

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Hazai PRRS fertőzések genomi epidemiológiája

Fornyos Kinga

Témavezető: Dr. Bálint Ádám, PhD

Társtémavezető: Dr. Szabó István, PhD



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2023

Bevezetés

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (angolul: porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), a sertések vírus okozta, (PRRSV) szaporodásbiológiai zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó fertőző betegsége, amely a világ valamennyi sertéstartással foglalkozó államában előfordul. A PRRSV rendszertani besorolását tekintve a Nidovirales rendbe Arteriviridae családba és a Betaarterivirus nemzetségbe tartozik.

Magyarországon a vírus 1990-es évek óta jelen van, de csak az 1995 óta van biztos tudomásunk jelenlétéről, Hornyák Ákos és munkatársai szerológiai vizsgálatai 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 országokban 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., 2009).

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 mentesítés 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 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 (NÉBIH ÁDI közlése szerint).

A vírus terjedése a fertőzött állatok nyálával, orrváladékával, vizelettel, ondóval és esetenként bálással is történhet. A fertőzés terjedhet a sertések közvetlen érintkezésével, illetve indirekt módon, fertőzött tárgyakkal, eszközökkel. A széleskörű fertőzöttség szinte

kikerülhetetlen, hiszen 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, intrauterin és intravaginális úton. A vírusbejutás módjától függően más-más mennyiségű vírus szükséges a fertőzés kialakulásához (Zimmerman, 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 ($0,4-0,7 \mu\text{m}$) és $5,1 \times 10^4$ RNS-kópia/ m^3 ($9,0-10,0 \mu\text{m}$) közötti részecske mennyiségben. A vírus sertésállományoktól akár 9,1 km-re is terjedhet a levegőben (Alonso és mtsai., 2015).

A PRRS vírus a különböző korosztályú sertésállományokban egyenlő gyakorisággal figyelhető meg. A fiatal korosztályú sertésekben légzőszervi zavarokat, tenyészállatokban szaporodásbiológiai zavarokat (vetelés, koraellés, korai elhullás, halvaszületés) idézhet elő. A klinikai tünetek hiánya nem jelenti a vírustól való mentességet (Zimmerman, 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, antitesteket 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 szakaszban 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, 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 mozgásának 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, tenyészkanokat, 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). 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. Fontosak az állattartók preventív intézkedései is, mint az importált állatok karanténba helyezése, szállítási, fertőtlenítési protokollok betartása és a telepek zártságának fenntartása. 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. Alkalmazásuk 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. Jelenleg ez a mai napig elérhető leghatékonyabb megoldás a PRRSV által okozott gazdasági károk mérséklésére (Nan és mtsai., 2017).

Célkitűzés

A kutatás célja egy olyan diagnosztikai módszer kidolgozása, amely lehetővé teszi a feltételezett PRRSV virémia időszakában annak elkülönítését, hogy azt a védekezéshez használt élő, modifikált vakcinavírus vagy vadvírus okozta-e. 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 vad vírus 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 vad vírus 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.

Anyag és Módszer

A fertőzött telepek a mentesítési programjuk alapján kidolgozott PRRS Nemzeti Mentesítési Terv 4.0 (95%-os prevalencia és 2%-os konfidencia intervallum) utasításainak megfelelően vettek mintát heti/havi rendszerességgel az állomány státuszának nyomon követése érdekében. 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. 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.

