

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Vírusok okozta komplex oktanú
enterális megbetegedések sertésekben,
különös tekintettel a coronavírusokra**

PhD értekezés tézisei

dr. Valkó Anna

2019

Témavezetők:

Prof. Tuboly Tamás†

Állatorvostudományi Egyetem

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

témavezető

dr. Cságola Attila

Ceva-Phylaxia Zrt.

témavezető

dr. Valkó Anna

Bevezetés

A fertőző eredetű enterális megbetegedés világszerte a sertések egyik leggyakrabban előforduló és jelentős gazdasági veszteséget okozó bántalma. Számos vírust hoztak már összefüggésbe a betegséggel, melyek egy része bizonyított enteropatogén kórokozó, míg mások esetében a kórtani szerep továbbra is tisztázatlan. Az egyes vírusok felmérésére számos példát találunk, de egyre elterjedtebbek a komplex vizsgálatok is, mivel feltételezhető a kórokozók összetett szerepe a hasmenés kialakulásában. A fertőzés következtében kialakuló megbetegedés leginkább a fiatal állatokat érinti, ennek megfelelően a legtöbb felmérés a szopós malacok vizsgálatán alapszik. Azonban a kórokozó állomány szintű fenntartásában az idősebb korosztály is szerepet játszhat, így célszerű a vizsgálatokba több korcsoportot is bevonni. Az egyes vírusok malacok és hízók közötti előfordulásának felmérésére találunk magyar példákat is, komplex vizsgálat azonban még nem valósult meg. A koronavírusok között is előfordulnak ismert enteropatogén kórokozók, melyek jelentőségüknél fogva kiemelt figyelmet érdemelnek. Ilyen szempontból jelenleg kisebb a szerepe a transzmisszibilis gastroenteritis vírusnak (transmissible gastroenteritis virus, TGEV), mely az utóbbi évtizedekben ritkán fordult elő Európában. Néhány évvel ezelőtt viszont újra felbukkant egy klinikai eset során Magyarországon, mely megkérdőjelezte az országban lévő sertésállományok védetségét a vírussal szemben. A ritka TGEV-vel szemben a sertések járványos hasmenésének vírusa (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) napjaink egyik legfontosabb enteropatogén kórokozójának tekinthető, mely Észak-Amerikában és Ázsiában jelentős veszteségeket okoz, míg Európa egyelőre kevésbé érintett. A kontinensek közötti különbségnek nincs egyértelmű magyarázata, ezért fontos a kórokozó előfordulásának feltérképezése és a detektált PEDV genetikai vizsgálata az egyes területeken található vírusok összehasonlítása és a koronavírusokra jellemző mutációk és rekombináció felderítése érdekében.

Célkitűzések

Kutatásunk célja az volt, hogy átfogó képet kapjunk Magyarország sertésállományai vírusterheltségének aktuális helyzetéről a hasmenéshez kapcsolódó kórokozók vonatkozásában. Ezen vírusok előfordulásának felmérésével elő kívántuk segíteni a betegség komplexitásának, valamint a vizsgált korcsoportok számára ajánlható védekezési stratégiák körének megismerését.

A TGEV vonatkozásában célunk volt a vírus előfordulásának feltérképezésén túl a sertésállományok védettségi szintjének megállapítása, melyhez szerológiai vizsgálatokat terveztünk.

A PEDV előfordulásának feltérképezésére kiemelt jelentőségének megfelelően külön figyelmet kívántunk szentelni, ezért a felmérő vizsgálatra gyűjtött mintákon túl rutin diagnosztikai vizsgálatra érkezett mintákat is vizsgáltunk erre a kórokozóra. Kutatási célunk az volt, hogy a kimutatott vírusok genetikai elemzése révén összehasonlítást végezzünk más országokból származó PEDV szekvenciákkal, kiemelt figyelmet fordítva azon szakaszokra, amelyek a protektív immunitásban jelentősek lehetnek. A vírusok izolálásának kíséretével pedig közelebb próbáltunk kerülni a távlati célként kitűzött antigénszerkezeti vizsgálatok és vakcina fejlesztés kezdeti lépésének megvalósításához.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

A felmérő vizsgálatához 2016 májusa és 2018 februárja között az ország különböző pontjain elhelyezkedő 17 sertéstelepről összesen 384 bélsármintát gyűjtöttünk, melyek közül 239 hasmenéses, 145 pedig tünetmentes, azaz kontroll állatokból származott. A minták egy, kettő és három-négy hetes szopós malacoktól, a hozzájuk tartozó kocáktól, valamint egy választott növendék malac korcsoportból kerültek begyűjtésre.

A TGEV szerológiai felméréséhez használt 908 szérumminta a sertések reprodukciós és légzőszervi szindróma (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) elleni mentesítés keretében a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságára (ÁDI) érkezett mintákból került kiválasztásra. A mintákat 93 különböző sertéstelepről küldték az intézetbe, és telepenként lehetőség szerint tíz mintát választottunk ki a vizsgálatokra. Ezek a minták főként kocákból származtak, így bevontuk a vizsgálatba saját archív mintáinkat is, melyek közül egy füzesabonyi telepen (a továbbiakban 'F' telep) 2013-ban gyűjtött, több korosztályt lefedő 174 mintát vizsgáltunk részletesen.

A felmérő PCR vizsgálatához nem kapcsolódóan 2016-ban egy, 2018-ban pedig három PEDV eset fordult elő, melyekből különböző minták kerültek begyűjtésre.

Egy vízszerű hasmenéssel és esetenként hányással, 100%-os morbiditással és az újszülött malacok körében nagyjából 30%-os mortalitással járó eset fordult elő egy 60 kocás sertéstelepen 2016 januárjában. A Székesfehérvár melletti telepről egy szopós malac hulla és különböző korosztályú állatoktól (kan, koca, malac) származó 12 végbéltampon minta került begyűjtésre.

