

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

Hazai PRRS fertőzések genomi epidemiológiája



Doktori értekezés

Fornyos Kinga

2023

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tag:

.....
Dr. Bálint Ádám, PhD

Részlegvezető
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Budapest
témavezető

.....
Dr. Szabó István, PhD

c. főiskolai tanár, az állatorvostudomány kandidátusa,
laboratóriumi (bakteriológus-immunológus) szakállatorvos,
PRRS Nemzeti Mentés Bizottság szakmai vezetője
társtémavezető/témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a sz. példányban.

.....
Fornyo Kinga

Tartalomjegyzék

ÖSSZEFOGLALÁS	6
1 BEVEZETÉS	11
2 CÉLKITŰZÉS	13
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	14
3.1 A VÍRUS TÖRTÉNETE.....	14
3.2 A VÍRUS TULAJDONSÁGAI	15
3.2.1 A vírus eredete.....	15
3.2.2 Taxonómia	15
3.2.3 A vírusgenom jellemzői.....	16
3.2.4 Genetikai változékonyság.....	18
3.3 A PRRS JÁRVÁNYTANA	19
3.3.1 A vírus terjedése.....	19
3.3.2 Kórfejlődés	20
3.3.3 Tünetek, kórbonctan.....	22
3.4 DIAGNOSZTIKA	23
3.4.1 Indirekt víruskimutatás, szerológia	23
3.4.2 Direkt víruskimutatás.....	24
3.4.2.1 A vírus izolálása	25
3.4.2.2 A vírusantigén kimutatása	25
3.4.2.3 A vírus genetikai anyagának kimutatása	25
3.4.2.4 A DIVA PCR módszer.....	27
3.5 MEGELŐZÉS, VÉDEKEZÉS.....	28
3.5.1 A magyar sertésállományokban használt vakcinák	29
3.6 PRRSV ELLENI IMMUNITÁS	30
3.6.1 Társfertőzések.....	31
3.7 GAZDASÁGI KÁRTÉTEL	32
3.8 A PRRS ÁLLATEGÉSZSÉGÜGYI IGAZGATÁSI VONATKOZÁSAI	33
3.9 MENTESÍTÉS MAGYARORSZÁGON.....	34
4 ANYAG ÉS MÓDSZER	37
4.1 VAKCINÁK STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	37
4.1.1 A vakcinák genetikai stabilitása	37
4.1.2 Mintavétel.....	37
4.1.3 Diagnosztikai vizsgálatok	38
4.1.4 Szekvencia analízis.....	38

4.2	TELEP SPECIFIKUS DIVA RRT-PCR FEJLESZTÉSE A TELJES VIZSGÁLATI PROTOKOLLAL EGY PRRSV MENTESÍTÉS ALATT ÁLLÓ TELEPEN	39
4.2.1	<i>Mintagyűjtés</i>	39
4.2.2	<i>Indirekt ELISA</i>	40
4.2.3	<i>A vírus RNS izolálása</i>	41
4.2.4	<i>Real-Time PCR</i>	41
4.2.4.1	Elsődleges szűrő rRT-PCR	41
4.2.4.2	Elkülönítő (DIVA) PCR (TaqMan rRT-PCR)	42
4.2.4.3	DIVA PCR-hez szükséges primerek és próbák	43
4.2.4.4	A rendszer specifitása és érzékenysége	44
4.2.4.5	Vegyes fertőzés kimutatása DIVA PCR módszerrel	45
4.2.4.6	A diszkriminatív TaqMan rRT-PCR módszer optimalizálása	45
4.2.5	<i>Szekvenálás</i>	45
4.3	A DIVA PCR GYAKORLATI ALKALMAZÁSA	46
4.3.1	<i>Sertésállományok vizsgálata</i>	46
4.3.2	<i>Vizsgálatban résztvevő telepek és jellemzőik</i>	47
4.3.2.1	„A” telep	47
4.3.2.2	„B” és „C” telep	48
4.3.2.3	„D” telep	49
4.3.2.4	Statisztikai elemzés	50
5	EREDMÉNYEK	51
5.1	PORCILIS PRRS VAKCINA	51
5.1.1	<i>ORF5 szekvencia vizsgálata</i>	51
5.1.2	<i>ORF7 szekvencia vizsgálata</i>	53
5.2	UNISTRRAIN PRRS VAKCINA (KORÁBBI NEVÉN AMERVAC)	55
5.2.1	<i>ORF5 szekvencia vizsgálata</i>	55
5.2.2	<i>ORF7 szekvencia vizsgálata</i>	56
5.3	REPROCYC PRRS EU VAKCINA (ÉS A NEM ADJUVÁLT VÁLTOZATA, PRRS FLEX EU)	57
5.3.1	<i>ORF5 szekvencia vizsgálata</i>	57
5.3.2	<i>ORF7 szekvencia vizsgálata</i>	58
5.4	A DIVA REAL-TIME PCR MÓDSZER SPECIFICITÁSÁNAK ÉS ÉRZÉKENYSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA	59
5.5	VEGYES FERTŐZÉS KIMUTATÁSA DIVA PCR MÓDSZERREL	59
5.6	DIAGNOSZTIKAI DIVA RRT-PCR MÓDSZER EREDMÉNYEI A VIZSGÁLATBAN RÉSZTVEVŐ TELEPEK ESETÉBEN	60
5.6.1	„A” telep	61
5.6.2	„B” telep	62
5.6.3	„C” telep	63
5.6.4	„D” telep	64
6	MEGBESZÉLÉS	66

6.1	A MAGYARORSZÁGON HASZNÁLT VAKCINÁK STABILITÁSÁNAK JELENTŐSÉGE A PRRSV ELLENI VÉDEKEZÉSBEN.....	66
6.2	A LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKA FONTOSSÁGA A PRRSV FELSZÁMOLÁSA SZEMPONTJÁBÓL	68
6.3	A DISZKRIMINATÍV RRT-PCR JELENTŐSÉGE A VIZSGÁLT TELEPEK ESETÉBEN	70
6.4	A MAGYARORSZÁGI PRRSV-VEL FERTŐZÖTT TELEPEK ELLENŐRZÉSI PROGRAMJA, AVAGY A DISZKRIMINATÍV RRT-PCR A GYAKORLATBAN	71
7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	73
8	IRODALOM.....	74
9	A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEIBŐL SZÁRMAZÓ KÖZLEMÉNYEK.....	86
9.1	A TÉMÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK, POSZTER NEMZETKÖZI KONFERENCIÁN	86
9.2	A DOKTORI KUTATÁS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK, POSZTEREK	86
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	88

Összefoglalás

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) súlyos fertőzéseket idéz elő, ezáltal jelentős anyagi károkat okoz mind a hazai, mind a külföldi sertéstartásban. A modern iparszerű sertéstartás egyik legsúlyosabb gazdasági károkat okozó tényezőjeként tartják számon. A vírus reprodukciós, illetve légzőszervi tüneteket okozhat korosztálytól függően. A megbetegedés önmagában is, valamint az általa okozott immunszuppresszió következtében kialakuló másodlagos fertőzések következtében is az állat korai elhullásához vezethet.

A komoly gazdasági károkat okozó vírus a különböző országokból Magyarországra irányuló intenzív import következtében a nyugat-európai országokhoz képest heterogénebb populációt alakított ki, amely megnehezíti a PRRSV diagnosztikáját. Magyarországon 2014-ben fogadták el a Nemzeti PRRS Mentésítési Programot, melynek célja a magyar sertéstartás versenyképessé tétele. 2022-re a program eredményeként az ország teljes sertésállománya mentes a PRRS vadvirulens vírus fertőzéstől, és csupán 5 olyan nagylétszámú tenyészállomány van, amelyben a tenyészállatokat még vakcinázzák, de az utódállomány vakcinázás nélkül is egész élete folyamán mentes marad a fertőződéstől.

A kutatásaim célja egy olyan diagnosztikai módszer kidolgozása volt, amely lehetővé tette a feltételezett virémia időszakában a védekezéshez használt élő, modifikált vakcinavírus, illetve a telep befertőződését okozó vadvirulens vírus elkülönítését.

Elsőként nyertünk információkat a magyarországi PRRS mentésítésben használt vakcinák genetikai stabilitásáról, valamint kidolgoztunk egy gyors, robosztus, olcsó és hatékony telepspecifikus DIVA Real-Time RT-PCR módszert, mely egyszerre nagy mennyiségű minta feldolgozását tette lehetővé.

A jelen kutatásban az elkülönítő PCR módszer a PRRSV hatékonyabb telepi diagnosztikájának köszönhetően hozzájárult a vírus sertésállományokban való cirkulációjának csökkentéséhez és támogatta egy adott állomány PRRS mentésítési programjának sikerességét.

A kutatás járványtani folyamatainak elemzése alapul szolgálhat preventív intézkedések bevezetéséhez, amelyek meggátolhatják a sertésállományok PRRSV általi elsődleges, valamint ismételt fertőződését.

Summary

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) induces severe infections, leading to substantial financial losses for both Hungarian and international pig farming sectors. It stands as one of the most critical contributors to economic impairment in contemporary industrial pig husbandry. Depending on the age group, the virus can elicit reproductive and respiratory symptoms. The disease itself, or coupled with secondary infections due to its immunosuppressive effects, can lead to early mortality in the animals.

The virus, responsible for noteworthy economic damage, has exhibited a more diverse genetic makeup compared to Western European countries, largely due to intensive imports from various nations. This heterogeneity complicates the diagnosis of PRRSV. In Hungary, the National PRRS Eradication Programme was implemented in 2014 with the goal of enhancing the competitiveness of Hungarian pig farming. By the year 2022, the implemented program aims to achieve the absence of PRRS wild virus infection in the complete pig population of the nation. This goal will be realized through the cessation of vaccination in all but five major breeding herds, where breeding animals will still undergo vaccination, however, the unvaccinated progeny will remain free from infection perpetually, rendering vaccination unnecessary.

The primary objective of this research was to develop a diagnostic approach capable of distinguishing, during the presumed viremia phase, whether it originated from the attenuated live vaccine virus applied for control purposes, or from the virulent wild virus responsible for the infection of the farm.

We were pioneers in gathering insights into the genetic stability of PRRS vaccines used for eradication efforts in Hungary. Additionally, we successfully developed an expedient, robust, cost-effective, and efficient farmspecific DIVA Real-Time PCR method, enabling the simultaneous processing of a substantial number of samples.

In the present study, the discriminative PCR method played a pivotal role in curbing the circulation of the virus within swine herds, and facilitated a more effective farmspecific diagnosis of PRRSV, thereby contributing to a successful PRRS eradication programme within a specific herd.

The epidemiological analyses conducted in this study serve as a cornerstone for the implementation of preventive measures. These measures aim to avert both primary and recurrent infections of pig herds by PRRSV, offering a framework for enhancing the overall health and resilience of swine populations.

Rövidítések

ADE	antibody-dependent enhancement	antitestfüggő fokozódás
ADV	Aujeszky's disease virus	Aujeszky-féle betegség vírusa
BAL	bronchoalveolaris lavage	bronchoalveoláris lavázs
Cy5	cyanine-5	cianin-5
Ct	cycle threshold	ciklus küszöb
DC	dendritic cell	dendritikus sejt
DIVA PCR	differentiating infected from vaccinated animals polymerase chain reaction	vadvírus és vakcina elkülönítő polimeráz láncreakció
EAV	equine arteritis virus	ló arteritisz vírus
ELISA	enzym linked immunosorbant assay	enzim által kötött immunszorbens módszer
FAM	carboxyfluorescein	karboxifluoreszcein
GP	glycoprotein	glikoprotein
HEX	hexachloro-flourescein	hexakloro-floureszcein
HP-PRRS	highly patogen-porcine reproductive and respiratory syndrome	magas patogenitású sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma
IFA	immunfluorescence assay	immunfluoreszcens módszer
IFN	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin
IL-10	interleukin 10	interleukin 10
LDV	lactate dehydrogenase-elevating virus	egér aktát dehidrogenáz szintjét emelő vírus
MLV	modified live virus	módosított élő vakcina
NA	neutralizing antibody	neutralizáló antitestek
NGS	new generation sequencing	új generációs szekvenálás
Nsp	non-structural protein	nem stukúrális fehérje
OD	optical density	optikai denzitás
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
ORF5	open reading frame 5	nyitott leolvasási keret 5

PAM	pulmonary alveolar macrophage	tüdő alveoláris makrofág
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PCV2	porcine circovirus 2	sertés cirkovírus-2
PEARS	porcine epidemic abortion and respiratory syndrome	sertések epidémiás vetelés és légzőszervi szindrómája
PMWS	post-weaning multisystemic wasting syndrome	malacok cirkovírus okozta sorvadása
pp1a	protein phosphatase 1a	fehérje foszfatáz 1a
pp1ab	protein phosphatase 1ab	fehérje foszfatáz 1ab
PRCV	porcine respiratory complex virus	sertés légzőszervi komplex vírus
PRDC	porcine respiratory disease complex	sertések légzőszervi komplex betegsége
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome	sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus	sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírusa
PRV	pseudorabies virus	Aujeszky-féle vírus
RFLP	restriction fragmnet length polymorphism	restrikciós fragment hossz polimorfizmus
RFS	ribosomal framshifting	riboszómális keret eltolódás
RNA	ribonucleic acid	ribonukleinsav
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
rRT-PCR	real time reverse transcription polymerase chain reaction	valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció
sgmRNA	subgenomic messenger RNA	szubgenomiális hírvivő RNS
SHFV	simian haemorrhagic fever virus	majmok vérzésemes lázát okozó vírus
S/P	sample/positive control	minta/pozitív kontroll
Th	T helper cell	T segítő sejt

TMB	tetramethyl-benzidine	tetrametil-benzidin
VIC	2'-chloro-7'-phenyl-1,4 dichloro-6- carboxyfluorescein	2'-kloro-7'-fenil-1,4 dikloro-6- karboxifluoreszcein
VF	vaccinated free	vakcina mentes
WGS	whole genom sequeuencing	teljes genom szekvenálás

1 Bevezetés

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (angolul: porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), a sertések vírus okozta, szaporodásbiológiai zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó fertőző betegsége, amely a világ majdnem minden sertéstartással foglalkozó államában előfordul.

Magyarországon a vírus valószínűleg 1990-es évek óta jelen van, de csak az 1995 óta van biztos tudásunk jelenlétéről, szerológiai vizsgálatok alapján (Hornyák és mtsai., 1996). A PRRSV-t izolálni 1999-ben sikerült hazánkban, mely által bebizonyosodott az európai genotípusba tartozó vírus jelenléte itthon is (Medveczky és mtsai., 2001). A PRRS-t, az Állategészségügyi Szabályzat 41/1997. (V.28.) FVM rendelete alapján 2001. június 1-ig bejelentési kötelezettség alá vonta, majd ezen intézkedést visszavonta, mivel a betegséget az EU országaiban rendeletileg nem szabályozták. 2006-ban ismét a bejelentendő betegségek közé került. A két időszak között a vírus sokkal gyorsabban terjedt hazánkban, mivel a fertőzöttség megállapítása nem vont maga után hatósági intézkedést. Magyarország Európai Unióhoz való csatlakozása tovább könnyítette a betegség terjedését hiszen a fertőzött állományok hatósági állategészségügyi ellenőrzések nélkül érkezhettek nyugat-európai országokból (Balka és mtsai., 2008).

A PRRS az 2005. évi CLXXVI. törvény alapján 2006. január 1-jétől újból bejelentési kötelezettség alá tartozik Magyarországon. A Nemzeti PRRS Mentésítési Terv 2014-ben lépett életbe azzal a céllal, hogy felmérjék a hazai sertésállományok fertőzöttségét, optimalizálják a hízósertések nevelését alacsonyabb gyógyszer, elsősorban antibiotikum felhasználás mellett, és elérjék a vírusmentességet. A mentésítés előkészítéséhez 2010 és 2013 között átfogó vizsgálatokat végeztek, melyek során pontosan regisztrálták és minősítették a kis és nagylétszámú tenyészállományok és hizlaldák PRRS fertőzöttségét, valamint genetikai kládokba sorolták az azonosított PRRSV törzseket a szekvenálás alapján (Szabó és mtsai., 2020).

A PRRS vírus a különböző korosztályú sertésállományokban egyenlő gyakorisággal figyelhető meg. A fiatal korosztályú sertésekben légzőszervi zavarokat, tenyészállatokban szaporodásbiológiai zavarokat (vetélés, koraellés, korai elhullás, halvaszületés) idézhet elő. A klinikai tünetek hiánya nem jelenti a vírustól való mentességet (Zimmerman és mtsai, 2019). Ezért különösen fontosak a diagnosztikai vizsgálatok, a különböző korosztályok folyamatos monitorozása. A fertőzés jelenlétét indirekt és direkt módszerrel is vizsgálhatjuk. Az indirekt vírus hatás kimutatása szerológiai (pl.: ELISA) vizsgálatokkal történik, ahol kórokozó által kiváltott immunreakciók termékeit, ellenanyagokat tudunk detektálni. A vírus

antigénjei által termelt ellenanyagok a fertőzött állatok vérsavóiban mutathatók ki, így az ELISA módszerrel az állományokban zajló fertőzést, illetve az eltérő korcsoportok immunológiai státuszát tudjuk megállapítani. A direkt víruskimutatás alkalmas arra, hogy a fertőződést a megbetegedés akut szakaszában azonosítsuk. Az eltérő korcsoportokban a vírus a fertőzést követően csak bizonyos ideig mutatható ki vérsavóból, malacokban 4-6 hétig, kanok és kocák esetében 1-2 hétig. A vírus RNS-t reverz transzkripció polimeráz láncreakción (RT-PCR) alapuló technikával detektálhatjuk (Zimmerman és mtsai, 2019), erre a legalkalmasabb az ORF7, mint konzervatív génszakasz.

A különböző korcsoportokból származó vérmintákat szerológiai (ELISA) és molekuláris biológiai (PCR) módszerekkel vizsgáltuk a fertőzés időpontjának meghatározására. Ezt az eljárást használtuk fel arra, hogy egy telepspecifikus mentesítési protokollt dolgozzunk ki, amely nem csak a vakcinázási rendszert foglalja magában, hanem a belső járványvédelmi intézkedéseket is. Ilyenek többek között az állatok mozgatásának szigorítása, fertőtlenítőszer alkalmazása, dolgozók beléptetése a telepre és telepen belüli mozgás szigorítása a különböző állattartó létesítményei között, illetve a megfelelő ruházat viselése, a munkaeszközök istállóhoz kötése stb.

A fertőzött sertésállományok felszámolásának alapelve a gazdaságok külső és belső járványvédelmi szabályzatának a szigorú betartása, laboratóriumi monitorozása az állomány különböző korcsoportjai között és a PRRS elleni immunizálás (beleértve a vemhes és a nem vemhes tenyészkocákat, kocasüldőket, tenyészkacákat, malacok pótlását a laktáció alatt, és a hízókat). A PRRSV ORF5 és ORF7 szekvenciák azonosítása rendkívül fontos tájékoztatást ad a PRRSV terjedéséről, a fertőzés lehetőségének meghatározásáról és a járvány terjedésének módjáról (Bálint és mtsai., 2021). Az epidemiológiai kapcsolatok vizualizálása jelentősen növeli a lehetőséget, hogy a szakemberek virológiai módszerekkel elemezzék az epidemiológiai folyamatokat és molekuláris biológiai alapú eredményeket (Szabó és mtsai., 2020^b). A szekvencia adatok kiértékelése kiemelt jelentőségű a PRRS járvány gazdaságok közötti és állományon belüli vírus terjedésének vizsgálatában.

A PRRSV elleni védekezés elsődleges célja, a gazdasági kártétel csökkentése, megszüntetése és a vírus eliminálása, valamint a jelenleg negatív sertésállományok státuszának megtartása, illetve a fertőzött telepeken lévő új rekombináns törzsek kialakulásának megakadályozása. A specifikus védekezési lehetőségek közül a vakcinázás során megfigyelhető, hogy önmagában az inaktivált vakcina nem biztosít elegendő védelmet a korábban nem fertőződött sertések immunválaszának megfelelő kialakulásához. Az élő vírusos (MLV) vakcinák erőteljesebb immunválaszt alakítanak ki, de teljeskörű védelmet ezek sem adnak. Jelen kutatás célja a már meglévő diagnosztikai módszerek fejlesztése, illetve alkalmazásukkal komplex mentesítési módszerek kidolgozása a PRRS elleni védekezés érdekében.

2 Célkitűzés

A kutatásaim célja egy olyan diagnosztikai módszer kidolgozása volt, amely lehetővé teszi a feltételezett PRRSV virémia időszakában a védekezéshez használt élő, modifikált vakcinavírus, illetve a telep befertőződését okozó vadvírus elkülönítését. Mindezek mellett a rendszeres laboratóriumi PRRSV PCR vizsgálatokkal nyomon követhetők a magyarországi PRRSV törzsek elterjedése is. A kutatás hozzájárulhat a magyarországi sertéstelepeken alkalmazott vakcinatörzsek állományon belüli terjedésével és genetikai stabilitásával kapcsolatos ismeretek bővítéséhez is.

A jelen kutatásban kidolgozott elkülönítő PCR módszer a PRRSV hatékonyabb telepi diagnosztikájának köszönhetően hozzájárulhat a vírus sertésállományokban való cirkulációjának csökkentéséhez és elősegítheti egy adott állomány PRRS mentesítési programjának hatékonyságát. A DIVA PCR fejlesztése kiemelkedő fontosságú volt, melyet saját kutatásunkban megvalósítottunk, mivel ez a módszer érzékenyen és gyorsan képes megkülönböztetni a PRRS vadvírust az attenuált vakcinatörzstől.

Ezenkívül a kutatás segítséget adhat a már meglévő adatokat felhasználva a hazánkban előforduló PRRS vírus törzsek azonosítására, nyomon követésére, evolúciójuk és filogenetikai kapcsolataik további elemzésére, összehasonlítására, földrajzi elhelyezkedésük megállapítására, valamint járványtani szerepük meghatározására.

Laboratóriumunk számos PRRS vírussal fertőzött telepről kap heti rendszerességgel vérsavó mintákat. A telepek többségében élővírusos vakcinázást is alkalmaznak. A több évre visszavezethető minták ORF5 és ORF7 szekvencia analízisével pontos képet kaphatunk a vakcina által okozott szelekciós nyomásra kialakuló vadvírus törzsek evolúciójáról, új, esetleg a telepen párhuzamosan megjelenő variánsok megjelenéséről, valamint az alkalmazott vakcinák genetikai stabilitásáról.

Az élő vírusos vakcinát használó sertéstelepek számára elengedhetetlen, hogy minél rövidebb idő alatt értesüljenek arról, hogy az adott korcsoportban azonosított vírus vakcina vagy vadvírus eredetű. Az úgynevezett elkülönítő PCR (DIVA PCR) segítségével megállapítható, hogy az állatban vadvírus vagy vakcinavírus van-e jelen. Ez az elkülönítő PCR szűrés, mely az ORF5 szekvencia azonosítása alapján történik preventív jelleggel bírhat a fertőzött telepek számára. Munkánk során arra törekedtünk, hogy bemutassuk az elkülönítő PCR-ek alkalmazásának jelentőségét, szerepét a mentesítési eljárás során.

Szeretnénk felhívni a figyelmet az esetleges újonnan megjelenő magas virulenciával rendelkező rekombináns vírustörzsek kialakulására és azok fontosságára.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A vírus története

A PRRSV az 1980-as években jelent meg először Észak-Amerikában (Keffaber és mtsai., 1989), majd az 1990-es években Európában is leírták, elsőként Északnyugat-Németországban (Medveczky, 1996). Az ismeretlen eredetű megbetegedést többféle képpen nevezték el úgymint „Mystery Swine Disease”, később tipikus kórtani-klinikai elváltozásának köszönhetően kapta a „Blue -Eared Disease” nevet, majd a „Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS)”, illetve „X Disease” néven is említették (Collins és mtsai., 1991). A vírust először 1991-ben Hollandiában, Lelystad városában izolálták. A sikeresen azonosított vírus törzset (Lelystad vírus) azóta is referenciaként tartják fent (Wensvoort és mtsai., 1991). Európa után sikeresen izolálták a kórokozót az Amerikai Egyesült Államokban, ahol VR-2332 jelzésű nevet kapta. A két különböző kontinensen azonosított vírusizolátumok között a nukleotidsorrendjük alapján csak csekély azonosságot találtak, így lett, a Lelystad, mint PRRSV1 (régbben 1-es genotípusú, európai), a VR-2332 pedig a PRRSV2 (régbben 2-es genotípusú észak-amerikai genotípusú) prototípus törzse (Tian, 2017; Chae, 2016). A két genotípus antigénszerkezetileg és genetikailag is jól elkülöníthető egymástól, mivel a teljes genom nukleotidsorrendjére nézve csak 60-65%-os azonosságot mutat (Faaberg és mtsai., 2012). A vírus jelenlétét később, 2006-ban Ázsia területén Dél-Kínában is leírták, melyek nagyon egyedi genetikai háttérrel rendelkeztek (Li és mtsai., 2016). Az ekkor még ismeretlen eredetű vírus által okozott betegséget magas láz és jelentős elhullás jellemezte. Az állatok szerveiből sikeresen izolálták a PRRSV-t, melyek segítségével a mesterséges fertőzést követően súlyos kórképet tudtak kiváltani. A betegség Kína legtöbb tartományában gyorsan terjedt (Tong és mtsai., 2007; Li és mtsai., 2007). Míg Ázsiában a vírus 2-es genotípusához (PRRSV2) tartozó törzsei találhatóak meg (Cha és mtsai., 2006), addig Oroszországban és Thaiföldön az európai változatok vírustörzsei figyelhetők meg (Thanawongnuwech és mtsai., 2004; Stadjek és mtsai., 2008). A HP-PRRS vírust először 2010-ben, Thaiföldön azonosították (Thanapongtharm és mtsai., 2014).

A PRRS vírus okozta betegség világszerte gyorsan terjedt. Ugyanakkor több ország is mentes maradt a kórokozótól, mint például Ausztrália, Új-Zéland, Svájc, Finnország, Norvégia, valamint Argentína, Brazília és Kuba. Európában jelenleg a PRRSV1 esetében három genetikai altípust azonosítottak, és egy további negyedik altípus is jelen van

(<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Porcine-reproductive-and-respiratory-syndrome/#D>).

(https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.08.06_PRRS.pdf)

Magyarországon a vírus 1990-es évek elején jelent meg, de csak az 1995-ben sikerült azonosítani, Hornyák Ákos és munkatársai szerológiai vizsgálatai alapján (Hornyák és mtsai., 1996). A PRRS vírust azonban csak 1999-ben sikerült hazánkban izolálni, mely által bebizonyosodott az európai genotípusba tartozó vírus jelenléte itthon is, mely rokonságot mutat spanyol törzsekkel (Medveczky és mtsai., 2001).

A PRRSV világszerte gyorsan elterjedt a legtöbb sertéshús-termelő országban, és felelős gazdaságilag egyik legjelentősebb betegségért, amely valaha is érintette a globális sertésipart (Neumann és mtsai., 2005).

3.2 A vírus tulajdonságai

3.2.1 A vírus eredete

A PRRSV, mint kórokozó, mintegy 34 évvel ezelőtt jelent meg az Egyesült Államok középnyugati részén és Közép-Európában, a betegség mára világszerte elterjedt. Észak-Amerikában és Európában a PRRSV-t két genotípus okozza, melyek egy arterivírushoz tartoznak, genomjuk pedig körülbelül 40%-ban különbözik egymástól. A két eltérő PRRSV genotípus eredetét és evolúcióját magyarázó elméletek között megtalálható az is, hogy egy közeli rokonságban lévő egér arterivírus (lactate dehydrogenase-elevating virus, LDV) mutánsa fertőzte meg a vaddisznókat Közép-Európában. Ezek a vaddisznók köztes gazdaként szolgáltak, és a vírust Észak-Karolinában az 1912-ben importált, fertőzött európai vaddisznók terjesztették el. Ettől kezdve a vírus függetlenül fejlődött a két kontinensen elterjedt vaddisznó populációkban, mintegy 70 évig, míg önállóan át nem jutott a házi sertés populációkba (Plagemann, 2003). A PRRSV korábbi tanulmányok szerint vaddisznóknál jelent meg először, majd később megindult a házi sertésben való adaptálódása. Európában számos vaddisznó fertőzött a vírus európai törzsével (Stadejek és mtsai., 2013), azonban ezt a tényt Magyarországon vaddisznóállományokban nem tudták diagnosztikai módszerekkel megerősíteni (sem a vírus antigént, sem az ellenanyagot) (NÉBIH ÁDI közlése szerint).

Egy másik elmélet szerint arra a következtetésre jutottak, hogy a PRRSV-t 1980-as években egy másik gazdafajból közvetítették sertésbe, majd azok adaptálódtak a transzmembrán régiók megváltoztatásával a sertésekben (Hanada és mtsai, 2005). Azonban egy másik tanulmány alapján a két vírus típus szétválását közös őstől feltételezik, amit az 1880-as évekre tehetünk. Ezen epidemiológiai problémákat végül genetikai adatelemzéssel és statisztikai módszerek alkalmazásával tudták alátámasztani (Forsberg, 2005).

3.2.2 Taxonómia

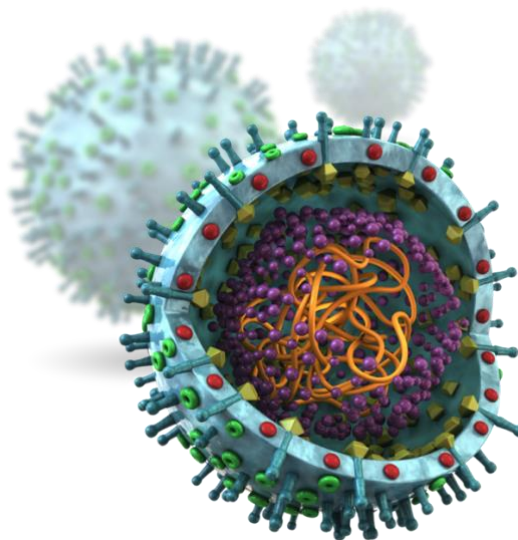
A PRRSV, a Nidovirales rendbe (amely magába foglalja a Coronaviridae és Roniviridae családokat is) (Kappes és Faaberg, 2015) Arteriviridae családba és a Porterivirus nemzetségbe

tartozik. A virion 50-70 nm átmérőjű, helikális nukleokapsziddal és lipidtartalmú burokkal rendelkezik (Eclercy és mtsai., 2019).

