ed.), *Varicella-zoster virus: virology and clinical management*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Klausberger M, Tscheliessnig R, Neff S, Nachbagauer R, Wohlbold TJ, Wilde M, Palmberger D, Krammer F, Jungbauer A, Grabherr R. (2016). Globular head-displayed conserved influenza H1 hemagglutinin stalk epitopes confer protection against heterologous H1N1 virus. *PLoS ONE* 11(4):e153579.

Klimov A, Cox N. (2003). Serologic diagnosis of influenza virus infections by hemagglutination inhibition. *Influenza Laboratory Course*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA p 7.1-7.5.

Klimov A, Balish A, Veguilla V, Hancock K. (2012). Influenza virus titration, antigenic characterization and serological methods for antibody detection. *In: Methods in molecular biology* (Clifton NJ) 865:26-51.

Koren G, Money D, Boucher M, Aoki F, Petric M, Innocencion G, Wolosk M, Remple V, Pelland F, Geist R, Ho T, Bar-Oz B, Loebstein R. (2002). Serum concentrations, efficacy, and safety of a new, intravenously administered varicella zoster immune globulin in pregnant women. *J Clin Pharmacol* 42:267–274.

Krah DL, Cho I, Schofield T. (1997). Comparison of gpELISA and neutralizing antibody responses to OKA/Merck live varicella vaccine (Varivax) in children and adults. *Vaccine* 15:61–64.

Kurstak E. Progress towards the global control of infectious diseases. In: Ed. E. Kurstak, *Modern Vaccinology*, Plenum Publishing Corporation, New York, USA, 1994, p 1-9

Lamb RA, Krug RM: *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, *Fields Virology*. 4th ed. Vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 2001.

Lambre CR, Terzidis H, Greffard A, Webster RG. (1990). Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtiter plates coated with natural substrates. *J Immunol Methods* 135:49-57.

LaMere MW, Moquin A, Lee FE, Misra RS, Blair PJ, Haynes L, Randall TD, Lund FE, Kaminski DA. (2011). Regulation of antinucleoprotein IgG by systemic vaccination and its effect on influenza virus clearance. *J Virol*, 85:5027-5035.

Lee YN, Kim MC, Lee YT, Hwang HS, Cho MK, Lee JS, Ko EJ, Kwon YM, Kang SM. (2014). ASO4-adjuvanted virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains of influenza virus confer improved protection. *Vaccine* 32:4578-4585.

Leonardi S, Pratico AD, Lionetti E, Spina M, Vitaliti G, La Rosa M. (2012). Intramuscular vs intradermal route for hepatitis B booster vaccine in celiac children. *World J Gastroenterol* 18:5729-5733.

Leroux-Roels G. (2010). Unmet needs in modern vaccinology adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 28S(3):C25-3.

Levine MJ, Ellison MC, Zerbe GO, Barber D, Chan C, Stinson D, Jones M, Hayward AR. (2000). Comparison of a live attenuated and an inactivated varicella vaccine to

boost the varicella-specific immune response in seropositive people 55 years of age and older. *Vaccine* 18:2915-2920.

Levin Y, Kochba E, Hung I, Kenney R. (2015). Intradermal vaccination using the novel microneedle device MicronJet600: Past, present, and future. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11:4, 991-997.

Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. (2008). Cutting edge: Inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.* 181(1):17-21.

Lin W, Harding HP, Ron D, Popko B. (2005). Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon. *J Cell Biol* 169: 603-612.

Liu YV, Massare MJ, Pearce MB, Sun X, Belser JA, Maines TR, Creager HM, Glenn GM, Pushko P, Smith GE, Tumpey TM. (2015). Recombinant virus-like particles elicit protective immunity against avian influenza A(H7N9) virus infection in ferrets. *Vaccine* 33: 2152-2158.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-delta delta CT method. *Methods* 25:402–408.

