

Állatorvostudományi Egyetem

Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok Doktori Iskola

Afrikai sertéspestis vírus tanulmányozása szövettenyésztésben és primer makrofágokban

PhD értekezés

Tamás Vivien Mária

2024

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Zádori Zoltán PhD

Állatorvostudományi Kutatóintézet

HUN-REN Magyar Kutatási Hálózat

témavezető

Készült példányban. Ez a(z) sz. példány.

.....

Tamás Vivien Mária

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2. ÖSSZEFOGLALÁS	8
3. BEVEZETÉS	12
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	14
4.1. AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUSÁNAK MORFOLÓGIÁJA.....	14
4.2. A VÍRUS GENOMSZERVEZŐDÉSE.....	15
4.2.1. Az MGF géncsalád tagjai	16
4.3. SEJTBE VALÓ BEJUTÁS ÉS SEJTEN BELÜLI TRANSPORT	18
4.4. REPLIKÁCIÓ	19
4.5. GENO- ÉS SZEROTÍPUSOK.....	21
4.5.1. Az afrikai sertéspestis szekvenálásának problémái	22
4.6. AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS ELLENI IMMUNVÁLASZ	23
4.6.1. Veleszületett immunitás	23
4.6.2. Szerzett immunitás	24
4.6.3. Az antitestek szerepe az ASPV elleni védelemben	25
4.6.4. Specifikus gének szerepe a virulencia és az immunitás kialakításában	26
4.7. AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS ELTERJEDÉSE.....	28
4.8. JÁRVÁNYTAN	29
4.9. KÓROKTAN, KÓRFEJLŐDÉS TÜNETEK.....	31
4.10. VAKCINAFEJLESZTÉS.....	34
4.10.1. A vakcinafejlesztés kihívásai.....	34
4.10.2. Inaktivált vakcinák.....	34
4.10.3. Aleggység vakcinák, vektor vakcinák és DNS-vakcinák	35
4.10.4. Élő, attenuált törzsek.....	36
4.10.5. Élő, attenuált vakcinák	38
5. CÉLKITŰZÉSEK.....	42
6. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	43
6.1. SERTÉS ALVEOLÁRIS MAKROFÁGOK (PAM) ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS FENNTARTÁSA	43
6.2. SZEKVENÁLÁS.....	43
6.2.1. Vírusfertőzés.....	43

6.2.2. DNáz I kezelés.....	43
6.2.3. DNS-tisztítás	43
6.2.4. Kvantitatív PCR a DNS tartalom meghatározására	44
6.2.5. Aspecifikus DNS-amplifikáció	44
6.2.6. Az amplifikált DNS tisztítása	44
6.2.7. IonTorrent szekvenálás.....	44
6.2.8. Illumina szekvenálás.....	45
6.2.9. Mapping és a genom szekvenciák összeállítása	45
6.2.10. Sanger-szekvenálás	46
6.3. A MÓDOSÍTOTT VÍRUSOK ELŐÁLLÍTÁSA.....	46
6.3.1. Plazmidtervezés és az Lv17/WB/Rie1/d110-11L konstrukció összeállítása.....	46
6.3.2. Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L konstrukció előállítása	48
6.3.3. Az Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL konstrukció előállítása	49
6.3.4. Az Lv17/WB/Rie1/d24 konstrukció előállítása	49
6.4. A VÍRUSOK IZOLÁLÁSA.....	49
6.5. A VÍRUS STOCKOK ELŐÁLLÍTÁSA	50
6.6. IMMUNFLUORESZCENS FESTÉS (IF) ÉS TITERMEGHATÁROZÁS	50
6.7. KÓPIASZÁM MEGHATÁROZÁS.....	50
6.8. A MUTÁNS VÍRUSOK SZEKVENCIA ADATAINAK VIZSÁLATA	51
6.9. STATISZTIKAI ELEMZÉS	51
7. EREDMÉNYEK.....	52
7.1. ÚJGENERÁCIÓS SZEKVENÁLÓ MÓDSZER FEJLESZTÉSE.....	52
7.1.1. A PAM sejtek fogékonyságának vizsgálata	52
7.1.2. Az ASPV fertőzési dinamikájának vizsgálata	53
7.1.3. A DNS mennyiségi meghatározása és a vírus DNS maximalizálása	54
7.1.4. A gazdag genom DNS-sel való szennyeződésének minimalizálása	54
7.1.5. A vírus-DNS nem specifikus amplifikációja	55
7.1.6. Az ASPV genom NGS szekvenciaelemzése	57
7.2. AZ AZ LV17/WB/RIE1/D110-11L KONSTRUKCIÓ TULAJDONSÁGAI.....	59
7.2.1. Az MGF-110 11L gén tulajdonságai.....	59
7.2.2. Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L vírus előállítása és szekvenálása.....	61
7.2.3. Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L szaporodása PAM sejteken	63
7.3. AZ LV17/WB/RIE1/D110-11L KONSTRUKCIÓ TULAJDONSÁGAI.....	64
7.3.1. Az Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL vírus előállítása és szekvenálása.....	64
7.4. AZ LV17/WB/RIE1/D24 KONSTRUKCIÓ TULAJDONSÁGAI	66
7.4.1. Az Lv17/WB/d24 vírus előállítása és szekvenálása	66
7.4.2. Az Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL és Lv17/WB/Rie1/d24 vírusok szaporodása PAM sejteken.....	68

8. MEGBESZÉLÉS	71
8.1. ÚJGENERÁCIÓS SZEKVENÁLÓ MÓDSZER FEJLESZTÉSE	71
8.2. SZEKVENÁLÁSI EREDMÉNYEK.....	71
8.2.1. A vírus DNS-tartalom maximalizálása	71
8.2.2. A gazdagenom DNS-sel való szennyeződésének minimalizálása	72
8.2.3. Teljes genom amplifikáció és a szekvenálási eredmények értékelése	72
8.2.4. A szekvenálási protokoll munkafolyamata.....	73
8.3. AZ LV17/WB/D110-11L VÍRUS TULAJDONSÁGAI	74
8.4. AZ LV17/WB/DCD-DGL VÍRUS TULAJDONSÁGAI	76
8.5. AZ LV17/WB/D24 VÍRUS TULAJDONSÁGAI	77
8.6. AZ LV17/RIE/D110-11L, LV17/WB/D24 ÉS AZ LV17/WB/DCD-DGL VÍRUSOK <i>IN VIVO</i> TULAJDONSÁGAI.....	79
9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	81
10. IRODALOMJEGYZÉK	82
11. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	105
11.1. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEIBŐL SZÜLETETT, LEKTORÁLT, IMPAKT FAKTORRAL BÍRÓ... TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK.....	105
11.2. A DOKTORI DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK	106
11.3. KONFERENCIA ÖSSZEFOGLALÓK	106
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	108
13. MELLÉKLETEK.....	109
1. MELLÉKLET – KÜLÖNBÖZŐ ASPV TÖRZSEK PRIMER SEJTEKEN TÖRTÉNŐ PASSZÁLÁSAKOR BEKÖVETKEZŐ VÁLTOZÁSOK ÖSSZEFOGLALÁSA	109
2. MELLÉKLET – KÜLÖNBÖZŐ ASPV TÖRZSEK SEJTKULTÚRÁKON TÖRTÉNŐ PASSZÁLÁSAKOR BEKÖVETKEZŐ VÁLTOZÁSOK ÖSSZEFOGLALÁSA	110
3. MELLÉKLET – AZ MGF FEHÉRJÉK ÖSSZEFOGLALÁSA KÜLÖNBÖZŐ ASPV TÖRZSEKBEN.....	111