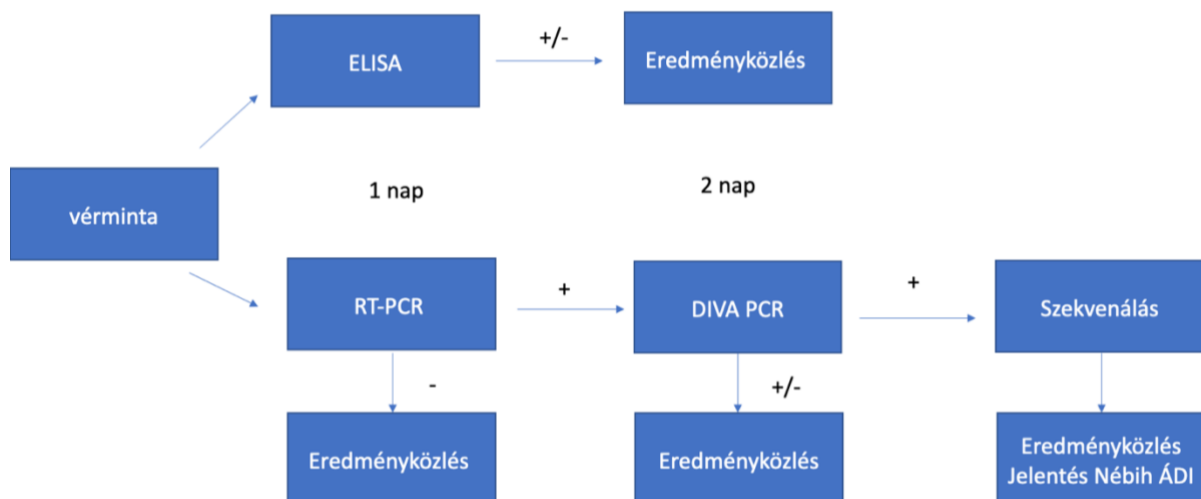
Az élő vírusos vakcinák szekvenciaelemzését a „similarity network” filogenetikai elemzés (Bálint és mtsai., 2020) segítségével végeztük el az egyes vakcinákban lévő vírushoz legközelebbi, leghasonlóbb szekvenciák azonosítására. A vizsgálatban szereplő vírusvakcinák a következők voltak: Porcilis MLV[®] PRRS vakcina (gyártó: MSD Animal Health, Madison, NJ, USA), Unistrain PRRS vakcina (korábban: Amervac) (gyártó: Laboratorios Hipra, S.A., Amer, Spanyolország), Reprocyc PRRS EU vakcina (gyártó: Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Németország).

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 szekvenciaelemzés vizsgálatnak a célja az volt, hogy az immunizálást követően hogyan alakul az adott vakcina vírus ORF5/ORF7 szekvenciája a standardhoz viszonyítva a Magyarországon használt vakcinák esetében. Valamint feltételeztük, hogy ezen vizsgálat segítségünkre lesz DIVA Taqman rRT-PCR-t fejlesztésében.

A DIVA PCR-hez szükséges primereket és próbákat úgy terveztük, hogy 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

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.

A DIVA PCR gyakorlati alkalmazását négy magyarországi sertés telepen, olyanok bevonásával, amelyek részt vettek a PRRS mentesítési programban. 2017 és 2019 között 38 447 különböző korcsoportból származó mintát vizsgáltunk meg kereskedelmi forgalomban kapható ViroReal PRRSV RT-PCR Kit (Ingenetix, Ausztria) segítségével, olyan telepek részvételével, melyek az immunizációs programjukat élő vírusos vakcinával végezték és az élő vakcinák esetében a Porcilis MLV[®]-t használták. Minden olyan mintát, melyet a kereskedelmi forgalomban kapható kittel pozitívrá értékeltünk megvizsgáltuk a fejlesztett DIVA PCR-rel. 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 állomány-specifikus PCR-rel PRRSV-re a 2-4 hetes választás előtti malacait leselejtezték.