A legújabb taxonómia szerint a vírust a *Betaarterivirus* nemzetségbe, a *Variarteriviridae* alcsaládba, a *Nidovirales* rendbe és a *Arteriviridae* családba sorolja. Az *Arteriviridae* család jelenleg 23 fajt tartalmaz köztük a PRRSV-t, a majom vérzések láz vírusát (SHFV), a laktát-dehidrogenáz vírust (LDV), a lovak arteritis vírusát (EAV) és az újonnan felismert wobbly possum betegség vírusát (WPDV). A PRRSV két genotípusba sorolják, mint PRRSV1 (európai genotípus, *Betaarterivirus* suid 1) és PRRSV2 (észak-amerikai genotípus, *Betaarterivirus* suid 2) (Su és mtsai., 2021). A *Nidovirales* rendbe tartozó vírusokat genom szerveződésük, valamint a vírus replikációs tulajdonságaik alapján sorolták egy egységbe. A fészkek, nidus latin elnevezés a vírus replikációs folyamatában kialakult sg-mRNS-ekre utal, melyek „fészkes” szerveződésűek (Meulenberg, 1993).

3.2.3 A vírusgenom jellemzői

A PRRS vírus pleomorf morfológiájú. A virion alakja gömbölydedtől oválisig terjed, mérete körülbelül 50-65 nm, magja üreges és rétegzett kb. 40 nm átmérőjű, sima külső felülettel és beágyazott burokfehérje komplexekkel rendelkezik. A genomot nukleokapszid veszi körül, amely fehérje homodimerek kétrétegű láncából áll, melyek egy üreges golyóba kötődnek (1. ábra). A nukleokapszid magot lipid membrán fedi, ebbe a burokba ágyazódnak a szerkezeti fehérjék. A lipidburok főkomponensei a GP5 és az M fehérjék, ezek együttesen alkotják a vírusfehérjék mennyiségének legalább felét. A GP2, GP3 és GP4 kisebb szerkezeti fehérjék a lipidburokba beépült multimer komplexet alkotnak, az 1-es típusú PRRS vírusok esetében az E fehérje is ennek a komplexnek a részét képezi (Lara és mtsai., 2014).

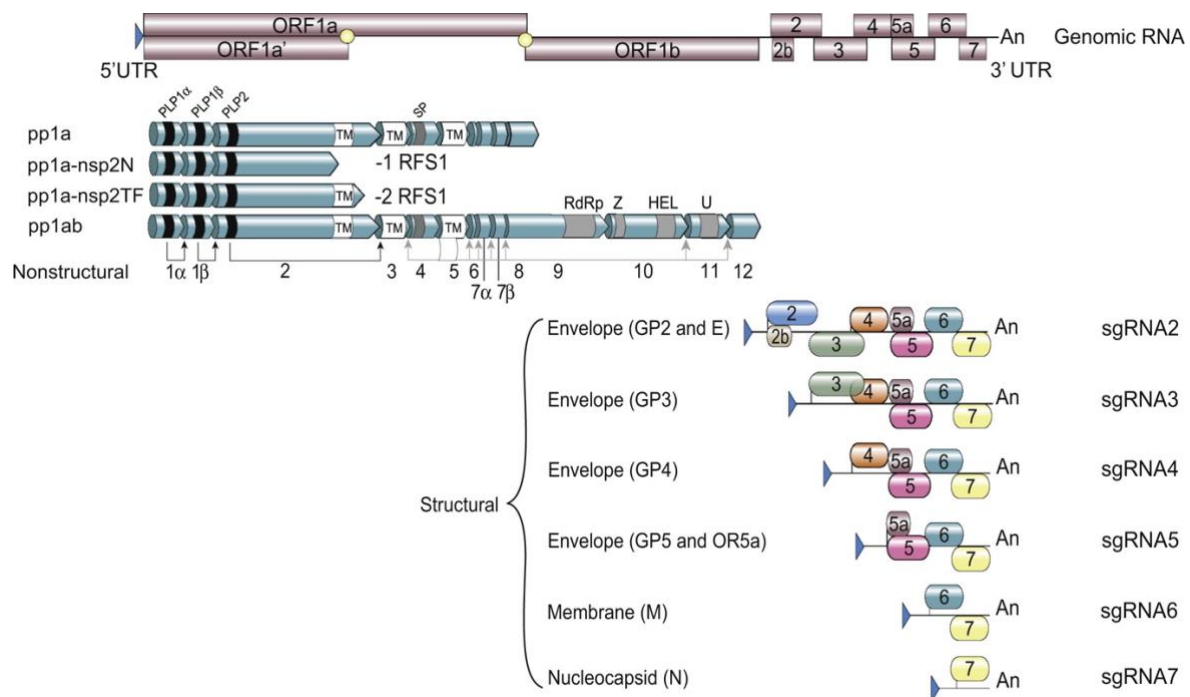


1. ábra A PRRSV virionjának szerkezete (<https://www.prrs.com/disease-control/virus>)

A PRRSV egyszálú, pozitív irányítottságú RNS vírusok (+ssRNS) közé tartozik. A vírus genomja 14 900 – 15 500 nukleotid hosszú molekula (Kappes és Faaberg, 2015), két különböző transzkripció mechanizmuson keresztül számos járulékos és strukturális fehérjét expresszál. A PRRSV genom egy 5' proximális nem kódoló elemet (5'-nem transzlált régió; 5'UTR) kódol, amely 217-222 nukleotidból áll (Faaberg és mtsai., 2012, Yun és Lee 2013). Közvetlenül az 5'UTR után találhatóak a leolvasási keretek. Az ORF1a/b-nek egyetlen transzlációs kezdőhelye van, de két riboszómális kereteltolódási (RFS) hellyel van kiegészítve a 3889 nukleotid (RFS; nem strukturális fehérje (nsp)) és a 7695 nukleotid (RFS2; nsp8/9) genomi pozícióban (Kappes és Faaberg, 2015). A PRRSV replikációja számos genetikai és fehérjeszabályozó mechanizmus révén fejlődik, ahol a genom expressziója négy poliproteint eredményez (pp1a, pp1a-nsp2N, pp1a-nsp2TF, pp1ab). Két termék jön létre az RFS1 oldalról, míg RFS2 esemény megközelítőleg 20%-os hatékonysággal következik be, amely a nem strukturális fehérje (nsp2) transzmembrán doménjén keresztül létrehozza az nsp2TF terméket. Az nsp2TF génben lévő mutáció a vírus terjedését lassította a sejtenyészetekben (Fang és mtsai., 2012) (2. ábra).

A genom legalább tíz leolvasási kerettel rendelkezik (Stoian és Rowland, 2019), melynek 80%-át az ORF1a és 1b fedi le, mely 12 nem strukturális proteint (NSP) kódol, amelyek elsősorban a vírus replikációjában játszanak szerepet. Az ORF1a kódolja a pp1a-t, amely magába foglalja az nsp 1-8-at, az ORF1ab pedig az összes ismert nsp-ből álló pp1 ab-t kódolja (nsp1 α/β , nsp2–6, nsp7 α/β , nsp8–12) (Meulenberg és mtsai., 1993, Nelsen és mtsai., 1999) (1. ábra). A 2-7 ORF-ek a genom 3' végén helyezkednek el, és a strukturális fehérjéket (SP) kódolják. A vírus három fő fehérjéje a GP5 (glikoprotein 5), az M (membrán protein) és az N (nukleokapszid) fehérje. Az ORF5 a glikoprotein 5 burokfehérje (GP5), míg az ORF6 az M membrán fehérje kódolásáért felelős, mely két protein egymással diszulfidkötéssel heterodimert képez. Ez a fehérjekomplex felelős a vírus elsődleges sejthez való kötődéséért is. Az ORF7 az N (nukleokapszid) protein kódolásáért felelős (Balka, 2009; Dokland, 2010; Meulenberg, 2000; Wu és mtsai., 2005). Az ORF2a, ORF2b, ORF3 és ORF4 gének a GP2, GP3 és a GP4 kisebb felületi membrán proteineket kódolják, melyek a vírus másodlagos szerkezeti fehérjéi. Az M mátrixfehérje és N nukleokapszid fehérje játszik szerepet a vírus sejtbe történő bejutásában, melyek az immunogenitás szempontjából is jelentősek (Wang és mtsai., 2019). Bizonyos kutatások azt igazolják, hogy az sg-mRNS 5 két fehérjét is kódol, a kanonikus GP5 fehérjét, illetve az ORF5a, vírustörzstől függő 43-64 aminosavból álló peptidet (Firth és mtsai., 2011; Oh és Lee, 2012). Az említett fehérjék keletkezését a „leaky scanning” jelenséghez kötik, melynek magyarázata, hogy a transzláció nem minden esetben indul a start AUG kodonnal, a riboszóma átesik rajta és már csak a következő kezdő kodont ismeri fel, mint iniciációs jelet. Ez a mechanizmus előfordulhat, ha nem optimális az első

startkodon környezete, beleértve +4 pozícióban nem guanin, -3 pozícióban nem adenin vagy guanin található (Firth és Brierley, 2012).



2. ábra: A PRRSV genom transzkripciója és translációja (Kappes és Faaberg, 2015).

3.2.4 Genetikai változékonyság

A PRRSV replikáció három kulcsfontosságú tulajdonsága elősegíti a genetikai variabilitást. Ezen tulajdonságok magukba foglalják a gazdaszervezet plazmasejt membránjának átrendeződését vírusreplikációs komplexek kialakításához, úgymint a genomiális RNS szintézisét és expresszióját, valamint az sg-RNS transzkripcióját és szerkezeti fehérjék hatékony expresszióját (Wang és mtsai., 2021; Nazki és mtsai., 2020). Az elhúzó fertőzéseket lehetővé tevő RNS vírusok rekombinációs rátája magasabb lehet, mivel egy gazdaszervezetben több törzs egyszerre is jelen lehet (Simone-Loriere és Holmes, 2011). A PRRSV-nek hosszú ideg tartó fertőzési fázisa van, amely akár 250 napig is eltart (Allende és mtsai., 2000).

A virulens törzsek újbóli megjelenése óta számos tanulmány írt le nem folyamatos 30 aminosavból álló deléciókat a nem strukturális protein-2-t (Nsp2) kódoló régióban (ORF1a) mind a virulens PRRSV-1, mind a PRRSV-2 törzsekben. Ezek a deléciók a virulens törzsek genetikai markereiként tekinthetők (Canelli és mtsai., 2017; Ruedas-Torres és mtsai., 2021). Azonban ezeknek a mutációknak az alacsony virulenciájú törzsekben való jelenléte kétségbe vonja, akadályozza az Nsp2 deléciók és törzsek virulenciája közötti kapcsolat létjogosultságát. A specifikus Nsp2 epitópok deléciója szerepet játszhat a gazdaszervezet immunmodulálásában, valamint az Nsp2 szerepet játszik a PRRSV sejt tropizmusában

(Chen és mtsai., 2010; Song és mtsai., 2019). Az ORF1b, különösen az Nsp9 és az Nsp10 hozzájárul ugyanannak a PRRSV-2 in vivo és in vitro virulenciájához, az Nsp9 586. és 592. aminosavai, mint kritikus helyek, szabályozzák a virulens PRRSV-2 intenzívebb replikációját. Az Nsp3-8 (ORF1a) és az ORF5 régiók a fő virulencia determinánsok, azonban az Nsp1-3 (ORF1a), Nsp10-12 (ORF1b) és ORF2, szintén szerepet játszanak a virulencia kialakulásában, mely arra utal, hogy a PRRSV virulencia determinánsai több génre kiterjednek (Ruedas-Torres és mtsai., 2021; Do és mtsai., 2016).

3.3 A PRRS járványtana

3.3.1 A vírus terjedése

A vírus terjedése a fertőzött állatok nyálával, orrváladékával, vizelettel, ondóval és esetenként bálárral is történhet. A fertőzés terjedhet a sertések közvetlen érintkezésével, illetve indirekt módon, fertőzött tárgyakkal, eszközökkel. Bár a vírus ellenállóképessége kicsi, a külvilágban nedves közegben maximum 1 hétig marad fertőzőképes a vírus. A széleskörű fertőzöttség szinte kikerülhetetlen, mivel napjainkban gyakorta alkalmazzák a mesterséges termékenyítést. Ezen módszer használata elősegíti a gyors és nagy távolságban történő PRRSV terjedést. Az állatok megbetegedése történhet intranazális, orális, intramuszkuláris, intraperitoneálisan, intrauterin és intravaginális, illetve intravénásan oltással és nemi úton (Dietze és mtsai., 2011). A kanok esetében a vírus akár 90 napig is jelen lehet az ondóban, a fialás előtti fertőzött kocáknál a tejben is megjelenhet.

A vírusbejutás módjától függően más-más mennyiségű vírus szükséges a fertőzés kialakulásához (Zimmerman és mtsai., 2019). A víruspartikulák a levegő részecskéihez kötődve szállítódnak, melyek befolyásolják a vírus terjedését. A részecskék határozzák meg a vírus szállítására alkalmas távolságot. A PRRSV-t kimutatták 6×10^2 (0,4-0,7 μm) és $5,1 \times 10^4$ RNS-kópia/ m^3 (9,0-10,0 μm) közötti részecske mennyiségben. A vírus sertésállományoktól akár 9,1 km-re is terjedhet a levegőben (Alonso és mtsai., 2015).

A fertőzés több úton is lehetséges, aerogen módon szájon át, fedeztetéskor vagy mesterséges termékenyítés során az ondóval, de bőrsérüléseken keresztül is, továbbá ragályfogó tárgyak, eszközök, járművek, de maga az ember közvetítésével is. A vírust vaddisznók is ugyanúgy terjeszthetik és megfertőzhetik a házi sertést (Christopher-Hennings és mtsai., 1996; Dee és mtsai., 2009). Az egyik leggyakoribb fertőződési út az oronazális, főleg fiatal állatok esetében hiszen 6-8 hétig is képesek átadni a vírust az egy légtérben tartott hasonló korú társaiknak. A vírusátvitel orrváladék, valamint a köhögés, tüszögés során képződött aeroszol által is történhet (Wills és mtsai., 2002). A légutakból ürülő vírus túlélésének az alacsony hőmérséklet és alacsonyabb relatív páratartalom kedvez (Hermann és mtsai., 2007).

A PRRS vírus elleni védekezést megnehezíti a vírus azon tulajdonsága, hogy hosszú ideg tartó fertőzést képes kialakítani az állatban, amely járványtani szempontból igen nagy jelentőséggel bír. Az RNS-vírusok, amelyek képesek hosszan tartó fertőzésekre, magasabb rekombinációs sebességgel rendelkezhetnek, mivel egyetlen gazdaszervezet számára nagyobb lehetőség nyílik a különböző törzsekkel való fertőzés megszerzésére. A PRRS akár 250 napig is jelen lehet a gazdaszervezetben (Risser és mtsai., 2021).

A spermával történő fertőződés a PRRSV lehetséges vírusátvételi módja. A vírus ondóba jutása különös aggodalomra ad okot a mesterséges termékenyítés révén történő hosszú távú vírusátvitel lehetősége miatt. Kísérletekkel igazolták, hogy direkt ráfertőzéssel spermából 92 napig tudták kimutatni a PRRSV-t polimeráz láncreakcióval (PCR) (Christopher-Hennings és mtsai., 1996; Dee és mtsai., 2009). A vírus terjedése az állományok közötti közvetlen és közvetett érintkezés révén is lehetséges, ami azt eredményezi, hogy a sertésenyésztőknek újra kell gondolniuk a biológiai biztonsági stratégiájukat a vírus terjedésének minimalizálása érdekében (Lager és mtsai., 2002).

Fontos megemlíteni a vírus terjedésénél a ragályfogó tárgyakat, mint a vírussal fertőzött csizmákat, ruhadarabokat, injekciós tűket, a különböző járműveket. Járványvédelmi szempontból a higiéniai körülmények betartásával a vírus terjedése csökkenthető (Otake és mtsai., 2002). Azonkívül az állattartók preventív intézkedései is meghatározóak, mint az importált állatok karanténba helyezése, szállítási, fertőtlenítési protokollok betartása és a telepek zártságának fenntartása. A vírus nagy távolságokra történő terjedését nagymértékben befolyásolják az olyan emberi tevékenységek, mint az állatszállítás és mesterséges termékenyítés, melyek a PRRSV távolságfüggetlen terjedését okozza (Shi és mtsai., 2013). Egyes vizsgálatok azt mutatják, hogy a vírus a levegőben akár 9,1 km távolságba is eljuthat (Alonso és mtsai., 2015).

3.3.2 Kórfejlődés

A PRRSV fertőzés következtében a vírus először a légutakba jut, majd a tüdő alveoláris és intravascularis macrophagjaiban szaporodik, valamint a tüdő kis véreinek endothelsejtjeiben. A fertőződés után 24-48 órán belül tartós fertőzés alakul ki, mely hónapig is fennmaradhat és ezáltal elhúzódó virémiát válthat ki. A virémia során a vírus tömegesen szaporodik a keringő lymphoid sejtekben, melynek immunszuppresszió a következménye. A virémia kifejezett állatokban 1-2 hétig, fiatalokban tovább tart. A magzatok is fertőződhetnek, egy részük elhal vagy kisebb-nagyobb mértékben károsodik, melynek következménye koraellés, elhalt, gyenge életképtelen malacok. A reprodukciós zavarok 3-4. hét után jelentkeznek (Xiao és mtsai., 2010; Kimman és mtsai., 2009). A PRRSV immunszuppresszív hatása más kórokozókval kombinálva az állományon belül jelentősen növeli a morbiditást és a mortalitást (Szabó és mtsai., 2020^a). A PRRSV törzsek virulenciájuktól függően különböző

mértékű programozott sejthalált (apoptózis) okozhatnak, amely proapoptotikus citokinek, IL-1 β és TNF- α felszabadulásával jár. A virulens PRRSV törzsek által indukált sejthalál nyirokszervekben és a tüdőben megjelenő súlyos elváltozásokat okoz, melyeket másodlagos fertőzések súlyosbíthatnak (Sánchez-Carvajal és mtsai., 2021; Ruedas-Torres és mtsai., 2021).

A PRRSV erősen modulálja a gazdaszervezet immunválaszait és megváltoztatja a gazdaszervezet génexpresszióját. A vizsgálatok kimutatták, hogy a PRRSV gátolja az I. típusú interferonokat (IFN- α/β , SPI IFN), különösen az IFN- α -t (Albina és mtsai., 1998), és indukálja az interleukin 10-et (IL10). Az IL10 expressziójának indukciója jól ismert veleszületett antivirális immunreakciót alakít ki a vírussal fertőzött sejtekben. Mind in vitro, mind in vivo kimutatták, hogy a PRRSV csak minimális IFN- α termelést váltott ki, gátolva ennek expresszióját. Az IFN- α gátlása döntő lépés a patogenezisben, mivel kimutatták, hogy IFN- α gátolja a PRRSV replikációját (Xiao és mtsai., 2010; Kimman és mtsai., 2009). Mivel a PRRSV elsődleges célsejtjei a sertés tüdő alveoláris makrofágjai (PAM), számos tanulmány elemezte a PAM-ok PRRSV fertőzéssel szembeni immunválaszát. A fertőzés korai szakaszában a PAM sejtek nagyobb mennyiségben termelnek TNF- α -t és interleukin-8-at, amelyek gátolják a vírus szaporodását (Ait-Ali és mtsai., 2007).

A fertőzés kimenetelében a már említett tényezők felsorolása mellett fontos a vírus-törzsek virulenciájának molekuláris tulajdonságait megemlíteni. Számos tanulmányban írtak le nem folyamatos, 30 aminosavból álló deléciókat a nem struktúrális protein 2-t (Nsp2) kódoló régióban (ORF1a) mind a virulens PRRSV-1, mind a PRRSV-2 törzsekben, ezen deléciók a virulens törzs genetikai markereiként funkcionálnak. Azonban ezeknek a mutációknak az alacsony virulenciájú törzsekben való megtalálása megnehezíti az Nsp2 deléciók és a törzsek virulenciája közötti kapcsolat bizonyítását, azonban a specifikus Nsp2 epitópok deléciója szerepet játszhat a gazdaszervezet immunitásának modulálásában. Továbbá egy kutatásban igazolták, hogy az ORF1b, különösen az Nsp9 és az Nsp10 hozzájárul ugyanannak a PRRSV-2 törzsnek a virulenciájához, és az Nsp9 586. és 592. aminosavait emelték ki, mint kritikus helyeket, amelyek szabályozzák ennek a virulens törzsnek a replikációját (Xu és mtsai., 2018; Ruedas-Torres és mtsai., 2021). Az Nsp3-8 (ORF1a) és az ORF5 régiók a fő virulencia-determinánsok, valamint az Nsp1-4 (ORF1a), Nsp10-12 (ORF1b) és ORF2, ami arra utal, hogy a PRRSV virulencia-determinánsai több génre kiterjednek. Az ORF5 mutációja olyan aminosav-deléciókat eredményez, melyek a virulencia lehetséges vírusgenetikai determinánsai egyes ázsiai PRRSV-2 törzsekben (Ko Ko és mtsai., 2019; Do és mtsai., 2016).

3.3.3 Tünetek, kórbonctan

A kórképeket, melyeket a PRRSV vált ki, két biotípusba sorolt törzsek okozzák: a klasszikus törzsek (C-PRRSV) és a magas virulenciájú törzsek (HP-PRRSV). Ezek a törzsek különböző tüneteket alakítanak ki, amelyek a vírus virulenciájától, az állatok fiziológiai és immunológiai állapotától, valamint más betegségek jelenlététől függenek. Bizonyos esetekben tünetmentes átvészelés is megfigyelhető (Quezada-Fraide és mtsai., 2021). A betegség akut fázisa általában kb. 2 hétig tart, és magában foglalja az akut virémia által okozott étvágytalanságot és bágyadtságot, valamint a lázat, tachypnoét, nehézlégzést és a végtagokon megjelenő társuló bőr hyperaemiát, cianózist. A második fázis, amely az első szakasz befejeződése előtt indul, akár 4 hónapig is eltarthat, szaporodási rendellenességeket és légzőszervi problémákat jelent, különösen azoknál a kocáknál, amelyek a vemhesség harmadik szakaszában fertőződtek (Van Reeth és mtsai., 2012).

A lappangási idő mesterséges fertőzést követően 2-7 nap. Frissen fertőzött állományokban valamennyi korosztály megbetegedhet. Endémiásan fertőzött állományokban a fiatal süldők és a korábban immunitást nem szerzett egyedek betegszenek meg. A PRRS vírus csökkenti a sejtes immunválaszt és károsítja a nyálkahártya felszínét. A reprodukciós elégtelenségek során a kocáknál a betegség először levertséggel és csökkent étvágytalansággal jár, 7-10 napon belül gyorsan terjed az állományban. A klinikai tünetek magukban foglalják a terméketlenséget, agalactiát, csökkent alomszámot, növekvő mértékű késői vetélést, halvaszületést, mumifikálódást, illetve gyenge életképességű malacok születését, melyek gyakran légúti és másodlagos fertőzésekben elpusztulnak. Az idősebb sertések a légúti betegség enyhe tüneteit mutatják, amelyeket általában másodlagos fertőzések súlyosbítnak (Ludemann és Lager, 2008). Légzőszervi betegség egyaránt jelen lehet, gyakori tünetek magas láz, bágyadtság, étvágytalanság, köhögés, nehezített légzés, sántaság és hasmenés is előfordulhat (Tian és mtsai., 2007; Dietze és mtsai., 2011; An és mtsai., 2010). A kocák képesek transzplacentálisan továbbítani a PRRSV-t születendő malacaiknak. A malacokban, melyek túlélnek a vemhességi időt és az újszülöttkori időszakot, a PRRSV légúti tüneteket okoz, amelyek gyakran másodlagos fertőzésekkel súlyosbodhatnak. Magas elhullási arány figyelhető meg, jellemzően 30-50%-ban a fiatal malacoknál és 4-20%-ban a választás utáni sertéseknél. A választás után és tenyészsertéseknél a klinikai tünetek közé tartozik a nehézlégzés, bágyadtság, a bőr hyperaemia, a durva szőrzet és a csökkent súlygyarapodás. A szubklinikai fertőzés gyakran előfordul sertéseknél, amely egyes állományokban tünetmentes, de átmeneti lázzal és étvágytalansággal is járhat (Dietze és mtsai., 2011; An és mtsai., 2010; Li és mtsai., 2007). A kocák esetében találkozhatunk súlyos atipikus PRRS-sel, más néven SAMS (sow abortion and mortality syndrome), amely 50%-os vetélést és 10%-os elhullást eredményez (Martelli és mtsai., 2003).

A PRRSV okozta post mortem elváltozások a légúti és limfoid szövetekben figyelhetőek meg, súlyos elváltozások csak a bőrben látszódnak, mint elfehéredő kiütések, az orrban a háton, szájban és a belső combokon, fiatal állatokban fülön kialakuló cianózis (Tian és mtsai., 2007). Az elváltozások leginkább újszülött és fiatal, választott malacoknál figyelhetőek meg, az idősebb egyedekben is észrevehetőek, viszont sokkal kevésbé kifejezettek. A súlyos betegségben szenvedő állatok esetében a tüdőben foltokban megjelenő barna és vörös, tömött tapintatú elváltozások figyelhetőek meg, főleg a cranioventrális lebenyekben. Vérzéses gócok alakulnak ki a májban, illetve szívizom elfajulás is jelentkezik. Emellett a lép infarktusa, vörösbarna vizelettel telt kitágult húgyhólyag, a vese vérzéses elfajulása, sárgás-fehér elhalásos gócok, valamint szívizomdegeneráció is előfordulhat. A tüdőben szövettani vizsgálatokor intersticiális gyulladásokat és hiperpláziával járó gócot figyelhetünk meg, valamint vérzések és tüdőödéma is jelentkezik. A nyirokcsomók folliculáris hiperpláziája jelentős megnagyobbodással és vérzéssel járhat. A fentiekén kívül még enyhe encefalomalácia, ízületi gyulladás, duzzadt ízületek és bélfekély is megfigyelhető. (Dietze és mtsai., 2011; Tian és mtsai., 2007).

3.4 Diagnosztika

A PRRSV az állatok életkorától függetlenül minden sertésállományban előfordulhat. A klinikailag aktív PRRSV-fertőzött állományokban gyakoriak a reprodukciós adatokban megfigyelhető változások, mint az emelkedett vetélések, kora ellések, halvaszületések, választás előtti mortalitás és terméketlenség. Azonban a klinikai tünetek hiánya nem jelenti azt, hogy egy populáció mentes PRRSV-től, ezt minden esetben kiegészítő laborvizsgálatokkal állapítják meg. Kimagaslóan fontos a látszólag nem fertőzött (nem virémiás) állatok kiszűrése és megkülönböztetése a vírust hordozó állatoktól, melyeket eltávolítanak az állományból (Molina és mtsai., 2008).

3.4.1 Indirekt víruskimutatás, szerológia

A szerológiai vizsgálatok esetén a sertések vérsavójából a vírusfertőzés során a gazdaszervezet immunrendszere által a vírus antigéntermészetű komponensei ellen termelt ellenanyagokat mutatjuk ki. A PRRS antitestek rutinszerűen kimutathatóak nem csak szérumban, de nyál mintákból is (Rotolo és mtsai., 2017; Sattler és mtsai., 2015). A rutin diagnosztikában az antitestek jelenlétének kimutatása a PRRSV ellen termelődött IgG antitesteket jelenti, a szerológiai áthangolódást (negatívról pozitívrá való átmenetet) és/vagy a PRRSV-specifikus ellenanyagok idővel növekvő szintjét a szérumban vagy nyál mintákban a PRRSV fertőzések diagnosztizálására vagy nyomon követésére alkalmazzák. A jelenlegi antitest vizsgálatok

nem tudják megkülönböztetni a fertőzés által indukált antitesteket az MLV vakcinák hatására termelődött ellenanyagoktól.

A PRRSV elleni antitestek kimutatására leggyakrabban használt tesztek az immunoperoxidáz monolayer assay (IPMA), indirekt immunofluoreszcens próba (IFA), ELISA és vírusneutralizáció (VN) (Gerber és mtsai., 2014; Rotolo és mtsai., 2018). A leggyakrabban használt vizsgálat az ELISA. A kereskedelemben kapható antitest ELISA vizsgálatok széles körben elérhetőek a PRRSV nukleokapszid antigén elleni IgG antitestek kimutatására szérumban és nyál mintákban. Bár ezen PRRSV indirekt ELISA tesztek diagnosztikai teljesítménye eltérő, egyszerre nagy számú mintát lehet velük viszonylag rövid időn belül megvizsgálni (Sattler és mtsai., 2014). Az ELISA módszert diagnosztikailag érzékenynek és specifikusnak tekintik. A legtöbb kereskedelemben kapható ELISA-t úgy tervezték, hogy mind a PRRSV-1, mind a PRRSV-2 elleni antitesteket kimutatja, de néhányuk genotípus-specifikus. Az antitest ELISA-val kimutatható a szérumban vagy nyál mintában már a fertőzést követő 9. nap után, de a válasz az egyes sertéseknél és a vírustörzseknél eltérő (Horter és mtsai., 2002; Johnson és mtsai., 2004). Nincs kimutatható különbség az antitestválaszban a tartósan fertőzött és a lezajlott fertőzést mutató állat között, azaz az ELISA eredmények nem használhatók a hordozó státusz előrejelzésére, azonban egy adott állomány fertőzés lefolyását és járványmenetét meg lehet figyelni az egyes korcsoportok immunológiai státuszával (Fangman és mtsai., 2007; Molina és mtsai., 2008). A VN tesztek kimutatják azokat az antitesteket, amelyek képesek a sejtenyészetben állandó mennyiségű PRRSV-t semlegesíteni. Ezek a neutralizáló ellenanyagok körülbelül 4 héttel a fertőzés után jelennek meg, és legalább 210 napig fennmaradnak, teljesen inaktíválják a homológ vírust, de csak részben semlegesíthetik a heterológ vírust. A VN módszert általában nem használják a rutin diagnosztikában, mivel a friss fertőzés azonosítására alkalmatlan (Meier és mtsai. 2003; Molina et al., 2008)

A PRRSV szerológiai diagnosztikájában több módszert is leírtak, mint az indirekt immunofluoreszcens próbák, ELISA tesztek, valamint IPMA, ezen tesztek korlátaival tisztában kell lenni a vizsgálatok során. Az immunfluoreszcens próbák és az IPMA tesztek sokkal munkaigényesebbek és kevésbé költséghatékonyabbak, szemben az ELISA vizsgálatokkal.

3.4.2 Direkt víruskimutatás

A nukleinsav alapú PRRSV kimutatási módszerek közé tartozik a RT-PCR, a szekvenálás és az in situ hibridizáció (ISH).