1. Rövidítések jegyzéke

A, C, G, T	adenine, cytosine, guanine, thymine	adenin, citozin, guanin, timin
ASP	African Swine Fever	afrikai sertéspestis
ASPV	African Swine Fever Virus	afrikai sertéspestis vírusa
bp	base pair	bázispár
BSA	bovine serum albumin	szarvasmarha szérum albumin
CRISPR-Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR- associated nuclease 9	rövid, fordított ismétlődésekkel elhatárolt szekvenciák genomi régiója/CRISPR-kapcsolt nukleáz 9
Ct	threshold cycle	ciklusszám
DC	dendritic cell	dendritikus sejt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbecco féle módosított Eagle médium
DMSO	Dimethyl-sulfoxide	dimetil-szulfoxid
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecesav
eGFP	enhanced green fluorescent protein	felerősített zölden fluoreszkáló fehérje
ER	endoplasmatic reticulum	endoplazmatikus retikulum
FBS	fetal bovine serum	magzati szarvasmarha szérum
FFU	fluorescent focus unit	fluoreszcens fókusz egység
gRNS	guide RNS	irányító RNS
HA	hemadsorption	hemadszorpció
HAI	hemadsorption inhibition test	hemadszorpció gátlási teszt
hpi	hours post infection	a fertőzés óta eltelt órák
IF	immunofluorescence	immunfluoreszcens
IFN	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin
Lv17	Lv17/WB/Rie1	litván vaddisznóból izolált törzs
LVR	left variable region	bal oldali változó régió
MGF	multi gene family	multigén család
MLV	modified live vaccine	módosított élővírusos vakcina
MOI	multiplicity of infection	fertőzés multiplicitása
MTOC	microtubule organizing center	mikrotubulus-szervező központ
mRNA	messenger RNS	hírvivő RNS

mtsai	colleagues	munkatársai
NGS	next-generation sequencing	újgenerációs szekvenálás
NK sejt	natural killer cell	természetes ölüsejt
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PAM	porcine alveolar macrophage	sertés alveoláris makrofág
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
qPCR	quantitative PCR	kvantitatív PCR
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Médium
RVR	right variable region	jobb oldali változékony régió
WGA	whole genome amplification	teljes genom amplifikáció

2. Összefoglalás

Az afrikai sertéspestis (ASP) továbbra is a házisertéseket (*Sus scrofa domestica*) és a vaddisznókat (*Sus scrofa*) érintő egyik legveszélyesebb vírusos betegség, amely jelentős gazdasági és állategészségügyi károkkal jár. A közelmúltbeli ázsiai és európai járványkitöréseket követően Amerikában is megjelent a betegség. A vírus terjedésének megakadályozásához és a világjárvány leküzdéséhez sürgősen hatékony vakcinákra van szükség.

Bár a természetben előforduló, alacsony virulenciájú törzsek alapot kínálnak egy hatékony élővírus-tartalmú vakcina kifejlesztéséhez, de a virulenciában és az immunválaszban szerepet játszó gének deléciója kiszámíthatatlan és váratlan eredményekhez vezethet. A módosulások, továbbá a természetben előforduló törzsek evolúciójának jobb monitorozásához egyszerűen alkalmazható genomszekvenálási módszerre van szükség, ezért munkánk során először egy megbízható újgenerációs szekvenálási módszert fejlesztettünk ki. A technika segítségével alapvető laboratóriumi eszközök használatával, Illumina platformon és esetlegesen mindössze három Sanger-szekvenálás alkalmazásával gyorsan és pontosan meghatározható az afrikai sertéspestis vírusának teljes genom szekvenciája.

A természetes úton attenuálódott Lv17/WB/Rie1 (Lv17) törzs alkalmas jelöltnek tűnik egy hatékony élővírus-tartalmú vakcina kifejlesztésére, rekombinációs technikákkal végrehajtott génmódosítások után. Ezen technikák alkalmazásával vizsgáltuk az Lv17 vírussal történő rekombináció (illegitim és homológ) jelenségét különböző szövetekben. Kísérleteink során három rekombináns vírust állítottunk elő (Lv17/d110-11L, Lv17/dCD-d8CR-dGL, Lv17/d24).

Először genetikailag módosítottuk az Lv17 genomját a CRISPR-Cas9 rendszer segítségével. Feltételeztük, hogy az MGF 110 géncsalád egyik génjének deléciója javíthatja a vírus élő attenuált vakcinaként való alkalmazhatóságát. Bár az MGF-110 11L gén deléciója valóban gyengítette a vírus replikációs képességét PAM sejteken és enyhítette a vírus által okozott tüneteket, de az attenuáció mértéke nem érte el a vakcina vírusoktól elvárt szintet.

Ezen felül kutatócsoportunkban előállított gendeletált (dCD2v, d8CR és d9GL) Lv17 vírusok keresztezésével vizsgáltuk az ASPV homológ rekombinációs képességét PAM sejteken, melynek során bebizonyítottuk, hogy különböző ASPV törzsek PAM sejteken történő koinfekciója során homológ rekombináció történik, és az így létrejövő vírusok egyszerűen izolálhatóak.

Az ASPV *in vitro* rendkívül rosszul szaporítható, csak sorozatpasszálást követően képes szaporodni néhány sejtvonalon, és ez többnyire kiszámíthatatlan változásokat

okoz a vírus genomjában. A genetikai instabilitás viszont kizáró ok az élővírus-tartalmú vakcinák regisztrációjánál. Ezért munkánk következő fázisa a törzs stabilitásának vizsgálata volt Cos7 sejteken. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy az Lv17/WB/Rie1 genetikailag instabil Cos7 sejtekben, és a jelenlevő vírusállományok nem homogének. A detektálható vírusok többsége mindössze öt passzázs során nagyjából 40 kb-nyi szakaszt veszített a genomjából. Azonban megállapítottuk, hogy az adaptáció során a Cos7 sejteken való passzáláskor nem, vagy nehezen kimutatható minor variánsok is fennmaradhatnak alacsony hígítású passzázsokban. Ezen változatok pedig néhány passzázs során különböző tenyésztési körülmények között, jelen esetben PAM sejtekben, a vírus kvázispeciést meghatározó fő variánssá válhatnak.

2.1. Summary

African swine fever (ASF) is one of the most dangerous viral disease affecting domestic pigs and wild boars, causing significant economic and animal health losses. Following recent outbreaks in Asia and Europe, the disease has also appeared in the Americas. Effective vaccines are urgently needed to prevent the virus from spreading and to combat the pandemic.

Although naturally occurring, low virulence strains provide a basis for the development of an effective live virus vaccine, deletion of genes involved in virulence and immune response could lead to unpredictable and unexpected results. To better monitor these modifications, as well as the evolution of naturally occurring strains, we need an easy-to-use genome sequencing method, therefore in our work, we first developed a reliable next-generation sequencing method to determine the whole genome sequence of ASFV strains. Using basic laboratory tools, on an Illumina platform and possibly a subset of only three Sanger-sequencing, the technique allows rapid and accurate whole genome sequencing of African swine fever virus.

The naturally attenuated Lv17/WB/Rie1 (Lv17) strain appears to be a suitable candidate for the development of an efficient live virus vaccine after genetic modification by recombination techniques. Using these techniques, we investigated the phenomenon of recombination (illegitimate and homologous) with Lv17 virus in different tissues. In our experiments, we produced three recombinant viruses (Lv17/d110-11L, Lv17/dCD-d8CR-dGL, Lv17/d24).

First, we genetically modified the genome of Lv17 using CRISPR-Cas9. We hypothesized that deletion of a gene of the MGF 110 gene family could improve the viability of the virus as a live attenuated vaccine. Although the deletion of the MGF-110 11L gene reduced the replication ability of the virus in PAM cells and mitigated the symptoms caused by the virus, the attenuation did not reach the level expected for vaccine viruses.