Egy 1800 kocás, nyírcsaholyi sertéstelepen (a továbbiakban 'A' telep) 2018 januárjában minden korosztályban hasmenés és étvágytalanság tüneteit figyelték meg, az egy hetesnél fiatalabb állatokban pedig a mortalitás 40%-on tetőzött. Az 'A' telepről két hulla előzetes vizsgálatát követően négy héttel kanoktól, kocáktól, kocasüldőktől, valamint négy és egy hetes malacoktól gyűjtöttünk mintákat. Ugyanazon állatoktól nyolc végbéltampon-, nyolc vér-, és öt, hét vagy nyolc bélsárminta, valamint minden egyes korosztályból három környezeti tamponminta került begyűjtésre.

Egy mohácsi sertéstelep (a továbbiakban 'B' telep) hizlaldaként működő egységében ('B2') figyelték meg hasmenést és jelentős testtömegbeli szóródást 2018 januárjában. Az 1000 kocás, teljes vertikumban termelő, tünetmentes egységből ('B1') hat nyálmintát gyűjtöttünk hat, nagyjából 30 állatot számláló csoportból. A 'B2' egységből öt végbél- és négy környezeti tamponmintát, valamint öt nyál- és öt vérmintát gyűjtöttünk egy-egy kutricából, összesen öt, egyenként 25-30 növendéket számláló csoportból. A mintagyűjtés négy héttel a hasmenés megjelenése után, főleg tünetmentes állatokból történt.

Egy nagyhegyesi hizlaldából (a továbbiakban 'C' telep) rutin diagnosztikai vizsgálatra küldtek hat hullát 2018 márciusában.

A 'B' telep nyálmintái a helyszínen, a 'C' telep mintái pedig a patológiai vizsgálat keretében WITNESS PED-TGE-Rota gyorstesztel lettek megvizsgálva.

Molekuláris biológiai módszerek

A nukleinsav kivonást a MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen) felhasználásával végeztük egy King Fisher 96 Flex (Thermo Fisher Scientific Inc.) berendezésen a gyártó útmutatásainak megfelelően.

A koronavírusok kimutatásához valós idejű PCR-t használtunk, melyet a Viroreal Kit PEDV&SDCV és a Viroreal Kit TGEV (Ingenetix GmbH) segítségével végeztünk a Rotor-Gene Q 5plex Platform (Qiagen) berendezéssel, követve a gyártó útmutatásait. A PEDV-pozitív mintákat a PEDV N génre irányuló PCR-rel is vizsgáltuk, két PEDV esetben pedig teljes genom meghatározást végeztünk a szakirodalomban elérhető módszerek alapján. Az adeno-, astro-, boca-, calici-, kobu-, rota- és Torque teno vírusokat hagyományos PCR segítségével mutattuk ki a TGradient Thermocycler (Biometra) vagy a 2720 Thermocycler (Applied Biosystems) berendezések segítségével korábban leírt primereket alkalmazva. RNS vírusok esetében a PCR-t megelőző reverz transzkripciót a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) segítségével hajtottuk végre, követve a gyártó útmutatásait.

A felmérő vizsgálatra gyűjtött bélsármintákon kívül az 'A' telepről származó 30 bélsármintát, a 'B' telepen gyűjtött 25 végbéltampon mintát, valamint a 'C' telep 5 bélsármintáját is teszteltük az előzőekben felsorolt vírusokra.

Szekvenálás, szekvencia elemzés

A felmérő vizsgálat során kapott PCR termékek egyharmada, a PEDV N gén PCR megfelelő termékei, valamint a két PEDV teljes genom meghatározásához szükséges fragmensek kerültek szekvenálásra. A szekvenálást a BaseClear B.V. vagy a Biomi Kft. végezte el számunkra. A szekvenciák szerkesztéséhez és elemzéséhez a BioEdit (Ibis Biosciences), a DNASTAR (DNASTAR Inc.) és a MEGA különböző verzióit, a rekombináció felderítésére pedig az RDP4 és a SimPlot programot használtuk. Az általunk meghatározott két PEDV teljes genomot feltöltöttük a GenBankba, ahol KX289955 és MH593900 hozzáférhetőségi számokon (accession number, Acc. No.) érhetők el.

Szerológiai módszerek

A TGEV szerológiai felméréséhez gyűjtött szérummintákat és az archív mintáinkat immunfluoreszcencia teszttel (IFT) vizsgáltuk. A sejthez adaptált Purdue-115 TGEV törzsszel

fertőzött sertés here sejteket először a hígított mintákkal, majd fluoreszcens festékekkel jelölt anti-sertés IgG-vel (Sigma-Aldrich) inkubáltuk, végül kontrasztfestésként Evans kék oldatot alkalmaztunk. A sejtek festődését fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon) vizsgáltuk. A több korcsoportot (szopós malacok, kocák és hízók) reprezentáló 'F' telep pozitív mintáit kvantitatív módon egy kettes alapú hígítási sor elkészítésével is vizsgáltuk.

A TGEV IFT eredményeként pozitív szérummintákat a TGEV és a sertés respirációs coronavírusa (porcine respiratory coronavirus, PRCV) ellen képződött ellenanyagok elkülönítése érdekében teszteltük az INgezim Corona Diferencial 2.0 (Ingenasa) kit segítségével a gyártó útmutatásának megfelelően.

A 2018-as PEDV esetekben érintett 'A' és 'B' telep vérmintáit az Ingezim PEDV (Ingenasa) kit segítségével vizsgáltuk meg követve a gyártó utasításait.