3.4.2.1 A vírus izolálása

A PRRSV erősen korlátozott sejttropizmussal rendelkezik, és főként a differenciált és aktivált monocita/makrofág vonalú sejtekben képes replikálódni. A sertéstüdőből származó sertés alveoláris makrofágokat (PAM) alkalmazták a PRRSV törzsek izolálására. Ez számított a legjobb közegnek a vírus kinyerése szempontjából (Xie és mtsai, 2018; Yim-Im és mtsai., 2021). Hátránya, hogy a PAM sejtek in vitro nem szaporodnak, ezért a megfelelő mennyiséget 6 hetesnél fiatalabb malacokból BAL mintával veszik (Balka és mtsai., 2004). Egy másik folytonos sejtvonalról, a MARC-145-ről, a MA 104 majomvese sejtvonalból származó szubklónról azt találták, hogy permisszív volt a PRRSV replikációjára (Yim-Im és mtsai., 2021). Egy tanulmány bebizonyította, hogy a PRRSV-RNS pozitív szérum és tüdő mintákból származó PRRSV-2 és PRRSV-1 aránya szignifikánsan magasabb volt a ZMAC-1 sejtekben, mint a MARC-145 sejtekben. A ZMAC sejtek egységesen expresszálják a tipikus makrofág markereket. Ezen sejtek a PAM-okból származnak. Napjainkban is a MARC-145 a leggyakrabban használt sejtvonal PRRSV izolálásra, szaporításra. A klinikai mintákból a PRRSV izolálására nem mindig megfelelő egyetlen sejtkultúra használata (Yim-Im és mtsai., 2017; Calzada-Nova és mtsai., 2012).

A PRRSV sejtenyészetben való izolálása megerősíthető reverz transzkripció PCR-rel (RT-PCR) vagy fertőzött sejtek citoplazmájában lévő virális antigén azonosításával fluoreszcens antitesttel (FA) vagy immunhisztokémiával (IHC) PRRSV specifikus monoklonális antitestek segítségével (Straw és mtsai., 2013).

3.4.2.2 A vírusantigén kimutatása

A virulens és az alacsony virulenciájú PRRSV törzsek kimutatására különböző szövetekből immunhisztokémiai módszerrel, illetve fluoreszcens antitest (FA) festéssel lehetséges. Ezen módszerrel PRRSV antigén jelenlétét a virulens PRRSV-2 VR-2385 törzsszel fertőzött sertésekből származó tüdőből, szívből, nyirokcsomóból, csecsemőmirigyből, lépből, májból, veséből, bélből származó nagyszámú sejtben lehetett kimutatni (Ruedas-Torres és mtsai., 2021). A virulens törzsek újbóli megjelenésével a vírusantigént számos szövetben vizsgálták, mint például az agyban, a kisagyban, gyomorban, a vékony- és vastagbélben, szívben, sőt a hypodermiszben is (Tian és mtsai., 2007; Lv és mtsai., 2008). A vizsgálatok során formalinnal rögzített, paraffinba ágyazott vagy fagyasztva metszett szövetmintákból lehet a PRRS vírusantigéneket kimutatni (Balka, 2009).

3.4.2.3 A vírus genetikai anyagának kimutatása

A vírus azonosítása in situ hibridizációval (ISH) és reverz transzkripció PCR-rel, valós idejű PCR-rel és szekvenálással történhet.

Az ISH sejtenyészetekben és formalinnal rögzített szövetekben zajlik, de ezt nem használják széles körben a diagnosztikai laboratóriumokban, ellenben a PCR technikákkal (Larochelle és mtsai., 1996). Az ISH vizsgálatok specifikus nukleinsavszekvenciákat céloznak meg a kórokozó genomjával komplementer próba alkalmazásával. Az ISH előnye a PCR-rel szemben, hogy lehetővé teszi a kórokozó azonosítását az elváltozások helyén. Elmondható, hogy az ISH sokkal kevésbé érzékeny a PCR módszerrel szemben, hiszen a szöveti feldolgozás is jelentősen csökkentheti a vizsgálatok kimutatási érzékenységét, valamint a használt oligonukleotidok kevésbé érzékenyek, mint az RNS próbák (Maes és mtsai., 2014; Dénes és mtsai., 2021).

A direkt víruskimutatás esetében az egyik legismertebb kimutatási technika a reverz transzkripció PCR, amely során egy specifikus génszakasz sokszorosítása történik enzimatis reakciók keretei között, mely a leggyakoribb módszer a PRRSV közvetlen kimutatására (Toplak és mtsai., 2012). A PRRSV RT-PCR-t eredetileg a PRRSV RNS kimutatására fejlesztették a kanok sperma és szérum mintájából (Christopher-Hennings és mtsai., 1995). Azóta különféle PRRSV PCR formátumokat írtak le. A valós idejű RT-PCR-t (rRT-PCR) széles körben használják, analitikailag érzékeny, specifikus, pontos és gyors módszer, valamint kompatibilis a nagy átteresztőképességű tesztekkel, melyek alkalmasak mindkét genotípus PRRSV törzsek kimutatására.

A valós idejű RT-PCR (rRT-PCR) lehetővé teszi a PRRSV genomiális másolatait számszerűsíteni a mintában (Gerber és mtsai., 2013). A vírus mennyisége a széles körben alkalmazott valós idejű kvantitatív PCR-rel vizsgálható, azonban a törzsek kivételes genetikai sokfélesége befolyásolhatja a különböző módszerek érzékenységét (Toplak és mtsai., 2012; Dénes és mtsai., 2021). A legtöbb valós idejű vizsgálat a célspecifikus TaqMan próbák használatán alapul (Chen és mtsai., 2021). A PRRSV RT-PCR minden, jellemzően laboratóriumi vizsgálatra gyűjtött mintán elvégezhető. Akut fertőzés esetén a leginkább megfelelő minta a szérum- és szövetminta (tüdő, nyirokcsomók). A különböző virulenciájú PRRSV törzsek által kiváltott virémia időtartama is eltérő lehet, ezt a diagnosztikai tesztek alkalmazása során figyelembe kell venni. A vizsgálat hatékonyságát növeli, ha a mintákat poolozzuk (minimum 2 egyedi minta egy mintába történő összevonása), a módszer javítja a vizsgálat hatékonyságát, csökkenti a költségeket. Tisztában kell lenni a poolozott minta korlátaival is, hiszen túl sok minta elegyítése hamis negatív eredményhez vezethet. Egy tanulmány szerint bebizonyosodott, hogy öt szérum minta poolozása nem csökkentette a PRRSV rRT-PCR kimutatási arányát, ha a pool legalább egy pozitív mintát tartalmazott viszonylag magas vírus RNS koncentrációval (Gerber és mtsai., 2013).

A vírus genom azonosítására a szekvenálás manapság igen gyakori kimutatási technika, amely költséges, de pontos és hatékony. Mielőtt a szekvenálás elérhetővé vált volna, a PRRSV izolátumokat ORF5 RFLP azonosította, különböztette meg (Umthun and Mengeling

1999; Wesley és mtsai., 1998). Az RFLP módszer nem tudja a minták között a genetikai rokonságot megkülönböztetni, valamint a vírus virulenciáját megállapítani. A szekvenálás és a filogenetikai elemzések precíz és pontos genetikai jellemzést biztosítanak a PRRSV izolátumokról. Az ORF5 a PRRSV szekvenálásának legelterjedtebb célpontja, mivel ezek a szakaszok egyike a legnagyobb változatosságú régióknak. A mérések során kapott szekvencia eredményeket kiterjedt adatbázis alapján össze lehet hasonlítani. Az ORF5 a teljes PRRSV genomnak csak hozzávetőlegesen 4%-a. A teljes genom szekvenálása átfogóbb információt tud adni a genetikai összehasonlításához, melyre az NGS szekvenálás alkalmas. Az NGS gyorsabban és alacsonyabb költséggel képes meghatározni a teljes genomszekvenciákat, mint a korábbi technológiák (Zhang és mtsai., 2017). Ahogy a genetikai elemzés olcsóbbá válik, az átfogóbb diagnosztika, például a teljes genomszekvenálása (WGS) jobban is elérhetővé válik (Risser és mtsai., 2021).

3.4.2.4 A DIVA PCR módszer

A DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) módszert, mint diagnosztikai vizsgálatot először egy blokkoló ELISA tesztként fejlesztették ki az Aujeszky-féle betegség vírusával (ADV) fertőzött és vakcinázott sertések megkülönböztetésére az ADV glikoprotein E (gE) elleni szérumanititestek jelenléte vagy hiánya alapján. A gE-ELISA rendkívül specifikus, érzékeny és alkalmas nagyszabású szero-epidemiológiai vizsgálatokra a fertőzött sertések azonosítására, a gE negatív vakcinával vakcinázott populációban (Van Oirschot és mtsai., 1988). Az Aujeszky-féle betegség felszámolása a marker vakcina segítségével történt. A glikoprotein E (gE) deletált, módosított élő vírus vakcina és egy kísérő gE ELISA ELISA együttes alkalmazásával lehetővé vált a vakcinázott és vad vírus fertőzött állatok elkülönítése. Így jöhetett létre a PRV gB és gE ELISA teszt, mellyel a vírus ellen termelt ellenanyagot vagy az élő vírus vakcinát mutatjuk ki (Lager és mtsai., 2008). Magyarországon a mentesítés ellenőrzése ELISA gB és gE diagnosztikai módszerekkel történt, ahol az „M” minősítésű (Aujeszky-féle betegségtől mentes) állományokat gB-ELISA vizsgálattal és az „MV” minősítésű (vakcinázott, de Aujeszky-féle betegségtől mentes) állományokat gB- és gE-ELISA vizsgálatokkal ellenőrizték (Netjogtár, 3/2009 (III.27) FVM rendelet, <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0900030.fvm>). Van Oirschot és munkatársai gE ELISA fejlesztésével megalapozták az ADV mentesítési programot, ami új koncepciót vezetett be a vírusbetegségek elleni védekezésben (Van Oirschot és mtsai., 1988).

Az ADV mentesítési program kritikus pontja fertőzés minél előbbi kimutatása, ezért a szerológiai vizsgálatokon kívül a TaqMan módszer segítségével, két különböző diszkriminatív real-time PCR próbát használtak. A primereket és próbákat az Aujeszky-féle betegség gB és gE génjeihez tervezték. Ezen PRV specifikus valós idejű PCR képes volt megkülönböztetni az összes vad típusú PRV izolátumot a vakcinatörzstől (Ma és mtsai.,

2008). Azóta is az elsődleges és rendkívül sikeres példa maradt a marker vakcinák és a kísérő diagnosztika kombinált felhasználására, amely lehetővé teszi a fertőzött és vakcinázott állatok megkülönböztetését. Az elkülönítő PCR stratégia és az ELISA próbák kombinációja révén vált megvalósíthatóvá az Aujeszky-féle betegség felszámolása, melyet világszerte alkalmaztak (Ma és mtsai., 2008; Mettenleiter, 2020; Kit és mtsai 1985; Freuling és mtsai., 2017).

Az Aujeszky-féle betegség DIVA diagnosztikai módszerén kívül máig a világon nem fejlesztettek ki egyéb betegségekre más DIVA diagnosztikai módszert. A PRRS esetében sem létezik kereskedelmi forgalomban lévő DIVA vakcina, ezért elkülönítő ELISA teszt sincs. A DIVA PCR sem volt elérhető a PRRSV vizsgálatához, ezért is kiemelkedően fontos a vizsgálati módszer fejlesztése, amit munkánk során megvalósítottunk. A DIVA PCR egy érzékeny és gyors valós idejű reverz transzkripció PCR, amely képes megkülönböztetni a PRRS vadvírust a vakcinázási programban használt attenuált törzstől. Ezen diagnosztikai eszközökkel lehetett biztosítani a vírus gyors, releváns kimutatását ezzel is segítve a mentesítési programban résztvevők munkáját.

3.5 Megelőzés, védekezés

A vakcinák rendkívül fontos szerepet játszanak a különböző fertőzések, köztük a PRRS elleni védekezésben. A specifikus védelem kialakításának érdekében a vakcináknak biztonságosnak, hatékonyak és megfelelő minőségűnek kell lenniük (Bálint és mtsai., 2021). A vakcinázás és a külső-belső járványvédelmi intézkedések összekapcsolása, valamint a folyamatos monitoring vizsgálatok bevonása a legelőnyösebb kombináció megközelítés a betegség okozta gazdasági károk hatékony csökkentésére. A módosított élő vakcinák (MLV-k) és az inaktivált vírusvakcinák kereskedelmi forgalomban kaphatóak (Wang és mtsai., 2021; Chae, 2021). Az attenuált PRRS vakcinák viszonylag jó immunválaszt képesek kiváltani, de a rendelkezésre álló vakcinák sajnos csak homológ törzsek ellen nyújtanak védelmet, és nem képesek hatékony keresztvédelmet nyújtani a heterológ törzsekkel szemben (Charerntantanakul, 2012; Roca és mtsai 2012). Az élő vakcinákkal végzett immunizálás sertésekben virémiát alakít ki, ezáltal több hétig ürítik a vakcinavírust, amely közvetlenül vagy közvetve áterjedhet a nem vakcinázott állatokra (Bálint és mtsai., 2021). A tapasztalatok és a vizsgálatok azt mutatják, hogy az élő, attenuált vakcinával való védekezés sokkal hatékonyabb, hiszen csökken a vetélések aránya, a klinikai tünetek megjelenése a fiatal malacokban, emellett csökkenti az elhullások számát és lehetővé teszi a malacok normális ütemben való testtömeg gyarapodását. Mindez azért lehetséges, mert az INF- γ és a hozzákötődő T-sejtes aktivitás szerepet játszik a PRRSV elleni immunitásban. A T-sejt epitópok találhatóak meg a nem strukturális fehérjéken és strukturális fehérjéken is, ezáltal hatékonyabb védelmet tudnak nyújtani. Fontos megemlíteni, hogy az élő vírusos

vakcinával számos probléma léphet fel. A vakcinázást követően a védelem kialakulásának ideje akár 3-4 hét is lehet, mire mérhető ellenanyag szinteket kapunk. A vakcina általi védelem genotípus specifikus, vagyis 1-es típusú vad, míg az 1-es genotípusú MLV PRRSV ellen véd (Charerntantanakul, 2012; Mateu és Diaz, 2008).

Az MLV vakcinák alkalmazása kockázatos is lehet (Botner és mtsai.,2000), hiszen a vírus magas genetikai változékonysággal bír, amely mutációkhoz, rekombinációhoz vezethet, és ezáltal a vírus visszanyerheti virulenciáját is (Nan és mtsai., 2017). A vírus magas fokú genetikai és antigén heterogenitás, valamint a PRRSV-nek az immunrendszer előli rejtőzködő tulajdonsága is jelentős akadály a PRRS elleni védekezésnek. A PRRSV a genetikai variabilitás szempontjából egyik leginkább diverz RNS vírus, amelynek replikációja során a pontmutációk és templátváltásokon alapuló rekombinációs események aktívan részt vesznek a genetikai változatosság kialakításában (Hanada és mtsai., 2005). Mivel az attenuált vakcinatörzsek vad típusú vírusokból származnak, nem meglepő, hogy különböző vad típus és attenuált törzsek rekombinációjáról számoltak be in vitro és in vivo a sertéstartó telepeken világszerte (Risser és mtsai., 2021). Mégis a vakcinák a mai napig elérhető leghatékonyabb megoldás a PRRSV által okozott gazdasági károk mérséklésére (Nan és mtsai., 2017).

A vakcinák hatékonyan csökkentik a klinikai tüneteket és a virémiát, lerövidítik a vírus terjedésének időtartamát. Hatékony védelmet nyújthatnak a fertőzés ellen (Han és mtsai., 2009, Leng és mtsai., 2012). Az élő, gyengített vakcinákkal végzett tömeges vakcinázás alkalmával a vakcinavírusok átterjedhetnek beoltott sertésekről nem vakcinázottakra, így képesek lehetnek az állományban cirkulálni, és különböző, klasztereket kialakítani (Guo és mtsai., 2018).

A PRRS elleni vakcinázás legjobb termelési és gazdasági eredmények elérése érdekében a tenyészkocák, utódállomány és malacok együttes vakcinázásával, valamint a technológiai folyamatok és vírus állományon belüli terjedés szigorú ellenőrzésével valósítható meg (Quezada-Fraide és mtsai., 2021).

3.5.1 A magyar sertésállományokban használt vakcinák

A Nemzeti PRRS Mentésési Programban használt élő attenuált vírustörzsekből kifejlesztett oltóanyagok a következők voltak:

- *A vakcina:* Porcilis MLV® PRRS vakcina (gyártó: MSD Animal Health, Madison, NJ, USA)
- *B vakcina:* Unistrain PRRS vakcina (korábban: Amervac) (gyártó: Laboratorios Hipra, S.A., Amer, Spanyolország)

- *C vakcina*: Reprocyc PRRS EU vakcina (gyártó: Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Németország)
- *D vakcina*: Ingelvac PRRSFLEX EU vakcina (gyártó: Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Németország)
- *E vakcina*: Suvaxyn PRRS MLV (gyártó: Zoetis Belgium SA)

A magyarországi nagylétszámú tenyésztelpek 29 %-a Porcilis PRRS, 25 %-a Unistrain PRRS, míg 9 %-a Reprocyc PRRS EU vakcinát alkalmazott. A további telepek (37 %) a mentesítés során inaktivált vakcinát használtak, melyek a Progressis® PRRS vakcina (gyártó: Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt, Magyarország) és a Biosuis PRRS inact EU+AM (gyártó: Bioveta, Csehország) vakcina.

3.6 PRRSV elleni immunitás

A PRRSV fertőzés során a sertés immunrendszere dinamikusan megnöveli az immunválaszt a vírus eliminációjának érdekében (Westley és mtsai., 2006). A sikeres vírus kiürüléséhez elengedhetetlen a sertés veleszületett immunrendszerének megfelelő aktiválása, mely hozzájárul a PRRSV elleni adaptív immunitás kialakulásához. A PRRSV replikációjának preferenciális helyei a tüdőben jelenlévő alveoláris makrofágok, amelyek légzési DC/makrofág hálózat fő összetevőjét alkotják. E hálózat túlnyomórészt az idegen antigének érzékelésében, gyulladás szabályozásában és az adaptív immunválasz kiváltásában vesz részt (Nazki és mtsai., 2020; Maisonnasse és mtsai., 2016). Különböző, specifikus DC alcsoportok a tüdő légzőszervi DC/makrofágok hálózatában, melyek rezisztensek a PRRSV fertőzéssel szemben (Bordet és mtsai., 2018; Maisonnasse és mtsai., 2016). Aktiválás után ezek a DC-k a limfoid szövetekben jutva antigént prezentálnak a T-helper sejteknek, és így teremtenek kapcsolatot a veleszületett és az adaptív immunitás között (Nazki és mtsai., 2020). A T-sejtek kritikus szerepet játszanak a PRRSV elleni immunitás kialakulásában, központi szerepük van az antigén-specifikus immunválaszok kialakításában és szabályozásában, beleértve a B-sejt aktivációt és a citokin hatás funkciókat a fertőzött sejtekben (Loving és mtsai., 2015).

A fertőzött sertésekben egy-két héten belül igen erős humorális immunválasz alakul ki, de ezek a kezdeti ellenanyagok nem nyújtanak védelmet, sőt károsak is lehetnek az antitestfüggő fokozódás (ADE) közvetítésével, mivel ezek az ellenanyagok elősegíthetik a vírus bejutását a célsejtekbe. Úgy tűnik, hogy a PRRSV elleni humorális immunitás tartósan fennmarad (Batista és mtsai., 2004). Ezzel szemben a neutralizáló antitestek (NA) később jelennek meg szintjük alacsony marad, ami nem képes hatékonyan eliminálni a PRRSV-vel fertőzött sejteket (Mateu és Diaz, 2008; Costers és mtsai., 2006). Bár a neutralizáló antitestek

számos vírusfertőzések leküzdésében kulcs fontosságúak, azonban a PRRSV esetében hatékonyságuk megkérdőjelezhető. Megjelenésük elsődleges fertőzésben főként a virémia megszűnése után következik be, melyet a neutralizáló antitest titerek mérésével detektálhatunk (Molina és mtsai., 2008). Természetes úton fertőzött sertésekben a neutralizáló antitest magas titere keresztvédelmet nyújthat a heterológ PRRSV-vel szemben (Robinson és mtsai., 2015, 2018).

Kimutatták, hogy a homológ neutralizáló antitestek passzív átvitele megakadályozza a szaporodási betegségeket és a vírus utódokra való átvitelét (Osorio és mtsai., 2022).

A PRRSV esetében a fehérje-specifikus T-sejt proliferációt vagy citotoxikus hatást nehéz kimutatni. A szabályozó T-sejteket és a Th3 citokin IL-10-et PRRSV-vel fertőzött dendritikus sejtek indukálják. Ezek a T-sejtek fontosak lehetnek a PRRSV fertőzések során, mivel az immunitás késleltetett indukációja és az elhúzódó fertőzés azt jelzi, hogy a T-sejtes válasz inkább szuppresszív, mint segítő (Klinge és mtsai., 2009; Murtaugh és mtsai., 2009; Wongyanin és mtsai., 2010).

3.6.1 Társfertőzések

A PRRSV növeli a gazdaszervezet érzékenységét a betegségek széles skálájára vírusos és bakteriális légúti kórokozók tekintetében, ami erősítő a klinikai tüneteket és a tüdőelváltozások súlyosságát. PRRSV és egyidejű sertésinfluenza vírus, vagy/és sertés légúti koronavírus (PRCV) és a sertés circovírus 2 (PCV2) fertőzés esetén súlyosabb klinikai tünetek és növekedési visszamaradás fordul elő, mint azon sertéseknél, akik csak PRRSV-vel fertőződtek (Renukaradhya és mtsai., 2010; Opriessing és mtsai., 2011; Gómez-Laguna és mtsai., 2013). A PRRSV-vel és PRCV-vel egyszerre fertőzött sertések klinikai tüneteinek súlyosbodása a veleszületett immunválasz károsodásával járnak a tüdőben, különösen a természetes ölf (NK) sejt közegben csökkent citotoxicitás észlelhető a csökkent interferon (IFN) expressziója miatt. Ezzel egyidőben az adaptív immunválasz is károsodik, ami a PAM-ok fokozott apoptózisához vezet az interleukin (IL)-6 és IL-10 koncentrációjának növekedése miatt (Renukaradhya és mtsai., 2010; Jung és mtsai., 2009). A PRRSV mellé gyakran társuló megbetegedés a malacok választás utáni sorvadásos kórképe (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS). E betegség kórokozója a 2-es típusú sertés circovírus (PCV2). Egyes leírások alapján a PRRSV és PCV2 a két legfontosabb betegség a sertést tenyésztő országokban nagy gazdasági kártételük miatt (Prpić és mtsai., 2014). Különböző vizsgálatok kimutatták, hogy a telepi fertőzések ezzel a két vírussal voltak a leggyakoribbak (Allan és mtsai., 2000). A PRRS-hez kapcsolódó hepatitisben szenvedő kocák májában mind a PCV2, mind a PRRSV jelen volt és a PMWS esetek többségében mind a PRRSV, mind a PCV2 antigént, genomot kimutatták a szövetekben (Harms és mtsai., 2001). A fertőzött sertéseknél

túlnyomórészt bőrelváltozások, súlyvesztés, légzőszervi és emésztési zavarok, majd a mortalitási arány növekedése volt (Prpić és mtsai., 2014).

A PRRSV gyakorta előforduló vírusos és/vagy bakteriális társfertőzéseit nevezzük a sertés légúti betegségek komplexumának (PRDC) (Pomorska-Mól és Dors, 2022). A fő társkozókozói a sertés cirkovírus 2-es, az influenza-A vírusok (IAV), a *Mycoplasma hyopneumoniae*, az *Actinobacillus pleuropneumoniae*, és a torzító orrgyulladás kialakításáért felelős *Bordetella bronchiseptica* és *Pasteurella multocida*. A *Mycoplasma hyopneumoniae* társfertőzés növelheti a PRRS tüneteinek súlyosságát. Egy kutatás szerint a PRRSV által kiváltott légúti betegség, valamint makroszkópikus és mikroszkópos tüdőgyulladás súlyosabb és tartósabb volt *Mycoplasma hyopneumoniae*-val fertőzött sertésekben. A fertőzött sertések továbbra is a PRRSV által kiváltott tüdőgyulladásra jellemző elváltozásokat mutattak, míg csak a PRRSV-vel fertőzött sertések tüdejének szövettani képe negatív volt. Egy vizsgálat során kimutatták, hogy egy lezajló *Mycoplasma hyopneumoniae* fertőzés utáni PRRSV felülfertőződés során a tünetek nem súlyosbodnak szignifikánsan (Thacker és mtsai., 1999).

Egy másik betegséget is érdemes megemlíteni a társfertőzések esetében, ez a sertések torzító orrgyulladása, amely kiváltó oka a *Bordetella bronchiseptica* fertőzésre rátelepedő, a sertéssel együtt élő baktérium a *Pasteurella multocida*. Mely utóbbinak egyes törzsei toxinokat termelnek (*Pasteurella multocida* toxA), ami a sertések torzító orrgyulladásának klinikai manifesztációját okozzák. (Magyar és Lax., 2002). A PRRSV-vel és *Bordetella bronchiseptica*-val való együttes fertőzés hajlamosította a sertéseket a felső légutak és a tüdő *Pasteurella multocida* fertőzésre. A sertések szaporodási és légzőszervi szindróma vírusa és a *Bordetella bronchiseptica* kölcsönhatásba léphet, és hátrányosan befolyásolhatja a légúti védekezési mechanizmusokat, így a sertések különösen érzékenyek a másodlagos kórokozók, például a *Pasteurella multocida* által okozott fertőzésekre (Brockmeier és mtsai., 2001).

3.7 Gazdasági kártétel

A sertés szaporodási és légúti szindróma (PRRS) egy jelentős fertőző betegség, amely világszerte súlyos gazdasági veszteségeket okoz a modern intenzív sertéstartásban (Szabó és mtsai., 2020^a). Először Hollandiában izolálták a sertés szaporodási és légzőszervi szindróma vírusát (PRRSV), amely világszerte hatással van a modern sertéstermelésre, és továbbra is jelentős gazdasági problémát jelent a sertésipar számára. A kocánkénti átlagos veszteség járványkitörésként 126 euró volt. A járvány kitörése utáni költségek kocánként 3 és 160 euró között jelentősen változtak (Nieuwenhuis és mtsai., 2012). Németországban a károkat kocánként 75 euróra becsülik évente (Renken és mtsai., 2021). Dániában ezeket a veszteségeket 31 euróra tartják (Kristensen, 2012). Különböző gazdasági elemzések

megerősítették a sertések szaporodási és légzőszervi szindróma (PRRS) klinikai kitöréseinek jelentős pénzügyi hatását a sertéstermelésre.

Az Egyesült Államokban 2005-ben a PRRS-járványok körülbelül évi 560 millió dolláros pénzügyi veszteséget okoztak, egy újabb, 2013-as számítás szerint az Egyesült Államokban a PRRS miatti termelékenységesztések költsége évi 664 millió dollárra tehető (Renken és mtsai., 2021; Holtkamp és mtsai., 2013). A koca/év költsége 114,71 dollár, a befejező költség pedig 4,67 dollár volt. Az Egyesült Államokból behozott sertések és/vagy spermium vásárlása esetén a szűrővizsgálatok jelentősége fokozott, hiszen egy lehetséges fertőzési forrást engedhetünk be, ami az EU sertéstermelésére nézve éves szinten 1,5 milliárd dolláros (1,13 milliárd eurós) veszteséget jelent (Kristensen és Vinther, 2013). Egy 4 hónapos járvány kitörésének költségeit egy 250 kocás állományban 236 dollár/tenyészkocára becsülték (Neumann és mtsai., 2005). Egy másik, 2015-ös jelentés szerint a PRRS költsége a krónikusan fertőzött állományok esetében az Egyesült Királyságban 135 euró volt kocánként évente, míg Hollandiában és Dániában, ahol az akután érintett állományokban kocánként évente 100 euró, a becslések valamivel alacsonyabbak voltak (Renken és mtsai., 2021). Magyarországon a PRRS fertőzések okozta veszteségeket megközelítőleg évi 5 milliárd forintra becsülik (≈ 14 millió €) (Szabó és mtsai., 2023).

A PRRS járvány jelentős költségeket okozott Japánban is, melyet a PRRSV-nek kitett gazdaságok mindegyikében kimutattak. A PRRS miatti veszteségeket, olyan adatok szorzata alapján számították, mint a klinikai tünetek, a PRRS járvány időtartama és a veszteségek mértéke. Ezekből a gazdaságokból származó különböző klinikai tünetek miatti teljes veszteségeket 2 év alatt 35,25 millió dollárra becsülték. A teljes veszteséget a kocák számának arányával becsülték, amely 280 millió dollár volt, amely magában foglalja a szopós és választott malacokat és a hízósertéseket is (Yamane és mtsai., 2009).

A PRRS-hez kapcsolódó hatalmas pénzügyi veszteség azt jelzi, hogy szükség van és lesz továbbra is megfelelő megelőző és ellenőrzési stratégiákra.

3.8 A PRRS állategészségügyi igazgatási vonatkozásai

A PRRS a 2005. évi CLXXVI. törvény értelmében 2006. január 1-jétől ismét bejelentési kötelezettség alá tartozik, azonban a Nemzeti PRRS Mentésítési Tervet csak 2014-ben fogadták el. Ennek célja az volt, hogy a hazai összes kis- és nagylétszámú sertésállományok fertőzöttségének mértékét felmérjék, valamint növeljék a hízósertések nevelésének hatékonyságát alacsonyabb gyógyszerfelhasználás mellett, miközben vírus mentességet érnek el az állományokban. A mentésítési eljárás megalapozására 2010 és 2013 között újabb átfogó vizsgálatokra volt szükség, hogy hazánk részletesebb vírustérképét felállítsák. A vizsgálatok során megtörtént a kis és nagylétszámú tenyészállományok és a nagylétszámú hizlaldák PRRS fertőzöttségének pontos, országosan regisztrált felmérése (Nemes és mtsai.

2019, Szabó és mtsai. 2019, Szabó és mtsai. 2020^a.) A felmérések során elvégzett szekvenálások alapján a kimutatott PRRSV törzsek az 1-es genotípus hat kládjába voltak besorolhatóak. Figyelemre méltó, hogy azonosítottak 2-es genotípusba tartozó az 1-es (virulens észak-amerikai) és az 5-ös (ingelvac MLV) genetikai vonalhoz tartozó izolátumokat is. Előbbiek szlovák import, utóbbiak illegális vakcinahasználattal kerülhettek magyar állományokba. Egy friss tanulmány szerint, 206 magyarországi szekvencia alapján a PRRSV1 törzsek kilenc kládba tartoznak (Szabó és mtsai., 2020^b).

Fontosak a telepek preventív intézkedései is, mint az importált állatok karanténba helyezése, szállítási, fertőtlenítési protokollok betartása és a telepek zártságának fenntartása. A vakcinázás, mint specifikus védekezési lehetőség, alkalmazása során az a tapasztalat, hogy egy inaktivált vakcina általában önmagában nem elegendő a korábban nem fertőzött sertés kellő védelmet nyújtó immunválaszának kialakulásához.