In addition, we have investigated the homologous recombination ability of ASFV in PAM cells by crossing Lv17 viruses with gene-deleted (dCD2v, d8CR and d9GL) viruses produced by our research group, demonstrating that homologous recombination occurs when different ASPV strains are co-infected in PAM cells and that the resulting viruses can be easily isolated.

ASFV is extremely difficult to replicate *in vitro* on continuous cell lines, as it can only multiply on a few cell lines after serial passaging, and this causes mostly unpredictable changes in the viral genome. Genetic instability is an exclusion factor in the registration of live virus vaccines, therefore, the next phase of our work was to study

the stability of the Lv17 strain in Cos7 cells. Our results clearly show that Lv17 is genetically unstable in Cos7 cells, and the present virus populations are not homogeneous. The majority of detectable viruses lost around 40 kb of their genome in just five passages. However, we have found that minor variants that are undetectable or difficult to detect during passaging in Cos cells may persist in low dilution passages during adaptation. These variants may then become major variants determining the quasispecies of the virus in a few passages under different culture conditions, in this case in PAM cells.

3. Bevezetés

Az afrikai sertéspestis (ASP) jelenleg az egyik legnagyobb gazdasági és állategészségügyi kártétellel járó vírus, amely a sertésállományt veszélyezteti. A betegség vérzéses, lázas tünetekkel jár, kórokozója az afrikai sertéspestis vírusa (ASPV), amely házi sertésekben (*Sus scrofa domestica*) és vaddisznókban (*Sus scrofa*) akár 100%-os elhullást is okozhat.

A vírus elleni védelmet hátráltatja, hogy jelenleg nem rendelkezünk hatékony vakcinával az ASPV ellen, így az egyetlen védekezési lehetőség a megelőzés. A védekezést tovább nehezíti, hogy a vírus rendkívül ellenálló a környezeti hatásokkal szemben. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy akár hónapokig is fertőzőképes marad elhullott állati tetemekben és bizonyos húskészítményekben, illetve aeroszol útján is képes fertőzni.

A kór terjedésének szempontjából fontos járványügyi vizsgálatok, a vírussal kapcsolatos egyéb kutatások, a létrehozott vakcinajelöltek ellenőrzése és a vakcinafejlesztés érdekében elengedhetetlen egy egyszerű és reprodukálható módszer fejlesztése az ASPV teljes genomjának szekvenálására. A nagy genomméret miatt a vírus szekvenciája leggyorsabban újgenerációs szekvenálási módszerekkel határozható meg, azonban az ASPV teljes genomjának szekvenálását számos technikai probléma nehezíti.

Bár a vírus felfedezése után nem sokkal megkezdődtek a vakcinafejlesztési kísérletek, azonban a hagyományos megközelítések nem hozták meg a kívánt hatást. A legjobb kísérleti eredményeket élő, attenuált vírusokkal érték el, de eddig sem a természetesen attenuált törzsek, sem pedig az egygénes deléciókat tartalmazó genetikailag módosított vírusok nem vezettek teljes sikerhez. A többgénes deléciókat tartalmazó vakcinajelöltekkel végzett kísérletek számos esetben biztató eredményeket mutattak, azonban még nem vezettek áttöréshez. A többgénes deléciót tartalmazó vakcinatörzsek előállításánál kihívást jelent, hogy számtalan ASPV-fehérje funkciója a mai napig ismeretlen.

Az attenuált vakcinák fejlesztését, továbbá az ismeretlen funkciójú fehérjék vizsgálatát sok esetben homológ rekombináción alapuló célzott génmódosítással végzik. A rövid, fordított ismétlődésekkel elhatárolt szekvenciák genomi régiója/CRISPR-kapcsolt nukleáz 9 (CRISPR-Cas9) rendszer által indukált kettősszálú törések viszonylag nagy gyakoriságú rekombinációt indukálnak az ASPV és a transzfer plazmidok között, illetve néhány közvetett bizonyíték is van arra, hogy a homológ rekombináció hozzájárul az ASPV evolúciójához, azonban az ASPV genomok közötti homológ rekombinációra vonatkozó kísérleti bizonyítékot még nem publikáltak.

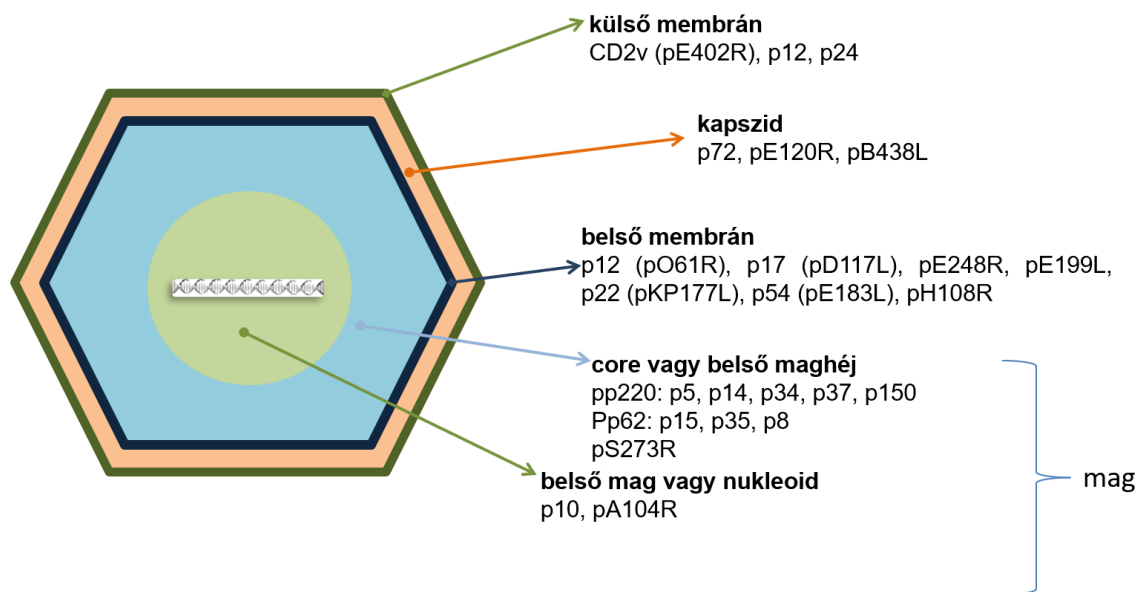
A vakcina kifejlesztését nagymértékben hátráltatta, hogy sokáig nem állt rendelkezésre olyan gazdaeredetű sejtvonala, amelyen az ASPV nagy titerben és stabilan szaporítható lenne. Bár egyre több, ígéretesnek tűnő sejtvonallal szülő kutatás érhető el, a vírus genetikai stabilitását igénylő legtöbb kísérletet jelenleg sertés eredetű primer makrofágokon végzik. A makrofágokon történő munkát nehezíti, hogy a sejtek izolálása költséges, időigényes és a kísérletek nehezen reprodukálhatók. A természetben előforduló törzsek vagy vakcinajelöltek adaptálása immortalizált sejtenyészetre szinte mindig jelentős genetikai változásokkal jár, a vírusgenom nagymértékű módosulása és átrendeződése figyelhető meg, mely a parentális törzsek immunogén tulajdonságainak megváltozásával is járhat.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Az afrikai sertéspestis vírusának morfológiája

Az afrikai sertéspestis vírusa nagyméretű, burkos, ikozaédes szimmetriájú vírus, amely az *Asfarviridae* család egyedüli tagja. Bár szerkezetében, genomszervődésében és replikációs jellemzőiben hasonló más nagy méretű DNS vírusokhoz (*Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae*, *Ascoviridae*, *Marseilleviridae*), az afrikai sertéspestis vírusa egyedi tulajdonságai miatt mégis elkülönül a rend többi tagjától, így a korábban monofiletikus *Megavirales* rendből átsorolták az *Asfuvirales* rendbe (ICTV, 2023).