Lövgren Bengtsson K, Morein B, Osterhaus ADME. (2011). ISCOM technology-based Matrix MTM adjuvant: success in future vaccines relies on formulation. *Expert Rev. Vaccines* 10: 401-403.

Lövgren Bengtsson K, Song H, Stertman L, Liu Y, Flyer DC, Massare MJ, Xu RH, Zhou B, Lu H, Kwilas SA, Hahn TJ, Kpamegan E, Hooper J, Carrion Jr. R, Glenn G, Smith G. (2016). Matrix-M adjuvant enhances antibody, cellular and protective immune responses of a Zaire Ebola/Makona virus glycoprotein (GP) nanoparticle vaccine in mice. *Vaccine* 34(16):1927-35.

Magnusson BM, Walters KA, Roberts MS. (2001). Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. *Adv Drug Deliv Rev* 50:205–227.

Marin M, Broder KR, Temte JL, Snider DE, Seward JF, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010). Use of combination measles, mumps, rubella, and varicella vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 7;59(RR-3):1-12.

Marin M, Meissner HC, Seward JF. (2008). Varicella prevention in the United States: a review of successes and challenges. *Pediatrics* 122(3): e744-751.

Mbawuike IN, Zhang Y, Couch RB. (2007). Control of mucosal virus infection by influenza nucleoprotein-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Respiratory Research* 8:44.

McAllister L, Anderson J, Werth K, Cho I, Copeland K, Le Cam Bouveret N, Plant D, Mendelman PM, Cobb DK. (2014). Needle-free jet injection for administration of influenza vaccine: a randomised noninferiority trial. *Lancet* 384:674 –681.

McElhaney JE, Zhou X, Talbot HK, Soethout E, Bleackley RC, Granville DJ, Pawelec G. (2012). The unmet need in the elderly: how immunosenescence, CMV infection, comorbidities and frailty are a challenge for the development of more effective influenza vaccines. *Vaccine* 30:2060-2067.

Miller E, Andrews N, Stellitano L, Stowe J, Winstone AM, Shneerson J, Verity C. (2013). Risk of narcolepsy in children and young people receiving AS03 adjuvanted pandemic A/H1N1 2009 influenza vaccine: retrospective analysis. *BMJ* 346:f794.

Miller MS, Tsibane T, Krammer F, Hai R, Rahmat S, Basler CF, Palese P. (2013). 1976 and 2009 H1N1 Influenza Virus Vaccines Boost Anti-Hemagglutinin Stalk Antibodies in Humans. *J Infect Dis.* 207(1): 98–105.

Mina MJ, McCullers JA, Klugman KP. (2014). Live attenuated influenza vaccine enhances colonization of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in mice. *MBio*. 18;5(1). pii: e01040-13.

Mitchell R, Kelly DF, Pollard AJ, Trück J. (2014). Polysaccharide-specific B cell responses to vaccination in humans. *Hum Vaccin Immunother*. 10(6):1661-8.

Mitka M. (2006). FDA approves shingles vaccine: herpes zoster vaccine targets older adults. *JAMA* 296:157–158.

Mohr B, Cunningham AF, Toellner KM, Bobat S, Coughlan RE, Bird RA, MacLennan IC, Serre K. (2010). IFN-(gamma) produced by CD8+ T cells induces T-bet-dependent and –independent class switching in B cells in responses to alum-precipitated protein vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17292-17297.

Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. (2000). Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med* 160: 3243-7.

Morishima T, Togashi T, Yokota S, et al. (2002). Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan. *Clin Infect Dis* 35: 512-7.

Mueller NH, Gilden DH, Cohrs RJ, Mahalingam RN, Nagel MA. (2008). Varicella Zoster virus infection: Clinical Features, Molecular Pathogenesis of Diseases, and Latency. *Neurol Clin*. 26, 675-97.

Mullane KM, Winston DJ, Wertheim MS, betts RF, Poretz DM, Camacho LH, Pergam SA, Mullane MR, Stek JE, Sterling TM, Zhao Y, Manoff SB, Annunziato PW. (2013). Safety and immunogenicity of heat-treated zoster vaccine (ZVHT) in immunocompromised adults. *J Infect Dis* 208:1375–1385.