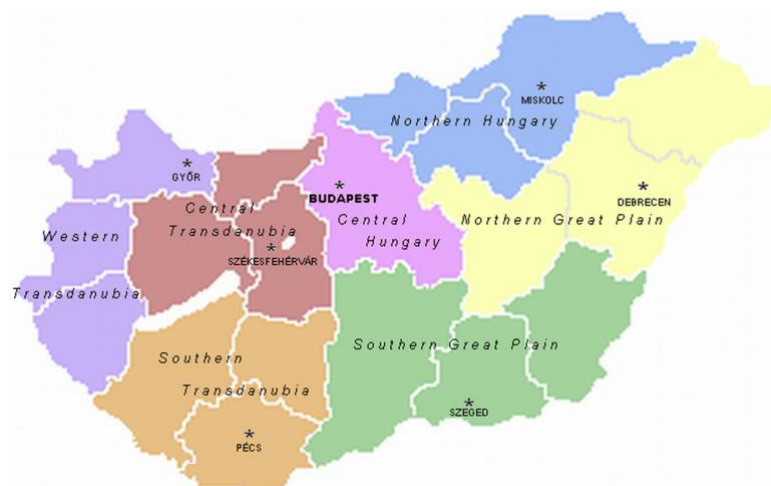
3.9 Mentésítés Magyarországon

A jelentős sertésiparral rendelkező EU- tagállamokban a PRRS fertőzések prevalenciája igen magas, ezért döntött Magyarország kormánya arról, hogy felszámolja a PRRSV-t Magyarországon. Az EU tagállamai közül az elsők között Magyarországon nemzeti PRRS mentesítési programot vezettek be. A program célja a hatékonyabb, gazdaságosabb és versenyképesebb sertéselőállítás (Nemes és mtsai., 2019).

A magyarországi sertésenyésztést hosszú évtizedek óta két különböző gazdálkodási forma párhuzamos jelenléte jellemzi. A nagyüzemi sertéstelepek piacra termeltek sertést, míg az egy-két kocát és korlátozott számú hízósertést (1-10) tartó egyéni gazdák jellemzően helyszíni feldolgozásra és fogyasztásra neveltek sertést. Magyarország EU-csatlakozásának évében 41,6%, míg 2016-ban a sertések 24,2%-át tartották háztáji sertéstelepeken (KSH adatai, 2018.12.01. lekérdezés alapján) A nagylétszámú tenyészállományok jellegzetessége, hogy fialástól vágásig típusba tartoznak (>85%), ami jelenti a szaporodási, fialási, előhízalási, hizlaló és kocasüldő nevelési egységek együttes, egy telepen belül való tartását. Magyarországon a telepekre túlnyomórészt csak tenyészkan vagy sperma kerül behozatalra (Nemes és mtsai., 2019; Szabó és mtsai., 2020^a).

A Magyar Kormány Sertés- és Élelmiszerlánc-biztonsági stratégiája (2013–2022) kiemeli a sertés szaporodási és légúti szindróma vírus (PRRSV) felszámolásának szükségességét, mely folyamat nagyban elősegítené a piaci lehetőségek növekedését. Magyarországot hét régióra osztották fel (3. ábra), melyben 19 megye és Budapest található (Szabó és mtsai., 2020^a; Szabó és mtsai, 2019). A mentesítési program jogszabályi hátterét a 3/2014 (I.16.) VM rendelet szabályozza. A rendelet szerint minden sertés PRRSV-vel fertőzött, „amelyből származó mintában - a vakcina törzseket kivéve - PRRS vírust mutattak ki, illetve amely

járványtanilag kapcsolatba hozható PRRS vírus fertőzött sertéssel, és amelyből származó mintában PRRS vírus specifikus antigén vagy RNS lett kimutatva, amely nem vakcinázás következménye, vagy amely járványtanilag kapcsolatba hozható megerősített PRRS vírus fertőzött sertéssel, és amelyből származó mintában PRRS vírus vakcina törzset, az antigénjét, az RNS-ét vagy PRRS vírus elleni specifikus ellenanyagokat mutattak ki, amely nem a vakcinázás következménye. PRRS fertőzöttségére nézve gyanús az a sertés, amelynek klinikai tünetei vagy kórbonctani elváltozásai a PRRS-re utalnak és a laboratóriumi vizsgálatok a betegség jelenlétét még nem igazolták vagy zárták ki, illetve amely nem vakcinázott, valamint a szerológiai vizsgálat során pozitív vagy kétes eredményt ad és a további vizsgálatok a fertőzöttséget még nem erősítették meg, illetve zárták ki, vagy amelyet a megelőző hatvan napon belül fertőzött sertéssel együtt tartottak, vagy fertőzött sertéstől származó ondóval termékenyítettek. PRRS-től mentes a sertés, ha az állatból a betegség vírusa vagy annak genomja nem mutatható ki, vagy az állat szerológiai vizsgálata negatív eredményű, és az állatot nem fertőzött állományban tartják. PRRS-től mentes vakcinázott a sertés, ha az állományban alkalmazott élő, modifikált PRRS vakcina vírustól eltérő PRRS vírus vagy ennek genomja nem mutatható ki, és a kanok esetében negyedévente elvégzett PRRS vírus kimutatására irányuló ondó vizsgálat negatív eredményre vezet.” (<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a1400003.vm>).



3. ábra Magyarország hét régiója az Európa Unió Statisztikai Területi egységek Nomenklatúrája (NUTS) alapján (Szabó és mtsai., 2020^a)

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RegionsHungary.png?uselang=hu>

A mentesítési módszerek közül a leghatékonyabb és leggyorsabb, ugyanakkor a költséges megoldás az állomány felszámolása és a telep újbóli létrehozása, amely hosszú távú termelőkiesést vonhat maga után (Fornyos és mtsai, 2022). Adott országban adott

betegség mentesítése lényegében három lépésből áll: a mentesítési terv kidolgozása, megszervezése és végrehajtása. Kimagaslóan fontos az adott ország állategészségügyi állapotának ismerete az adott állatállományra nézve. Döntő tényező az állat/állomány nyilvántartása, földrajzi elhelyezkedése, fertőzött állatok megoszlása a termelési ágazatok között. A PRRSV mentesítés első szakaszában szükséges volt a PRRSV fertőzött nagylétszámú tenyészsertés állományok országbeli elhelyezkedésének meghatározására. Az alkalmazott módszer lehetővé tette a sertések szigorúbb minősítését, amely alapján meghatározhatták, hogy fertőzött, fertőzésre gyanús vagy PRRSV-től mentes státuszúak. Ezen kritériumok alapján egyértelmű követelményeket, szabályokat kellett megfogalmazni a nagy létszámú gazdaságok besorolására a PRRS tekintetében. Minden PRRSV-vel fertőzött telepnek, olyan módszert kellett kidolgoznia, amely a legjobban szolgálja gazdasági teljesítményét, és biztosítja a folyamatos termelést a felszámolási folyamat során. Természetesen ez a folyamat magával hozta, hogy a külső és belső járványvédelmi szabályzatokat részletesen felülvizsgálják, akár szakmai szakértők bevonásával és ezen egységek gyakori ellenőrzését írják elő. (Szabó és mtsai., 2019, Szabó és mtsai., 2020^a).

Magyarországon a PRRS mentesítése során vakcinázást alkalmazó gazdaságok sokkal nagyobb arányban alkalmaztak élő vírusos vakcinát (61%), mint inaktíváltakat (39%). A tapasztalatok szerint a betegségvédelmi intézkedések - laboratóriumi monitorozás – vakcinázási módszer mentesítési protokollként történő alkalmazása sokkal fontosabb tényező, mint az alkalmazott vakcina típusa (Szabó és mtsai., 2020^b). A mentesség elérését követően a mentesség fenntartása és a nemzetközi mentességi előírások (vakcinázás befejezése az ország teljes területen) betartása feladat.

4 Anyag és módszer

Vizsgálatainkba olyan magyarországi sertéstartó telepeket vontuk be, melyek a PRRSV fertőzöttségük miatt mentesítést folytattak, és élő vírust tartalmazó vakcinával technológiaszerűen immunizáltak. A vizsgálatba főleg nagylétszámú 300-2500 kocát tartó sertéstelepeket vontunk be, az elléstől a vágásig terjedő típusút, melyeken fertőzött vagy vakcinázott státuszú kocák voltak. A 19 megyéből ilyen típusú telep 13 megyében volt Magyarországon.

4.1 Vakcinák stabilitásának vizsgálata

4.1.1 A vakcinák genetikai stabilitása

A vizsgálatban a mentesítés alatt álló telepek mind élő vírusos vakcinát használtak. A vizsgálatok választ adnak arra, hogy az egyes korcsoportok PRRS PCR pozitivitását a vadvírus vagy az alkalmazott élő attenuált vakcinatörzs okozza-e. A vakcinák genetikai stabilitásának vizsgálatát a pozitív mintákból származó amplikonok szekvenálásával végeztük. A szekvencia adatokat filogenetikai diagram segítségével ábrázoltuk, az azonosítás a vírushoz legközelebbi, leginkább hasonló szekvenciákat keresi egyes vakcinákban. Ezen szekvenciáknak ORF5-höz és ORF7-hez viszonyított százalékos hasonlóságát értékeltük a GenBank-ban tesztelt élő PRRS vírusvakcina törzséhez képest (Bálint és mtsai., 2021).

4.1.2 Mintavétel

A fertőzött telepek a mentesítési programjuk alapján kidolgozott PRRS Nemzeti Mentésítési Terv 4.0 utasításainak megfelelően (95%-os prevalencia és 2%-os konfidencia intervallum) vettek mintát heti/havi rendszerességgel az állomány státuszának nyomonkövetése érdekében. Általában vér- és szerv mintákat (pl: tüdő, nyirokcsomók) dolgoztunk fel. A vérmintákat szopós, választott állatokból hízó- és hízósertésekből, valamint tenyészállatokból (kanok, kocák, kocasüldők) vették. A rendszeres ellenőrzés mellett a szaporodási tünetet és légzőszervi rendellenességeket mutató állatokból vettek mintát (szervminták választott, előhízalt és hízó állatokból, valamint vetélt magzatból) a PRRSV szűrése érdekében.

A minták másik csoportja importált hízó alapanyagból származott, a mintavétel 48 órával Magyarországra érkezésük után történt. A vizsgálatra azért van szükség, mert az adott állománynak nincs mentességi igazolása vagy érkezhettek olyan állat, ami PRRSV ellen vakcinázva volt. Ugyanis Dániából érkező sertések esetében a nem vakcinázott sertések és a vakcinázott sertések gyűjtő állomáson való együtt tartásával kimutatható mindegyik állatból

a vakcinavírus (gyártó: Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, amerikai törzset tartalmazó PRRS vakcina). A gyűjtő állomáson együtt tartják a PRRS mentes, PRRS vakcinázott és akár a PRRS fertőzött állatokat is (Rathkjen és mtsai., 2017; Nemzeti PRRS Mentésítési Terv 4.0 https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/0/1_2019+OFÁ+határozat_PRRS+NMT_4.0.pdf/5e6f7a00-4bad-10dc-eca0-00f5f790cdab?t=1589453312110).

4.1.3 *Diagnosztikai vizsgálatok*

A különböző korcsoportokból származó vérmintákat szerológiai (ELISA) és molekuláris biológiai (PCR) módszerekkel vizsgáltuk a fertőzés időpontjának meghatározására. Ezt az eljárást használtuk fel arra, hogy egy telepspecifikus mentésítési protokollt dolgozzunk ki, amely nem csak a vakcinázási rendszert foglalja magában, hanem a belső járványvédelemi intézkedéseket is. A sertés vérsavókból PRRSV ELISA-teszteket végeztek az INgezim PRRS Universal ELISA Kit (Ingenasa, Madrid, Spanyolország) segítségével a gyártó ajánlásának megfelelően. A szérummintákból származó RNS-t a KingFisher Flex rendszerrel (ThermoFisher, Waltham, Ma, USA), a MagAttract 96 cador Pathogen Kit segítségével vontuk ki. A PCR-t per-Rotor-Gene Q (Qiagen) valós idejű PCR gépen végeztük a PRRSV virotípus RT-PCR Kit (Qiagen) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A PCR pozitív mintákat szekvenálásnak vetettük alá, melyben a vírus ORF5 régióját szekvenáltuk, de sikertelenség esetén a vírus ORF7 génjét is szekvenálták. A szekvenálást Sanger-módszerrel végeztük a BigDye 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ABI 3500 szekvenálógépen (Applied Biosystems). A kromatogramokat a BioEdit szoftver 7.2-es verziójával elemeztük és kézzel szerkesztettük (Hall, 1999) www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html .

4.1.4 *Szekvencia analízis*

Ebben a vizsgálatban 2342 PRRSV ORF5 szekvenciát (606 nt) és 478 PRRSV ORF7 (387 nt) szekvenciát elemeztünk. Az ORF5 szekvenciák közül 69 található a GenBankban, melyeket nemzetközi szakirodalomban publikáltak, míg a többi magyarországi vizsgálatok eredménye volt. A hazai szekvenciák közül 118, 2013 előtt, 47, 2014-ben, míg 2060 szekvencia 2015 és 2019 között keletkezett. Az ORF7 szekvenciák közül 36 volt nemzetközi (GenBank), 42, 2013-ig, 27, 2014-ben, míg 373, 2015 és 2019 között került meghatározásra. Összesen 832 ORF5 és 88 ORF7 szekvencia került be a GenBankba (accession number: MT628907-MT629731).

A szekvenciaelemzést a „similarity network” filogenetikai elemzés segítségével végeztük el az egyes vakcinákban lévő vírushoz legközelebbi, leghasonlóbb szekvenciák azonosítására. A hálózat létrehozásához a Prim algoritmust alkalmaztuk és létrehoztunk egy

minimum „spanning” fájlt (Minimum Spanning Tree, MST). A hálózat elemzés és az adatok vizualizálása a Cytoscape 3.6.0 szoftverrel történt (Szabó és mtsai., 2020^b). Ezt követően, ezeknek a szekvenciáknak az ORF5 és ORF7 szekvenciákhoz való százalékos hasonlóságát értékeltük. A GenBankban vizsgált élő vírusvakcina PRRSV törzsének ORF5-jét és ORF7-jét a következőkből 2014-től kezdődően a járványügyi adatoknak megfelelően (a minta eredetére vonatkozó állatorvosi információk, immunizáció stb.) minden magyar szekvenciához/mintához hozzárendeltük. A program által generált azonos és eltérő genetikai csoportokat tudtuk ábrázolni. A gyakorlatias és könnyen követhető, minimálisan átfogott „similariry network” filogenetikai elemzés alkalmazással a vírustörzsek közötti filogenetikai kapcsolatok jobb ábrázolásával, kiküszöböltük annak szükségességét, hogy előre meghatározott, önkényes határértéket, illetve számításigényes algoritmusokat alkalmazzunk. A filogenetikai elemzés reprezentációja lehetővé tette a vakcina- és vad típusú PRRSV nagy mennyiségű szekvenciájának elemzését és vizuális azonosítását, valamint a különböző vírusszekvenciák közötti kapcsolatok feltárását, amelyek segítik az adatalapú döntéshozatalt a különböző gazdaságok mentesítési programjaiban.

4.2 Telep specifikus DIVA rRT-PCR fejlesztése a teljes vizsgálati protokollal egy PRRSV mentesítés alatt álló telepen

4.2.1 Mintagyűjtés

A minták gyűjtése az Eurofins Vetcontrol Kft (régi nevén: M.A.H. Food-Controll Kft. Vetcontrol Állategészségügyi Diagnosztikai részlege) és a NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságába, diagnosztikai és monitoring vizsgálatra érkező vérminták feldolgozásán keresztül valósult meg. A vizsgált állomány 1400 kocából álló, fialásig tartó gazdaság, mely 2003-ban fertőződött PRRSV-vel. Azóta az immunizálást folyamatosan végezték élő és/vagy inaktivált PRRS vakcinákkal különböző vakcinázási gyakorlatok alapján (tömeges vakcinázás, később 6/60-as program (a kocákat a vemhesség 60. napján és az ellés utáni 6. napon Porcilis PRRS-sel immunizálták) MLV-vel, vemhesség 90. napján inaktivált vakcinával. 2017-től csak a tenyészállatokat oltották be. Az élő vakcinák közül csak a Porcilis MLV[®]-t használták.

A vírusok direkt kimutatására valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakcióra (rRT-PCR) alapozott általános és diszkriminatív diagnosztikai módszereket alkalmaztunk, majd a pozitív mintákat további, klasszikus, ORF5 és ORF7 kimutatására alkalmas RT-PCR módszerekkel vizsgáltuk. A kimutatott vírustörzsek részleges vagy teljes genomszekvenciáinak meghatározását klasszikus és új generációs szekvenálással végeztük.

A laboratóriummal együttműködő telepek a mentesítési program céljából heti rendszerességgel küldtek különböző korcsoportú állatokból az alvadásban nem gátolt vérmintákat, figyelembe véve azt, hogy 9-16 hetes állatokban a legmagasabb a vírus prevalenciája (Duinhof és mtsai., 2011).

4.2.2 *Indirekt ELISA*

A vizsgálatainkban résztvevő telepekről heti rendszerességgel érkezett minimum 250 db savóminta, melyek a Nemzeti PRRS Mentesítési Terv 4.0 rendelet követelményeinek megfeleltek (95%-os prevalencia és 2%-os konfidencia intervallum). Első lépésben ezen minták PRRSV-specifikus ellenanyag tartalmát határoztuk meg. Ehhez kereskedelmi forgalomban kapható indirekt ELISA (enzym-linked immunosorbant assay) tesztet használtunk (Ingezim PRRS 2.0. Ingenasa, Spanyolország). A mintákat laboratóriumba kerülésüket követően 1500x g gyorsulással 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően a vérsavót pipettával eltávolítottuk, megközelítőleg 500 µl-t, és felhasználásig a későbbi rRT-PCR vizsgálathoz az RNS stabilitásának megőrzése érdekében -20°C-on tároltuk. Esetleges pozitív minták hosszútávú tárolását -80°C-on végeztük.

Az ELISA vizsgálatokat a gyártó által meghatározott utasítások alapján végeztük. A savómintákat a teszt kit-ben található minta hígító oldattal egy kötés mentes hígító lemezben előhígítottuk 1/40-es hígításban, majd további hígítást végeztünk az érzékenyített 96 lyukú lemezben, ahol a végső térfogat 100 µl mintánként. A kontroll mintákat duplikáltan helyeztük mindegyik lemezre szintén 100-100 µl mennyiségben. Az érzékenyített 96 lyukú lemez aljában sertésekre specifikus monoklonális antitest volt kötve, valamint a PRRS amerikai és európai törzseinek rekombináns N fehérjéjét tartalmazza antigénként. Az első inkubáció szobahőmérsékleten történik 45 percig, majd a nem kötődött anyagokat 3x300 µl mosó pufferes mosással eltávolítjuk. Tormaperoxidázzal konjugált anti-sertés ellenanyagot mértünk a lyukakba 100 µl mennyiségben, majd egy újabb inkubáció következett ugyanolyan körülményekkel 30 percig. Az inkubációt követően a lemezt ismét 5x300 µl mosó pufferrel kimostuk és 100 µl tetrametil-benzidin (TMB) tartalmú szubsztrát oldatot mértünk rá. A szubsztrátot a mintákkal együtt szobahőmérsékleten 15 percig sötétben (pl. egy fiókban) kellett inkubálni, majd 100 µl leállító oldatot mértünk a lemezre. Ezekután a lemezeket Multiscan Ms reader (Thermofisher, USA) leolvasó készülékbe tettük, ahol a minták fényelnyelését tudtuk mérni (optical density, OD) 450 nm hullámhosszon. A kapott OD értékekből a minták S/P (sample/positive) értékeit tudtuk kiszámolni. AZ ELISA eredményeket az S/P számolt értékekből határoztuk meg. Ha 0,4 vagy annál nagyobb volt azt pozitívnak értékeltük.

4.2.3 A vírus RNS izolálása

A vérmintákból az RNS kivonás Macherey-Nagel RNA Virus Core Kit-tel történt. A kivonáshoz 150 µl vérsavót használtunk, melyet előzőleg 10 percig 1500g/perc fordulatszámon centrifugáltunk, és belemértünk egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A gyártó által (MN NucleoSpin Viral RNA Isolation User Manual) leírt protokoll alapján a TECAN automata nukleinsav kivonó robot segítségével kinyertük a mintánkból az RNS-t. Szervminta esetében a vírust tartalmazó szervből 200 mg mennyiséget vettünk és tettünk dörzsmozsárba, ahol 1 ml steril PBS puffer hozzáadását követően szétroncsoltuk a sejteket. Ezt az egész elegyet tettük 1,5 ml-es Eppendorfcsőbe és 10 percet 10000g/perc fordulatszámon centrifugáltuk. Ezután a felülúszóval dolgoztunk tovább és követtük az RNS kivonó (MN NucleoSpin Viral RNA Isolation User Manual) protokoll utasításait a nukleinsav kinyeréséig. Az így kapott RNS mintákat azonnali felhasználásra kerültek, vagy -80°C-on fagyasztva tároltuk, hogy megőrizzük a nukleinsav integritását és elkerüljük annak lebomlását.

4.2.4 Real-Time PCR

4.2.4.1 Elsődleges szűrő rRT-PCR

A vizsgálat célja a vérmintákból kimutatható vírus jelenlétének detektálása, melyet az Ingenetix ViroReal PRRS Virus EU & NA 1.1 Kit-tel végzünk. Ez egy rendkívül érzékeny módszer, mellyel egyszerre mutatható ki és egyben különíthető el a PRRS 1-es és a 2-es típusa. A reakció során fluoreszcens festékekkel jelzett oligonukleotid, az úgynevezett próba specifikusan kötődik a felerősített génszakaszhoz. A fluoreszcens jel intenzitásának detektálásával mérhetjük az amplikon/amplikonok mennyiségét, a próbák használatával pedig minőségi információt is kapunk. A ViroReal PRRS Virus EU & NA 1.1 Kit (Ingenetix GmbH, Ausztria) három különböző primer próba kombinációt tartalmaz. Az 1-es genotípus (európai) jelzésére a FAM festék, a 2-es genotípus (észak-amerikai) jelzésére a VIC/HEX festék alkalmas, míg a belső kontrollt (béta-aktin mRNA) a Cy5 festék detektálja. A belső kontroll segítségünkre van a hamis negatív reakciók kiszűrésére, valamint megmutatja az RNS extrakció megfelelőségét. A vizsgálat AriaMx Electronic Tracking qPCR (Agilent Technologies, Inc. Headquarters, USA) készüléken történik.

Program 1 Cycles: 1 Analysis: None	Program 2 Cycles: 1 Analysis: None	Program 3 Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60°
50°C 15 min	95°C 20 sec	95°C 5 sec 60°C 1 min

4. ábra: A szűrő PRRSV Real Time PCR termál profilja. https://www.ingenetix.com/wp-content/uploads/products/pdf/ViroReal_KIT_PRRS+Virus_ingenetix_Manual_v3-1engl.pdf

4.2.4.2 Elkülönítő (DIVA) PCR (TaqMan rRT-PCR)

Az elkülönítő PCR vizsgálatot azokból a mintákból végeztük, melyek előzőleg pozitívnak bizonyultak az elsődleges szűrő rRT-PCR-rel. A diszkriminatív PCR lényege, hogy a vizsgálat során elkülönítsük a vakcinavírus és vadvírus jelenlétét a mintában telepspecifikus primerek használatával. A sertésstelepekre jellemző különböző PRRS vadvírusok kialakulása miatt vált szükségessé ezen primerek használata. A vizsgálatot QIAGEN OneStep RT-PCR Kit-tel és a specifikus primerek felhasználásával végezzük egy 25 µl-es reakcióelegyben, a következőkben: reverz transzkripció 50 °C-on 30 percig, majd 95 °C-on 15 percig, és 40 cikluson keresztül 95 °C-on 15 másodpercig, 50 °C-on 20 másodpercig és 72 °C-on 30 másodpercig. A reakció paramétereit a primerek és a próbák koncentrációit és az annealing hőmérsékletet beállítottuk, optimalizáltuk annak érdekében, hogy az alacsony küszöbértéket (Ct) és a magas fluoreszcens jelet elérjük.

1. Táblázat: A primerek és a próbák szekvencia sorrendjei, melyeket a vizsgálatban használtunk. A primerek és próbák helyzete az 4. ábrán van feltüntetve. (^a A vastag betővel jelölt nukleotidok a specifikus T7-et jelzik, promóter szekvenciát adunk a forward primerekhez).

Név	Irányultság	Szekvencia 5'-3'
Disc F	Genomikus	CTCTCAYTGGGTTTYCTCAC
Disc R	Reverz	GCACGRATGACAAAACATAC
Porcilis P	Genomikus	FAM-TGCAGCGTCTACGGCGCTTG-BHQ1
Vadvírus P	Genomikus	HEX-AGCAGTGTCTACAGCACTTG-BHQ1
ORF5 F	Genomikus	TAATACGACTCACTATAGGGA -GTTGCTSCATTCMTGACAC ^a

2. Táblázat: A táblázat a DIVA valós idejű RT-PCR reakcióelegy összetételét mutatja 1 mintára nézve.

H ₂ O: MilliQ	11,4 µl
Qiagen one-step puffer (5x)	5 µl
RNAse inhibitor, Fermentase	0,1 µl
dNTP (10nM) Fermentas	1 µl
Porcilis F (10 µM)	1 µl
Porcilis R (10 µM)	1 µl
Probe FAM (10 µM)	0,5 µl
Probe HEX (10 µM)	0,5 µl
Qiagen RT-PCR enzime mix	1 µl

4.2.4.3 DIVA PCR-hez szükséges primerek és próbák

Az MLV vakcinatörzsek szekvencia sorrendjét azonosítottuk az adott telepen a Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 (MEGA 6.0) szoftver segítségével. A primereket és próbákat Primer3 szoftverrel terveztük. A célzott régió az ORF5 gén volt, a PRRSV genom egyik legvariábilisabb régiója. Az ORF5 középső részét találtuk alkalmasnak a primerek és próbák kialakítására a PRRSV diszkriminatív TaqMan rRT-PCR vizsgálat létrehozásánál. A forward és reverse primereket úgy terveztük, hogy mind a vakcina mind a vad típusú PRRSV szekvenciával megegyezzenek. A forward és a reverse primerek tartalmaznak kettő és egy degenerált nukleotidot, amely lehetővé tette a Porcilis MLV és a telepspecifikus PRRS vadvírus kötődését. Ezekkel szemben két különböző TaqMan próbát terveztünk mindegyiket úgy, hogy egyezzen a vakcina és/vagy vad típusú vírusszekvenciákkal. A két próba csupán négy nukleotidban különbözött azért, hogy megelőzzük a nem cél szekvenciához való kötődést. Az MLV-k ORF5-je megegyezett az eredeti Porcilis PRRS MLV-vel (GenBank acc. no.: AY743931) Ezzel szemben vizsgáltunk három kisebb genetikai variánst (PRRSV 34040/2017, PRRSV 34548/2017, PRRSV 3502/2017), amely a vad típusú PRRSV-vel 92,6%-os, 93,9%-os, és 96,6%-os nukleotid azonosságot mutattak (5. ábra). Az amplicon 152 nukleotid hosszú volt (Lelystad vírusra számolva, regisztrációs szám: AY588319). A vakcina specifikus próbákat FAM-mal jelöltük, míg a vad típusú PRRSV specifikus próbákat HEX-et tartalmazó flouoroflór festékkel. A primerek és próbák szekvenciáit az 1. Táblázat mutatja.

```

LV 13728
Disc F
Porcilis CTCTCAYTGGGTTTYCTCAACAACAAGCCATTTTTTTGACGCGCTCGGTCTCGGCGCTGTATCCACTGCAGGATTG
PRRSV 34040/2017 .....C.....C...T.....A..G..T....G...GT.....
PRRSV 34548/2017 .....T.....C.CC...T.....A.....G...G.C.....
PRRSV 35302/2017 .....C..C...T.....A.....G...G.C.....

LV 13824 LV 13879
Porcilis P/Wild P Disc R
Porcilis TTGGCGGGCGGTATGTACTCTGCAGCGTCTACGGCGCTTGTGCTTTCGCAGCGTTCSTATGTTTGTTCATYCGTGC
PRRSV 34040/2017 .CA.T.A.....A...T.....A..A.....T..G....A.....T....
PRRSV 34548/2017 .CA.....A...T.....A..A.....C..T..G....G.....T....
PRRSV 35302/2017 .CA.....A...T.....A..A.....G....G.....T....

```

5. ábra: A primerek és a vizsgálathoz használt próbák helyzete a vizsgált vad típusú genetikai variánsokhoz képest. A referencia szekvencia sorrend a Porcilis MLV, mely a szürkével jelölt rész a forward és reverse primerek szekvenciáját jelölik, míg a sárga és zöld árnyalatú rész a Porcilis MLV és vad típusú specifikus próbák (Fornyos és mtsai., 2022)

4.2.4.4 A rendszer specificitása és érzékenysége

A rendszer érzékenységét a Porcilis MLV törzsből és a telepspecifikus vad típusú vírus PRRSV 30040/2017 NÉBIH törzsből (első PRRS izolátumból származó vírustörzs) rekombináns RNS standard kópia száma alapján határoztuk meg.

A rekombináns RNS standardok előállításához hagyományos RT-PCR-t végeztünk ORF5 specifikus primerekkel (Balka és mtsai., 2008), ahol a specifikus T7 promóter szekvenciátadtunk az 5' vég forward primerhez (1. Táblázat). Az amplikonokat gélen futtattuk és QiaQuick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Németország) kittel tisztítottuk. A tisztított DNS-t RNS-sé írtuk át a MEGAscript® T7 Kit-et használva (Ambion, Austin, TX, USA). Egy Nanodrop ND 1000 műszer (Wilmington, USA) segítségével meghatároztuk a hígítatlan minták RNS koncentrációját. A kópiaszámokat az Avogadro formulával számítottuk ki. A PCR hatékonyságot $E = 10(-1/s) - 1$ képlet alapján határoztuk meg, ahol E hatékonyságot az s pedig a meredekséget jelenti. A standard görbéket a fenti RNS standardok tízszeres RNS hígításainak teszteredményeit felhasználva állítottuk fel.

A teszt specificitását a Porcilis MLV és a PRRSV 30040/2017 PRRSV NÉBIH törzsek sorozat hígításával értékeltük. Különböző sertés kórokozókat használtunk a PRRSV elkülönítő rRT-PCR vizsgálat keresztreakcióinak kizárása érdekében. A felhasznált sertés vírusok a következők voltak: sertés circovírus 2-es típusú, sertésinfluenza vírus (H1N1, H3N2), afrikai sertéspestis, klasszikus sertéspestis, sertés légúti koronavírus, Aujeszky-betegség vírusa, sertés parvovírus és a sertés citomegalovírus.