Az ASPV szerkezete összetett, több koncentrikus rétegből áll és jelenlegi ismereteink szerint több mint 50 fehérjét tartalmaz (Carrascosa et al., 1984; Yang et al., 2023) (4.ábra). Átlagos átmérője 200 nm, azonban kínai gazdaságokból izolált vírusok közül kimutattak 260-300 nm átmérőjű vírusokat is (Wang et al., 2019).



4. ábra: Az ASPV virionjának szerkezete

A belső mag (nukleoid) tartalmazza a genomot. Itt legnagyobb mennyiségben két szerkezeti fehérje található, a p10 és a hisztonszerű pA104R. A belső magban ezek mellett főként a vírus replikációjáért és transzkripciójáért felelős fehérjék fordulnak elő (Salas and Andrés, 2013). A nukleoidot egy vastag fehérjeréteg, a maghéj (core) borítja, amely a virion tömegének legnagyobb részét teszi ki. A maghéj két poliprotein, a pp220 (p150, p37, p34, p14 és p5) és a pp62 (p35, p15 és p8) termékeiből épül fel, amelyeket a S273R cisztein-proteáz hasítja. A pp220 kulcsszerepet játszik a mag összeépülésében, beleértve a genom becsomagolásához, a kondenzációhoz és a vírus nukleoprotein

felvételéhez vezető lépéseket is (Andrés et al., 2002). A legújabb elektronmikroszkópos kutatások kimutattak egy belső kapszidot is (Andrés et al., 2020), amely szintén a pp220 és pp62 hasítási termékiből áll. A core és a belső kapszid viszonya, illetve pp220 és pp62 fehérje hasítási termékeinek pontos elhelyezkedése ezekben a rétegekben még nem tisztázott.

A belső maghéjon kívül egy endoplazmatikus retikulum (ER) eredetű belső membrán helyezkedik el, amely számos transzmembránfehérjét tartalmaz. Az itt található fehérjék (p17 és p54) a virion összeépüléséhez szükségesek. A p12, pE248R, pE199L, p54 és p22 fehérjék hasonlóak a vaccinia vírus fúziós komplexét alkotó fehérjékhez, a belső membrán és az endoszómamembrán fúziójában vesznek részt, elősegítik a vírusmag bejuttatását a sejt citoplazmájába (Suárez et al., 2010a). Bár a pH108R fehérje jelenlétét is kimutatták a belső membránban, funkciója még nem ismert.

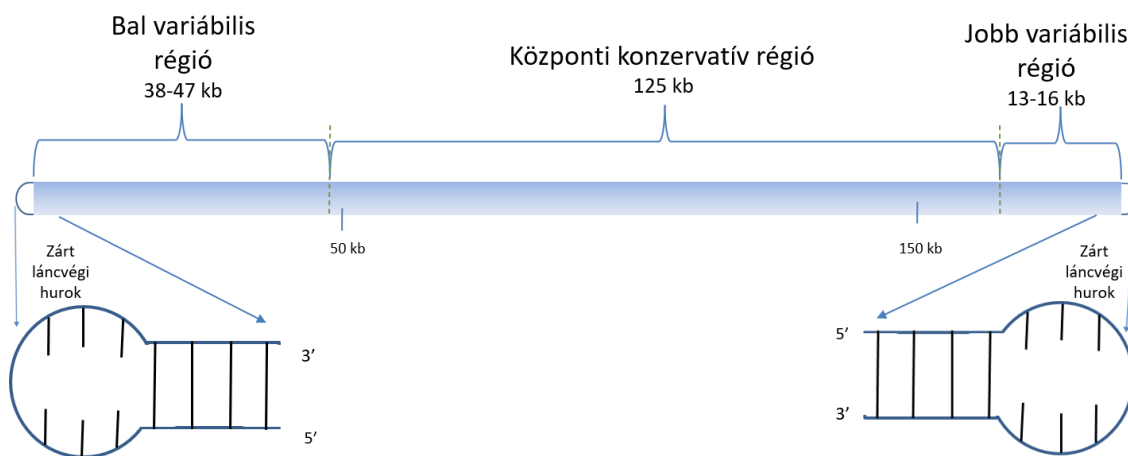
Az intracelluláris virionok legkülső rétege a kapszid, mely nagyrészt p72 fehérjéből áll, de megtalálható benne két másik kapszidalkotó fehérje is. Az egyik a pE120R, amely a sejtmembrán irányába történő transzportban játszik szerepet, a másik a pB438L, amely a virion ikozaéderes alakjának kialakulásáért felel (García-Escudero et al., 1998).

Az extracelluláris virionok egy további külső burokkal rendelkeznek, amely a bimbózási folyamat során kerül rájuk. A gazda eredetű fehérjéken kívül itt található a CD2v (pE402R), amely homológ a sertések T-limfocitáinak antigén felismerésében részt vevő CD2 fehérjéjével, és a limfociták gátlásában, illetve a fertőzött sejtek hemadszorpciójában és az immunválasz szabályozásában vesz részt. Mind az intracelluláris érett vírusrészecskék, mind a burkos, extracelluláris vírusrészecskék fertőzőképesek (Galindo and Alonso, 2017). A hemadszorpcióban szintén részt vevő C-típusú lektin (pEP152R) is vélhetően a külső burookban helyezkedik el, azonban jelenlétét eddig nem sikerült kísérletesen igazolni (Zhu, 2022). Egyes adatok szerint a külső burookban helyezkedik el a p12 fehérje is, amely elősegíti a vírusrészecskék adszorpcióját a gazdasejteken (Angulo et al., 1992), illetve itt található a p24 is, melynek pontos funkciója nem ismert (G. Wang et al., 2021).

4.2. A vírus genomszerveződése

Az ASPV az egyetlen ízeltlábú vektorok által terjesztett DNS-vírus (Dixon et al., 2019), örökítőanyaga izolátumtól függően 170-193 kbp hosszú, kettős szálú DNS. A DNS két végén fordítottan ismétlődő szekvenciák találhatóak, amelyek kovalensen zárt hajtúszerkezetet képeznek (5. ábra). A genom tartalmaz egy kb. 125 kb hosszú, erősen konzervált központi régiót, valamint mindkét végén egy-egy változó hosszúságú régiót. Az általuk kódolt fehérjéket öt multigén családba (MGF) sorolhatjuk. Az MGF-be tartozó

gének szekvenciái hasonlóak, számukban jelentős változások figyelhetők meg az ASPV evolúciója során (Blasco et al., 1989). A vírus genomja több mint 150 nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, de az ASPV gének közel felének funkciója még mindig ismeretlen. A strukturális információk lehetővé teszik a vírusfertőzés mechanizmusainak jobb megértését, és bár az ASPV strukturális felépítését krio-elektronmikroszkópos módszerekkel is vizsgálják, a felbontás még nem elegendő az egyes fehérjekomponensek szerkezeti részleteinek megjelenítéséhez. Eddig az ASPV fehérjék közel felének szerkezetét és funkcióját sikerült csak tisztázni; ezek közül néhány szerkezeti fehérje, míg mások a vírus túléléséhez szükséges speciális feladatok ellátására expresszálnak, azaz a DNS-replikációban, a génátírásban és a fehérjemódosításban résztvevő enzimek (G. Wang et al., 2021).



5. ábra: Az ASPV genomszerveződése

4.2.1. Az MGF géncsalád tagjai

Az MGF-ek öt családba sorolhatók, ezek az MGF-100, MGF-110, MGF-300, MGF-360, MGF-505 vagy -530. Az MGF-300, -360 és -505 tagjainak N-terminális végei nagyon hasonlóak egymáshoz, a szekvenciaelemzések során kapott eredmények arra utalnak, hogy az MGF gének génduplikációk útján alakultak ki, egymással paralógok (Vega et al., 1990). Az ASPV genomjában a vírus evolúciója során bekövetkező leggyakoribb változások is az MGF fehérjék kópiaszámának növekedésében vagy csökkenésében figyelhetők meg (Zhu et al., 2021).