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

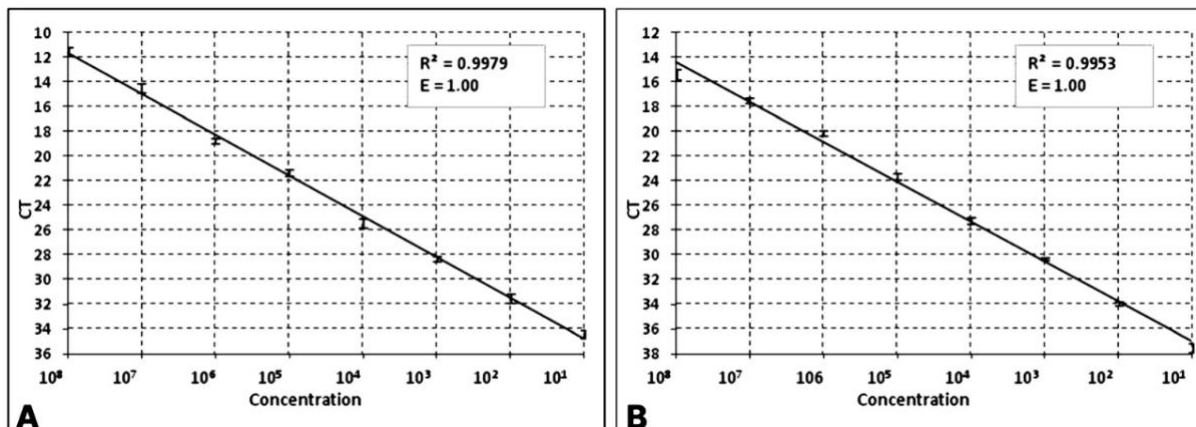
Eredmények

A vakcinák ORF5 szekvencia vizsgálata során 832 ORF5 szekvenciát vizsgáltunk. Azt találtuk, hogy volt 618 db Porcilis MLV[®] ORF5 szekvencia, amely legalább 98%-os hasonlóságot mutatott a Porcilis PRRS vakcinában található törzzsel. E szekvenciák közül 328 (53,1%) volt 100%-ban azonos a vakcinatörzs ORF5 szekvenciájával (beleértve a Porcilis PRRS vakcinatörzset is), 264 (42,7%) 99,1 és 99,9% közötti hasonlóságot mutatott, és 26 (4,2%) 98-99%-os hasonlóság volt. Az Amervac vakcina esetében 179-et találtunk legalább 98%-ban hasonlóknak az Unistrain PRRS vakcinában lévő törzshöz. E szekvenciák közül négy (beleértve az Amervac és Unistrain vakcinatörzseket és két nemzetközi szekvenciát: DQ345725.1 (MLV vakcina) és JQ040769.1 (AN0708EU_1 klón) 100%-ban ORF5 szekvenciájával. 70 (39,1%) szekvencia 99%-os hasonlóságot mutatott, míg 105 (58,7%) szekvenciában 99% alatti, de több mint 98%-os hasonlóság volt megfigyelhető. A magyar sertésállományokban kimutatott szekvencia egyike sem volt 100%-ban azonos a PRRSV törzs ORF5 szekvenciájával az Unistrain PRRS vakcinában, hiszen telepspecifikus kládok alakultak ki. 4 db nem az állomány immunizálásából származó szekvencia, hanem a vakcina eredeti vírusának a szekvenciája. A Reprocyc vakcina esetében 35 ORF5 szekvencia mutatott legalább 98%-os hasonlóságot a Reprocyc PRRS EU vakcinában található vírustörzzsel. Ezek közül a szekvenciák közül három (8,6%) – köztük a Reprocyc vakcinatörzs – teljesen azonos volt a vakcinatörzs ORF5 szekvenciájával. 11 (31,4%) és 21 (60%) szekvencia esetében a hasonlóság 99,1 és 99,9% között volt, illetve kevesebb, mint 99%, de több mint 98%. Ebben az esetben is telepspecifikus kládok alakulnak ki. 3 db szekvencia volt, amely a vakcina vírusának szekvenciája (1 db Reprocyc, 1 db Reprocyc PRRS-Flex vakcina és 1 db Genbankból).

A vakcinák ORF7 vizsgálatánál összesen 478 különböző hazai és GenBankban található PRRSV ORF7 szekvencia közül a standard vakcina vírus szekvenciához 98%-nál nagyobb mértékben hasonlító szekvenciákat elemeztünk. 88 db olyan szekvencia volt, melyet tudtunk elemezni, ebből 51 db Porcilis MLV[®], 29 db Amervac és 8 db Reprocyc ORF7 szekvencia. Az ORF7 szekvencia vizsgálatánál kevesebb adat állt rendelkezésünkre, így az eredmények felbontása jóval alacsonyabb volt, de megerősítette az előzőekben kapott eredményeinket. Kimondható, hogy az ORF7 gén konzervatívabb szakasz.

A standard görbékét a Porcilis MLV[®], és PRRSV 30040/2017 NÉBIH törzsekkel állítottuk be, a tízszeres RNS hígítások tesztjeinek eredményeit felhasználva. 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 tervezésénél, melyeket szintén tízszeres RNS hígításokkal

állítottunk be. A PCR hatékonysága (E) 1 volt, míg a korreláció hatékonysága (R^2) mindkét esetben 0,99 volt. 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.



2.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.

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 a kisebb változat kópiaszám aránya 0,1% feletti (1. Táblázat).

1. 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.

A mentesítés alatt álló gazdaságban 38477 szérum mintából 3164 minta volt PRRSV RT-PCR pozitív, melyet első körben ViroReal PRRSV EU/NA Real-Time PCR Kittel vizsgáltunk meg. Ezeket a pozitív mintákat diszkriminatív eljárásnak vetettük alá RT-PCR vizsgálattal 2017 és 2019 között (2. Táblázat). Az eredmények a diszkriminatív RT-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 szevenálással.

2. Táblázat: A mentesítési program során a DIVA Real-Time RT-PCR teszttel vizsgált telepek pozitív mintáinak éves és korcsoportos megoszlása.