Murphy RB, Chanock RM. Immunization against viral diseases. In: David M. Knipe, Peter M. Howley, Fields Virology 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2001: p435-467,

National Centre for Disease Control. (2007). National guidelines for rabies prophylaxis and intra-dermal administration of cell culture rabies. Retrieved from: http://www.ncdc.gov.in/Rabies_Guidelines.pdf

National Institute of Pharmacy and Nutrition, Hungary. (2015). Summary of Product Characteristics – Fluval AB suspension for injection. Retrieved from: https://www.ogyei.gov.hu/kiseroirat/ah/ah_0000021913_20150402140957.doc

Nelson EA, Lam HS, Choi KC, Ho WC, Fung LW, Cheng FW, Sung RY, Royals M, Chan PK. (2013). A pilot randomized study to assess immunogenicity, reactogenicity, safety and tolerability of two human papillomavirus vaccines administered intramuscularly and intradermally to females aged 18 –26 years. *Vaccine* 31:3452–3460.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559 –1582.

O'Neill RE, Talon J, Palese P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 17(1): 288–296.

Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongis EA. (2012). Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Inf Dis* 12:36-44.

Otani N, Yamanishi K, Sakaguchi Y, Imai Y, Shima M, Okuno T. (2012). Varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity in subjects with herpes zoster. *J Immunol Methods* 377:53–55.

Oxman MN. (2009). Herpes zoster pathogenesis and cell-mediated immunity and immunosenescence. *J Am Osteopath Assoc.* 109(6 Suppl 2):S13-7.

Oxman MN. (2010). Zoster Vaccine: Current Status and Future Prospects
Clin Infect Dis 51 (2): 197-213.

Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD, Arbeit RD, Simberkoff MS, Gershon AA, Davis LE, Weinberg A, Boardman KD, Williams HM, Zhang JH, Peduzzi PN, Beisel CE, Morrison VA, Guatelli JC, Brooks PA, Kauffman CA, Pachucki CT, Neuzil KM, Betts RF, Wright PF, Griffin MR, Brunell P, Soto NE, Marques AR, Keay SK, Goodman RP, Cotton DJ, Gnann JW Jr, Loutit J, Holodniy M, Keitel WA, Crawford GE, Yeh SS, Lobo Z, Toney JF, Greenberg RN, Keller PM, Harbecke R, Hayward AR, Irwin MR, Kyriakides TC, Chan CY, Chan IS, Wang WW, Annunziato PW, Silber JL, Shingles Prevention Study Group. (2005). A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med.* 352(22):2271-84.

Pedersen G, Major D, Roseby S, Wood J, Madhun AS, Cox RJ. (2011). Matrix-M adjuvanted virosomal H5N1 vaccine confers protection against lethal viral challenge in a murine model. *Influenza and other respiratory viruses* 5: 426-437.

Pevenstein SR, Williams RK, McChesney D, Mont EK, Smialek JE, Straus SE. (1999). Quantitation of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus genomes in human trigeminal ganglia. *J Virol* 73:10514 – 10518.

Pinquier D, Lecuyer A, Levy C, Gagneur A, Pradat P, Soubeyrand B, Grimprel E, Pediatricians Working Group. (2011). Inverse correlation between varicella severity and level of anti-varicella zoster virus maternal antibodies in infants below one year of age. *Hum Vaccin* 7:534 –538.

Plotkin SA. (2010). Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 17:1055–1065.

Plotkin SA. (2015). Increasing complexity of vaccine development. *J. Infect. Dis.* 212(1):S12-6.

Rappazzo G, Watkins HC, Guarino CM, Chau A, Lopez JL, DeLisa M, Leifer CA, Whittaker GR, Putnam D. (2016). Recombinant M2e outer membrane vesicle vaccines protect against lethal influenza A challenge in Balb/c mice. *Vaccine* 34:1252-1258.