Bár a legtöbb MGF által kódolt fehérje funkciója ismeretlen, az eddigi kutatások szerint az MGF fehérjék fontos szerepet játszhatnak a vírus életciklusában, beleértve a transzkripciót, a translációt, a virulenciát és különböző immunszökési mechanizmusokat (Zsak et al., 2001; Neilan et al., 2002; Afonso et al., 2004). Megerősítést nyert, hogy az MGF-360/530 gének képesek elnyomni az I. típusú interferon (IFN) választ (Afonso et al., 2004). Egy másik kísérletben kimutatták, hogy egy mutáns vírus, amelyből két MGF

(MGF-360 és MGF-530) géncsalád három tagja hiányzott, bár makrofág tenyészetekben képes volt szaporodni, sertésben elvesztette a virulenciáját (Neilan et al., 2002).

A legtöbb ASPV izolátum legalább 4 különböző, az MGF-100 géncsaládba tartozó gént tartalmaz. Az MGF-100 1L, I7L és I8L a jobb terminális variábilis régióban található, és csak az MGF-100 1R található a bal terminális variábilis régióban (Vydelingum et al., 1993). Bár ezeknek az MGF-100 géneknek ismeretlen a funkciója, az I7L és az I8L nem esszenciális gének a vírus életciklusában. Egy közelmúltban végzett vizsgálatban azonban egy 5 génből álló (I7L, I8L, I9R, I10L és I11L) géncsoport deléciója, amely gének közül kettő az MGF-100 közé tartozott (MGF-110 I7L és I8L) jelentősen csökkentette a virulenciát *in vivo* (J. Zhang et al., 2021). Az MGF-100 1R gén erősen konzervált és korai génként íródik át a vírus replikációs ciklusa során, deléciója nem befolyásolja a virulenciát (Liu et al., 2021).

A jelen disszertáció szempontjából legfontosabb MGF-110 család tizenhárom génből áll (1L, 2L, 3L, 4L, 5L, 6L, 7L, 8L, 9L, 11L, 12L, 13L, 14L), amelyek egymás paralógjai. A család valamennyi tagja kizárólag a reverz szárról íródik át. A paralógok nagyfokú variációt mutatnak a törzsek között, számos inszercióval, delécióval és sok esetben fúzióval (Upton, 2020). A vírus szövettenyészetben való sorozatpasszálása gyakran eredményezi az MGF-110 család tagjainak elvesztését (Almendral et al., 1990; Pires et al., 1997). Azok a vírusváltozatok, amelyekből hiányzik a teljes MGF-110, magas titerrel képesek *ex vivo* szaporodni és virulensek, ezért úgy tűnik, hogy az MGF-110 tagjai nem nélkülözhetetlenek sem az *in vitro* replikációhoz, sem az *in vivo* fertőzéshez házisertésben (Agüero et al., 1990). Az MGF-110 fehérjék tulajdonságait elsősorban deléciós mutánsokkal végzett kísérletekkel tanulmányozták, a funkciójukról szerzett ismereteink meglehetősen hiányosak. Az MGF-110 1L az MGF-110 egyetlen tagja, amely minden ASPV izolátumban jelen van, azonban a géndeléciós kísérletek alapján nem befolyásolja a virulenciát (Ramirez-Medina et al., 2021a). Az MGF-110 4L és 6L a pre-Golgi kompartmentben lokalizálódik. Ez a két fehérje részt vehet az ER átrendeződésében a vírusfertőzés során, és ronthatja annak azon képességét, hogy citokintermelésben vagy antigénprezentációban szerepet játszó fehérjéket szintetizáljon (Netherton et al., 2004a). Az MGF-110 5L-6L gén nem játszik szerepet a sertések klinikai tüneteinek kialakulásában (Ramirez-Medina et al., 2022). Az MGF-110 7L aktiválja a gazdaszervezet környezeti stresszre reagáló PERK/PKR-IF2a útvonalát, (Zhong et al., 2022). Az MGF-110 9L gén deléciója egy erősen virulens törzsből a vírus részleges attenuációját eredményezte, ami némileg ellentmond a korábbi megállapításoknak (Li et al., 2021a), miszerint az MGF-110 gének nem szükségesek a vírus fertőzőképességéhez vagy virulenciájához (Agüero et al., 1990).

Az MGF-300 három nyitott leolvasási keretből (ORF) áll, amelyek által leírt fehérjék három jól konzervált, ismeretlen funkciójú domént (I-III domén) tartalmaznak, és aminosav azonosságuk 25-46%. E géncsaláddal kapcsolatos ismereteink szintén hiányosak. Az MGF-300 és MGF-530 fehérjék aminoterminális régiói jelentős hasonlóságot mutatnak egymással és az MGF-360 ORF-ek által kifejezett fehérjék bizonyos régióival. A fehérjéken szignálpeptid és transzmembrán domén nem található, potenciális foszforilációs helyekkel viszont rendelkeznek (Yozawa et al., 1994).

Az MGF-360 géncsaládot a különböző törzsek közötti nagyfokú számbeli variáció jellemzi. A család akár tizenkilenc, a genomban szétszórt paralógból is állhat. Az egyes MGF-360 ORF-ek hossza körülbelül 960-1100 bázispár (bp) (Upton, 2020). Az MGF-360 géncsalád számos példát mutat ortológ fúziókra és csonkolásokra. Kimutatták, hogy az MGF-360 gének némelyikének deléciója a genom bal oldali régiójában lévő MGF-505 géncsalád génjeivel együtt nem eredményezi a rendkívül virulens Georgia 2010 izolátum attenuációját (Ramírez-Medina et al., 2020). Emellett leírták, hogy az *Ornithodoros porcinus* kullancsban az ASPV replikációja specifikus MGF-360 gének (3HL, 3IL, és 3LL) jelenlététől függ (Burrage et al., 2004). Azonban az MGF-360 1L deletált Georgia izolátumával történő kísérleti fertőzése kimutatta, hogy az MGF-360 1L nem nélkülözhetetlen a vírus virulenciájához (Ramírez-Medina et al., 2020) házi sertésben. Az MGF-360 14L részt vesz az IFN-I expresszió szabályozásában és a gyulladás befolyásolása szempontjából kulcsfontosságú cGAS jelátviteli útvonal negatív szabályozásában (Y. Wang et al., 2022).

Az MGF-505 család tíz paralógból áll, amelyek bizonyos mértékű eltérést mutatnak a különböző vizsgált törzsek között. Az egyes MGF-505 paralógok hossza viszonylag szűk határok között változik (~1500-1630 bp), kivéve a 3R-t (843 bp). Ezen géncsalád esetében is számos példát találhatunk ortológ fúzióra és csonkoltságra (Upton, 2020). Az ASPV MGF-505 7R a cGAS-STING útvonal fontos inhibitoraként működik, így részt vesz a vírus által kiváltott IFN indukciós útvonalak és a veleszületett immunrendszer vírusellenes válaszainak gátlásában (Li et al., 2021b). Az MGF-505 7R-t a JAK-STAT1 jelátvitel (sejten belüli fehérjék közötti kölcsönhatás lánc) hatékony inhibitoraként azonosították (Li et al., 2021c). A legújabb kutatások szerint az MGF-505 2R szintén részt vesz a veleszületett immunitás gátlásában (Huang et al., 2023).