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 (7,4)	233 (7,4)	14 270	1043 (7,3)	349 (2,4)	21 025	1820 (8,7)	184 (0,9)

Az „A” telep egy fialástól választásig típusú, 2000 kocával. Kocaállomány tömeges vakcinázása történt kétszer, 1 hónapos időközzel a Porcilis MLV[®], vakcinával. A vakcinázást követően zárt állomány volt. 2019 januárjában 1minta/alom rRT-PCR-rel, majd 2019 februárjától 3minta/alom Real-Time PCR és DIVA PCR vizsgálatát végeztük.

Ezen telep vizsgálatánál arra voltunk kíváncsiak, hogy kétszeri koca vakcinázás megállítja-e a vadvírus átadását a malacokra?

3. 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%)

Az „B” telep egy fialástól vágásig típusú, 870 kocával. Kocaállomány tömeges vakcinázása történt negyedévente Porcilis MLV[®], vakcinával. Régóta immunizált állományban is találtunk olyan mintát, ami vadvírus pozitív. Ahhoz, hogy biztosak tudjunk lenni abban, hogy a választott malac nem kapott-e vadvírust, ahhoz 3 malac/alom vizsgálatra van szükség (2% prevalencia). A cél az volt, hogy a DIVA PCR módszerrel meghatározzuk, maradt-e az állományban vadvírus ürítő koca.

4. 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

Az „C” telep egy fialástól vágásig típusú, 1400 kocával. Kocaállomány tömeges vakcinázása történt negyedévente Porcilis MLV vakcinával. Ezen a telepen is három malac/alom vizsgálatát végeztük DIVA PCR-rel PRRSV jelenlétére, és a pozitívokat szekvenáltuk. 2018 szeptemberében minden olyan kocát leselejtezték, amelyek 3 hetes malacai vad típusú PRRS vadvírusra pozitívoknak bizonyultak. Sikerült elérni, hogy a kocák nem fertőzik megszületett malacukat, azok választásig PRRS vadvírus mentesen felnevelhetőek.

5. 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%)

Az „D” telep egy fialástól vágásig típusú, 850 kocával. A mentesítési terv módszere tenyészállomány negyedévenkénti immunizálása mellett utódállomány immunizálásának megszüntetése és fertőzés mentes felnevelésének biztosítása belső járványvédelmi módszerekkel és laboratóriumi vizsgálatokkal. 2020 januárjától kezdődően almonként 3 malacot vizsgáltunk meg ELISA, PCR és DIVA PCR laboratóriumi vizsgálatokkal és a pozitívokat szekvenáltuk. A cél az volt, hogy PRRS mentes, vakcinázott státuszt (MV) elérje a telep, a DIVA PCR vizsgálat során vírusra pozitív egyedek selejtezése életkortól függetlenül megtörténjen.

6. 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/%	db/%
összesen	4761	5049	3456	1930	3058	1977	1632	5277	3721	
negatív	2913	61%	2763	55%	2532	73%	1803	93%	3027	99%
pozitív	1848	39%	2286	45%	924	27%	127	6,6%	31	1%
PCR										
összesen	4761	5049	3456	1930	3058	1977	1632	5277	3721	
negatív	4389	92%	5013	99%	3456	100%	1639	85%	3025	99%
pozitív	372	7,8%	36	0,7%	0	0%	291	15%	33	1%
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	0%	279	96%	27	82%
vadvírus	6	1,6%	0	0	6	2,1%	0	0	0	

Megbeszélés

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

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 RT-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 részvevő telepek összes PRRSV pozitív mintájára alkalmaztuk a DIVA RT-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 a kisebb vírustörzs aránya 0,1% körül volt.

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 (Fornyo 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 RT-PCR módszer alkalmazásával.

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 RT-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, helyzetekben, amikor a vad típusú PRRSV fertőzések a PRRSV mentes állományok közvetlen közelében fordulnak elő az állományban, a diszkriminatív RT-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.

A doktori kutatás eredményeiből származó közlemények

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*.

Irodalom jegyzék

- 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.
- 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.
- 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.
- 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*.
- Hornyák, Á., Pálfi, V., & Karakas, M. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome szerológiai felmérése Magyarországon. *Akadémiai beszámoló*, 10.
- 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.
- 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.
- 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.
- Szabó, P. M., Szalay, D., Kecskeméti, S., Molnár, T., Szabó, I., & Bálint, Á. (2020). Investigations on spreading of PRRSV among swine herds by improved minimum spanning network analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.
- 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.