4.2.4.5 Vegyes fertőzés kimutatása DIVA PCR módszerrel

Azokban az állományokban, amelyekben az MLV vakcinázást alkalmazzák a PRRSV elleni védekezésre vagy a mentesítés elősegítésére vegyes fertőzések fordulhatnak elő, mivel mind a vakcina, mind a vad típusú PRRSV-t hosszú ideig hordozhatják és ürítik, különösen a fiatal állatok. A DIVA rRT-PCR teszt értékeléséhez két hígítási sorozatot alkalmaztunk, amelyeket változó kópiaszámmal 10^1 és $10^8/\mu\text{l}$ között keresztittráltunk a Porcilis MLV és a telep-specifikus vad típusú PRRSV kimutatására. A második lépésben ugyanezeket a hígítási sorozatokat használtuk, de most állandó kópiaszámú másik vírust, $10^4/\mu\text{l}$ kópiaszámú mintával mértünk. Ezeket a keverékeket DIVA PCR vizsgálatnak vetettük alá, hogy az érzékenységet összehasonlítsuk az egy PRRS vírust használó próbákéval, mint templát.

4.2.4.6 A diszkriminatív TaqMan rRT-PCR módszer optimalizálása

A rendszer optimalizálása során célunk az volt, hogy elérjük alacsony Ct érték és legmagasabb fluoreszcencia jel használatával a fix templát szintet (10^4 kópiaszám). Első lépésben a forward és reverse primerek négy koncentrációjának (100-600 nM) kombinációjával határoztuk meg a próbák konstans (400nM) koncentrációját. A legmagasabb fluoreszcenciát mutató primer koncentráció volt tesztelve négy különböző TaqMan próba koncentrációval (100-400 nM). A legoptimálisabb koncentrációk kombinációja 600nM a primereknek és 400 nM a próbáknak. Az annealing hőmérsékletet is meghatároztuk és 50 °C-on használtuk a további vizsgálatokban.

4.2.5 Szekvenálás

A PRRSV virulenciáját több genomiális régió is befolyásolja, ezért is lenne fontos a teljes genom szekvenálásának elvégzése. A teljes genom szekvenálására ezen munkánk keretében nem nyílt lehetőségünk, ezért a pozitív mintákban az ORF5 és ORF7 régiók szekvenálását végeztük el, hogy megerősítsük és igazoljuk a mentesítési eljárásban előírt diagnosztikai vizsgálatok eredményeit. A szekvenálás azért is bírt ekkora jelentőséggel, mert vissza tudtuk ellenőrizni a DIVA PCR által kapott pozitív eredményeinket, akár vakcina akár vad típusú vírus esetén. A virális örökítőanyag felsokszorozását RT-PCR technikával végeztük el. A pozitív mintákon diagnosztikai primerekkel az ORF5 és ORF7 régiók PCR vizsgálatát hajtottuk végre. Az így kapott terméket TBE pufferben oldott, 2 μl Midori green Advance DNA Strain (Nippon Genetics Europe GmbH, Németország), 1%-os alacsony olvasádpontú agarózgélben (Agarose Gel, Bio-Rad, USA) elektroforetizáltuk 100 V feszültséggel 30 percen keresztül. Az ampikonok helyzetét 302nm UV átvilágítással DNS

létra segítségének használatával határoztuk meg. A terméket tartalmazó géldarabot kivágtuk és a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Németország) segítségével kivontuk a DNS-t.

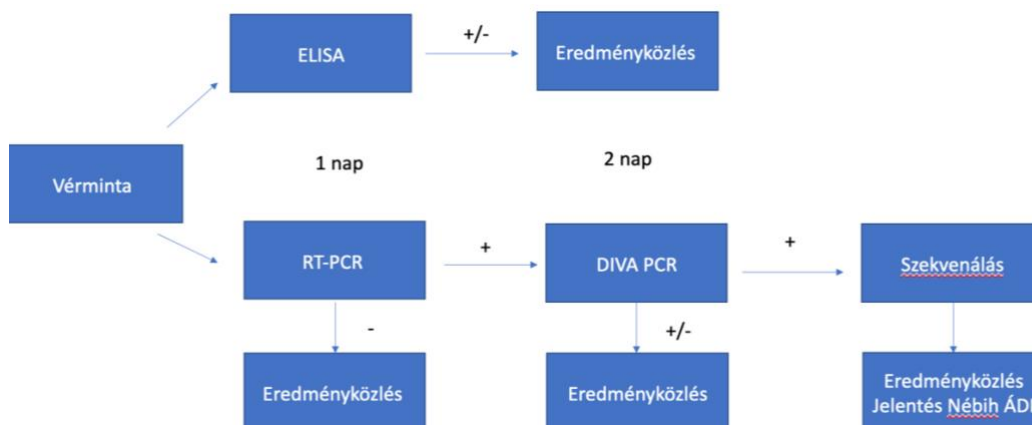
A szekvenálást fluoreszcens festékekkel jelölt didezoxi-nukleotidok szálépítésén alapuló módszerrel (az állategészségügyi szempontból kiemelt jelentőséggel bíró mintákból) Beckman Coulter GenomeLab GeXP Genetic Analysis System készüléken végeztük. A generált PCR termékekből cDNS könyvtárakat készítünk, a különböző törzsek egyedi megjelölésével (vonalkódozás/indexelés). Ez az eljárás lehetővé teszi több vírus genom egyidejű szekvenálását a nagy átírási képességű új generációs DNS szekvenáló (Beckman Coulter GenomeLab GeXP Genetic Analysis System, USA) készüléken. A nyers szekvencia adatok kiértékelése a CLC Genomics Workbench, illetve Geneious programok segítségével történt.

4.3 A DIVA PCR gyakorlati alkalmazása

4.3.1 Sertésállományok vizsgálata

A vizsgálatot Magyarországon végeztük, olyan sertésletelek bevonásával, amelyek részt vettek a PRRS mentesítési programban. 2017 és 2019 között 38 447 különböző korcsoportból származó mintát vizsgáltunk meg kereskedelmi forgalomban kapható ViroReal PRRS Virus EU & NA 1.1 Kit (Ingenetix GmbH, Ausztria) segítségével, olyan telepek részvételével, melyek az immunizációs programjukat élő vírusos vakcinával végezték. A vizsgált telepek főként nagyüzemi, 300-2500 kocából álló, fialástól a vágásig rendszerűek voltak eltérő fertőzöttségi státusszal. Azóta az immunizálás folyamatosan történik élő és/vagy inaktivált PRRS vakcinákkal. 2017-től csak a tenyészállományt oltják.

Az élő vakcinák esetében a Porcilis MLV[®]-t használták. Az állományt heti rendszerességgel laboratóriumi ellenőrzéseknek vetették alá a PRRS vírus állományon belüli terjedésének kimutatására. Minden szűrő valós idejű RT-PCR pozitív mintát megvizsgáltunk megerősítés céljából a diszkriminatív TaqMan PCR módszerrel. A vizsgálatokkal vad típusú PRRSV-t és az MLV vakcinát lehet azonosítani. A DIVA Real Time PCR módszerrel a korcsoportok PRRS státuszáról kaptunk információt. A módszer alkalmas volt a telepek adott technológiai lépése előtt megmondani, hogy a vizsgált korcsoport vad PRRSV fertőzött-e. Ha egy koca pozitív eredményt adott telepspecifikus PCR-rel PRRSV-re a 2-4 hetes választás előtti malacait leselejtezték.



6. ábra: A PRRS mentesítési programban résztvevő telepek vizsgálati protokollja.

4.3.2 Vizsgálatban résztvevő telepek és jellemzőik

A vizsgálatokba bevont valamennyi sertéstelep nagylétszámú, árutermelő tenyészállomány volt.

4.3.2.1 „A” telep

Annak értékelésére, hogy 2%-os prevalencia és 95%-os megbízhatósági szint teljesüljön, valamint, hogy almonként legalább egy malac mintavétele elegendő-e a vírusmentesség megbízható megállapításához vizsgálatainkat az „A” nagyméretű telepen végeztük. Ez egy 2000 kocás elléstől a választásig tartó telep, amely cég két másik, nevelősertést termelő állománya számára biztosít választott malacokat a társasággal szerződött hizótelepek számára (több telephelyes rendszer). Az ellés folyamatos volt a telepen, nevelésbe vétel viszont nem volt engedélyezve. Ehhez a vizsgálathoz a mintákat gyenge (gyengébb) malacokból vette a telepet ellátó állatorvos. A mintavétel időpontját egy héttel a választás általános időpontja (28 napos) előtt terveztük.

Az „A” Farm PRRSV-mentes telepe 2018 közepén vad típusú PRRS-1 vírussal fertőződött meg, amit az ORF5 gén szekvenálása is megerősített. A betegség klinikai tünetekben (vetelés, halvaszületés) nyilvánult meg. A 2000 kocás telep összes tenyészállatát kétszer immunizálták élő módosított, gyengített vakcinával (Porcilis PRRS, MSD Animal Health) 2018. november 14-én és 2018. december 13-án 4 hetes időközzel. Később állományzárást alkalmaztak (nem került sor újonnan beállított kocasüldők bevezetésére, és az utódok nem lettek beoltva).

A teljes kocapopuláció vakcinázását követően 2019. január végétől február közepéig a választáskori malacok minden alomjának egy egyedéből vettük, melyet PRRS ellenanyag ELISA és PRRSV PCR vizsgálatnak vetettük alá. 2019. február közepétől május végéig a mintaszámot almonkénti egy malacról almonként három malacra növeltük.

4.3.2.2 „B” és „C” telep

Annak meghatározására, hogy a DIVA PRRS PCR vizsgálatot hogyan illesszük be a rendszeres monitorozási ütemtervbe vizsgálatunkat a „B” és „C” telepeken végeztük.

A „B” telep 870 kocából álló állomány az elléstől a vágásig típusú rendszerrel. Ebben a gazdaságban 2008-ban történt a PRRSV fertőződés. 2008 és 2015 között háromféle vakcinát használtak a gazdasági veszteségek csökkentése érdekében: két inaktivált (Progressis, Ceva Santé Animale és Ingelvac PRRS KV, Boehringer Ingelheim Animal health) és egy élő attenuált vakcinát (Porcilis PRRS).

A PRRS mentesítését 2015-ben indították el az állomány tömeges vakcinázásával kétszer, 4 hét különbséggel a teljes tenyészállományt (kocák, kocasüldők, kanok és 2 hetesnél idősebb utódok). Az állomány vakcinázását első alkalommal 2015. június 15-e és 16-a között végezték el, amikor közel 8500 sertést oltottak be. Másodszor pedig 2015. július 14-e és 15-e között 8200 sertést oltottak be. Porcilis PRRS-t használtak az immunizáláshoz. Ezt követően a mentesítési terv szerint folyamatos termeléssel, a szeropozitív tenyész kocák folyamatos kiselejtezésével és pótlásával, a hizlalás végére az újszülött generáció PRRSV-mentes státuszának megőrzésére törekedtek.

Az oltási protokolljuk a következő volt:

1. 2 hetes korban az összes malac
2. 180 és 210 napos kocasüldő
3. minden 60 napos vemhes koca
4. minden koca ellés után 6 nappal
5. negyedévente minden kan

2015 végétől a mentesítési program előrehaladásának nyomon követése érdekében almonként 5-7 nappal a választás előtt egy malac vérmintáját vizsgáltuk ELISA-val és általános PCR-rel. 2018 szeptemberétől a laktációs időszak alatti vakcinázást leállították, a malacokat 4-5 és 9-10 hetes korukban Porcilis PRRS-sel oltották be. 2018 áprilisától a tenyészállományt háromhavonta immunizálták. 2018. december 12-től a megfigyelési rendszer almonként három választott malacra módosult, 3-5 nappal az elválasztás előtt.

A „C” telep egy 1400-as létszámú kocás, fialástól vágásig tartó tenyészállomány, amely 2003-ban fertőződött meg PRRSV-1-gyel. A fertőzést követően az immunizálást folyamatosan végezték élő és/vagy inaktivált PRRS vakcinákkal a különböző oltási gyakorlatoknak megfelelően. Az élő vakcinák közül csak a Porcilis PRRS-t alkalmazták. Az állományt rendszeres laboratóriumi ellenőrzésnek vetették alá a PRRS vírus állományon belüli terjedésének kimutatására.

Kezdetben úgy tűnt, hogy a malacok hosszú ideig (7-8 hónapig) PRRSV-mentesen nevelhetők, akár a hizlalási időszak végéig. 2016 végétől azonban kiderült, hogy a PRRSV nagyon elterjedt az állományban, beleértve a választott malacokat is, amit az ORF5

szekvenálás mutatott ki. 2017 januárjában, februárjában és májusában minden kocát újraimmunizáltak, majd a 6/60 program következett (a kocákat a vemhesség 60. napján és az ellés utáni 6. napon Porcilis PRRS-sel immunizálták). Az elválasztás után az 5 hetes malacokat ugyanazzal a vakcinával vakcinázták. 2018 januárjától minden választás előtt 5-7 nappal almonként három malac szérummintáját teszteltük PRRSV PCR-rel. Az alom leggyengébb (valószínűleg fertőzött) malacait választottuk ki vérvételre. Ezek közül a pozitív mintákat DIVA PRRS PCR-rel vizsgáltuk. Ha a DIVA PRRS PCR vad típusú vagy vakcinavírus jelenlétét jelezte, szekvenálást is végeztünk. 2018 szeptemberétől minden olyan kocát, amelynél PCR-vizsgálattal kimutattuk a vad típusú PRRSV jelenlétét, az utódaikkal együtt leselejteztek.

4.3.2.3 „D” telep

Az alábbi vizsgálat egy 850 koca létszámú, fialástól vágásig típusú sertéstelepen („D” telepen) történt. A telep Magyarország egyik legnagyobb sertéssűrűségű régiójában található, amely 2014-ben a leginkább érintett volt PRRS-sel. A telepen ugyanabból az állományból tenyésztésre szánt malacokat neveltek. A termékenyítés vásárolt spermával történt. Az ellés folyamatos volt, a malacok átlagosan 4 hétig (legfeljebb 32 napig) tartózkodtak a malac nevelőben. Az elválasztás után a tenyészkocákat ugyanabban a légtérben tartották, de fizikailag elkülönítve a hízóállománytól. A dedikált épületekben történő hizlalás 70 napos kor körül kezdődött, 26-30 kg testtömeggel, all in all out módszerrel. Minden hizláló épületben 2 db hizláló helyiség volt szabad térben. A sertéseket 100-115 kg-os tömegük elérésekor adták el vágásra.

A gazdaság 2018 januárjáig nagy gazdasági károkat okozó fertőző betegségektől (többek között Aujeszky-betegség, brucellózis, sertésleptospirozis, PRRS, mikoplazmózis, aktinobacillózis, torzító orrgyulladás, sertésdizentéria és rüh) mentes állományokkal működött. 2018 januárjában azonban az állomány PRRS vírussal fertőződött meg. A menedzsment döntése az volt, hogy a PRRS-t meg kell szüntetni, de nem gazdasági megközelítéssel. A mentesítési terv célja egy stabil PRRS mentes tenyészállomány létrehozása volt belső járványvédelmi intézkedésekkel, a folyamatos monitorozás specifikus laboratóriumi vizsgálatokkal és aktív immunizálás. Ebből a célból a teljes állományt 2018. február 9-10-én immunizálták, majd ezt 4 héttel később megismételték. Minden 1 hétnél idősebb malacot szintén immunizáltak. Ezt követően a tenyészállomány minden egyedét 3 havonta immunizálták, a malacokat választás után és 6-7 hetes korukban a malac nevelőben. 2020 decemberében a tenyészállomány immunizálását befejezték, belső biobiztonsági ellenőrzési módszerekkel és laboratóriumi vizsgálatokkal végzett folyamatos monitorozással biztosították a tenyészállomány PRRS vírusmentességét. Monitoring tesztek (ELISA és PCR) végeztünk 2019 végétől a következő csoportokban: i tenyészállatok: féléves

kontrollvizsgálatok; ii. választott malacok: almonként 3 sertés (az alom leggyengébb egyedei) választás előtt; iii. előhizlalt malacok: 60 malac nevelőnként az előnevelés végén (70-80 napos, még előnevelésben lévő); iv. hízósertés: 60 sertés a hízlalási fázis végén a hízó istállóba történő telepítést követően.

4.3.2.4 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést a 4.2.0 verziójú R szoftverrel végeztük. A Fisher-féle egzakt próbát használtuk a PCR-pozitív eredmények arányának összehasonlítására a vizsgált gazdaságokban alkalmazott különböző módszerek között; a <0,05-ös P-értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

5 Eredmények

5.1 Porcilis PRRS Vakcina

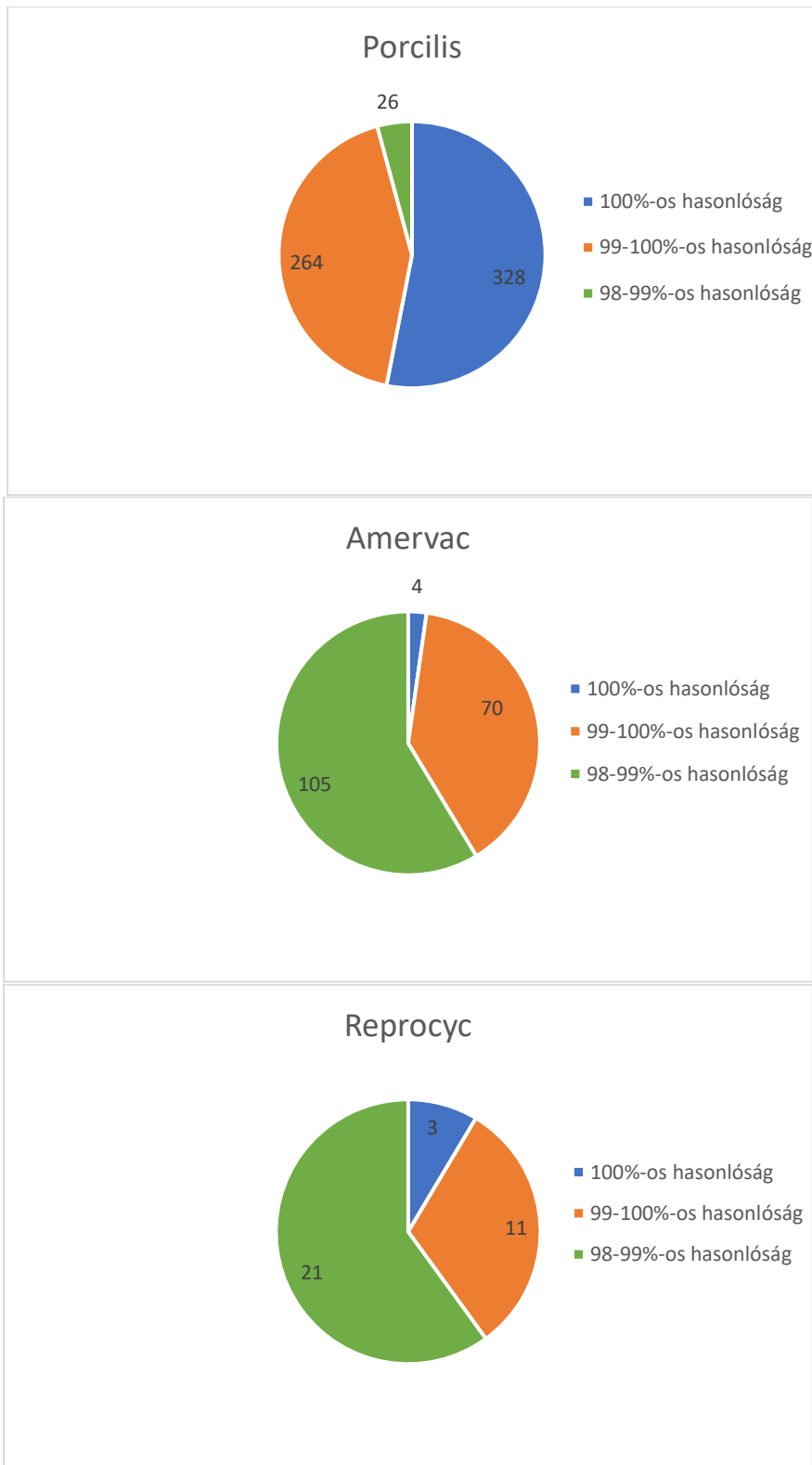
5.1.1 ORF5 szekvencia vizsgálata

Magyarországon a Porcilis PRRS vakcina első forgalomba hozatali engedélyének időpontja: 2002. május 6. A PRRS vírus szekvenálása 2003-ban már megkezdődött, de annak a rendszerszintű felhasználására csak 2014-től, a PRRS mentesítés megindulását követően került sor. A 2342 vizsgált PRRSV ORF5 szekvencia közül 618-ról derült ki, hogy legalább 98%-ban hasonlóságot mutat a Porcilis PRRS vakcinában található vírustörzssel. Ezen szekvenciák közül 328 (53,1%) volt 100%-ban azonos a vakcinában előforduló ORF5 szekvenciájával, 264 (42,7%) 99,1 és 99,9% közötti hasonlósággal rendelkezett, és 26 (4,2%) esetben a hasonlóság 98-99%-os között volt. Figyelemre méltó, hogy a Lelystad törzs az utóbbi csoportba tartozik (7. ábra).

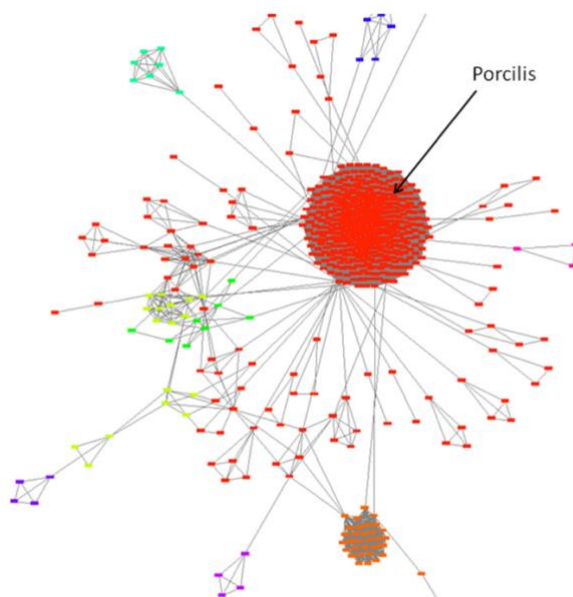
A szekvenciák eredetének vizsgálata során azt találtuk, hogy a vakcinázott és nem vakcinázott szopós malacokban, a baktériás életkorban vakcinázott malacokban, valamint a karanténzás során kétszer immunizált, majd azt követően 2-3 hét múlva történt vérvételből származó 273 szekvencia közül 270 esetében a kimutatott szekvencia hasonlósága az eredeti vakcina vírustörzsben találhoz képest több mint 99% volt.

Azon hízótelepek esetében, amelyek hazai eredetű hízóalapanyagot kaptak, 104 szekvenciát határoztunk meg. Ezek közül 102 esetben a kimutatott szekvencia 99 %-nál nagyobb mértékben volt hasonló a Porcilis PRRS vakcinában található vírus ORF5 szakaszához. Ezen állományok esetében minden alkalommal Porcilis PRRS immunizálás történt.

A Porcilis PRRSV vakcina magas genetikai stabilitását filogenetika fa alapján erősítettük meg és nem azonosítottunk telepspecifikus törzseket (8. ábra).



7. ábra: A vakcina ORF5 szekvenciáinak eloszlása és hasonlósága a GenBankban található standard törzsszel (Bálint és mtsai., 2021)

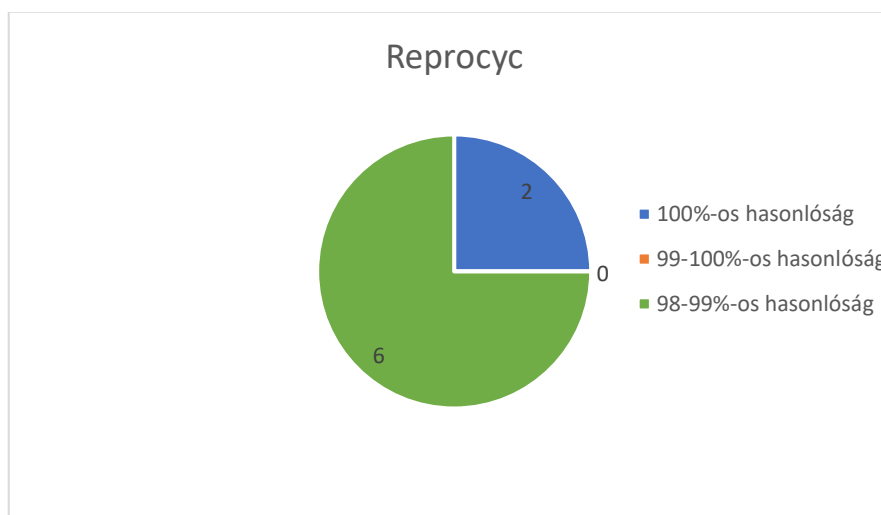
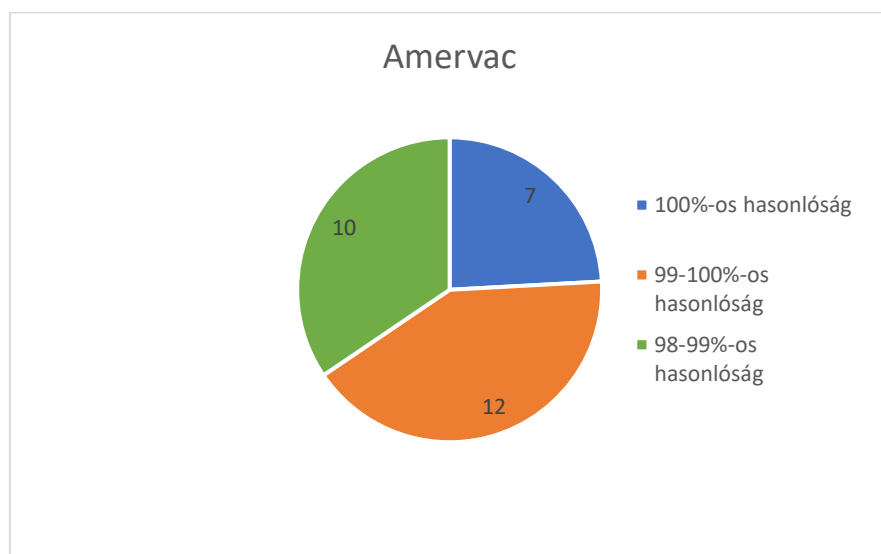
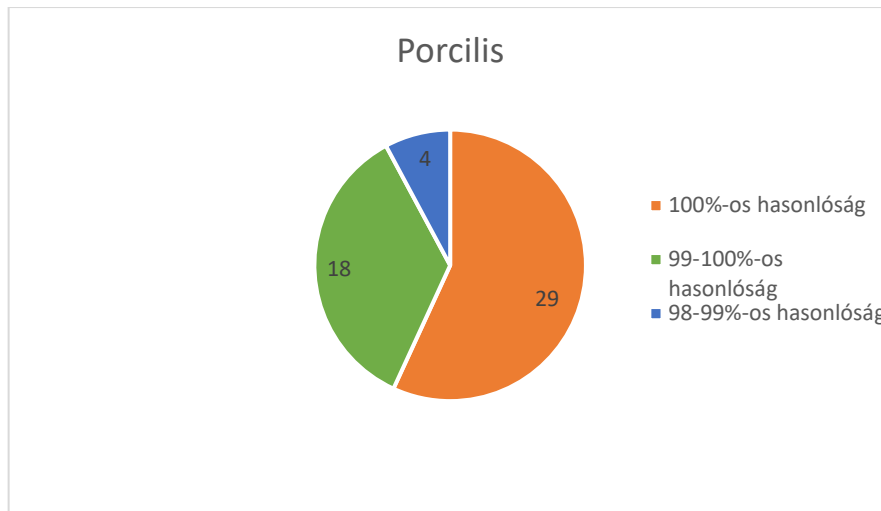


8. ábra: A Porcilis PRRSV vakcina genetikai stabilitása filogenetikai fa alapján (A különböző színek, vonalak a Porcilis vakcina eltérő genetikai csoportjait jelöli) (Bálint és mtsai., 2021)

5.1.2 ORF7 szekvencia vizsgálata

A Porcilis PRRS vakcina élő, attenuált PRRS DV vírustörzse ORF7 szekvenciája 100%-ban megegyezik a nemzetközi irodalomban megadott Lelystad PRRSV ORF7 régiójával. A Lelystad-vírus a PRRS 1 genotípusának referens (vadvirulens) törzse, amelyet először európai PRRS járványok során mutattak ki (41/1997. (V.28:), 1997 FM rendelet). Ennek megfelelően gondosan meg kell vizsgálni, hogy egy állományból kimutatott PRRSV ORF7 szekvencia származhat-e a mintavételt megelőzően végzett Porcilis PRRS vakcina alkalmazásából. A gyártó leírása szerint a vakcina vírus a vakcinázás után 5 hétig is ürülhet a vakcinázott állatokból, azonban ez az időszak nagyobb populációban hosszabb ideig is tarthat.

Összesen 478, különböző hazai sertésállományból, valamint a GenBankban található PRRSV ORF7 szakasz szekvenciái közül választottuk ki a Porcilis PRRS vakcina vírustörzse ORF7 szakaszával jelentős mértékben egyező ORF7 szekvenciájú PRRSV törzseket. A Porcilis PRRS vakcinával oltott magyar sertésállományok közül 29 (56,9%) PRRSV ORF7 szekvenciája 100%-ban megegyezett a Porcilis PRRS vakcinatörzsszel, illetve Lelystad törzs ORF7 szekvenciájával. Tizennyolc (35,3%) és négy (7,8%) szekvencia 99,1-99,9%-ban illetve 98-99%-os hasonlóságot mutattak a vakcinatörzsszel. Mind az 51 PRRSV ORF7-szekvencia olyan állományokból származott, amelyeket Porcilis PRRSV-vel vakcináztak (9. ábra).