4.3. Sejtbe való bejutás és sejten belüli transzport

Az ASPV fertőző ciklusa a vírus adszorpciójával és a gazdasejtbe való belépéssel kezdődik. Az afrikai sertéspestis vírusának elsődleges célsejtjei sertésekben a makrofágok. A korai tanulmányok az ASPV sejtbe való bejutását alacsony pH- és hőmérsékletfüggő folyamatként jellemezték (Valdeira and Geraldes, 1985).

A vírus receptora(i) még mindig ismeretlen(ek). A kutatásokat nehezíti, hogy a csak kapsziddal rendelkező intracelluláris és a külső membránnal rendelkező extracelluláris virionok is fertőzőképesek, illetve technikai problémát jelent a két forma nagy tisztaságú elválasztása. Mivel a két forma felszíne teljesen különböző, így valószínűsíthető hogy más sejtfelszíni receptorok vesznek részt a kötődésükben (Galindo and Alonso, 2017).

Az ASPV korlátozott sejtotropizmusa azonban arra utal, hogy a fertőzéshez makrofág-specifikus receptor szükséges. A sertés makrofágok és monociták ASPV általi sikeres fertőzése a CD163 scavenger receptor expressziójával korrelál. A CD163-t sokáig potenciális receptorjelöltnek gondolták, mivel a molekula elleni monoklonális antitestek képesek voltak blokkolni a primer alveoláris makrofágok fertőzését (Sánchez-Torres et al., 2003). Újabb vizsgálatok azonban kimutatták, hogy a Georgia 2007/1 izolátummal való fertőzéshez nem szükséges a CD163. A CRISPR/Cas9 rendszerrel előállított, a CD163 teljes kiütésével rendelkező génmódosított sertések nem mutattak különbséget a klinikai tünetek, a mortalitás, a patológia vagy a virémia tekintetében (Popescu et al., 2017). E vizsgálatok egyik következtetése az volt, hogy más makrofág felszíni fehérjék is részt vesznek a fertőzés folyamatában. Ezt a bizonyítékot az is alátámasztja, hogy az ASPV *in vivo* a makrofágokon kívül képes endothelsejteket, májsejteket és hámsejteket is fertőzni, amelyekben a CD163 nem expresszálódik. Számos más fehérjéről is feltételezik, hogy részt vehet az ASPV bejutásában (pl. CD45, MHC II), azonban a receptorok pontos meghatározása még várat magára (Li et al., 2022).

A vírus fehérjéi közül a p12, p54 és p30-ról bizonyítottan szerepet játszik a receptorkötésben (Angulo et al., 1992; Gómez-Puertas et al., 1998).

Az ASPV dinamin-függő klatrin-mediált endocitózissal és makropinocitózissal juthat be a sejtbe, de a kutatók fagocitózisra utaló jeleket is találtak a vizsgálatok során. A sikeres bejutáshoz koleszterinre is szükség van. Ezek a mechanizmusok mind a makrofág célsejtben, mind pedig Vero sejtekhez adaptált vírusok vizsgálatával megfigyelhetők (Galindo and Alonso, 2017). A vírus ezután végighalad az endoszomális-lizoszomális kompartment rendszeren. A dekapszidációt a késői multivezikuláris endoszómák savas, pH 5 alatti kémhatása váltja ki (Hernáez et al., 2016).

A dekapszidáció után a belső burok fehérjéi szabaddá válnak, a vírus belső membránja és az endoszóma között fúzió történik, aminek következtében a vírusmag a sejt plazmába, onnét pedig a perinukleáris térbe kerül (Hernáez et al., 2016).

4.4. Replikáció

Az ASPV a saját kódolt DNS-replikációs enzimeit (DNS-polimeráz, DNS-polimeráz X, DNS-ligáz, topoizomeráz II, guanilil-transzferáz, a DNS-helikáz

szupercsaládból 3 enzim és az AP endonukleáz) használja a replikáció elindítására közvetlenül a fertőzés után. Az ezeket a fehérjéket kódoló gének az ASPV genomjának kb. 20%-át teszik ki, így a folyamat a sejt enzimeitől függetlenül is elindulhat. A mikrotubulusok nélkülözhetetlenek a vírusgenom replikációjához, ami a citoplazmában, a sejtmag közelében, a mikrotubulus-szervező központ (MTOC) közelében zajlik (Rojo et al., 1999). A mikrotubulusok polimerizációjának gátlásával a replikációs központ kialakulása is elmarad (Alonso et al., 2001).

A replikáció körülbelül 6 órával a fertőzés után kezdődik. A vírus magjába csomagolt transzkriptáz elindítja a korai mRNS-ek átírását. A vírus p54 polipeptidje szerepet játszik abban, hogy a vírusok hozzá tudjanak kötődni a dineinhez és mikrotubulus mediálta transzport segítségével a replikáció megkezdéséhez a víruspartikulumok a MTOC-ba kerüljenek. A replikációban és a virionok érésében központi szerepet tölt be az endoplazmatikus retikulum (Rouiller et al., 1998).

Az ASPV többféle módon befolyásolhatja az ER-ben létrejövő stresszválaszt, ami a sejt vírusok elleni védekezését segíti. Például a pDP71L fehérje az eIF2 eukarióta transzlációs iniciációs faktor defoszforilációját okozva megakadályozza a hatékony sejtválaszt, amely szerepet játszhatna a vírusfehérje szintézis leállításában. Az A179L, EP153R, DP71L és az A224L által kódolt fehérjék az apoptózis gátlásában játszanak szerepet. Az A179L fehérje szokatlanul erős specificitással kötődik a pro-apoptotikus BH3-domén tartalmú fehérjékhez. Az A224L kötődik az IAP-család fehérjéihez és gátolja a kaspáz 3-at, valamint aktiválja a NF- κ B jelátviteli utat, ezáltal növeli az anti-apoptotikus gének, köztük a cFLIP, cIAP2 és c-rel expresszióját. A DP71L fehérje fehérje-foszfátáz 1-hez való kötődése az eIF2 defoszforilációjához vezet, ami gátolja a pro-apoptotikus CHOP transzkripció aktivációját. Az EP153R fehérje gátolja a p53 fehérje aktiválódását (Dixon et al., 2017).

A vírus morfogenezis előrehaladtával a citoplazmában növekszik az új virionok termelődésének területe. A vírusképződés során egy nem-strukturális chaperonfehérje, a pB602L katalizálja a kapszidszerkezet fokozatos kialakulását azáltal, hogy segíti a kapszid nagy részét alkotó p72 és a kapszid csúcsfehérjét alkotó p49 megfelelő térszerkezetének elnyerését (Epifano et al., 2006). A CP530R gén által kódolt pp62 poliprotein nélkülözhetetlen a vírusmag megfelelő összeszereléséhez és éréséhez. A pp62 a p8, p15 és p35 proteinek prekurzora. A pp62 feldolgozásához a pp220 megjelenése szükséges, és mindkét prekurzor, a pp62 és a pp220 feldolgozása a p72 kifejeződésétől függ. Bár a pp62 expressziójának elnyomása nem változtatja meg a késői gének kifejeződését, vagy a pp220 poliprotein proteolitikus feldolgozását, hatással van a pp220 szubcelluláris lokalizációjára. Elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a pp62 szükséges a vírusrészecske core részének megfelelő összeszereléséhez és

éréséhez. Repressziója üres, genom nélküli vírusrészecskék megjelenéséhez, éretlen és hibás virionok felhalmozódásához vezet. Az immunelektronmikroszkópos elemzés egyértelmű korrelációt mutatott a pp62, illetve pp220 poliprotein mennyisége, és a core fejlődési állapota között, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a pp62 poliprotein teljes hiánya a morfogenezis során valószínűleg csak üres virionok létrejöttét eredményezné (Suárez et al., 2010b).