Rappuoli R, Mandl CW, Black S, De Gregorio E. (2011). Vaccines for the twenty-first century society. *Nature Reviews Immunol.* 11: 865-872.

Redman RL, Nader S, Zerboni L, Liu C, Wong RM, Brown BW, Arvin AM. (1997). Early reconstitution of immunity and decreased severity of herpes zoster in bone marrow transplant recipients immunized with inactivated varicella vaccine. *J Infect Dis* 176:578 –585.

Reed LJ, Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* 27:493-497.

Roizman B, Knipe DM, Whitley R. Herpes Simplex Viruses. in: Knipe DM, Howley PM, Fields Virology, 6th edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 2013, pp. 1823-1897.

Romani N, Thurnher M, Idoyaga J, Steinman RM, Flacher V. (2010). Targeting of antigens to skin dendritic cells: possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunol Cell Biol* 88:424 –430.

Roos A, Roozendaal R, Theeuwswan J, Riahi S, Vaneman J, Tolboom J, Dekking L, Koudstaal W, Goudsmit J, Radosevic K. (2015). Protection against H5N1 by multiple immunization with seasonal influenza vaccine in mice is correlated with H5 cross-reactive antibodies. *Vaccine* 33: 1739-1747.

RTPrimerDB. (2015). qRT-PCR primers and probes. Retrieved from: <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/>

Sarkadi J, Jankovics M, Kis Z, Skare J, Fodor K, Gonczol E, Visontai I, Vajo Z, Jankovics I. (2013). Protection of Chinese painted quails (*Coturnix chinensis*) against a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus strain after vaccination. *Arch Virol.* 158(12):2577-81.

Sarkadi J, Jankovics M, Fodor K, Kis Z, Takacs, Visontai I, Jankovics I, Gonczol E. (2015). High-level cellular and humoral immune responses in guinea pigs immunized intradermally with a heat-inactivated varicella-zoster virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 22:570-577.

Sarkadi J, Kuti D, Jankovics M, Pallinger E, Fodor K, Kis Z, Gonczol E, Visontai I, Jankovics I. (2017). Protection by humoral elements independent of virus neutralization activity against an influenza virus challenge. *New Microbiologica Közlésre elfogadva.*

Schmader KE, Oxman MN, Levin MJ, Johnson G, Zhang JH, Betts R, Morrison VA, Gelb L, Guatelli JC, Harbecke R, Pachucki C, Keay S, Menzies B, Griffin MR, Kauffman C, Marques A, Toney J, Keller PM, Li X, Chan IS, Annunziato P; Shingles Prevention Study Group. (2012). Persistence of the efficacy of zoster vaccine in the shingles prevention study and the short-term persistence substudy. *Clin Infect Dis.* 55(10):1320-8.

Sgarbanti R, Nencioni L, Amatore D, Coluccio P, Fraternali A, Sale P, Mammola CL, Carpino G, Gaudio E, Magnani M, Ciriolo MR, Garaci E, Palamara AT (2011). Redox regulation of the influenza hemagglutinin maturation process: a new cell-mediated strategy for anti-influenza therapy. *Antioxid. Redox Signal.* 15:1-14.

Sharp M, Terada K, Wilson A, Nader S, Kinchington PE, Ruyechan WT, Hay J, Arvin AM. (1992). Kinetics and viral protein specificity of the cytotoxic T lymphocyte

response in healthy adults immunized with live attenuated varicella vaccine. *J Infect Dis* 165:852–858.

Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Dohi Y. (1984). Delayed-type hypersensitivity and in vitro lymphocyte response in guinea pigs immunized with a live varicella vaccine. *Biken J* 27:19–22.

Shirane R, Tang H, Hayashi K, Okuno Y, Iso H, Asada H, Yamanishi K, Mori Y, SHEZ study group. (2017). Relationship between cell-mediated immunity to Varicella–Zoster virus and aging in subjects from the community-based Shozu Herpes Zoster study *J. Med. Virol.* 89:313–317.