Vírusizolálás

A 2016-os PEDV eset során gyűjtött vékonybél minta, valamint a 2018-as esetek közül az 'A' telep 2 bél-, 2 bélsár- és 2 végbéltampon mintája, a 'B' telep 3 nyál- és 2 végbéltampon mintája és a 'C' telep 5 bélsármintája szolgált a vírusizolálás kiindulási anyagaként. Az izolálást alapvetően egy korábban leírt módszer alapján végeztük kisebb, a helyi laboratóriumi körülményeknek megfelelő módosításokkal. A centrifugálással és szűréssel előkészített mintákkal Vero sejteket fertőztünk. A naponta megfigyelt citopatogén hatás (CPE) függvényében a fertőzést követő hetedik vagy korábbi napon a sejteket tartalmazó palackokat háromszor lefagyasztottuk és felengedtük, az így kapott szuszpenziót pedig a korábban említett PEDV N gén PCR-rel vizsgáltuk a vírusizolálás sikerességének megállapítása érdekében.

Statisztikai elemzések

A felmérő vizsgálat eredményeinek statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism 7.0 programot (GraphPad Software) használtuk. A hasmenéses és kontroll minták arányainak összehasonlításához a Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztuk. A különböző korcsoportokban a kimutatott vírusok számában lévő eltéréseket khí-négyzet próbával vizsgáltuk meg. Az egyes korosztályok, illetve vírusok közötti kapcsolatokat pedig binomiális eloszlással elemeztük, mely során a nullhipotézis minden esetben a tesztelt csoportok közötti különbség hiánya volt.

Eredmények

Felmérő PCR vizsgálat

A felmérő vizsgálatra gyűjtött 384 bélsármintából 196 mintában mutattunk ki legalább egy vizsgált vírust és mind a 17 sertéstelepen találtunk pozitív mintákat. A 196 pozitív mintából 126-ban csak egy vírust mutattunk ki, 70-ben pedig kevert fertőzést találtunk, mely során az esetek 63%-ában kettő, 27%-ában három, 10%-os arányban pedig négy különböző vírust találtunk ugyanazon mintában. Leggyakrabban kobuvírusokat detektálunk, melyek a pozitív minták 55,1%-ában fordultak elő, ezt követte a bocavírusok 33,2%-os, majd a rotavírusok 20,9%-os aránya. A többi vizsgált vírus előfordulási aránya az összes pozitív mintához viszonyítva nem érte el a 15%-ot (adenovírus – 14,3%, astrovírus – 13,8%, kettes típusú sertés circovírus – 7,7%, calicivírus – 5,6%, Torque teno sertés vírus 1 és 2 – 1,0-1,0%). Coronavírusokat és sertés rotavírus (porcine rotavirus, PRV) B-t nem találtunk a felmérő vizsgálatra gyűjtött mintákban.

A pozitív minták 63,8%-a hasmenéses állatokból származott, és a TTSuV1 kivételével, mely csak kontroll mintákban fordult elő, minden vizsgált vírus esetén darabszám szerint magasabb értékek mutatkoztak a hasmenéses mintákban. Ugyanakkor, az összes hasmenéses (239) és kontroll (145) mintához viszonyítva elvégzett korrekcióval a kobuvírusok (porcine kobuvirus, PKV) esetén már magasabb előfordulási gyakoriság volt látható a kontroll csoportban (24,7% hasmenéses és 33,8% kontroll). A többi vizsgált vírus esetén minden esetben magasabb volt a hasmenéses minták pozitivitásának aránya a kontrollhoz képest (bocavírusok – 17,6% vs. 15,9%, rotavírusok – 13,4% vs. 6,2%, adenovírus – 8,4% vs. 5,5%, astrovírus – 7,5% vs. 6,2%, calicivírus – 5,0% vs. 2,1%, kettes típusú sertés circovírus – 3,3% vs. 2,1%, Torque teno sertés vírus 2 – 0,8% vs. 0,0%), azonban csak PRV esetén volt kimutatható szignifikáns különbség ($p=0,0275$) a hasmenéses mintákban történt detektálás javára.

Korcsoport szerinti bontásban a legalább egy vizsgált vírust tartalmazó pozitív minták aránya csökkenő sorrendben a három-négy hetes malacok esetében 69,6% (48/69), a kéthetes malacoknál 64,5% (49/76), a választott malacoknál 63,9% (46/72), az egyhetes malacoknál 40,4% (36/89), míg a kocák esetében 21,8% (17/78) volt. A sorrend a kimutatott vírusok számát tekintve módosult, választott malacok mintáiból 108, három-négy hetes malacok esetében 65, kéthetes malacoknál 58, egy hetes malacoknál 48, kocák esetében pedig 20 vírust detektáltunk. Ezen adatokat összegezve megállapítottuk, hogy a kevert fertőzés aránya a választott malacok esetében volt a leggyakoribb 76,1%-os aránnyal, míg a többi csoport esetében az egy vírus okozta fertőzés volt jellemzőbb, kevert fertőzés az egyhetes malacoknál 30,6%-os, a kéthetes malacoknál 16,3%-os, a három négy hetes malacok esetén 29,2%-os arányban, kocákban pedig mindössze 11,8%-ban fordult elő. A pozitív minták

arányában nem volt szignifikáns különbség az egyes korcsoportok között, a kimutatott vírusok száma azonban összességében szignifikáns eltérést ($p < 0,0001$) mutatott, valamint az egyes csoportok egymáshoz való viszonyítása során is csak a kéthetes és a három-négy hetes malacok csoportja között nem volt jelentős különbség e tekintetben.