Az ASPV vírusrészecskék mikrotubulus-mediálta transzporttal jutnak a sejt felszínre. Az adatok arra utalnak, hogy a pE120R fehérje részt vehet az ASPV-részecskék mikrotubulusok által közvetített szállításában a vírusgyárból a plazmamembránba, azonban ennek bizonyítására további kísérletek szükségesek. Bizonyított azonban a pE120R fehérjének az intracelluláris virionok felszínén való lokalizációja, illetve a p72 fő kapszidfehérjéhez való kötődése. A vírusok a sejtből bimbózással jutnak ki, így kerül rájuk a külső membránréteg (Andrés et al., 2001; Jouvenet et al., 2004).

4.5. Geno- és szerotípusok

Mivel az ASPV nagy genetikai és antigéndiverzitással rendelkezik, a vírus evolúciójának követése szempontjából elengedhetetlen a változékony régiók elemzése és az ASPV törzsek gyors és egyszerű tipizálása.

Az ASPV-t 24 genotípusba sorolják a p72 fehérjét kódoló B646L gén C-terminális végének szekvenciája alapján. Valamennyi genotípus csak Afrikában fordul elő; ezekből a nyugat-afrikai eredetű I-es genotípus felelős a 2007 előtti európai, karibi, dél- és közép-amerikai járványkitörésekért. A Georgiából kiinduló világjárványt azonban egy kelet-afrikai eredetű II-es genotípusú vírus megjelenése okozza (Gallardo et al., 2009, 2014).

A szerotípusokba való sorolás azért fontos, mert egy fertőzés átvészélésekor vagy egy adott szerotípus ellen való vakcinázás során az állat általában csak az adott szerotípusú vírus ellen szerez védeltséget, keresztvédelem nem minden esetben alakul ki. Az izolátumokat nyolc szerotípusra osztják a hemadszorpcióért felelős EP402R gén által kódolt CD2v fehérje és az anti-apoptotikus tulajdonságú C-típusú lektin homológ EP153R gén terméke alapján (Malogolovkin et al., 2015). Bár a hemadszorpció-gátlási teszt (HAI) az ASPV szerotipizálás standardja, a HAI-alapú szerocsoport-meghatározásnak vannak korlátai: a teszthez fertőzött sertésekből származó szérumokra van szükség, viszont az ASPV HAI általi kimutatásához szükséges vírus antitestek későn és alacsony titerben termelődnek, ezért célszerű lenne mélyebben megérteni a HAI szerocsoportosítás mechanizmusát és szükséges lenne az antigén determinánsok pontos ismerete is (Qu et al., 2022). Bár a CD2v és a C-típusú lektin homológ ASPV-fehérjék fontosak a keresztvédelem közvetítésében *in vivo*, de

önmagukban nem mindig képesek teljes szerotípus-specifikus homológ védelmet biztosítani, ami arra utal, hogy a folyamatban más antigének is szerepet játszhatnak. A Cd2v és C-típusú lektin homológ fehérjét, illetve p30 és p54 fehérjét is tartalmazó kísérleti alegység- és vektorvakcinákról kimutatták, hogy virulens vírusokkal szemben védelmet vagy részleges védelmet indukálnak. A p30 és p54 fehérjék szerepe azonban nem tisztázott a szerotípus-specifikus reakciók kiváltásában (Gómez-Puertas et al., 1998; Barderas et al., 2001).

Az izolátumok jellemzését nehezíti, hogy a geno- és szerotípusok a legtöbb esetben nem esnek egybe, ezért célszerű lenne egységes rendszert kialakítani a geno- és szerotípusok tekintetében. Más szekvenciák, például a központi konzervatív régió egyes génszakaszai, illetve az E183L gén elemzése segíthet az ASPV molekuláris járványtani vizsgálatainak kiegészítésében, de jelenleg a fent említett besorolási módszerek a legelterjedtebbek (Malogolovkin and Kolbasov, 2019).

4.5.1. Az afrikai sertéspestis szekvenálásának problémái

Az első teljes ASPV genomszekvenciát Sanger-módszerrel határozták meg sejtkultúrához adaptált Ba71V törzsön (Yáñez et al., 1995). Azóta számos újgenerációs szekvenálási technológiát (NGS) alkalmaztak az ASPV törzsek szekvenálására, többek között a Roche (454 GS FLX), az Illumina (HiScanSQ, MiSeq, HiSeq, NextSeq500) és a Nanopore eszközein is. Ezen technológiáknál azonban az eredmények megbízható értékeléséhez nagy lefedettség és jó minőségű egyedi szekvencia adatok szükségesek. Az alacsony lefedettség az NGS technológiák magas intrinzik hibaszázaléka miatt ugyanis az adatok félreértelmezéséhez és az egyes előforduló variánsok gyakoriságának alul- vagy felülbecsléséhez vezethetnek. Számos paraméter, különösen az átlagos lefedettség, összefügg a vírus DNS-tisztítás hatékonyságával és a minta minőségével is. Az ASPV-genomok NGSszekvenálás során tapasztalt alacsony lefedettség egyik forrása az eukarióta, gazdaszervezet eredetű DNS-szennyezés, ami azt eredményezi, hogy a leolvasott szekvencia adatoknak csak kis része (<0,5%) víruseredetű. Különböző stratégiákkal próbálták ezt a problémát kezelni a mintákban (Pérez-Núñez et al., 2020). Ezek közé tartozik vörösvértetekhez abszorbeálódott vírusok tisztítása állati vérből (Bishop et al., 2015; Olesen et al., 2018b), a vírus dúsítása ultracentrifugálással vagy a vírus DNS-ének ASPV-specifikus polimeráz láncreakcióval (PCR-rel) történő amplifikációja a mintákban, amelyet Sanger-szekvenálás követ (Chapman et al., 2011; Bacciu et al., 2016; Olesen et al., 2018b).

Wen és munkatársai (Wen et al., 2019) az NGS véletlenszerű, ún. shotgun megközelítése helyett, az ASPV genomszekvenciájának teljessé tételéhez 86 átfedő specifikus PCR-t alkalmaztak, majd – mivel a mintáikban nagyon alacsony százalékban

voltak jelen vírus szekvenciák – az ampikonokat NGS-szekvenálták. Ez a szélsőséges példa nyilvánvalóvá teszi, hogy az NGS módszer előnyei az ASPV szekvenálásában csak akkor használható ki, ha a minta össz DNS tartalmának nagyobb százaléka származik a vírusgenomból. Az ún. target enrichment módszerrel az Illumina szekvenálás során ugyan elérhető az ASPV-specifikus szekvenciák hatékony dúsítása, de a módszer jelentős idő és anyagi ráfordítást igényel (Forth et al., 2019). Az említett tényeket figyelembe véve kénytelenek voltunk kidolgozni egy egyszerű NGS módszert, amellyel költség- és időhatékonyan, illetve rutinszerűen meghatározható az ASPV genom szekvenciája.

4.6. Az afrikai sertéspestis elleni immunválasz

Annak ellenére, hogy évtizedek óta kutatott terület, ismereteink hiányosak az ASPV elleni immunválaszról. A legtöbb vírusfertőzéshez hasonlóan a veleszületett immunitás és a szerzett immunitás mindkét ága (humorális és sejtes) egyaránt fontosnak tűnik a védelem kialakításában.

4.6.1. Veleszületett immunitás

A dendritikus sejtek (DC) ASPV általi fertőzése befolyásolhatja a DC-k antigénfeldolgozását és prezentálását, ami immunszuppressziót eredményezhet (Z. Wang et al., 2022). Kutatások azt is kimutatták, hogy az attenuált vagy avirulens törzsek csökkentik az MHC-I molekulák expresszióját a monocita eredetű DC sejteken (Franzoni et al., 2018).