Soonawala D, Verdijk P, Wijmenga-Monsuur AJ, Boog CJ, Koedam P, Visser LG, Rots NY. (2013). Intradermal fractional booster dose of inactivated poliomyelitis vaccine with a jet injector in healthy adults. *Vaccine* 31:3688–3694.

Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W, Bean T, Barclay W, Deeks JJ, Lalvani A. (2013). Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat Med* 19:1305-1312.

Szabo A, Rajnavolgyi E. (2013). Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses. *Am J Clin Exp Immunol* 2(3):195-207.

Stepanova LA, Kotlyarov RY, Kovaleva AA, Potapchuk V, Korotkov AV, Sergeeva MV, Kasianenko MA, Kuprianov VV, Ravin NV, Tsybalova LM, Skryabin KG, Kiselev OI. (2015). Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS ONE* 10(3):e0119520.

Svahn A, Linde A, Thorstensson R, Karlén K, Andersson L, Gaines H. (2003). Development and evaluation of a flow-cytometric assay of specific cell-mediated

immune response in activated whole blood for the detection of cell-mediated immunity against varicella-zoster virus. *J Immunol Methods* 277:17–25.

Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T. (1974). Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet* 304: 1288 –1290.

Takahashi M, Okada S, Miyagawa H, Amo K, Yoshikawa K, Asada H, Kamiya H, Torigoe S, Asano Y, Ozaki T, Terada K, Muraki R, Higa K, Iwasaki H, Akiyama M, Takamizawa A, Shiraki K, Yanagi K, Yamanishi K. (2003). Enhancement of immunity against VZV by giving live varicella vaccine to the elderly assessed by VZV skin test and IAHA, gpELISA antibody assay. *Vaccine* 21:3845–3853.

Tetsutani K, Ishii KJ. (2012). Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine* 30:7658-7661.

Treanor JJ. Influenza virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone; 2004: 2060-2085.

Tricco AC, Chit A, Soobiah C, Hallett D, Meier G, Chen MH, Tashkandi M, Bauch CT, Loeb M. (2013). Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 11:153-172.

Trombetta CM, Montomoli E. (2016). Influenza immunology evaluation and correlates of protection: a focus on vaccines. *Expert Review of Vaccines* 15(8):967-76.

Vajo Z, Kosa L, Szilvasy I, Pauliny Z, Bartha K, Visontai I, Jankovics M, Kis A, Jankovics I. (2008). Yearly licensing studies from 1997 to 2007 of the inactivated whole virus seasonal influenza vaccine fluval – a useful approach to pandemic vaccine development even in less well developed countries? *Influenza Other Respir Viruses* 2:211-218.

Vajo Z, Tamas F, Sinka L, Jankovics I. (2010). Safety and immunogenicity of a 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccine when administered alone or simultaneously with the seasonal influenza vaccine for the 2009-10 influenza season: a multicentre, randomized controlled trial. *Lancet* 375:49-55.

Vajo Z, Tamas F, Jankovics I. (2012). A reduced-dose seasonal trivalent influenza vaccine is safe and immunogenic in adults and elderly patients in a randomized controlled trial. *Clin Vaccine Immunol* 19:313-318.

Valkenburg SA, V. Vamsee Aditya Mallajosyula, Olive T. W. Li, Alex W. H. Chin, George Carnell, Nigel Temperton, Raghavan Varadarajan, Leo L. M. Poon. (2016). Stalking influenza by vaccination with pre-fusion headless HA ministem. *Scientific Reports* 6, Article number: 22666.