9. ábra: A vakcina ORF7 szekvenciáinak eloszlása és hasonlósága a GenBankban található standard törzsszel (Bálint és mtsai., 2021)

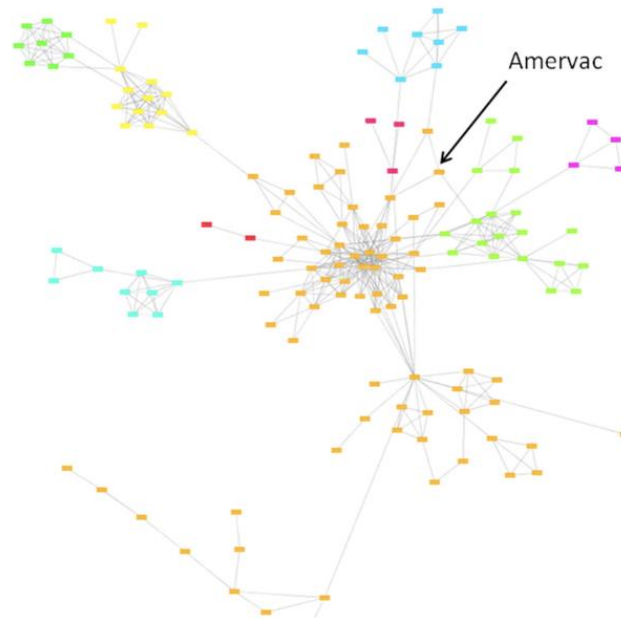
5.2 Unistrain PRRS Vakcina (korábbi nevén Amervac)

5.2.1 ORF5 szekvencia vizsgálata

Az Unistrain PRRS vakcinát (az Amervac PRRS vakcinát) forgalomba hozatalának ideje: 2004. április 28. 2019 végéig 2342 PRRSV ORF5 szekvencia összehasonlítását végeztük el, ezek közül 179 olyat találtunk, amely legalább 98%-os hasonlóságot mutatott az Unistrain PRRS-vakcinában lévő törzzsel. A megvizsgált szekvenciák közül négy (beleértve az Amervac és Unistrain vakcinatörzseket, valamint két nemzetközi szekvenciát: DQ345725.1 [MLV vakcina] és JQ040769.1 [AN0708EU_1 klón]) esetében a vakcinatörzs ORF5 szekvenciája 100%-os egyezést mutatott. 99,1-99,9%-os hasonlóságot 70 (39,1%) szekvencia esetében tapasztaltak, 98-99% közötti hasonlóságot 105 (58,7%) szekvenciában figyeltek meg (7. ábra). A magyar sertésállományokban kimutatott ORF5 szekvenciák közül egyik sem volt 100%-ban azonos a négy fenti szekvenciával, illetve az Unistrain PRRS-vakcinában található PRRSV-törzs szekvenciájával.

Azon tenyésztelepeken, ahol a mintákban az Unistrain PRRS vakcina vírussal legalább 99 %-ban megegyező ORF5 szekvenciát mutattunk ki, valamennyi esetben ezt az oltóanyagot alkalmazták a PRRS elleni immunizálásra. A tenyésztelepekhez hasonlóan a legalább 99 %-ban megegyező szekvenciát mutató hízótelepekről származó mintákban, (amelyek Magyarországról vásároltak hízóalapanyagot), minden esetben Unistrain PRRS vakcinázást alkalmaztak. Továbbá, Unistrain PRRS vakcinát használtak valamennyi tenyész- és hízó telepen, ahol az izolált törzs 98,1-98,9%-os hasonlóságot mutatott a vakcinatörzzsel (7. ábra). A további adatelemzés feltárta, hogy 79 szekvenciát mutattunk ki a vérmintákban, amelyek a vakcinázást követő 3-10. héten a növendék sertésekből származnak. Ezek közül 48 szekvencia <99%-os hasonlóságot mutatott az Amervac vakcinavírustörzzsel. A fennmaradó szekvenciák >99%-os hasonlóságot mutattak. Összesen 30 szekvencia származott oltatlan szopós malacokból vagy előnevelt süldőkből, amelyeknek a kocáit vemhességük alatt immunizálták. Az említett esetek közül 26 esetben az ORF5 régió kevesebb, mint 99%-os hasonlóságot mutatott az Amervac vakcinavírus törzsével, míg a fennmaradó esetekben a hasonlósági érték 99,07% és 99,54% között mozgott.

Az Unistrain PRRS-vakcina genetikai heterogenitását megerősítettük a filogenetikai fa diagram módszerével. A rendelkezésre álló adatok telepspecifikus genetikai vonalak kialakulását és evolúcióját mutatták, melyek különböző mértékű hasonlóságot mutattak az eredeti vakcinatörzshöz képest (10. ábra).



10. ábra: Az Unistrain (Amervac) PRRSV vakcina genetikai stabilitása a filogenetikai fa alapján (A különböző színek, vonalak az Amervac vakcina eltérő genetikai csoportjait jelöli) (Bálint és mtsai., 2021)

5.2.2 ORF7 szekvencia vizsgálata

A rendelkezésre álló 478, PRRSV ORF7 szekvencia elemzése során 29 olyan szekvenciát azonosítottunk, amelyek nagyobb, mint 98%-os hasonlóságot mutattak az Unistrain PRRSV vírustörzsszel. Hét szekvencia 100%-ban megegyezett az Amervac PRRSV ORF7 szekvenciájával, ebből 4 esetben a tenyészállományokban, vagy hízóalanyag előállításánál alkalmaztak Amervac vakcinát, 1 esetben nem találtunk adatot e vakcina használatáról, 1 szekvencia pedig a Pysrvac (gyártója a LABORATORIOS SYVA), egy Magyarországon nem törzskönyveztetett élő, attenuált PRRS vakcina génbanki adata volt. 12 esetben a szekvenciák nagyobb, mint 99 %, de kisebb, mint 100 %-ban egyeztek az Amervac PRRSV ORF7 szekvenciájával. Közülük 10 esetben az állományban az Amervac vakcinát használták. Egy minta esetében, egy 16 hetes életkorú sertést korábban ugyan nem vakcináztak, de a kocaállomány a választás előtt 10 nappal, Unistrain vakcinát kapott. A fennmaradó három szekvencia közül kettő importált előhízókból származott, egy pedig egy spanyol PRRSV (65_2_Spain_1991) volt a Genbankban. Tíz esetben a szekvenciák az Amervac PRRSV ORF7 szekvenciájával 98%-nál magasabb, de 99%-nál alacsonyabb mértékű hasonlóságot mutattak (9. ábra).

Az Amervac vakcinával technológiaszerűen immunizált 3 állomány közül az egyikben (PRRS vírussal fertőződött, fialástól a választásig típusú tenyésztelepen), háromszori, teljes állományra terjedő, Amervac immunizálását követően az utódállomány vizsgálata során

mutattuk ki az Amervac-hoz nagymértékben hasonló (nagyobb, mint 99 %, de kisebb, mint 100 %) szekvenciát. Az említett telepen összefüggésében egy all-in-all-out rendszerben működő hízóállományban, az előbbi telepről vásárolt és 3 hetes életkorban Amervac immunizálásban részesült állatokból került az Amervac-hoz hasonló (nagyobb, mint 99 %, de kisebb, mint 100 %) szekvencia meghatározásra. A harmadik esetben a fialástól vágásig típusú tenyész telepen, ahol az anyakocákat a vemhesség alatt Unistrain vakcinával immunizálták, 8 hetes életkorú malacból történt a kimutatás. A fentiekben ismertetett 3 szekvencia járványtani eredete igazolta az Amervac vakcinatörzs ORF7 szekvenciájával 99,53 %-os hasonlóságot. Ezekben az esetekben is valószínűsíthető, hogy a mintákból az immunizáláskor alkalmazott élő, attenuált vakcina vírustörzset, illetve annak kismértékben eltérő változatát mutattuk ki.

5.3 Reprocyc PRRS EU Vakcina (és a nem adjuvált változata, PRRS FLEX EU)

5.3.1 ORF5 szekvencia vizsgálata

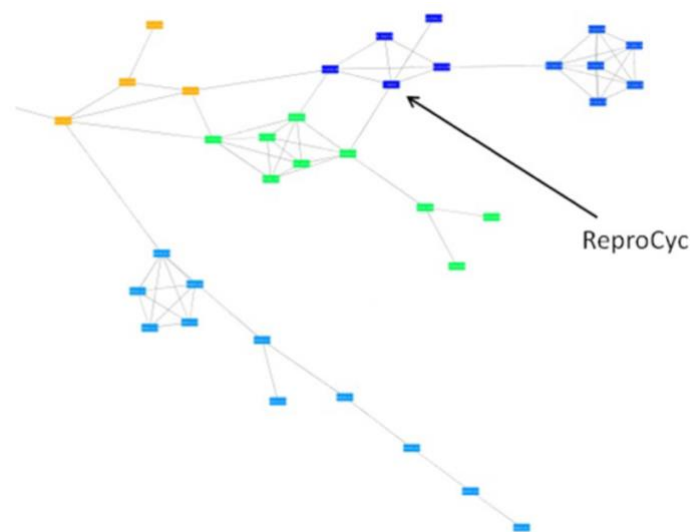
A Reprocyc PRRS EU és az Ingelvac PRRS FLEX EU vakcinák már a mentesítési program bevezetését követően, 2015. február 24.-én kaptak forgalomba hozatali engedélyt Magyarországon. Mindkét vakcinában a PRRSV 94881 törzse található, mely a Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH terméke. A PRRS FLEX EU (nem adjuvált) vakcinát a malacok, míg a Reprocyc PRRS EU (adjuvált) vakcinát a tenyész kocasüldők immunizálására használják (Nébih - Vakcinák használati utasítása, <https://atiportal.nebih.gov.hu/docs/4578/hasznut.pdf>, <https://atiportal.nebih.gov.hu/docs/4579/hasznut.pdf>).

Vizsgálatunkban 2342 PRRSV ORF5 szakasz elemzése során 35 szekvencia mutatott legalább 98%-os hasonlóságot a Reprocyc PRRS EU vakcinában található vírustörzssel. Ezen szekvenciák közül három (8,6%) teljesen azonos volt a vakcinatörzs ORF5 szekvenciájával. 11 (31,4%) és 21 (60%) szekvencia esetében a hasonlóság 99,1 és 99,9% közötti, valamint 98-99% közötti volt. (7. ábra). A részletes járványügyi elemzés során megállapítottuk, hogy két hazai szekvencia 100%-ban megegyezett a Reprocyc PRRS-vakcinában lévő PRRSV-törzssel. Ezt a két szekvenciát olyan hízótelepen tartott sertésekben mutatták ki, ahol az állatok nem voltak PRRS FLEX vakcinával immunizálva, de abban az épületben, ahol ezeket az állatokat tartották a fent említett vakcinával immunizálták. Ezen a telepen a fenti két szekvenciával egyidőben, csak más épületekben tartott állatokból –bár nem 100 %-os hasonlósággal – de 99% és 100 % közötti hasonlósággal 5 szekvenciát is meghatároztunk. A további 6 szekvencia olyan tenyésztelepekről származott, ahol a Reprocyc vakcinát alkalmazták a mentesítési programjuk megvalósításához. A 98,1-98,9%-os hasonlóságot mutató csoportban volt egy olyan hízótelep, amelynél a Reprocyc PRRS

vakcina használatáról nem állt rendelkezésünkre információ (7. ábra). A telepeket befertőző PRRSV ORF5 szakasza 84 és 85 % között mutatott hasonlóságot a Reprocyc vakcinában előforduló vírus ORF5 szakaszával. A filogenetikai elemzések megerősítették Reprocyc és PRRS FLEX vakcinák genetikai heterogenitását, valamint a telepspecifikus genetikai vonalak kialakulását (11. ábra).

5.3.2 ORF7 szekvencia vizsgálata

478, különböző járványtani esetből, Magyarország különböző sertésállományaiból származó, valamint a világban előforduló és leírt PRRSV ORF7 szakasz szekvenciái közül mindösszesen 8-at találtunk, amely 98 %-nál jobban hasonlított a Reprocyc PRRS vakcina vírustörzse ORF7 szakaszára. Ezek közé tartoznak az Ingelvac ORF7 és a Reprocyc ORF7 szekvenciák, amelyek a vakcinából származnak és ezzel egyezők. További két másik szekvencia, melyek az Amervac és a Pyrsvac vakcinából származnak 98,13%-os hasonlóságot mutatott a Reprocyc vakcina ORF7 szakaszával. A fennmaradó szekvenciák közül csak egy kapcsolódott a Reprocyc vakcina használatához, míg a többi szekvencia az Amervac vakcina alkalmazásával kapcsolatos (9. ábra).



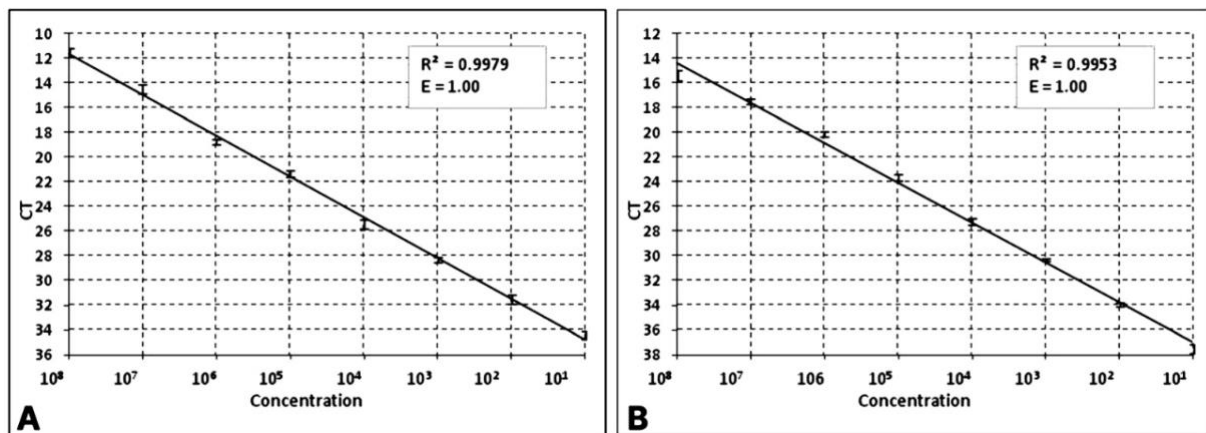
11. ábra: A ReproCyc PRRSV vakcina genetikai stabilitása a filogenetikai fa alapján (A különböző színek, vonalak a ReproCyc vakcina eltérő genetikai csoportjait jelöli) (Bálint és mtsai., 2021)

A 2342 PRRSV ORF5, és a 478 PRRSV ORF7 szekvencia közül a fentiekben nem említettek a telepeket fertőző, a bemutatott vakcinatörzsek szekvenciájától lényegesen eltérő olyan PRRSV törzsekből származtak, amelyek vagy a nemzetközi Génbanki adatokban találhatóak, vagy magyarországi sertésállományokból (tenyésztő, áruterrelő, hízó, kis- és nagylétszámú telepekről) származtak.

5.4 A DIVA Real-Time PCR módszer specificitásának és érzékenységének meghatározása

A rendszer érzékenységét pontos módszerrel határoztuk meg a Porcilis MLV törzsből és a telepspecifikus vad típusú vírus PRRSV 30040/2017 NÉBIH törzsből készült rekombináns standard RNS kópia száma alapján. A kimutathatósági határ tíz RNS tíz kópiának bizonyult volt a reakcióelegyben, valamint a módszer lehetővé tette a lineáris kimutatást 10^1 - 10^7 RNS kópiaszám/reakció tartományban. Minden mintából tízszeres hígítást készítettünk 10^{10} és 10^0 RNS kópiaszám/μl RNS mentes vízben. Minden reakciót három párhuzamos méréssel végeztünk, és a ciklusküszöb (Ct) értékek átlagadatait használtuk fel a standard görbék felállításához. A PCR hatékonysága (E) 1 volt, míg a korreláció hatékonysága (R^2) mindkét esetben 0,99 volt (12. ábra). A módszer érzékenységének összehasonlítása a kereskedelemben kapható PRRSV Real-Time PCR-rel 1-3 Ct érték eltérést mutatott ki a protokoll koncentrációjától függően a kereskedelmi kit javára.

A teszt specificitását a Porcilis MLV és a PRRSV 30040/2017 PRRSV NÉBIH törzsek sorozat hígításával értékeltük. Nem volt azonosítható keresztreakció még 10^{10} kópiaszám/reakcióval sem és ugyanez elmondható más vírusokkal végzett reakcióban is, melyek nem PRRSV vírusok.



12. ábra: A Porcilis MLV-ből (A) és a vad típusú PRRSV 30040/2017 NÉBIH törzsből előállított templát RNS tízszeres hígításával létrehozott standard görbék (B). Az RNS kópiaszámok az x tengelyen vannak feltüntetve, míg a Ct értékek az y tengelyen láthatóak.

5.5 Vegyes fertőzés kimutatása DIVA PCR módszerrel

A vegyes fertőzések kimutatására a Porcilis MLV és PRRSV 30040/2017 NÉBIH RNS sorozat hígításának kombinálásával történt. Amikor a mintában változó mennyiségben volt a két RNS megfigyeltük, hogy a diszkriminatív PCR mindkét vírust képes volt kimutatni, ha az alacsonyabb koncentrációjú változat kópiaszám aránya 0,1% feletti (3. Táblázat). A

következő lépésben a változó mennyiségű Porcilis MLV vagy PRRSV 30040/2017 NÉBIH RNS volt elegyítve 10^4 / μ l RNS kópiaszámú ellentettjével. Ugyanazt a tendenciát figyeltük meg mind az előző kísérletekben. Ha azonban az alacsonyabb koncentrációjú törzs kópiaszáma kimutatási határon volt (10^1 RNS kópia), a 0,1%-os kópiaszám aránynál nem volt lehetséges ennek a PRRSV-nek a kimutatása.

3. Táblázat: A diszkriminatív PCR hatékonysága kevert fertőzések kimutatására, különböző koncentrációjú templát RNS használatával Porcilis MLV és PRRSV 30040/2017 Nébih törzs esetében

MLV/vadvírus száma	$10^8/10^1$	$10^7/10^2$	$10^6/10^3$	$10^5/10^4$	$10^4/10^5$	$10^3/10^6$	$10^2/10^7$	$10^1/10^8$
Ct érték	12,9/n.a.	15,8/n.a.	19,1/31,4	22,5/26,2	27,3/22,1	32,3/19,3	n.a./15,8	n.a./13,1
MLV/vadvírus száma	$10^8/10^4$	$10^7/10^4$	$10^6/10^4$	$10^5/10^4$	$10^4/10^4$	$10^3/10^4$	$10^2/10^4$	$10^1/10^4$
Ct érték	12,3/n.a.	15,4/37,4	18,8/31,9	22,4/28,1	25,6/26,3	31,3/25,8	37,8/25,8	n.a./25,8
MLV/vadvírus száma	$10^4/10^8$	$10^4/10^7$	$10^4/10^6$	$10^4/10^5$	$10^4/10^4$	$10^4/10^3$	$10^4/10^2$	$10^4/10^1$
Ct érték	n.a./12,7	36,6/15,1	31,7/18,2	27,2/21,7	25,9/25,8	25,4/29,2	25,4/38,2	25,4/n.a.

5.6 Diagnosztikai DIVA rRT-PCR módszer eredményei a vizsgálatban résztvevő telepek esetében

A mentesítés alatt álló gazdaságban 38477 szérumból 3164 minta volt PRRSV RT-PCR pozitív, melyet első körben ViroReal PRRS Virus EU & NA 1.1 Kittel (Ingenetix GmbH, Ausztria) vizsgáltunk meg. Ezeket a pozitív mintákat diszkriminatív eljárásnak vetettük alá rRT-PCR vizsgálattal 2017 és 2019 között (4. Táblázat). Az eredmények a diszkriminatív rRT-PCR vizsgálati eredményeit mind megerősítették szekvenálással, ha egyetlen fertőzés történt, és a Ct érték <32 volt. Vegyes fertőzések esetén, ha a Ct értékek <1 log 10 titer különbséget mutattak, akár az MLV, akár a vadvírus típusú PRRSV vírust szekvenálással erősítettük meg. Ezzel szemben, ha az arány > 2 log 10 volt, csak a magasabb titerű vírust azonosítottuk szekvenálással. A 2017-es és 2018-as években az összes vizsgált 2-4 hetes malacok specifikus vadvírus PRRSV DIVA PCR eredménye pozitív volt. Az alkalmazott a diszkriminatív PCR módszerrel sikerült csökkenteni a PRRSV pozitív (2017-ben 3,1%-ról, 2018-ban 0,9%-ra) egyedek számát az állományokban (4. Táblázat).

A mentesítés végéhez közeledve az utolsó diagnosztikai vizsgálatoknál a PRRS negatív és csak az MLV pozitív eredményeket vártunk, és a monitoring során az állatokban nem találtunk vad típusú PRRSV-t. Minden életkori csoportban a vad típusú PRRSV pozitívitas 7,4%-ról (2017) 0,9%-ra (2019) csökkent, ezzel szemben az MLV PCR pozitívitas 2,1%-ról (2017) 7,8%-ra (2019) nőtt.

4. Táblázat: A mentesítési program során a DIVA Real-Time RT-PCR teszttel vizsgált telepek pozitív mintáinak éves és korcsoportos megoszlása (A PCR pozitív eredmények a vakcina- és vadvírus pozitivitást együttesen jelölik).

Korcsoportok	2017			2018			2019		
	Mintaszám	PCR pozitív (%)	DIVA PCR vad típus (%)	Mintaszám	PCR pozitív (%)	DIVA PCR vad típus (%)	Mintaszám	PCR pozitív (%)	DIVA PCR vad típus (%)
Koca	266	5 (1,9)	0 (0)	52	0 (0)	0 (0)	-	-	-
Utód sertés	60	3 (5)	3 (5)	118	2 (1,7)	0 (0)	-	-	-
2-4 hetes szopós malac	1 975	89 (4,5)	61 (3,1)	8 911	97 (1,1)	78 (0,9)	9 906	313 (3,2)	0 (0)
6 hetes malacnevelő	211	30 (14,2)	30 (14,2)	2 175	317 (14,6)	80 (3,7)	4 896	354 (7,2)	9 (0,2)
7-9 hetes malacnevelő	139	24 (17,3)	22 (15,8)	966	163 (16,9)	68 (7)	392	84 (21,4)	0 (0)
10-12 hetes malacnevelő	106	21 (19,8)	15 (14,2)	1 604	413 (25,7)	98 (6,1)	3 356	651 (19,4)	40 (1,2)
10-24 hetes hízó	395	129 (32,7)	102 (25,8)	444	51 (11,5)	25 (5,6)	2 475	418 (16,9)	135 (5,5)
Összes mintaszám	3 152	301 (9,5)	233 (7,4)	14 270	1043 (7,3)	349 (2,4)	21 025	1820 (8,7)	184 (0,9)

5.6.1 „A” telep

Eredményeink szerint („A” telep) a 4 hetes választott malacok esetében végzett vizsgálatok almonként egy állat mintavétele (241 alom összesen) egyszer sem adott PCR pozitív vizsgálati eredményt. Szerológiai tesztek alapján mindössze 56 (7,75%) szeropozitív állatot találtunk 4 hetes korban (5. Táblázat). Ez az eredmény a nem megfelelő kolosztrum felvételre is utalhat.

2019. február 18-tól május 21-ig a mintavételezést 4 hetes választott malacok esetében almonként három malacra emeltük. Ebben a konkrét esetben a vizsgált 2508 malacból 20 fialás és 60 db 4 hetes választott malac esetében állapítottuk meg a PRRS-re irányuló PCR teszt pozitív eredményét (5. Táblázat). Ennek megfelelően a 3 malac/alom mintavételi módszer szignifikánsan több PCR pozitív almot mutatott ($p < 0,01$, Fisher-féle egzakt próba, R szoftver 4.2.0.)

A 60 PCR pozitív eset közül a 2019. március 11-én vizsgált szopós malacok közül egy alomból három vérmintában egy PRRSV ORF7 gént azonosítottunk, amely 97,3%-ban hasonlít a telepspecifikus PRRS vírus génjéhez. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált 836 alomból csak egy alom (0,12%) volt, amely állományspecifikus vad típusú PRRSV-t hordoz. A fennmaradó 57 PCR-pozitív állat mindegyikében a szekvenálás megerősítette a Porcilis PRRS vakcinatörzs jelenlétét.

5. Táblázat: Az „A” telep PCR és ELISA eredményei almonként egy malac és almonként 3 malac diagnosztikai vizsgálata.

A PRRS vizsgálat eredményei az "A" telepen					
Időtartam	Vérminta 4 hetes malacokból	PRRSV PCR pozitív	Vadvírus pozitív	Vakcina vírus pozitív	ELISA pozitív (malacok)
1 minta/alom PCR	723 (241 alom)	0	0	0	56 (7,75%)
3 minta/alom PCR, DIVA PCR	2508 (836 alom)	60 (20 alom, 2,39%)	3 (1 alom, 0,12%)	57 (19 alom, 2,27%)	87 (3,47%)

5.6.2 „B” telep

2019-ben, a malacnevelő időszak elején (kb. 35 napos malacok, kb. 2 héttel az választás után és kb. egy héttel az oltás után) és a végén (67 napos malacok, pl. további 4 hét a malacnevelőben, és a nevelősertések második vakcinázása körül) PRRS PCR és PRRS ellenanyag ELISA vizsgálatot végeztünk. A 35 napos és 67 napos malacok közül a malacok 1,18%-a és 5,23%-a volt PRRSV-pozitív (6. Táblázat). A PCR eredmények azt mutatták, hogy a PRRSV kimutatási aránya szignifikánsan különbözött a két mintavételi periódus között ($p < 0,01$, Fisher-féle egzakt próba, R szoftver 4.2.0.). A malacnevelő szakasz kezdetén 1438 35 napos malac laboratóriumi vizsgálata azt mutatta, hogy csak egy állat (0,07%) fertőzött a telepre jellemző vad típusú PRRSV-vel, míg 16 mintában (1,11%) Porcilis PRRS vakcina vírust mutattunk ki (6. táblázat). 848 (58,97%) malac vérmintája 35 napos korban pozitív volt a PRRS szerológiai vizsgálatára, míg 590 állat már szeronegatívnak bizonyult.

A nevelési időszak végén végzett laboratóriumi vizsgálatok (67 napos malacok) 14 esetben (0,93%) jelezték a telepspecifikus vad típusú PRRSV jelenlétét az állományban. Ugyanakkor 65 (4,3%) esetben Porcilis PRRS-t is találtak. A vad típusú vagy vakcina vírustörzsek előfordulása nem különbözött szignifikánsan a két csoport között ($p=0,295$, Fisher-féle egzakt próba, R szoftver 4.2.0.). A 67 napos malacok közül összesen 1423 mintát vizsgáltunk szerológiai módszerrel, melyből 617 minta (43,36%) mutatott szeropozitív eredményt (6. Táblázat). A kolosztrom magas antitestszintjének kiürülési dinamikája jól kimutatható, bár a PRRSV antigének (a telepspecifikus vad típusú PRRSV és az alkalmazott

vakcinavírus antigén hatásával összhangban) a folyamatos replikáció miatt jelentős aktív antitest termelést eredményeznek.

6. Táblázat: A „B” telep PCR és ELISA eredményei almonként 3 malac diagnosztikai vizsgálata különböző korcsoportokból.

A PRRS vizsgálat eredményei a "B" telepen					
Korcsoport	Vérminta darabszáma	PRRSV PCR pozitív	Vadvírus pozitív	Vakcina vírus pozitív	ELISA pozitív (malacok)
Választott malac (3 minta/alom)	3349 (1116 alom)	12 (4 alom, 0,36%)	3 (1 alom, 0,09%)	9 (3 alom, 0,27%)	2241° (7,75%)
35 napos	1438	17 (1,18%)	1 (0,07%)	16 (1,11%)	848 (58,97%)
67 napos	1510	79 (5,23%)	14 (0,93%)	65 (4,30%)	617* (43,36%)

° 3349 szérum mintából 2806 volt ELISA-val vizsgálva

*1510 szérum mintából 1423 volt ELISA-val vizsgálva

5.6.3 „C” telep

2018-ban összesen 32 115 választott malacot állítottak elő a „C” telepen. Ebből 8911-et (27,7%) vizsgáltunk meg (három malac/alom) DIVA PCR-rel PRRSV jelenlétére, és a pozitívokat szekvenáltuk. A vizsgált állatok 2971 fialásra vonatkoztak. A 8911 választott malac közül 97 (1,09%) volt PCR-pozitív, ebből 78 (0,87%) bizonyult a DIVA PRRS PCR-rel a telepspecifikus vad típusú vírusnak (7. táblázat). Ezt a megállapítást párhuzamos szekvenálás is igazolta, a Porcilis PRRS-t 19 (0,22%) esetben mutattuk ki. 2018 szeptemberében minden olyan kocát leselejteztek, amelyek 3 hetes malcai vad típusú PRRS vadvírusra pozitívoknak bizonyultak.

2019-ben 8466 3 hetes malacból vettek mintát és végeztünk PRRS DIVA PCR tesztet. Vad típusú vírust egyik esetben sem észleltünk, míg 141 (1,67%) esetben találtuk meg a Porcilis PRRS vakcina A.U.V (MSD) vírusát. 2018-ban és 2019-ben nem történt vakcinázás a fiaztatóban, így a 3 hetes malacokból kimutatott vakcinavírus biztosan nem immunizált állatoktól. A kimutatott vakcinavírusnak külső forrásból (koca, fertőző tárgy stb.) kellett

származnia (7. táblázat). Az utódokon végzett PRRS DIVA PCR tesztek eredményei megerősítették, hogy 2018-ban szignifikánsan több alom volt vadvírus pozitív, mint 2019-ben ($p < 0,01$, Fisher-féle egzakt próba, R szoftver 4.2.0.), mielőtt a pozitív kocákat és malacokat selejtezték volna (7. táblázat). Sajnálatos módon a telep vezetése úgy határozott, hogy a PRRS és más kórokozók (mycoplasma, APP, rhinitis atrophicans, sertésdizentéria, rüh) miatt a telepet felszámolják, majd a populációt újratelepítik, ennek következtében megfigyeléseinket nem tudtuk folytatni.

7. Táblázat: „C” telep PCR és ELISA eredményei, almonként 3 malac felhasználásával PRRSV pozitív kocák selejtezése előtt és után.

A PRRS vizsgálat eredményei a "C" telepen				
Időtartam	Vérminta 3 hetes malacokból	PRRSV PCR pozitív	Vadvírus pozitív	Vakcina vírus pozitív
PRRS Vadvírussal fertőzött kocák selejtezése előtt (2018)	8911 (2971 alom)	97 (1,09%)	78 (0,87%)	19 (0,22%)
PRRS Vadvírussal fertőzött kocák selejtezése után (2019)	8466 (2822 alom)	141 (1,67%)	0 (0%)	141 (1,67%)

5.6.4 „D” telep

A DIVA PCR diagnosztikai módszereket alkalmaztuk a „D” telep esetében is, mely fiatalostól vágásig típusú tenyésztelő. Gyors diagnosztikai módszereket alkalmazva a selejtezést követően a cél a vakcinázott mentes PRRS státusz elérése volt.

2019 szeptemberében a „D” telepen az alábbi intézkedések bevezetésével PRRS-oltásmentes státuszt („MV” státusz) kívánt elérni. 2018-ban befejezték a PRRS vírusfertőzés időpontjában már tenyésztésben részt vevő kocák szelektív selejtezését. A DIVA PCR tesztek alapján a vírussal fertőzött almodat adó kocák szisztematikus selejtezését végezték. Hasonlóképpen, az összes sertést, mely a DIVA PCR-vizsgálattal kimutatott vírussal fertőzöttnek bizonyult, életkorától függetlenül leselejtezték. A diagnosztikai vizsgálatok és az eredmények közzétevése a telep adott technológiai lépése előtt történt. Rendszeresen elvégeztük a laboratóriumi vizsgálatokat a sertések életkor szerinti nyomon követésére a fiastató istállóban és a hizlaldában, hogy az egyes fázisok sorrendje meghatározható legyen.