A leggyakrabban előforduló PKV jellemzően a szopós malacok mintáiból származott és szignifikánsan kevesebbszer ($p < 0,0026$) mutatott ki választott malacokból, kocákban pedig egyáltalán nem detektáltuk. A második leggyakoribb bocavírusok (porcine bocavirus, PBoV) ezzel ellentétesen szignifikánsan magasabb ($p < 0,0001$) arányban fordultak elő választott malacokban a többi korcsoportéhoz képest. A harmadik leggyakoribb PRV esetén pedig a többi csoportéhoz képest csak az egyhetes malacok esetén találtunk jelentősebb eltérést ($p = 0,0029$), amely korosztályban egyedül fordult elő PRVC. A többi vizsgált vírust legtöbbször választott malacok mintáiból mutattuk ki, kivéve a TTSuV1-et, melyet egy kéthetes és egy három-négy hetes malac mintájában detektáltunk.

TGEV szerológia

A vizsgált 93 sertéstelep közül az országon belüli egyenletes eloszlással 41 telep esetén fordult elő pozitív eredmény, melyek közül a legtöbb, összesen 12 telepen csak egy pozitív mintát találtunk, és ezzel szemben csak egy telepen találtunk TGEV specifikus ellenanyagokat minden vizsgált mintában. Az IFT-vel vizsgált 908 szérumminta közül 140 esetben detektáltunk TGEV-re reagáló ellenanyagokat, melyek döntő többségét a differenciáló ELISA PRCV ellen képződött antitestként azonosította, csupán egyetlen mintában voltak TGEV ellen termelt ellenanyagok.

A több korosztályt lefedő 'F' telep 174 mintája közül 31 lett IFT-pozitív, melyek közül 20 a szopós malacok, 11 pedig a hízók csoportjában fordult elő. A minták titere a kvantitatív IFT során átlagosan 28,4 volt négy és 128 közötti szélső értékekkel. A differenciáló ELISA az összes IFT-pozitív mintában PRCV ellen termelődött antitesteket mutatott ki.

PEDV esetek

A 2016-os PEDV eset során a vírus jelenlétét az elhullott malac vékonybelében, valamint öt végbéltampon mintában igazoltuk.

A 2018-as esetek során PCR és ELISA pozitív mintákat is találtunk. Az 'A' telepen gyűjtött 85 mintából 26-ban detektáltunk PEDV-et, a 40 vérminta közül pedig 34 tartalmazott PEDV specifikus ellenanyagokat. ELISA-pozitív minták minden korosztályban előfordultak. Pozitív bélsármintákat a kocák, pozitív környezeti tamponmintákat pedig az egy hetes malacok kivételével minden korcsoportban találtunk, míg a végbéltampon minták közül csak az egy hetes malacoknál voltak pozitívak. A 30 bélsármintából 12 volt pozitív PEDV-re, ebből öt

esetben kevert fertőzés fordult elő, míg tíz minta csak egyéb vírusokra volt pozitív. A PEDV-en kívül adeno-, astro-, boca-, calici-, kobu- és Torque teno vírusok fordultak elő a mintákban.

A 'B' telepen gyűjtött 31 nyálminta negatív volt a helyszínen elvégzett WITNESS PED-TGE-Rota gyorstesztel és a 'B1' egységből származó minták PEDV PCR-rel is negatívak lettek, de a 'B2' egységben gyűjtött 25 nyálminta közül öt ezzel a módszerrel pozitívnak bizonyult. Ezen kívül a 'B2' egységben gyűjtött 25 vérminta mindegyike pozitív lett PEDV specifikus ellenanyagokra, PCR-rel pedig a 25 végbéltampon minta közül hét, a 25 környezeti tamponmintából 14 lett pozitív érintve minden vizsgált kutricát. Az egyéb vírusokra is tesztelt végbéltampon minták közül négy csak PEDV-re, három PEDV-re is, kilenc pedig csak más vizsgált vírusokra lett pozitív. A PEDV-en kívül adeno-, astro-, boca-, calici- és kobuvírusok fordultak elő a mintákban.

A 'C' telepről származó hat hulla közül kettőnél találtak nagy mennyiségű vízszerű tartalmat az állatok vékonybelében, de az összes esetben az enterális megbetegedéstől eltérő kórképet állapítottak meg az elhullás okaként. A kórbonctani vizsgálat során elvégzett WITNESS PED-TGE-Rota gyorsteszt öt állat esetén pozitív lett, amit a PEDV PCR megerősített. Mind az öt vizsgált minta tartalmazott a PEDV-en kívül egyéb vizsgált (circo-, kobu- és Torque teno) vírusokat is.

A PEDV esetekben érintett négy telep PEDV N génre irányuló PCR vizsgálata 99,4% és 99,7% közötti azonosságot mutatott.

A vírusizolálás a 2016-os PEDV eset során gyűjtött vékonybél mintából és a 2018-as esetekből kiválasztott 16 minta közül háromból kiindulva lett sikeres. Ezen esetekben a fertőzést követően legkorábban 48 óra múlva a sejtek lekerekedése, leválása, majd ezek összezapódásával óriássejtek kialakulása volt megfigyelhető, a vírus jelenlétét pedig a PEDV N génre irányuló PCR igazolta.

A PEDV teljes genom összeállítás a 2016-os eset során a vékonybél mintából kiindulva történt. Az így kapott PEDV HUN/5031/2016 magas, 99% feletti nukleotid (nt) egyezést mutatott az akkor elérhető 2014-2015-ös európai PEDV szekvenciákkal, a legnagyobb mértékű különbség az S génben jelentkezett. Ezek az eltérések az S génen belül egy nagyjából 400 nt hosszú szakaszon koncentráálódtak, ahol a legmagasabb, 95-96%-os hasonlóság a sertés enterális koronavírusaival (swine enteric coronavirus, SeCoV) jelentkezett. Ezen a szakaszon a 248 és 640 nt pozíciók között az RDP4 szignifikáns ($p < 0.05$) rekombinációt mutatott ki a PEDV 15V010/BEL/2015 (major parent, Acc. No.: KR003452) és az SeCoV Italy/213306/2009 (minor parent, Acc. No.: KR061459) részvételével, melyet a SimPlot program megerősített.