Vandervan HA, Ana-Sosa-Batiz F, Jegaskanda S, Rockman S, Laurie K, Barr I, Chen W, Wines B, Hogarth PM, Lambe T, Gilbert SC, Parson MS, Kent SJ. (2016). What lies beneath: antibody dependent natural killer cell activation by antibodies to internal influenza virus proteins. *EBioMedicine*, 8:277-90.

van Els C, Mjaaland S, Næss L, Sarkadi J, Gonczol E, Smith Korsholm K, Hansen J, de Jonge J, Kersten G, Warner J, Semper A, Kruiswijk C, Oftung F. (2014). Fastvaccine design and development based on correlates of protection (COPs). *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10:1935-1948.

Verjans GM, Hintzen RQ, van Dun JM, Poot A, Milikan JC, Laman JD, Langerak AW, Kinchington PR, Osterhouse AD. (2007). Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3496 –3501.

Verma R, Khanna P, Prinja S, Rajput M. (2011). Intra-dermal administration of rabies vaccines in developing countries. *Human Vaccines* 7:7, 792-794.

Vossen MT, Biezeveld MH, de Jong MD, Gent MR, Baars PA, von Rosenstiel IA, van Lier RA, Kuijpers TW. (2005). Absence of circulating natural killer and primed CD8 cells in life-threatening varicella. *J Infect Dis* 191:198–206.

Vukmanovic-Stejic M, Sandhu D, Sobande TO, Agius E, Lacy KE, Riddell N, Montez S, Dintwe OB, Scriba TJ, Breuer J, NikolichZuglich J, Ogg G, Rustin MH, Akbar AN. (2013). Varicella zoster specific CD4 Fox3 T cells accumulate after cutaneous antigen challenge in humans. *J Immunol* 190:977–986.

Wang W, Huang B, Jiang T, Wang X, Qi X, Tan W, Ruan L. (2014). Maximal immune response and cross protection by influenza virus nucleoprotein derived from *E. coli* using an optimized formulation. *Virology*, 468-470: 265-273.

Weinberg A, Levin MJ. (2010). VZV T-cell mediated immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 342:341–357.

World Health Organization. (2010). Serological diagnosis of influenza by microneutralization assay. Retrieved from: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/2010_12_06_serological_diagnosis_of_influenza_by_microneutralization_assay.pdf

World Health Organization. (2014). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season. Retrieved from: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201402_recommendation.pdf?ua=1

Wibowo N, Hughes FK, Fairmaid EJ, Lua LH, Brown LE, Middelberg AP. (2014). Protective efficacy of a bacterially produced modular capsomere presenting M2e from influenza: extending the potential of broadly cross-protecting epitopes. *Vaccine*, 32:3651-3655.

Wijnans L, Voordouw B. (2016). A review of the changes to the licensing of influenza vaccines in Europe. *Influenza Other Respir Viruses* 10(1): 2–8.

Yamanishi K. (2008). Molecular Analysis of the Oka Vaccine Strain of Varicella-Zoster Virus. *J Infect Dis* 197 (Supplement_2): S45-S48.

Yap KL, Ada GL, McKenzie IFC. (1978). Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus. *Nature* 273, 238 - 239.

Yassine HM, Boyington JC, Tamney PM, Wei CJW, Kaneklyo M, Kong WP, Gallagher JR, Wang L, Zhang Y, Joyce G, Lingwood D, Moin SM, Andersen H, Okuno Y, Rao SS, Harris AK, Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS. (2015). Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat Med*, 21:1065-1070.

Yasukawa M, Ohminami H, Yakushijin Y, Arai J, Hasegawa A, Ishida Y, Fujita S. (1999). Fas-independent cytotoxicity mediated by human CD4 CTL directed against herpes simplex virus-infected cells. *J Immunol* 162: 6100–6106.

Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM. (2014). Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 12(3): 197–210.

Zhong W, Gross FL, Holiday C, Jefferson SN, Bai Y, Liu F, Katz JM, Levine MZ. (2016). Vaccination with 2014-15 seasonal inactivated influenza vaccine elicits cross-reactive anti-HA antibodies with strong ADCC against antigenically drifted circulating H3N2 virus in humans. *Viral Immunol*, 29:259-62.