2020 januárjától kezdődően almonként 3 malacot vizsgáltunk meg ELISA, PCR és DIVA PCR laboratóriumi vizsgálatokkal (8. Táblázat). A választás előtti korban a malacok 39%-ának még volt anyai immunitása. A vizsgált almok mindössze 7,8%-a volt PCR pozitív, ennek ellenére két olyan almot találtunk, amelyben a malacok az állományra jellemző vírussal voltak fertőzöttek.

2020 második felétől a vizsgált beoltott malacok 93%-a szeronegatív, de még ebben a csoportban is találtunk 6 olyan állatot, amelyik az állomány vad típusú vírusát ürítette. Következésképpen az összes ebbe a csoportba tartozó sertést eltávolították a gazdaságból. A 2021-es eredmények lehetővé tették a sertések folyamatban lévő vakcinázásának megszüntetését, miután azokat a hízó istállóba telepítették. Az első olyan hízósertés, mely nem kapott vakcinát, 2021 januárjában került a hizlaldába.

2021 második felében nem azonosítottunk pozitív PCR-teszttel rendelkező előválasztott és előhizlalt sertést (az év első felében 36 választott malacot és 33 südőt találtunk PCR-pozitívnak). A hízók körében 2021-ben és 2022-ben is 98 százalékos volt a negatív PCR teszt eredmény. A többi esetben a kimutatott vírus az állományban használt vakcina volt. A szerológiai tesztek a minták 7-9%-ában adtak pozitív eredményt. A megnövekedett szeropozitivitás hátterében az áll, hogy a védőoltást végrehajtó munkatársak nem tartották be a belső járványmegelőzési utasításokat (beleértve az átöltözést is). Ez a vakcinavírus terjedését és az ezzel járó szerokonverziót eredményezte egyetlen hizláló helyiségben. A folyamatban lévő ellenőrzési intézkedések eredményeként és a rendelkezésre álló vizsgálati eredmények alapján a regionális hatóságok a gazdaságot 2021 októberében a PRRS-től mentes vakcinázott státuszba sorolták.

8. Táblázat: „D” telepről származó szérumból minták PRRSV laboratóriumi vizsgálata 2020 január és 2022 augusztusa között.

A PRRS vizsgálat eredményei a "D" telepen																		
ÉV	Választott malacok (3malac/alom)			Malacnevelő			Vágási korban lévő malacok											
	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022									
ELISA	db/%	db/%	db/%	db/%	db/%	db/%	db/%	db/%	db/%									
összesen	4761	5049	3456	1930	3058	1977	1632	5277	3721									
negatív	2913	61%	2763	55%	2532	73%	1803	93%	3027	99%	1977	100%	515	32%	4902	93%	3377	91%
pozitív	1848	39%	2286	45%	924	27%	127	6,6%	31	1%	0	0%	1117	72%	375	7%	344	9%
PCR																		
összesen	4761	5049	3456	1930	3058	1977	1632	5277	3721									
negatív	4389	92%	5013	99%	3456	100%	1639	85%	3025	99%	1977	100%	1395	85%	5157	98%	3654	98%
pozitív	372	7,8%	36	0,7%	0	0%	291	15%	33	1%	0	0%	237	14,5%	120	2,2%	67	1,8%
DIVA PCR																		
összesen	372	36	0	291	33	0	237	120	67									
negatív	9	0	0	6	6	0	0	0	0									
vakcina vírus	357	96%	36	100%	0	279	96%	27	82%	0	237	100%	120	100%	67	100%		
vadvírus	6	1,6%	0	0	6	2,1%	0	0	0									

6 Megbeszélés

6.1 A Magyarországon használt vakcinák stabilitásának jelentősége a PRRSV elleni védekezésben

A PRRSV-fertőzés magyarországi kimutatása óta a sertéstartók elsősorban vakcinázással védekeznek a betegség gazdasági kártételei ellen. Azonban, Magyarország volt az Európai Unióban az első ország, amely nemzeti mentesítési programot hajtott végre a PRRS-sel fertőzött sertésállományok szervezett módon történő felszámolására. Az állományfelszámolás jogalapját a sertéságazat vezető szereplőivel való átfogó konzultációk eredményeként határozták meg, mely során a tenyésztők, integrátorok, szakmai gyakorlatban jártas szakemberek és tudományos szakértők egyaránt részt vettek (Szabó és mtsai., 2020^a). A fertőzött sertésállományok felszámolásának alapelve a gazdaságok külső és belső járványvédelmi előírásainak szigorú betartása, az állományok különböző korcsoportjainak laboratóriumi ellenőrzése és a PRRS elleni immunizálás (beleértve a vemhes állatokat, hízókat, előhízókat is).

Az immunizálás fő céljai a következők:

- (a) a fertőzött tenyészállomány homogén immunstátuszának kialakítása a méhen belüli és újszülöttkori fertőzések megelőzése;
- b) az utódok vírusmentes felnevelésének elősegítése.
- c) PRRS-vírusmentes kocasüldők előállítását saját tenyészállományukból, vagy külső forrásból, ezáltal a fertőzött tenyészállományt vírusmentes kocákkal helyettesítve

A PRRSV ORF5 és ORF7 szekvenciáinak meghatározása létfontosságú a PRRSV terjedésének kontrollálása és megelőzése érdekében, mivel a vizsgálat lehetővé teszi a fertőzés kockázatának felmérését, valamint a PRRSV terjedési mechanizmusának részletes elemzését. A szekvenciák hasonlóságának láthatóvá tételével és a járványtani összefüggések megjelenítésével jelentősen javul a szakemberek számára a járványügyi folyamatok virológiai (molekulárisbiológiai) elemzésének lehetősége (Szabó és mtsai., 2020^a).

A szekvencia analízis nagyon fontos a PRRS járvány vizsgálata szempontjából, az egyes telepek közötti, valamint az állományon belüli vírus terjedés felderítéséhez. Az egyes korcsoportokban megjelenő PRRS PCR pozitívitás biztonságos meghatározása elengedhetetlen a betegség elleni specifikus védekezés és a mentesítési helyzet értékeléséhez, hogy el tudjuk különíteni a telepen jelen lévő virulens vírustól és az alkalmazott élő, attenuált vakcina vírustól származó fertőzéseket (Bøtner és mtsai., 2000).

Vizsgálataink során 2342 PRRSV ORF5 és 478 ORF7 szekvenciát elemeztünk. Az élő attenuált PRRS-vakcinákban található vírustörzsekkel kapcsolatban a következőket találtuk:

- az ORF5 szekvenciák közül 832 szekvencia (35,5%) az adott sertéstelepen alkalmazott valamely vakcinatörzssel 98% feletti homológiát mutat
- A vakcina eredetű 832 szekvenciából 618 (74,3%) a Porcilis, 179 (21,5%) az Unistrain (korábban Amervac) és 35 (4,2%) a Reprocyc vakcina származékának tekinthető
- A Porcilis eredetű törzsek 53%-a 100%-os homológiát, további 42%-a 99,1-99,9% homológiát mutatott az eredeti vakcinatörzssel. A szekvenciák mindössze 4 %-a mutatott 98-99% közötti homológiát a vakcinatörzssel
- Az Unistrain eredetű szekvenciák közül 2% bizonyult 100%-ban azonosnak, további 39% homológiája 99,1-99,9%-os volt és a szekvenciák 59%-ánál a homológia az eredeti vakcinatörzshöz viszonyítva 98-99% volt
- A Reprocyc eredetű szekvenciák homológiájának megoszlása a következő: 8,6% teljes mértékben, 31,4% 99,1-99,9 %-ban és 60% 98-99%-ban homológ a vakcinatörzssel.

Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a Porcilis megőrzi stabilitását, míg a variabilitás a Unistrain és a Reprocyc törzsek esetében jelentősen magasabb volt.

Azt is fontos megjegyezni, hogy valahányszor szentinel állatokat helyeztek hízó sertések közé, melyeket korábban Porcilis vakcinával immunizáltak, a belőlük kimutatott 19 szekvencia 99%-nál nagyobb hasonlóságot mutatott a vakcinavírus ORF5 régiójával. A telepen együtt tartott oltatlan hízók csoportja és Porcilis PRRS vakcinával immunizált tenyészkocásüldők között, amelyek egy légtérben voltak, PCR-pozitív eredményeket regisztráltuk. Ezen állatok szérumból származó PCR-termékek 100%-ban megegyeztek a vakcinavírussal (a hízók nem voltak immunizálva). Egyes hizlaldai állományok esetében valószínűsíthető, hogy az importból származó hízó alapanyagot vagy tenyészállományt a származási helyen a Porcilis PRRS vakcinával immunizálták. Az ezekből az esetekből származó 74 szekvencia közül csak kettő volt 99%-nál kisebb mértékben hasonló a vakcinatörzs ORF5 régiójához.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a Porcilis PRRS vakcina A.U.V.-ben található vírustörzs ORF5 szakasza, függetlenül attól, hogy milyen módon kerül a vakcina vírus a sertés szervezetébe (vakcinázás, vagy a vakcinázást követő vírusürítés után történő „fertőzés”) következetesen stabil marad, a bejutást követő szaporodás időszakában nem történik olyan genetikai változás, amely a vakcina vírus szekvenálással történő azonosítását megzavarná. A Porcilis PRRS vakcinában megtalálható PRRSV törzs a változékonyságra nem hajlamos, ezért az általunk kifejlesztett DIVA PCR módszerhez a legjobb alapot adta.

Amennyiben a PRRSV ORF5 vagy ORF7 szekvencia legalább 98 %-ban hasonló a Porcilis PRRSV törzs szekvenciájához biztonsággal állítható, hogy Porcilis PRRSV törzset mutattunk ki (7. és 9. ábra). Az Unistrain PRRS (Amervac) vakcina esetében a beadást követően a genetikai változások viszonylag gyorsan, sokszor jelentős mértékben következnek be (7. és 9. ábra). A Reprocyc PRRS (és az ugyanazon vírustörzset tartalmazó, de nem adjuvált PRRS FLEX) vakcina vonatkozásában a rendelkezésre álló viszonylag kevés adat nem nyújt lehetőséget az előbbiekhöz hasonló megállapítás kialakítására.

A PRRSV ORF5 és ORF7 szakaszok összehasonlítása a 3 élővírus vakcina ORF5 és ORF7 szakaszával az eredményeink szerint úgy értékelhető, hogy amennyiben a hasonlóság 99% vagy 100%, akkor nagy valószínűséggel feltételezhető, hogy a mintában kimutatott szekvencia valamely nevezett vakcina közvetett vagy közvetlen alkalmazásával áll összefüggésben. A Porcilis PRRS vakcina vírustörzs ORF7 szakasza esetében azonban kellő óvatossággal kell eljárni, hiszen az 100%-ban egyezik a Lelystad PRRS vírustörzs ORF7 szakaszával. A szekvencia analízis alapján a PRRSV ORF5 szakasz szekvenálása az esetek jelentős részében önmagában elegendő a szekvenciák (PRRSV) azonosságának meghatározására. Kellő körültekintéssel ugyancsak hasznos információ kapható a PRRSV ORF7 szekvencia analízisével is.

Az állományok közötti fertőzések esetében a járványügyi nyomozást a PRRSV ORF5 és ORF7 szekvencia meghatározása jelentős mértékben elősegíti. A járványügyi nyomozás folyamán kiemelt jelentőséggel bír a vizsgált állomány eredete és a környező telepek immunizációs gyakorlatainak ismerete. Az elemzett populáció hosszú időszakra visszamenőleges adatainak vizsgálata során létfontosságú az alkalmazott PRRS elleni vakcinák ismeretének megszerzése. Szintén nélkülözhetetlen a mintavételre került állatcsoport korának, hasznosítási irányának, telepre érkezése időpontjának ismerete. A mentesítés folyamatában az élő, attenuált vírust tartalmazó vakcinák alkalmazása során a PCR pozitívitas rendkívül lényeges annak tisztázására, hogy azt a telepi (vad)vírus vagy a vakcina vírus okozza-e.

6.2 A laboratóriumi diagnosztika fontossága a PRRSV felszámolása szempontjából

Az endemiásan fertőzött állományokban PRRS ellenőrzést végeznek, többnyire MLV vakcinákat alkalmazó telepeken. A jelentős gazdasági terhek miatt a sertésenyésztők körében elutasításra talál a fertőzött telepek kiürítésének és újratelepítésének módszere (Holtkamp és mtsai., 2011). 2017-ben az Állat-egészségügyi Világszervezet (OIE) egy új megfogalmazást hozott a PRRS mentes státusz tekintetében: csak PRRSV vakcinatörzseket tartalmazó állatok nem minősülnek PRRSV fertőzöttnek (OIE, 2017). Ezen megfontolás alapján a magyar PRRSV-re vonatkozó jogi kereteket később kibővítették a vakcinázott

állatok definíciójával és kategóriájával, úgymint a „vakcinázott mentes (MV) sertésállományok” kategória, melyhez elengedhetetlen a teljes PRRSV vakcinázott mentes státusz megléte (Szabó és mtsai., 2020^a). A jogszabály kimondja, hogy csak a tenyészállatokat lehet immunizálni időkorlátozás nélkül, valamint az utódoknak laboratóriumi vizsgálatokkal igazoltan PRRSV mentesnek kell lenniük laboratóriumi módszerekkel (ELISA, PCR) bármely korcsoportban. A rendszeres virológiai és szerológiai monitorozás a felszámolási program elengedhetetlen része ezekben a gazdaságokban.

A PRRS mentesítési programban a nagyobb tenyészállományok esetében az állomány stabilizálása a preferált megközelítés, különösen akkor, ha az állománycserét nem lehet megvalósítani. Holtkamp és munkatársai (Holtkamp és mtsai., 2019) kategorizálása alapján a stabil állomány elérésének alapja, hogy a 30 napos időközönként vett 30 kiválasztott sertés PRRS RT-PCR tesztje 4 hónapon keresztül negatív legyen. A stabil állományok fő jellemzője, hogy a PRRS szeropozitív kocák PRRSV negatív malacokat fialjanak (Kristensen és mtsai., 2013; Linhares és mtsai., 2014; Dee és mtsai., 1998). A leggyakrabban alkalmazott módszer az, hogy a tenyészállatokat a gazdaságban élő, attenuált vakcinavírussal immunizálják, vagy élő, állományspecifikus vírustörzzsel fertőzik meg (Rajic és mtsai., 2001). Az oltást vagy a mesterséges fertőzést szigorú belső és külső biológiai biztonsági intézkedésekkel kombinálják, és ezzel egyidejűleg az állományt elkülönítve tartják (Batista, 2005). A módszert tudomásunk szerint Európában eddig csak néhány esetben alkalmazták. Berton és munkatársai (Berton és mtsai., 2017) például Franciaország legintenzívebb sertéstenyésztő régiójában, egy fialástól a vágásig tartó típusú sertéstelepen végeztek felméréseket a PRRS-státusz stabilizálásáról. A vakcinázási protokoll a tenyészállomány két dózisú vakcinázásából állt, 1 hónapos időközzel, majd 16-20 hetes időközzel ismétléssel (Berton és mtsai., 2017). Az elválasztott sertések esetében a laboratóriumi ellenőrzést tételenként 30 sertéses mintaszámmal végezték. Ez a módszer 23 gazdaságból 15-ben volt sikeres. A sikertelenséget az esetek kis hányadában az állomány személyzetére visszavezethető járvány megelőzési intézkedések megsértésével magyarázták. A szerzők végső következtetése az volt, hogy a sertésállományok stabilizálása az elléstől a vágásig lehetséges, függetlenül azok méretétől és elhelyezkedésétől (Berton és mtsai., 2017). Almeida és munkatársai (Almeida és mtsai., 2021) 12 amerikai, az elléstől a választásig tartó típusú állományban kimutatták, hogy a PRRSV vírusos malacok eloszlása az ellési karámban véletlenszerű az almok között, ami újabb jelentős kihívást jelent a hatékony mintavételi módszer és a mintaszám meghatározása szempontjából. A végleges mintanagyság és a mintavételezendő sertések kiválasztását végső soron a helyi körülményekre szabottan kell meghatározni. Ezek a szerzők modellezték a legalább egy viremiás sertés kimutatásához szükséges mintanagyságot az adatoknak a fertőzés prevalenciájához való illesztésével (25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% és 1% értékekkel) különböző megbízhatósági

értékek (például 90%, 95 és 99%) mellett. A modellek azt mutatták, hogy ahhoz, hogy az ellés végén legalább egy PRRSV-fertőzött malacot találjunk 95%-os megbízhatósággal, 100 sertés esetében 96, 200 sertés esetében 130-154, 400 sertés esetében 177-210 és 600 koca esetében 171-236 mintát kell venni. Ezek a számok teljesen összhangban vannak a hazánkban jelenleg forgalomban lévő prevalencia táblázattal.

6.3 A diszkriminatív rRT-PCR jelentősége a vizsgált telepek esetében

Sajnálatos módon a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA és PCR tesztek nem tudnak különbséget tenni az MLV és a telepspecifikus vad típusú PRRSV között. Ennek oka a nagy genetikai változékonyság, és az a tény, hogy a vírus térbeli eloszlása, a különböző altípusok térbeli eloszlása is nagyon változatos. Jelenleg a megkülönböztetést csak szekvenálással lehet kimutatni, amit nagy számú minta esetén lassú elvégezni, vad típusú és vakcinavírusok együttes előfordulása esetén csak korlátozott mértékben lehet megállapítani. Az új generációs szekvenálás még mindig meglehetősen drága, és az általános protokollok alkalmazása esetén a vegyes fertőzésnél kisebb variánsok kimutatására alkalmas, nagy megbízhatósággal, ha annak aránya 1% feletti (Song és mtsai., 2021). Ezért van nagy szükség egy gyors, olcsó és robusztus diszkriminatív PCR tesztre, amely képes a minor variáns kimutatására és aktív elemként szolgálhat a gazdaságok diagnosztikai/monitorozási rendszerének.

Az általunk kidolgozott módszer egy egyszerű duplex diszkriminatív TaqMan rRT-PCR vizsgálat, amely közös forward és reverse primereket és két különböző próbát tartalmaz, mely képes az MLV és vad típusú PRRS telepspecifikus vírust kimutatni. Ez a vizsgálati módszer hatékonyan segítheti egy sertéstelep mentesítési folyamatát.

Munkánk során a mentesítésben résztvevő telepek összes PRRSV pozitív mintájára alkalmaztuk a DIVA rRT-PCR módszert. A vizsgálat képes volt mind az MLV, mind a vad típusú vírus kimutatására, a telepspecifikus PRRSV törzseket nagy megbízhatósággal tudtuk kimutatni még akkor is, ha alacsonyabb titerű vírustörzs aránya 0,1% körül volt. A telepi diagnosztikában mindkét vírus kimutatása elfogadható ezen aránytartományon belül, mivel kevésbé valószínű, hogy a telepspecifikus vad típusú PRRSV-t túlszaporodja az MLV készítményben található gyengített vírust (Martínez-Lobo és mtsai., 2013), ami 0,1%-nál alacsonyabb arányt eredményez. Mivel azonban a DIVA rRT-PCR vizsgálatot csak olyan gazdaságokban alkalmaztuk, amelyekben Porcilis MLV-t használtak a telepek vakcinázásra, további adatokra van szükség annak értékeléséhez, hogy más MLV-eket használó gazdaságokban való alkalmazása mennyire vezet eredményre a PRRSV mentes státusz eléréséhez. Elmondható, hogy a diszkriminatív rRT-PCR vizsgálat bevezetése után a következőkkel együtt az alapos vakcinázási rendszerrel és az ellenőrzési intézkedésekkel együtt, a vad típusú PRRSV pozitív állatok száma jelentősen csökkent minden

korcsoportban, és a vírus eltűnt a szopós malacokból. Ennek következtében nem volt több vad típusú PRRSV változat, melyek azonosítottunk volna az állományokban. A diszkriminatív rRT-PCR módszer számos lehetőséget kínál az általános PRRSV PCR tesztekhez képest, ezen felül a módszerrel nyomon tudjuk követni a vírus cirkulációját egy adott állományban.

Összeségében kimondható, hogy a bemutatott diszkriminatív TaqMan valós idejű RT-PCR-teszt olcsó, rugalmas, könnyen alkalmazható különböző állományokban, ahol MLV-eket használnak és módosítható az állandó megfigyelés során kapott szekvenciaadatok alapján. Egyszerűsége alapján a teszt alkalmazható akár a rutinszerű diagnosztikai laboratóriumokban is, és jelentős kiegészítő vizsgálatként szolgálhat a PRRS ellenőrzés és felszámolás vagy mentesítési folyamatok kapcsán.

6.4 A magyarországi PRRSV-vel fertőzött telepek ellenőrzési programja, avagy a diszkriminatív rRT-PCR a gyakorlatban

Magyarországon a leggyakoribb tenyészüzemtípus a fialástól a vágásig típusú. Ebből következően a PRRSV nemcsak az azonos korcsoportokon belül, hanem a hízalás fázisaiban a különböző csoportok között is képes terjedni, tovább nehezítve a mentesítés előrehaladását. A PRRS-mentesítési programot hazánkban koordináló Nemzeti PRRS Mentesítési Bizottság a PRRS-mentes, oltott állomány minősítésének 2019-es bevezetésekor új lehetőséggel bővítette. Az ilyen állomány létrehozásának feltételei, hogy a tenyészállomány stabil legyen, a választott malacok PCR vizsgálattal mindig negatív eredményt mutassanak, a hízóállomány pedig vágáskor szeronegatív legyen. A választott malacok esetében 95%-os megbízhatóságú és 2%-os előfordulási gyakoriságú laboratóriumi módszer szükséges. Például egy 1000 kocás gazdaságban, ahol havonta 180 ellés történik, és ahol az ellésenként 12 malac születik, a 2200 malacból a 3 malac/ellés mintavételi szám jóval meghaladja még a 95-ös megbízhatósági szintet és az 1%-os prevalencia szintet is. Ezt a gyakorlatot tehát teljes mértékben alátámasztják Almeida és munkatársai (Almeida és mtsai., 2021) legújabb, nagy léptékű mintavételen alapuló vizsgálatai is. A kutatásunk eredményeként igazoltuk, hogy a PRRSV-mentesnek deklarált alomszámok mintavételi módszere jelentőséggel bír, mivel szignifikánsan több PRRSV pozitív almot azonosítottunk, amikor három választott malacot/alom vizsgáltunk. Ez azt jelenti, hogy ha túl kevés mintát vizsgálnak, a választott malacok állapotát félre lehet értelmezni. E mintavételi módszer alkalmazásával és olyan laboratóriumi módszerek alkalmazásával, amelyek gyorsan kimutatják a vad típusú virulens vírus jelenlétét az állományban a nevelési időszak alatt (DIVA PCR (Fornyos és mtsai., 2022)), a PCR pozitív alom és kocáik selejtezésével jelentősen csökken a vírus jelenléte. Végül a fent említett eljárásokat egy fialástól a vágásig típusú gazdaságban is végrehajtottuk, és sikeresen gátoltuk a különböző korcsoportok vad típusú PRRSV fertőzését. Eredményeink azt mutatták, hogy ezen intézkedések alkalmazása

szigorú biológiai biztonsági intézkedésekkel együtt lehetővé tették, hogy két éven belül PRRS-mentes státuszt érjünk el a fialástól a vágásig tartó állományokban a DIVA rRT-PCR módszer alkalmazásával.

Lehetőség van a fialástól a vágásig típusú sertésállományok PRRS szempontjából történő stabilizálására függetlenül azok méretétől, lokalizációjától (Berton és mtsai., 2017).

Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy 1000 koca feletti PRRS fertőzött, fialástól a vágásig típusú sertésállományokban az állományszintű vakcinázást követő laboratóriumi monitoring vizsgálat esetében a választásonként, batch-enként 30 malac vizsgálata nem elegendő arra, hogy hosszú idő óta immunizált kocaállomány utódállománya vadvírus-mentességét –ezáltal a stabilitást – garantálja. Véleményünk szerint ehhez jóval nagyobb számú vizsgálatra – esetünkben legalább három választott malac/fialás- van szükség.

Mindezt azért kell megtenni, mert a fertőzött telepen tartott kocaállomány esetében az akár több éve tartó, programszerű vakcinázást követően előfordulhat akár több mint 1 %-ban is, hogy az ilyen mintaszámmal elvégzett monitor vizsgálat a telepi befertőző, vadvírust detektálja a malacokban. Kisebb számú vizsgálattal nem deríthető fel az a sokszor néhány vírushordozó, -ürítő tenyészkoca, ami azzal a veszéllyel jár, hogy a vadvírussal fertőzött malacok az előnevelés, hizlalás fázisában a fogékony társaikat fertőzik („előre menő fertőzés”). Ennek következménye az utódállományban a telepre jellemző PRRSV fertőzöttség klinikai tüneteinek megjelenése, illetve a vírusürítés állományszintű jelentős fokozódása.

Az ilyen almok, kocák selejtezése –természetesen az egyéb járványvédelmi intézkedések betartásával – biztonságosabban eredményezheti a PRRSV mentes utódállomány létrejöttét a fialástól a vágásig típusú tenyész sertéstelepeken.

7 Új tudományos eredmények

- 1) Elsőként nyertünk információkat a magyarországi PRRS mentesítésben használt vakcinák genetikai stabilitásáról.
- 2) Elsőként dolgoztunk ki egy gyors (1,5-2,5 órán belül elvégezhető), robosztus, olcsó és hatékony telepspecifikus DIVA Real-Time PCR módszert, mely a nagy mennyiségű minta feldolgozását tette lehetővé.
 - a) A DIVA PCR módszer alkalmazása a gyors, releváns eredmény közléssel lehetővé tette a telepek számára a mielőbbi intézkedéseket adott technológiai lépésük megtétele előtt csökkentve gazdasági veszteségeiket.
- 3) Elsőként végeztünk nagy számú magyarországi mintákon diszkriminatív rRT-PCR módszerrel méréseket.
- 4) Elsőként használtuk a DIVA PCR módszert a Nemzeti PRRS Mentelési Programban, mely nagy mértékben segítette ennek sikerességét az MLV vakcinát használó telepeken.
- 5) DIVA PCR felhasználható PRRSV pozitív állományok esetében az egyes korcsoportok vadvírus fertőzöttség felderítésére.
- 6) A DIVA PCR preventív jelleggel bír a fertőzött telepek számára a PRRSV kiszűrése érdekében.
 - a) A diszkriminatív PCR segít megérteni, hogy maga a vakcina vagy a vakcinázás rendszere és a telep belső biológiai biztonsági intézkedése az, amin változtatni vagy javítani kell.
 - b) Olyan járványtani helyzetekben, amikor a vad típusú PRRSV fertőzések a PRRSV mentes állományok közvetlen közelében fordulnak elő az állományban, a diszkriminatív rRT-PCR használata lehetővé teszi az MLV-k alkalmazását szigorú diagnosztikai megfigyeléssel együtt.
 - c) Segít a PRRS mentes állapot visszaállításában, fenntartásában és az oltás fokozatos abbahagyásában is.

8 Irodalom

- Ait-Ali, T., Wilson, A. D., Westcott, D. G., Clapperton, M., Waterfall, M., Mellencamp, M. A., Archibald, A. L. (2007). Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. *Viral immunology*, 20(1), 105-118.,
- Albina, E., Carrat, C., & Charley, B. (1998). Interferon- α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of interferon & cytokine research*, 18(7), 485-490.,
- Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Kennedy, S. (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archives of virology*, 145, 2421-2429.
- Allende, R., Laegreid, W. W., Kutish, G. F., Galeota, J. A., Wills, R. W., & Osorio, F. A. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *Journal of virology*, 74(22), 10834-10837.
- Almeida, M. N., Zhang, M., Lopez, W. A. L., Vilalta, C., Sanhueza, J., Corzo, C. A., Linhares, D. C. L. (2021). A comparison of three sampling approaches for detecting PRRSV in suckling piglets. *Preventive Veterinary Medicine*, 194, 105427.
- Alonso, C., Raynor, P. C., Davies, P. R., & Torremorell, M. (2015). Concentration, size distribution, and infectivity of airborne particles carrying swine viruses. *PloS one*, 10(8), e0135675.
- An, T. Q., Tian, Z. J., Xiao, Y., Li, R., Peng, J. M., Wei, T. C., Tong, G. Z. (2010). Origin of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China. *Emerging infectious diseases*, 16(2), 365.
- Bálint, Á., Molnár, T., Kecskeméti, S., Kulcsár, G., Soós, T., Szabó, P. M., Kaszab, E., Fornyos, K., Zádori, Z., Bányai, K., Szabó, I. (2021). Genetic variability of PRRSV vaccine strains used in the National Eradication Programme, Hungary. *Vaccines*, 9(8), 849.
- Balka, Gy. (2009). A PRRS diagnosztikájának javítása, a magyarországi járványtani helyzet felmérése és az itthon előforduló törzsek genetikai tulajdonságainak vizsgálata.
- Balka, Gy., Hornyák, Á., és Rusvai, M. (2004). A PRRSV diagnosztikájában használatos módszerek összehasonlítása (poszter). *Magyar Mikrobiológiai Társaság. Nagygyőlése és 10. Fermentációs kollokvium. Keszthely, 2004. október 7-9.*
- Batista, L. (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome diagnostics in the breeding herd: Back to the basics. *J Swine Health Prod*, 13(2), 96-98.
- Berton, P., Normand, V., Martineau, G. P., Bouchet, F., Leuret, A., & Waret-Szkuta, A. (2017). Evaluation of porcine reproductive and respiratory syndrome stabilization protocols in 23 French Farrow-to-finish farms located in a high-density swine area. *Porcine health management*, 3, 1-7.
- Bordet, E., Blanc, F., Tiret, M., Crisci, E., Bouguyon, E., Renson, P., ... & Bertho, N. (2018). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 1.3 Lena triggers conventional dendritic cells 1 activation and T helper 1 immune response without infecting dendritic cells. *Frontiers in immunology*, 9, 2299.

- Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K. J., Oleksiewicz, M. B., Storgaard, T. (2000). Distinction between infections with European and American/vaccine type PRRS virus after vaccination with a modified-live PRRS virus vaccine. *Veterinary Research*, 31(1), 72-73.
- Brockmeier, S. L., Palmer, M. V., Bolin, S. R., & Rimler, R. B. (2001). Effects of intranasal inoculation with *Bordetella bronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. *American journal of veterinary research*, 62(4), 521-525.
- Calzada-Nova, G., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., Zuckermann, F. A. (2012). Effect of the host cell line on the vaccine efficacy of an attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 148(1-2), 116-125.
- Canelli, E., Catella, A., Borghetti, P., Ferrari, L., Ogno, G., De Angelis, E., Martelli, P. (2017). Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs. *Veterinary microbiology*, 210, 124-133.
- Cha, S. H., Choi, E. J., Park, J. H., Yoon, S. R., Song, J. Y., Kwon, J. H., Yoon, K. J. (2006). Molecular characterization of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses and comparison to other Asian PRRS viruses. *Veterinary microbiology*, 117(2-4), 248-257.
- Chae, C. (2016). Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine respiratory syndrome virus. *J Swine Health Prod*. 2002;10(4):167-170.
- Chae, C. (2021). Commercial PRRS modified-live virus vaccines. *Vaccines*, 9(2), 185.
- Charerntantanakul, W. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World journal of virology*, 1(1), 23.
- Chen, Y., Shi, K., Liu, H., Yin, Y., Zhao, J., Long, F., ... & Si, H. (2021). Development of a multiplex qRT-PCR assay for detection of African swine fever virus, classical swine fever virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Science*, 22(6).
- Chen, Z., Zhou, X., Lunney, J. K., Lawson, S., Sun, Z., Brown, E., Fang, Y. (2010). Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response. *Journal of general virology*, 91(4), 1047-1057.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Nelson, J. K., Hines, R. J., Swenson, S. L., Hill, H. T., Chase, C. C. (1995). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1730-1734.
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Benfield DA. (1996). Detecting PRRSV in boar semen. *Swine Health Prod* 4(1):37-39.
- Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T., Harris, L., Gorcyca, D. E., Chladek, D. W., & Morrison, R. B. (1991). Swine infertility and respiratory syndrome (mystery swine disease). In *Minnesota Swine Conference for Veterinarians* (Sep. 16, 1991).
- Costers, S., Delputte, P. L., & Nauwynck, H. J. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages contain no detectable levels of viral proteins in their plasma

- membrane and are protected against antibody-dependent, complement-mediated cell lysis. *Journal of General Virology*, 87(8), 2341-2351.
- Dee, S. A., & Philips, R. (1998). Using vaccination and unidirectional pig flow to control PRRSV transmission. *Journal of Swine Health and Production*, 6(1), 21-25.
- Dee, S., Otake, S., Oliveira, S., & Deen, J. (2009). Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary research*, 40(4).
- Dénes, L., Horváth, D. G., Duran, O., Ratkhjen, P. H., Kraft, C., Acs, B., Balka, G. (2021). In Situ Hybridization of PRRSV-1 Combined with Digital Image Analysis in Lung Tissues of Pigs Challenged with PRRSV-1. *Veterinary Sciences*, 8(10), 235.
- Dietze, K., Pinto, J., Wainwright, S., Hamilton, C., & Khomenko, S. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Rome: FAO's Emer-gency Prevention System, 1, 1-8.
- Do, D. T., Park, C., Choi, K., Jeong, J., Nguyen, T. T., Le, D. T. H., ... & Chae, C. (2016). Nucleotide sequence analysis of Vietnamese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2013 to 2014 based on the NSP2 and ORF5 coding regions. *Archives of virology*, 161, 669-675.
- Dokland, T. (2010). The structural biology of PRSV. *Vir. Res.* 154, 86-97.
- Duinhof, T. F., Van Schaik, G., Van Esch, E. J. B., & Wellenberg, G. J. (2011). Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Veterinary microbiology*, 150(1-2), 180-184.
- Eclercy, J., Renson, P., Leuret, A., Hirschaud, E., Normand, V., Andraud, M., Bourry, O. (2019). A Field evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Veterinary microbiology*, 165(1-2), 21-28.
- Faaberg, K. S., Balasuriya, U. B., Brinton, M. A., Gorbalenya, A. E., Leung, F. C. C., Nauwynck, H., Snijder, E.J., Stadejek, T., Yang, H., Yoo, D. (2012). Family arteriviridae. *Virus taxonomy*. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 796-805.
- Fang, Y., Treffers, E. E., Li, Y., Tas, A., Sun, Z., Van Der Meer, Y., Firth, A. E. (2012). Efficient- 2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), E2920-E2928.
- Fangman, T. J., Kleiboeker, S. B., & Coleman, M. (2007). Tonsillar crypt exudate to evaluate shedding and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus after inoculation with live field virus or vaccination with modified live virus vaccine. *Journal of Swine Health and Production*, 15(4), 219-223.
- Firth, A. E., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Wills, N. M., Go, Y. Y., Balasuriya, U. B., Atkins, J. F., Posthuma, C. C. (2011). Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *The Journal of general virology*, 92(Pt 5), 1097.
- Freuling, C. M., Müller, T. F., Mettenleiter, T. C. (2017). Vaccines against pseudorabies virus (PrV). *Veterinary Microbiology*, 206, 3-9.
- Fornyo, K., Szabó, I., Lehardt, K., & Bálint, Á. (2022). Development of a farm-specific real-time quantitative RT-PCR assay for the detection and discrimination of wild-type porcine reproductive

- respiratory syndrome virus and the vaccine strain in a farm under eradication. *Acta Veterinaria Hungarica*.
- Forsberg, R. (2005). Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Molecular biology and evolution*, 22(11), 2131-2134.
- Gerber, P. F., Giménez-Lirola, L. G., Halbur, P. G., Zhou, L., Meng, X. J., & Opriessnig, T. (2014). Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and fluorescent microbead immunoassays for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *Journal of virological methods*, 197, 63-66.
- Gerber, P. F., O'Neill, K., Owolodun, O., Wang, C., Harmon, K., Zhang, J., Opriessnig, T. (2013). Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different sample types. *Journal of clinical microbiology*, 51(2), 547-556.
- Gómez-Laguna, J., Salguero, F. J., Pallarés, F. J., & Carrasco, L. (2013). Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *The Veterinary Journal*, 195(2), 148-155.
- Guo, Z., Chen, X. X., Li, R., Qiao, S., & Zhang, G. (2018). The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective. *Virology journal*, 15(1), 1-14.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Han, W., Wu, J. J., Deng, X. Y., Cao, Z., Yu, X. L., Wang, C. B., Zhang, Z. Q. (2009). Molecular mutations associated with the in vitro passage of virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus genes*, 38(2), 276-284.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., & Gojobori, T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Molecular biology and evolution*, 22(4), 1024-1031.
- Harms, P. A., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Bolin, S. R., Lager, K. M., Morozov, I., & Paul, P. S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology*, 38(5), 528-539.
- Hermann, J., Hoff, S., Muñoz-Zanzi, C., Yoon, K. J., Roof, M., Burkhardt, A., & Zimmerman, J. (2007). Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols. *Veterinary research*, 38(1), 81-93.
- Holtkamp, D. J. JK (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on united States Pork producers. *Journal of Swine Health and production*, 72-84.
- Holtkamp, D. J., Polson, D. D., Torremorell, M., Classen, D. M., Becton, L., Henry, S., Zimmerman, J. (2011). Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *Journal of Swine Health and Production*, 19(1), 44-56.

- Hornyák, Á., Pálfi, V., & Karakas, M. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome szerológiai felmérése Magyarországon. *Akadémiai beszámoló*, 10.
- Horter, D. C., Pogranichniy, R. M., Chang, C. C., Evans, R. B., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2002). Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary microbiology*, 86(3), 213-228.
- isolated porcine alveolar macrophages. *Viral. Immunol.* 20, 105-118.
- JH Lara P, R Echeveste G de A, F Quezada M, R Cortes F, F Castro P, B Lozano D, D Sarfati M, E Soto P, (2014) IPVS Congress. p 213.
- Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, C. R., & Murtaugh, M. P. (2004). Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(3), 233-247.
- Jung, K., Renukaradhya, G. J., Alekseev, K. P., Fang, Y., Tang, Y., & Saif, L. J. (2009). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modifies innate immunity and alters disease outcome in pigs subsequently infected with porcine respiratory coronavirus: implications for respiratory viral co-infections. *The Journal of general virology*, 90(Pt 11), 2713.
- Kappes, M. A., & Faaborg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479, 475-486. ko
- Keffaber, K. K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl*, 1, 1-9.
- Kimman, T. G., Cornelissen, L. A., Moormann, R. J., Rebel, J. M., & Stockhofe-Zurwieden, N. (2009). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*, 27(28), 3704-3718.
- Kit, S., Kit, M., & Pirtle, E. C. (1985). Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. *American journal of veterinary research*, 46(6), 1359-1367.
- Klinge, K. L., Vaughn, E. M., Roof, M. B., Bautista, E. M., & Murtaugh, M. P. (2009). Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology journal*, 6(1), 1-11.
- Ko Ko, Y., Pamonsinlapatham, P., Myint, A., Latt, A. Z., Aye, K., Rungpragayphan, S., & Powthongchin, B. (2019). Sequence and phylogenetic analyses of Nsp2-HVII, ORF 5, and ORF 7 coding regions of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus from Myanmar. *Transboundary and emerging diseases*, 66(2), 1073-1076.
- Kristensen, C. S. (2012). PRRSV control in Denmark: Status and perspectives. EuroPRRS2012, Lecture conducted from Pig Research Centre, Danish Agriculture & Food Council Denmark.
- Kristensen, C.S. and Vinther, J. (2013) Effect of PRRS on productivity in chronic infected Danish herds. Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians Meeting, San Diego, California, USA, pp 393-394.
- Lager, K. M., Mengeling, W. L., & Wesley, R. D. (2002). Evidence for local spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

- Larochelle, R., Mardassi, H., Dea, S., & Magar, R. (1996). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(1), 3-10.
- Leng, X., Li, Z., Xia, M., Li, X., Wang, F., Wang, W., Wu, H. (2012). Mutations in the genome of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentially related to attenuation. *Veterinary microbiology*, 157(1-2), 50-60.
- Li, C., Zhuang, J., Wang, J., Han, L., Sun, Z., Xiao, Y., Tian, K. (2016). Outbreak
- Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Jiang, P. (2007). Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *The Veterinary Journal*, 174(3), 577-584.
- Linhares, D. C. L., Cano, J. P., Torremorell, M., & Morrison, R. B. (2014). Comparison of time to PRRSV-stability and production losses between two exposure programs to control PRRSV in sow herds. *Preventive veterinary medicine*, 116(1-2), 111-119.
- Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 167(1-2), 1-14.
- Ludemann, L., Lager, K. M. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 1116-1127.
- Lv, J., Zhang, J., Sun, Z., Liu, W., Yuan, S. (2008). An infectious cDNA clone of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant associated with porcine high fever syndrome. *Journal of general virology*, 89(9), 2075-2079.
- Ma, W., Lager, K. M., Richt, J. A., Stoffregen, W. C., Zhou, F., & Yoon, K. J. (2008). Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(4), 440-447.
- Maes, R. K., Langohr, I. M., Wise, A. G., Smedley, R. C., Thaiwong, T., & Kiupel, M. (2014). Beyond H&E: Integration of nucleic acid-based analyses into diagnostic pathology. *Veterinary Pathology*, 51(1), 238-256.
- Magyar, T., Lax, A. J. (2002). Atrophic rhinitis. *Polymicrobial diseases*, 169-197.
- Maisonasse, P., Bouguyon, E., Piton, G., Ezquerro, A., Urien, C., Deloizy, C., ... & Bertho, N. (2016). The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal immunology*, 9(4), 835-849.
- Martelli, P., Cordioli, P., Fallacara, F., Terreni, M., & Cavirani, S. (2003, July). Genetic diversity (ORF5) of PRRSV isolates from a herd with sams. In *Proceedings 4th International symposium on emerging and re-emerging pig diseases*. Italy (pp. 56-57).
- Martínez-Lobo, F. J., De Lome, L. C., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I Prieto, C. (2013). Safety of porcine reproductive and respiratory syndrome modified live virus (MLV) vaccine strains in a young pig infection model. *Veterinary research*, 44, 1-14.
- Mateu, E., Díaz, I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *The Veterinary Journal*, 177(3), 345-351.

- Medveczky, I. 1996. Áttekintés a sertés reprodukciós és légzőszervi szindrómájának (PRRS) újabb ismereteiről. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 51, 367-371.
- Medveczky, I., Bálint, Á., Makranszky, L., Steverink, P., & Jacobs, L. (2001). Sequence analysis of the membrane protein gene and nucleocapsid gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated from a swine herd in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 49(2), 237-244.
- Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., Zuckermann, F. A. (2003). Gradual development of the interferon- γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*, 309(1), 18-31.
- Meulenberg, J.J.M. (2000). PRRSV, the virus. *Vet.Res.* 31. 11-21.
- Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., de Meier, E.J., Moonen, P.L., den Besten, A., de Kuyver, E.P., Wensvoort, G., and Moormann, R.J. (1993). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62-72.
- Mettenleiter, T. C. (2020). Aujeszky's disease and the development of the marker/DIVA vaccination concept. *Pathogens*, 9(7), 563.
- Ministry of Agriculture. 41/1997. (V. 28.) (Decree of the Minister of Agriculture on issuing the Animal Health Regulation). Available online: <https://njt.hu/jogszabaly/1997-41-20-11.49> (accessed on 28 May 1997)
- Molina-Barrios, R., Luevano-Adame, J., Henao-Díaz, Y. A., Giménez-Lirola, L., Piñeyro, P., Magtoto, R., Zimmerman, J. (2018). Collared peccary (*Pecari tajacu*) are susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Transboundary and emerging diseases*, 65(6), 1712-1719.
- Molina, R. M., Cha, S. H., Chittick, W., Lawson, S., Murtaugh, M. P., Nelson, E. A., Zimmerman, J. J. (2008). Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 126(3-4), 283-292.
- Murtaugh, M. P., Johnson, C. R., Xiao, Z., Scamurra, R. W., & Zhou, Y. (2009). Species specialization in cytokine biology: Is interleukin-4 central to the TH1–TH2 paradigm in swine? *Developmental & Comparative Immunology*, 33(3), 344-352.
- Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y. J., Zhou, E. M. (2017). Improved vaccine against PRRSV: current progress and future perspective. *Frontiers in microbiology*, 8, 1635.
- Nazki, S., Khatun, A., Jeong, C. G., Gu, S., Lee, S. I., Kim, S. C., ... & Kim, W. I. (2020). Evaluation of local and systemic immune responses in pigs experimentally challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary research*, 51(1), 1-19.
- Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P., & Faaberg, K. S. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *Journal of virology*, 73(1), 270-280.
- Nemes, I., Molnár, T., Abonyi, T., Terjék, Z., Bálint, Á., & Szabó, I. (2019). Eradication of PRRS from backyard swine herds in Hungary between 2012 and 2018. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(4), 543-552.

- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson CDMJWBEJ, S. A., Green, A. L., Zimmerman, J. J. (2005). Evaluación del impacto económico del síndrome reproductivo y respiratorio porcino en la producción porcina en los Estados Unidos. *J Am Vet Med Assoc*, 227, 385-392.
- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(3), 385-392.
- Nieuwenhuis, N., Duinhof, T. F., & Van Nes, A. (2012). Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Veterinary Record*, 170(9), 225-225.
- Oh, J., Lee, C. (2012). Proteomic characterization of a novel structural protein ORF5a of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 169(1), 255-263.
- Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L. G., & Halbur, P. G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, 12(2), 133-148.
- Osorio, F. A., Galeota, J. A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Laegreid, W. W. (2002). Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology*, 302(1), 9-20.
- Otake, S., Dee, S. A., Rossow, K. D., Moon, R. D., & Pijoan, C. (2002). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Canadian journal of veterinary research*, 66(3), 191.
- Plagemann, P. G. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerging infectious diseases*, 9(8), 903.
- Pomorska-Mól, M., & Dors, A. (2022). Recent Advances in Porcine Respiratory Diseases. *Frontiers in Veterinary Science*, 9.
- Prpić, J., Keros, T., Bedeković, T., Brnić, D., Cvetnić, Ž., Roić, B., & Jemeršić, L. (2014). Phylogenetic comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive respiratory syndrome virus (PRRSV) strains detected in domestic pigs until 2008 and in 2012 in Croatia. *Irish veterinary journal*, 67, 1-7.
- Quezada-Fraide, E. A., Peñuelas-Rivas, C. G., Moysén-Albarrán, F. S., Trujillo-Ortega, M. E., Martínez-Castañeda, F. E. (2021). Productive performance and costs of swine farms with different PRRS virus vaccination protocols. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(1), 205-216.
- Rajic, A., Dewey, C. E., Deckert, A. E., Friendship, R. M., Martin, S. W., & Yoo, D. (2001). Production of PRRSV-negative pigs commingled from multiple, vaccinated, serologically stable, PRRSV-positive breeding herds. *Journal of Swine Health and Production*, 9(4), 179-185.
- Rathkjen, P. H., & Dall, J. (2017). Control and eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 using a modified-live type 2 vaccine in combination with a load, close, homogenise model: an area elimination study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59, 1-12.

- Renken, C., Nathues, C., Swam, H., Fiebig, K., Weiss, C., Eddicks, M., Nathues, H. (2021). Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany. *Porcine health management*, 7(1), 1-12.
- Renukaradhya, G. J., Alekseev, K., Jung, K., Fang, Y., & Saif, L. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs. *Viral immunology*, 23(5), 457-466.
- responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in
- Risser, J., Ackerman, M., Evelsizer, R., Wu, S., Kwon, B., & Hammer, J. M. (2021). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic variability a management and diagnostic dilemma. *Virology Journal*, 18(1), 1-12.
- Robinson, S. R., Li, J., Nelson, E. A., & Murtaugh, M. P. (2015). Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 203, 56-65.
- Robinson, S. R., Rahe, M. C., Gray, D. K., Martins, K. V., & Murtaugh, M. P. (2018). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralizing antibodies provide in vivo cross-protection to PRRSV1 and PRRSV2 viral challenge. *Virus research*, 248, 13-23.
- Roca, M., Gimeno, M., Bruguera, S., Segalés, J., Díaz, I., Galindo-Cardiel, I. J., Mateu, E. (2012). Effects of challenge with a virulent genotype II strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on piglets vaccinated with an attenuated genotype I strain vaccine. *The Veterinary Journal*, 193(1), 92-96.
- Rotolo, M. L., Giménez-Lirola, L., Ji, J., Magtoto, R., Henao-Díaz, Y. A., Wang, C., ... & Zimmerman, J. J. (2018). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific IgM-IgA in oral fluid samples reveals PRRSV infection in the presence of maternal antibody. *Veterinary microbiology*, 214, 13-20.
- Rotolo, M. L., Sun, Y., Wang, C., Giménez-Lirola, L., Baum, D. H., Gauger, P. C., Zimmerman, J. J. (2017). Sampling guidelines for oral fluid-based surveys of group-housed animals. *Veterinary microbiology*, 209, 20-29.
- Ruedas-Torres, I., Rodríguez-Gomez, I. M., Sánchez-Carvajal, J. M., Larenas-Munoz, F., Pallares, F. J., Carrasco, L., & Gomez-Laguna, J. (2021). The jigsaw of PRRSV virulence. *Veterinary Microbiology*, 260, 109168.
- Sánchez-Carvajal, J. M., Ruedas-Torres, I., Carrasco, L., Pallarés, F. J., Mateu, E., Rodríguez-Gómez, I. M., & Gómez-Laguna, J. (2021). Activation of regulated cell death in the lung of piglets infected with virulent PRRSV-1 Lena strain occurs earlier and mediated by cleaved Caspase-8. *Veterinary research*, 52, 1-14.
- Sattler, T., Wodak, E., & Schmoll, F. (2015). Evaluation of the specificity of a commercial ELISA for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in individual oral fluid of pigs collected in two different ways. *BMC veterinary research*, 11, 1-6.
- Sattler, T., Wodak, E., Revilla-Fernández, S., & Schmoll, F. (2014). Comparison of different commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in serum. *BMC veterinary research*, 10(1), 1-6.

- Shi, M., Lemey, P., Brar, M. S., Suchard, M. A., Murtaugh, M. P., Carman, S., Leung, F. C. C. (2013). The spread of type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in North America: a phylogeographic approach. *Virology*, 447(1-2), 146-154.
- Simon-Loriere, E., & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 617-626.
- Song, J., Gao, P., Kong, C., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., Yang, H. (2019). The nsp2 hypervariable region of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain JXwn06 is associated with viral cellular tropism to primary porcine alveolar macrophages. *Journal of Virology*, 93(24), e01436-19.
- Song, P., Chen, S. X., Yan, Y. H., Pinto, A., Cheng, L. Y., Dai, P., Zhang, D. Y. (2021). Selective multiplexed enrichment for the detection and quantitation of low-fraction DNA variants via low-depth sequencing. *Nature biomedical engineering*, 5(7), 690-701.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M. B., Scherbakov, A. V., Timina, A. M., Krabbe, J. S., Chabros, K., Potapchuk, D. (2008). Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Archives of virology*, 153, 1479-1488.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Murtaugh, M. P., & Oleksiewicz, M. B. (2013). Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Veterinary microbiology*, 165(1-2), 21-28.
- Stoian, A. M., & Rowland, R. R. (2019). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine design: reviewing virus glycoprotein interactions with CD163 and targets of virus neutralization. *Veterinary sciences*, 6(1), 9.
- Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S., & Taylor, D. J. (Eds.). (2013). *Diseases of swine*. John Wiley & Sons, 695-696.
- Su, C. M., Rowland, R. R. R., & Yoo, D. (2021). Recent Advances in PRRS Virus Receptors and the Targeting of Receptor–Ligand for Control. *Vaccines*, 9(4), 354.
- Szabó, I., Bognár, L., Molnár, T., Nemes, I., Bálint, Á. (2020^a). PRRS eradication from swine farms in five regions of Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 68(3), 257-262.
- Szabó, I., Molnár, T., Nemes, I., Abonyi, T., Terjék, Zs. and Bálint, Á. (2019): PRRSV eradication on large-scale fattening pig farms in Hungary between 2014 and 2019. *Acta Vet. Hung.* 67 ,529–542.
- Szabó, P. M., Szalay, D., Kecskeméti, S., Molnár, T., Szabó, I., Bálint, Á. (2020^b). Investigations on spreading of PRRSV among swine herds by improved minimum spanning network analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.
- Szabó, I., Nemes, I., Búza, L., Polyák, F., Bálint, Á., Fitos, G., Ózsvári, L. (2023). The Impact of PRRS Eradication Program on the Production Parameters of the Hungarian Swine Sector. *Animals*, 13(9), 1565.
- Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R., & Thacker, B. J. (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of clinical microbiology*, 37(3), 620-627.
- Thanapongtharm, W., Linard, C., Pamaranon, N., Kawkalong, S., Noimoh, T., Chanachai, K., Gilbert, M. (2014). Spatial epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome in Thailand. *BMC veterinary research*, 10(1), 1-11.

- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., & Damrongwatanapokin, S. (2004). Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Veterinary microbiology*, 101(1), 9-21.
- Tian, K. (2017). Suppl-1, M3: NADC30-Like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in China. *The open virology journal*, 11, 59.
- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Gao, G. F. (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS one*, 2(6), e526.
- Tong, G. Z., Zhou, Y. J., Hao, X. F., Tian, Z. J., An, T. Q., & Qiu, H. J. (2007). Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerging infectious diseases*, 13(9), 1434.
- Toplak, I., Rihtarič, D., Hostnik, P., Grom, J., Štukelj, M., & Valenčak, Z. (2012). Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *Journal of virological methods*, 179(1), 51-56.
- Umthun, A. R., & Mengeling, W. L. (1999). Restriction fragment length polymorphism analysis of strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by use of a nested-set reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *American journal of veterinary research*, 60(7), 802-806.
- Van Oirschot, J. T., Houwers, D. J., Rziha, H. J., & Moonen, P. J. L. M. (1988). Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. *Journal of Virological Methods*, 22(2-3), 191-206.
- Van Reeth, K., Brown, I. H., Olsen, C. W., Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Stevenson, G. W. (2012). *Diseases of Swine*.
- Wang, H., Xu, Y., & Feng, W. (2021). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Immune Escape and Application of Reverse Genetics in Attenuated Live Vaccine Development. *Vaccines*, 9(5), 480.
- Wang, R., Kang, Y., Li, H., Ma, H., Wang, W., Cheng, Y., Zhao, M. (2019). Molecular cloning and functional characterization of porcine 2', 5'-oligoadenylate synthetase 1b and its effect on infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 209, 22-30.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M. A., Ter Laak, E. A., Bloemraad, M., De Kluyver, E. P., Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly*, 13(3), 121-130.
- Wesley, R. D., Mengeling, W. L., Lager, K. M., Clouser, D. F., Landgraf, J. G., & Frey, M. L. (1998). Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(2), 140-144.
- Wills, R. W., Doster, A. R., & Osorio, F. A. (2002). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) to age-matched sentinel pigs. *Journal of Swine Health and Production*, 10(4), 161-165.

- Wongyanin, P., Buranapraditkun, S., Chokeshai-Usaha, K., Thanawonguwech, R., & Suradhat, S. (2010). Induction of inducible CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary immunology and immunopathology*, 133(2-4), 170-182.
- Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R.R., Christopher-Hennings, J., Zimmerman, J., Benfield, D.A., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Stevenson, G.W., Torremorell, Zimmerman, J.J., (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 385–392.
- Xiao, S., Jia, J., Mo, D., Wang, Q., Qin, L., He, Z., Chen, Y. (2010). Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS one*, 5(6), e11377.
- Xie, J., Christiaens, I., Yang, B., Trus, I., Devriendt, B., Cui, T., Nauwynck, H. J. (2018). Preferential use of Siglec-1 or Siglec-10 by type 1 and type 2 PRRSV strains to infect PK15 S1–CD163 and PK15 S10–CD163 cells. *Veterinary research*, 49, 1-13.
- Yamane, I., Kure, K., Ishikawa, H., Takagi, M., Miyazaki, A., Suzuki, T., Kobayashi, H. (2009). Estimation of economic loss due to porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan. In *Proceedings of the 12th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Durban, South Africa. p (Vol. 206).
- Yim-Im, W., Huang, H., Park, J., Wang, C., Calzada, G., Gauger, P., Zhang, J. (2021). Comparison of ZMAC and MARC-145 cell lines for improving porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolation from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(3), e01757-20.
- Yim-Im W, Huang H, Park J, et al (2017). Comparison of PRRSV isolation from clinical samples using MARC-145 and ZMAC cell lines. In *Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 105.
- Yun, S. I., & Lee, Y. M. (2013). Overview: replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of microbiology*, 51(6), 711-723.
- Zimmerman, J. J., Dee, S. A., Holtkamp, D. J., Murtaugh, M. P., Stadejek, T., Stevenson, G. W., Zhang, J. (2019). Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (porcine arteriviruses). *Diseases of swine*, 685-708.
- Zhang, J., Zheng, Y., Xia, X. Q., Chen, Q., Bade, S. A., Yoon, K. J., Li, G. (2017). High-throughput whole genome sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from cell culture materials and clinical specimens using next-generation sequencing technology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(1), 41-50.

9 A doktori kutatás eredményeiből származó közlemények

9.1 A témában megjelent tudományos publikációk, poszter nemzetközi konferencián

Bálint, Á., Molnár, T., Kecskeméti, S.^(†), Kulcsár, G., Soós, T., Szabó, P. M., Kaszab, E., Fornyos, K., Zádori, Z., Bányai, K., Szabó, I. (2021). Genetic variability of PRRSV vaccine strains used in the National Eradication Programme, Hungary. *Vaccines*, 9(8), 849.

Fornyos, K., Szabó, I., Lehardt, K., & Bálint, Á. (2022). Development of a farm-specific real-time quantitative RT-PCR assay for the detection and discrimination of wild-type porcine reproductive respiratory syndrome virus and the vaccine strain in a farm under eradication. *Acta Veterinaria Hungarica*.

Fornyos, K., Szegedi, L., Nagy, P., Sántha, I., Makkai, I., Búza, L., Kardos G., Molnár T., Bálint Á., Szabó, I. (2023). PRRS szempontjából „Mentes vakcinázott (MV)” minősítésű nagylétszámú, fialástól a vágásig típusú sertésállomány létrehozása. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 145: 171-181.

Fornyos K., Szabó I., Lehardt K., Bálint Á. (poszter) (2022) DIVA RT-PCR for detection and discrimination of wild type and modified live vaccine strain of PRRSV. European College of Porcine Health Management (ESPHM) konferencia.

Fornyos K., Búza L., Makkai I., Polyák F., Pogácsás I., Savoia L., Szegedi L., Bálint Á., Jakab Sz., Bányai K., Szabó I. (2023) Sampling strategies in PRRS elimination in Hungary: an observational study involving four farrow-to-finish swine herds. *Veterinary Sciences*.

9.2 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk, poszterek

Jurkovich V., Bognár B., Kovács-Weber M., Szabó R.T., Kovács P., Könyves L., Fornyos K., Mézes M. (2016): Effects of subclinical *M. avium* ssp. *paratuberculosis* infection on the health and production parameters of dairy cows.

Jurkovich V., Bognár B., Balogh K., Kovács-Weber M., Szabó R.T., Kovács P., Könyves L., Fornyos K., Mézes M. (poszter) (2016): Effects of subclinical *M. avium* ssp. *paratuberculosis* infection on the health and production parameters of dairy cows, 29th World Buiatrics Congress.

Bognár B., Farkas K., Fornyos K., Zruffó R., Baumgartner W., Lorenz K. J., Jurkovich V. (2019): A szarvasmarhák paratuberculosisa és az ember Crohn-betegsége közötti lehetséges kapcsolat. Magyar Állatorvosok Lapja 141:658-675.

Bognár B., Fornyos K., Jurkovich V. (poszter) (2018): A paratuberculosis, mint lehetséges közegészségügyi veszélyforrás, XVIII. Közép-Európai Buiatrikus Kongresszus & a Magyar Buiatrikus Társaság XXVIII. Nemzetközi Kongresszusa.

Bognár B., Fornyos K., Jurkovich V. (előadás) (2018): A klinikai paratuberculosis előrejelzése bélsár RT-PCR vizsgálattal, Buiatrikus konferencia.

10 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Bálint Ádámnak, és társtémavezetőmnek Dr Szabó Istvánnak, akik mindig támogattak, bíztattak és rengetegszer segítségemre voltak a problémák megfelelő megoldásában, valamint kiküszöbölésében. Mindezek mellett építő jellegű kritikákkal támogatták munkám előrehaladását.

Köszönettel tartozom Dr. Lehardt Károlynak és Szilvási Anikónak, az egykori M.A.H. Food-Controll Állategészségügyi Diagnosztikai laboratórium (jelenleg: Eurofins Vetcontrol Kft) ügyvezető/tulajdonosának, akik biztosították a megfelelő eszközöket és anyagokat a projekt létrehozatalához, az elnyert pályázat sikeres diagnosztikai eljárás kidolgozásához 2018-2020 októberi időszakában (projekt száma: 2018-1.1.2.-KFI-2018-00169).

Továbbá köszönettel tartozom a Eurofins Vetcontrol Kft ügyvezetőjének Branduse Lászlónak, hogy tanulmányaimat a befejezés időszakáig támogatta, segítette, valamint kollégáimnak, hogy nélkülöztek a kutatás és hallgatói kötelezettségeim ideje alatt és tökéletesen helyettesítetek.

Végül köszönöm barátaimnak, különösképpen Dr. Szűcs-Somlyó Évának és családomnak, hogy bíztattak, támogattak és elolvasták munkámat, ezzel segítve a PhD disszertációs munkám végleges formájának létrejöttét.