A teljes genom összeállítás a 2018-as PEDV esetekből a PEDV N gén PCR során a legerősebb pozitivitást mutató vírusizolátumból történt. Az izolált PEDV HUN/S236/2018 a legmagasabb, 99,6%-os nt hasonlóságot a korábbi magyarországi PEDV HUN/5031/2016 és egy rekombináns szlovéniai (SLOreBAS-1/2015, Acc. No.: KY019623) vírussal mutatta.

Annak a szakasznak a vizsgálata, amely a PEDV HUN/5031/2016 törzsben rekombináns volt, magas hasonlóságot mutatott az előzőekben említett vírusokkal, valamint SeCoV-okkal, de ebben az esetben az RDP4 nem adott egyértelmű eredményt a rekombinációra vonatkozóan, ismeretlenként megjelölve a szülő vírusok eredetét. Ugyanakkor, a SimPlot a 2016-os esettel megegyezően detektálta rekombinációs esemény lehetőségét.

Megbeszélés

Felmérő PCR vizsgálat

Két év alatt összesen 384 bélsármintát gyűjtöttünk Magyarország 17 sertéstelepéről, hogy meghatározhassuk sertésekben a hasmenéssel összefüggő vírusok előfordulásának gyakoriságát. Végeredményben a hasmenéses minták 52,3%-ában, illetve a kontroll minták 49%-ában detektáltunk legalább egy vizsgált vírust, mely arány némileg elmarad a szakirodalomban található hasonló felmérések adataitól, bár az egyes beszámolókból eltér a vizsgált vírusok köre. Az összesen 196 pozitív minta 64%-ában fordult elő egyféle vírus okozta fertőzés, mely ismét ellentmondást jelent egyes szakirodalmi adatoknak és egyúttal annak a hipotézisünknek, hogy a kevert fertőzések prevalenciája magasabb. A technikai hibák kizárását követően feltételezzük, hogy az alacsonyabb és kevésbé összetett vírus prevalencia helyi sajátosságnak tekinthető, mely jelenség tisztázását nagyobb mintaszámmal végzett és még több vírusra kiterjedő vizsgálat, vagy egyéb, például metagenomikai módszerek alkalmazása segíthetne.

Érdekes módon koronavírusokat (PEDV, TGEV és sertés deltacoronavírus, PDCoV) egyáltalán nem találtunk a felmérésre gyűjtött mintákban, noha a PEDV ettől függetlenül előfordult hazánkban a vizsgált időszak alatt. Ugyanakkor, több ilyen irányú, szomszédos országokban végzett felmérés is hasonló negatív eredményre jutott, így feltehető, hogy ezen vírusok nem terjedtek el széleskörűen a térségben.

A leggyakrabban kimutatott PKV az összes pozitív mintához viszonyított 55,1%-os előfordulási aránya jól illeszkedik az irodalmi adatokhoz, az eredményeket az egészségügyi állapot függvényében tekintve viszont már vannak eltérések. Esetünkben 145 tünetmentes állatból származó minta 33,8%-ában, a hasmenéses sertésekből vett 239 mintának pedig a 24,7%-ában mutattunk ki PKV-t. Ezzel ellentétben egy korábbi magyar vizsgálatban 13 egészséges állat mintája 54,5%-os, 37 hasmenéses sertésből származó minta pedig 92,3%-os PKV pozitivitást mutatott. A felmérő vizsgálatunkban a PKV magasabb aránya a tünetmentes állatokban mégsem feltétlenül kirívó, hiszen a vírus gyakran fordul elő egészséges sertések mintáinak vizsgálatánál, így valósult meg első magyar vonatkozású leírása is. A detektált 108 PKV közül 99 a szopós malacok korcsoportjaiban fordult elő, így esetenként hozzájárulhatott ennek a fogékony korosztálynak a megbetegedéséhez, míg a PKV-pozitív, de tünetmentes állatokban a magasabb szintű maternális immunitás nyújthatott védelmet.

A második leggyakrabban, a pozitív minták 33,2%-ában kimutatott vírusok a PBoV-ok voltak, melyeket főként a választott malacok csoportjában detektáltuk, hasonlóan egy olyan felméréshez, amely légzőszervi tüneteket mutató sertéseket vizsgált.

A harmadik leggyakoribb PRV 13,4%-ban fordult elő a hasmenéses mintákban és 6,2%-ban a kontroll mintákban, mely arány a többi vizsgált vírushoz képest egyedül jelentett szignifikáns ($p=0,0275$) különbséget a két különböző egészségügyi státuszú csoport között a hasmenés javára, összhangban egy másik közép-európai felméréssel.

A többi vizsgált vírus előfordulási gyakorisága (adenovírus – 14,3%, astrovírus – 13,8%, kettős típusú sertés circovírus – 7,7%, calicivírus – 5,6%, Torque teno sertés vírus 1 és 2 – 1,0-1,0%) általában elmarad a szakirodalmi adatoktól, a vizsgált magyar sertésállományok alacsony vírusterheltségét mutatva a felmérés ideje alatt. Az adott vírusra pozitív minták gyűjteménye viszont hasznosnak bizonyulhat az intézményben végezhető új, például a kérdéses patogenitású vírusok kórtani szerepének meghatározására irányuló kutatások tervezésekor.