11. Saját közlemények bibliográfiai adatai

Az értekezésben felhasznált közlemények

Sarkadi J, Jankovics M, Fodor K, Kis Z, Takacs, Visontai I, Jankovics I, Gonczol E. (2015). High-level cellular and humoral immune responses in guinea pigs immunized intradermally with a heat-inactivated varicella-zoster virus vaccine. Clin Vaccine Immunol 22:570-577. **IF.: 2.277**

Sarkadi J, Kuti D, Jankovics M, Pallinger E, Fodor K, Kis Z, Gonczol E, Visontai I, Jankovics I. (2017). Protection by humoral elements independent of virus neutralization activity against an influenza virus challenge. New Microbiologica, 40, 3, 180-189.

IF.: 1.568

Egyéb közlemények az értekezés tárgykörében

Sarkadi J, Jankovics M, Kis Z, Skare J, Fodor K, Gonczol E, Visontai I, Vajo Z, Jankovics I. (2013). Protection of Chinese painted quails (*Coturnix chinensis*) against a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus strain after vaccination. Arch Virol. 158(12):2577-81. **IF.: 2.282**

Sarkadi J. (2013). Varicella-zoster virus vaccine, successes and difficulties. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 60 (4), pp. 379–396. **IF.: 0.78**

van Els C, Mjaaland S, Næss L, Sarkadi J, Gonczol E, Smith Korsholm K, Hansen J, de Jonge J, Kersten G, Warner J, Semper A, Kruiswijk C, Oftung F. (2014). Fast vaccine design and development based on correlates of protection (COPs). Human Vaccines & Immunotherapeutics 10:1935-1948. **IF.: 2.366**

Közlemények az értekezés tárgykörén kívül

Rókus László, Jankovics István, Jankovics Máté, Sarkadi Júlia, Visontai Ildikó.
(2013). Miért aktuális 2013-ban a Severe Acute Respiratory Coronavirus fertőzés 2005-ben Magyarországon igazolt esete? Orvosi hetilap 154. évfolyam, 47. szám, 1877–1882.

12. Köszönetnyilvánítás

Az értekezés alapját képező tudományos munkákra az Országos Epidemiológiai Központ Légúti Vírus osztályán került sor. A kísérletek megvalósulásához a Fastvac (Health and the Research Programmes of the European Union) és az UNISEC (European Union Seventh Framework Programme under grant agreement n°602012) Európai Unió pályázatok nyújtottak támogatást.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Gönczöl Évának, aki végtelen türelemmel és szakmai tudással irányította munkámat, kritikus észrevételeivel segítette közleményeim és disszertációm elkészítését.

Dr. Visontai Ildikónak köszönöm szakmai támogatását, valamint, hogy az általa elnyert és irányított Európai Unió pályázatok témakörébe engem befogadott és lehetővé tette, hogy a pályázati keretből a kísérletek elvégezzem.

Dr. Jankovics Istvánnak köszönöm, hogy az általa kifejlesztett intradermális immunizálásra alkalmas eszközzel kísérleteket végezhettem és hálás vagyok emberi támogatásáért és szakmai irányításáért, amit a munkám során tőle kaptam.

Köszönöm szerzőtársaimnak, Dr. Fodor Kingának, Jankovics Máténak, Kuti Dávidnak, Dr. Pállinger Évának, Dr. Kis Zoltánnak, és Dr. Takács Máriának a kísérletek során nyújtott segítségüket.

Köszönöm munkatársaimnak, Körmendiné Ilonának, Czira Zsoltnak, Szalai Bálintnak, Csabai Gyulának, Rózsa Mónikának, Herczeg Évának, Farkas Ildikónak, hogy mind szakmailag, mind emberileg támogattak az évek alatt.

Köszönet illeti Dr. Tresó Bálintot és Dr. Csire Mártát a disszertációm gondos átnézéséért, javításáért és a végső befejezést segítő kritikákért.

Hálás vagyok családomnak türelmükért, megértésükért, támogatásukért.