A felmérő vizsgálat eredményét korcsoport szerint elemezve megállapítottuk, hogy nem volt jelentős különbség a pozitív minták számában a korcsoportok között, a fertőzések összetettségét illetően viszont már szignifikáns eltérést ($p<0,0001$) tapasztaltunk az összes csoport együttes vizsgálatakor, valamint az egyes csoportok egymáshoz való viszonyítása során a kéthetes és a három-négy hetes malacok kivételével. A legtöbb, összesen 108 vírust, azaz az összes detektált vírus 36%-át a választott malacok csoportjának 46 mintájából mutattuk ki, vagyis ebben a korosztályban nagy számban fordult elő ko-infekció, ezért feltételezzük, hogy a kevert fertőzések magasabb arányának hipotézise kortól is függhet, hiszen ezzel ellentétben a szopós malacok esetében az egyféle vírus okozta fertőzések domináltak. A legalacsonyabb pozitív mintaszámok kocák esetében fordultak elő, mely jelzi, hogy a hozzájuk tartozó malacok fertőzöttségének ellenére ritkán alakult ki a kocákban olyan szintű vírusfertőzés, amely detektálható mértékű vírusürítéssel járt volna.

Az eredmények az egészségügyi státusz függvényében nem adnak egyértelmű választ a vizsgált vírusok patogenitásáról, hiszen közel azonos arányban detektáltuk őket a hasmenéses (52,3%) és tünetmentes (49%) állatokból származó mintákban, valamint a szakirodalom sem támasztja alá az adatok ilyen irányú felhasználását. Ugyanakkor, a pozitív kontroll minták jellemzően ugyanabból az állatcsoportból kerültek detektálásra, amelyben pozitív hasmenéses mintákat is azonosítottunk, utalva arra, hogy a vírusfertőzés és a vírus ürítése fennmaradhatott a klinikai tünetek megszűnését követően is. Mindezt összevetve a prevalencia adatok nem alkalmasak a sertések hasmenésével összefüggésben előforduló vírusok patogenitásának meghatározására, gyűjtésük mégis fontos támpontként szolgál az enterális megbetegedés elleni védekezés irányának meghatározásához, melyhez természetesen elengedhetetlen az adott sertéstelep sajátosságainak (higiénia menedzsment, takarmányozás stb.) ismerete.

TGEV szerológia

A TGEV által okozott kórkép az 1990-es években a vírus többnyire tünetmentes légúti fertőzést okozó deléciós mutánsa, a PRCV megjelenésével párhuzamosan jelentősen visszaszorult, de sporadikusan azóta is előfordul. Magyarországon utoljára 2013-ban mutatták ki a vírust egy klinikai esetből, majd egy 14 sertéstelepre kiterjesztett vizsgálat során még hét telepen találtak TGEV és PRCV pozitív mintákat. Ehhez képest az általunk vizsgált 17 sertéstelep egyikén sem detektálunk TGEV-t, az általunk használt PCR viszont a PRCV-t nem mutatja ki. A TGEV detektálásának hiányában azt feltételeztük, hogy hazánkat nagyfokú szerológiai áthangoltság jellemzi akár a TGEV, akár a keresztvédelmet biztosító PRCV ellen képződött ellenanyagok jelenlétével. Ezt a hipotézist cáfolta, hogy az IFT eredményeként a vizsgált 908 szérummintának csupán 15,4%-a volt szeropozitív. Az IFT pozitív mintákban a differenciáló ELISA alapján a PRCV elleni antitestek domináltak és csak egyetlen szérumban detektáltunk TGEV ellen képződött ellenanyagokat egy olyan telepen, ahol öt másik mintában anti-PRCV ellenanyagok voltak. Így ebben az esetben előfordulhatott, hogy a PRCV ellen képződött protektív ellenanyagok miatt csak egy inapparens TGEV fertőzés alakult ki az állatokban. A több korcsoport vizsgálatának céljával a felmérésbe bevont 'F' telep esetén az országos arányhoz hasonló eredményt kaptunk, a 174 minta 17,8%-a lett pozitív minden esetben a PRCV elleni antitestek kimutatásával. A kvantitatív IFT meglehetősen alacsony, átlagosan 28,4 értékű titert ért el, amely azonban nem feltétlenül jelenti a TGEV elleni hatékony védekezés hiányát, melyet alapvetően a nyálkahártyákon található más típusú immunglobulinok biztosítanak. Három IFT-pozitív minta esetében az ELISA először negatív eredményt adott és csak az ismételt vizsgálat erősítette meg a pozitivitást, melyet a kit küszöbértékének átlépéshez nem elegendő ellenanyag mennyiség magyarázhat, hozzájárulva a költséghatékonysági szempontok mellett mindkét diagnosztikai módszer használatának létjogosultságához.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a TGEV szeroprevalenciája alacsony Magyarországon, mely következtében nem zárható ki járványkitörés előfordulása, így a vírus vizsgálata a sertésekben előforduló hasmenés diagnosztikájának továbbra is fontos, el nem hagyható része.

PEDV esetek

A felmérő PCR vizsgálatához nem kapcsolódóan négy PEDV eset fordult elő Magyarországon a kutatás ideje alatt. Először egy kis sertéstelep volt érintett 2016-ban, melynek a tulajdonosa a kezdeti diagnózis után nem volt hajlandó további együttműködésre, a klinikai tünetek megszűnése után pedig beszüntette tevékenységét, így nem volt alkalmunk járványügyi nyomozásra. Ezt követően két évig nem fordult elő újabb eset és a célzott felmérő vizsgálat ellenére sem mutattuk ki a vírust, míg újra elő nem bukkant 2018-ban. Az új esetek forrásaként

kizártuk a 2016-ban felszámolásra került telepet, valamint az 'A' telepre az importált kanok behozatalát, az exportáló dán sertéstelep fertőzöttségének hiánya és a PEDV N gén szekvencia elemzése alapján. Ezen kívül az 'A' és 'B' telepről is szállítmányokat kapó vágóhíd merült fel a fertőzés gócpontjaként, melyet a vágóhíddal kapcsolatban lévő egyéb telepeken történő megbetegedések hiánya miatt vetettünk el. A 'C' telep nem állt kapcsolatban ezzel a vágóhíddal és a tulajdonosok itt sem járultak hozzá további vizsgálatok elvégzéséhez. Végeredményben nem sikerült megállapítani a vírus egyes sertéstelepekre történő bejutásának pontos módját, bár a szállító járművek szerepét nem lehetett kizárni.

A különböző típusú minták vizsgálata során a 2016-os esetben a végbéltampon minták közel fele PEDV pozitív lett, de az eljárás után fennmaradó mennyiség nem volt elegendő a további módszerekhez, így a következőkben az elhullott állatból vett vékonybél mintát használtuk.

A 2018-as esetek során az 'A' és 'B' sertéstelepekről volt lehetőségünk különböző típusú minták begyűjtésére, melyek az 'A' telep esetén korosztály szerint is eltértek. Az 'A' telepen ugyanazon állatoktól bélsár- és végbéltampon mintákat is gyűjtöttünk, melyeket összehasonlítva a bélsár minták között több lett a PEDV-pozitív, ezen belül pedig a vírus magasabb kópiaszámban volt megtalálható. A 'B' telepen nyálmintákat is gyűjtöttünk, melyek közül PCR segítségével mutattunk ki néhány pozitív mintát, de a WITNESS PED-TGE-Rota gyorseszteszt ezeket is negatívnak mutatta, mert feltehetően nem volt a mintában a teszt kimutathatósági határértékét meghaladó mennyiségű vírus. Mindezeket figyelembe véve a PEDV diagnosztikájához a bélsárminták gyűjtését és vizsgálatát javasoljuk.

Az 'A' telepen a kocák kivételével minden korcsoportban találtunk pozitív bélsármintákat amellet, hogy az állatok többségének a szérummintája is pozitív volt. A 'B' telepen szintén mutattunk ki vírust az összes vizsgált kutyicából minden sertés szerológiai pozitivitásával együtt. Ezen felül mindkét telep környezeti tamponmintái között voltak pozitívak, az 'A' telep esetén 47%-os, a B telepnél 70%-os gyakorisággal. Mindez arra utal, hogy hiába telt el négy hét az első klinikai tünetek megjelenése óta, mely alatt az állatok többsége immunológiai reakciót mutatott, mégis maradtak a fertőzés fenntartásáért felelős vírusűritő egyedek és fennállt a környezetből történő újrafertőződés lehetősége. Ezen tényezők pedig kiemelik az alapos tisztítás és fertőtlenítés, valamint az ezek ellenőrzésére végzett környezeti tamponminták vizsgálatának a jelentőségét.

Mind a három 2018-as esetben megpróbáltunk detektálni a PEDV-en kívül egyéb vírusokat is a felmérő vizsgálattal történő összehasonlítás érdekében elsősorban bélsármintákból. Sikerült detektálnunk a PEDV mellett vagy anélkül egyéb vírusokat is minden telepen, de nem találtunk összefüggést az egyes vírusok előfordulása kapcsán, illetve ezeket az állatok egészségügyi állapotához viszonyítva. A PEDV és egyéb, hasmenéshez köthető vírusok kapcsolata nem tisztázott a szakirodalomban sem.

A PEDV izolálása nem tartozik a könnyen megvalósítható feladatok közé, ezért számunkra is hosszabb időt vett igénybe az irodalmi módszereknek a saját laboratóriumi körülményeinkhez történő igazítása. A legfontosabb módosítás a szövettényesztő palackok nem egy, hanem három alkalommal történő fagyasztása és felengedése volt, hogy a sejtek roncsolásával kiszabadítsuk belőlük a vírust. Az eljárást a 2016-os eset során gyűjtött vékonybél mintából kiindulva dolgoztuk ki, mely a 2018-as esetek 16 mintája közül háromnál szintén eredményes volt. A sikeres vírusizoláción kívül is megfigyeltünk kisebb mértékű CPE-t némely sejttényeszeten, a vírust mégsem sikerült kinyerni. Feltételezzük, hogy ezekben az esetekben egyéb sejtkárosító anyagok lehettek a mintákban. Tudomásunk szerint az utóbbi évek európai PEDV eseteiből csak Németországban került sor vírusizolálásra, rekombináns PEDV izolálására pedig nem volt még példa. Az általunk izolált vírusok hozzájárulhatnak a gének szintjén lévő eltérések kifejeződésének vizsgálatához és vakcinák fejlesztéséhez.

A vírusizolálás elhúzódó kísérletei miatt a teljes genom meghatározása a 2016-os esetből közvetlenül a vékonybél mintából kiindulva történt. Az így meghatározott PEDV HUN/5031/2016 magas, 99% körüli azonosságot mutatott az előző néhány évben leírt európai vírusokkal. A főleg az S génre szorítkozó kis mértékű eltérés mégis jelentősnek bizonyult, mert rekombinációt tudtunk kimutatni benne. A rekombinációban egy belga PEDV (Acc. No.: KR003452) szerepelt az eleve rekombináns, vagyis TGEV gerinccel, de PEDV-ből származó S génnel rendelkező olasz SeCoV-val (Acc. No.: KR061459) együtt.

A 2018-as eseteket követően a sikeresen izolált PEDV HUN/S236/2018 törzsből szintén összeállítottuk a teljes genomot, melyben nem tudtunk egyértelmű rekombinációt kimutatni, noha a legnagyobb hasonlóságot a 2016-os magyar PEDV-vel és egy rekombináns szlovén (Acc. No.: KY019623) vírussal mutatta. Filogenetikai elemzés során a két magyar vírus a GenBankban 2016 végén elhelyezett, de egyelőre nem publikált két szlovén PEDV (Acc. No.: KY019623, KY019624) mellett helyezkedett el egyéb alacsony patogenitású európai vírusok mellett, melyektől valószínűleg célszerű lenne némiképp elkülöníteni őket tekintettel a rekombináció torzító hatására. A két rekombináns szlovén PEDV-ről nem áll rendelkezésre több információ, így nem tudhatjuk, hogy ezek a vírusok kerültek el hazánkba vagy egyidejűleg jelentek meg mindkét országban és közös az eredetük. Terjedésükkel viszont mindenképpen számolni kell, hiszen az S génre szorítkozó vizsgálattal egy olaszországi felmérésben már detektáltak hasonló vírusokat 2017-ben. A koronavírusokra jellemző mutációk és rekombináció miatt pedig nem zárható ki a jövőben további variánsok megjelenése, amely akár a patogenitás változásával is járhat.

Új tudományos eredmények

1. Magyarországon elsőként határoztuk meg egy felmérő vizsgálaton belül az adeno-, astro-, boca-, calici-, corona-, kobu-, rota- és Torque teno vírusok gyakoriságának előfordulását sertésállományokban.
2. A TGEV szerológiai vizsgálatával megállapítottuk, hogy a szeropozitivitás mértéke alacsony Magyarországon, ezért felmerül a kórokozó újbóli felbukkanásának lehetősége.
3. Magyarországon elsőként izoláltunk PEDV törzseket, egyúttal elsőként izoláltunk sikeresen rekombináns PEDV törzseket.
4. Elsőként határoztuk meg két magyar PEDV törzs teljes genom szekvenciáját.

A témában megjelent tudományos publikációk

VALKÓ, A., BIKSI, I., CSÁGOLA, A., TUBOLY, T.†, KISS, K., URSU, K. & Á. DÁN 2017. Porcine epidemic diarrhoea virus with a recombinant S gene detected in Hungary, 2016. *Acta Veterinaria Hungarica* 65 (2): 253-261.

VALKÓ, A., TUBOLY, T.† & A. CSÁGOLA 2018. A sertések enterális koronavírussai – Irodalmi összefoglaló. *Magyar Állatorvosok Lapja* 140 (4): 207-216.

VALKÓ, A., MAROSI, A., CSÁGOLA, A., FARKAS, R., RÓNAI, ZS. & Á. DÁN 2019. Frequency of diarrhoea-associated viruses in swine of various ages in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 67 (1): 140-150.

VALKÓ, A., ALBERT, E., CSÁGOLA, A., VARGA, T., KISS, K., FARKAS, R., RÓNAI, ZS., BIKSI, I. & Á. DÁN 2019. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 67 (2): [közlésre javasolt]

VALKÓ, A., BÁLINT, Á., BOZSA, Á. & A. CSÁGOLA 2019. Prevalence of antibodies against transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in Hungary. *Veterinary and Animal Science* 7:100042.

A témában tartott konferencia prezentációk

VALKÓ, A., CSÁGOLA, A., TUBOLY, T.†, DÁN, Á., URSU, K., BIKSI, I. & K. KISS. A sertések enterális megbetegedéseiben szerepet játszó vírusok kimutatása és elterjedtségük felmérése Magyarországon. Akadémiai Beszámolók – előadás, 2017.

VALKÓ, A., TUBOLY, T.†, DÁN, Á., URSU, K., BÁLINT, Á. & A. CSÁGOLA. A transzmisszibilis gastroenteritis szerológiai felmérése Magyarországon. Akadémiai Beszámolók – előadás, 2018.

VALKÓ, A. Vírusok a sertések hasmenésének hátterében. Köves napok – előadás, 2019.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Tuboly Tamásnak, hogy meglátta bennem a lehetőséget és elindította számomra ezt a PhD kutatást.

Köszönettel tartozom dr. Cságola Attilának, aki vállalta a témavezetés folytatását, és a munkám során mindvégig biztosított türelméről és támogatásáról.

Köszönöm dr. Dán Ádámnak a koronavírusok molekuláris biológiai vizsgálataiban és a PEDV esetek publikációiban nyújtott segítségét, ami nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönet illeti a NÉBIH ÁDI Molekuláris Biológiai Laboratórium dolgozóit a mintáim rendszerezésében és feldolgozásában való segítségnyújtásukért.

Köszönettel tartozom dr. Biksi Imrének, valamint a Haszonállat-gyógyászati Tanszék és Klinika munkatársainak a PEDV esetek során nyújtott segítségükért.

Köszönöm dr. Bálint Ádámnak, a NÉBIH ÁDI Baromfi és Sertés Virologiai Laboratórium dolgozóinak, valamint a NÉBIH ÁDI debreceni és kaposvári intézetek munkatársainak a szérumminták gyűjtésében és a TGEV szerológiai vizsgálatokban való közreműködésüket.

Köszönetet szeretnék mondani a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak a munkám során nyújtott segítségükért, különösen közvetlen kollégáimnak, dr. Lőrincz Mártának, dr. Szücs-Somlyó Évának, dr. Bartsik Ágnesnek és Herbák Józsefné Irénnek.

Köszönöm dr. Rónai Zsuzsannának a szakmai segítséget, a lektorálást és a baráti támogatást.

Köszönettel tartozom minden állatorvos kollégának és a vizsgálatokban részt vevő sertésstelepek dolgozóinak a közreműködésükért.

Köszönöm barátaimnak és családomnak a biztatását, türelmét és támogatását.

Külön köszönöm édesanyámnak, hogy minden írásom nyelvi lektorálását rábízhattam és mindig hitt bennem.