A természetes ölösejtek (NK sejtek) szerepe szintén vitathatatlan a megfelelő védelem kialakításában. Avirulens törzsekkel való fertőzés után 7 nappal a természetes ölösejtek aktivitásának növekedése figyelhető meg, miközben az állatok tünetmentesek maradnak. A tünetekkel küzdő egyedeknél viszont a NK sejtek aktivitása kisebb (Leitão et al., 2001).

A mintázatfelismerő receptorok közé tartoznak a TLR3 és a TLR5. A TLR3 a virális kettős szálú RNS-ek, a TLR5 pedig a nem metilált DNS felismeréséért felel. Az ASPV elleni veleszületett immunitás kulcsszereplője cGAS-STING szignalizációs útvonal, ami a citoplazmában lévő vírus DNS-ek felismerését végzi. Az evolúció során az ASPV számos olyan gént is szerzett, amelyek képesek a fertőzés korai szakaszában szabályozni a gyulladást, és ezek elsősorban a TLR3 és a cGAS-STING rendszer működését gátolják. A TLR3a a kettős szálú RNS-hez való kötődésekor jeleket továbbít a sejtekhez, ez a nukleáris kappa-B faktor (NF- κ B) fokozott expresszióját eredményezi, ami viszont aktiválja az interleukin 1 (IL-1), IL-6 és tumor nekrozis faktor- α , illetve más citokinek expresszióját (Yang et al., 2021).

Vizsgálatok kimutatták, hogy az ASPV által kódolt I329L és A276R fehérjék immunszuppresszív hatással rendelkeznek. Az I329L egy TLR3 homológ fehérje, a TRIF adaptor fehérjével kölcsönhatásba lépve gátolja az NF- κ B és az IRF3 aktiválódását (Correia et al., 2013), míg az A276R képes gátolni a TLR3 felismerő funkcióját (De Oliveira et al., 2011). Az említett példán kívül az ASPV több olyan fehérjét kódol, amelyek részt vesznek a cGAS-STING jelátviteli útvonal (pl. MGF-530, MGF-505 11R) elnyomásában, továbbá egyéb más jelátviteli rendszert is gátolnak – többek között a már említett JAK-STAT (pl. MGF-530, MGF-505 7R) és NF- κ B útvonalakat (pl. MGF-530, MGF-360 12L, DP96R, E120R) – (Z. Wang et al., 2022). Ezek az immunszuppresszív fehérjéket kódoló gének potenciális célgének lehetnek az élő, attenuált vakcinák előállításához.

Amikor a gazdasejt stresszjeleket érzékel, az eIF2 foszforilálódik, ami leállítja a fehérjeszintézis rendszerét. Az ASPV DP71L fehérjeje azáltal segíti elő a vírus szaporodását a sejtekben, hogy rekrutálja a protein foszfatáz 1-et az eIF2 defoszforilálására. Amikor az ASPV replikációja befejeződik, a mitokondriális apoptózis útvonal a p54 szerkezeti fehérjén keresztül aktiválódik, ez pedig elősegíti a sejtek lízisét, ami hozzájárul egy újabb fertőzési ciklus indulásához (Dixon et al., 2017).

Jelen dolgozat szempontjából érdemes kiemelni, hogy a CD2V sertés limfocitákban/makrofágokban aktiválja az NF- κ B-t és más IFN jelátviteli útvonalakat (Chaulagain et al., 2021).

4.6.2. Szerzett immunitás

Az ASPV hatást gyakorol a sejtek antigénfeldolgozására. A pEP153R gátolja az MHC-I expresszióját a membránon (Hurtado et al., 2011). Az ubikvitin molekulák az abnormális endogén fehérjék lizinjéhez vagy első metioninjához kötődnek, majd azok a proteoszómban lebontásra kerülnek. Az ubikvitináció folyamatát kihasználva a kutatók létrehoztak egy DNS-vakcinát, amelyben az ASPV hemagglutinin extracelluláris doménjéhez fuzionált p30 és p54 antigének voltak jelen. Mivel a vakcina nem fejtett ki védő hatást, úgy fejlesztették tovább, hogy a fent említett három vírusedeterminánst ubikvitinnel fuzionálva kódolja a vakcinaként alkalmazott plazmid. Az így létrehozott DNS vakcina részleges védelmet nyújtott a ráfertőzéssel szemben és specifikus T sejt választ indukált, vélhetően a jobb antigénprezentáció miatt (Argilaguet et al., 2012). Avirulens törzsekkel végzett immunizálást követő CD8+ depléciós kísérletek igazolták, hogy erőteljes CD8+ T-sejtek (citotoxikus T-sejtek) által közvetített immunitás is szükséges a virémia és a tünetek kialakulásának megakadályozásához (Oura et al., 2005). Arról is beszámoltak, hogy az ASPV 4-5 nappal a fertőzés után képes gátolni a

citotoxikus T-sejtek egyik fő lítikus effektorfehérjéjének, a perforinnak az expresszióját (Hüher et al., 2020).

4.6.3. Az antitestek szerepe az ASPV elleni védelemben

A vírus antitestek általi semlegesítése az egyik legfontosabb védekezési mechanizmus a vírusfertőzésekkel szemben. Az antitestek védőhatását sertésekben meggyőzően bizonyították kolosztrum vagy lábadozó sertésekből származó antitesteket tartalmazó szérum passzív átadásával. Ha ezek az antitestek a előtejen keresztül kerülnek át, akkor a szopós malacok számára is bizonyos fokú védelmet nyújtanak a vírusfertőzéssel szemben. Azok a sertések, amelyek nem kaptak ASP-ből gyógyult sertésekből származó kolosztrumot vagy szérumot, 16 nappal a fertőzés után mind elpusztultak. Ezzel szemben 30 nappal a fertőzés után csak egy sertés pusztult el azok közül, amelyek ASP-ből felépült kocától föccstejet vagy antiszérumot kaptak (n = 10 sertés) (Schlafer et al., 1984). Bár a neutralizáló antitestek jelenléte nem elegendő a teljeskörű védelem kialakításához, a közepes vagy magas ASPV-specifikus ellenanyag titer jelenléte a fertőzés idején szoros korrelációt mutat az erős klinikai tüneteket okozó betegséggel szembeni védelemmel (Silva et al., 2022). Bár a fertőzést túlélő állatok vérsavójában hosszú időn át, akár hónapokig, és nagy mennyiségben kimutathatók az ellenanyagok, az ASPV-specifikus antitestek csak részleges semlegesítő hatást fejtenek ki. Még nagy koncentrációjú antitestek, például monoklonális antitestek vagy hiperimmun szérumok jelenlétében is, amelyek attenuált vírussal fertőzött és/vagy virulens vad típusú vírussal való ráfertőzés után túlélő/védett sertésekből származnak, a virionok körülbelül 5-20%-át nem semlegesítik az ellenanyagok (Zhu, 2022). Egy kísérlet kimutatta, hogy a vírus aggregációja is hozzájárul az ASPV ellenanyagok részleges neutralizáló hatásához. Az ellenanyagok főleg a komplement-mediált sejtlízisben és az ellenanyag-mediált citotoxicitásban játszhatnak szerepet (Escribano et al., 2013). A CD2v fehérjével immunizált állatok széruma gátolta az ASPV fertőzést *in vitro*, és részleges védettséget mutatott sertésekben homológ ASPV-ráfertőzést követően (Rock, 2017). A p30-cal, p72-vel és p54-el szembeni ellenanyag *in vitro* képes gátolni az ASPV internalizációját (Jia et al., 2017; Arias et al., 2018). A p72, p30 és p54 tekinthető a legjelentősebb antigén fehérjéknek, amelyek humorális immunválaszt váltanak ki az ASPV fertőzés során. A p72 és a p54 elleni antitestekkel gátolni/blokkolni lehet a vírusadszorpciót (Lokhandwala et al., 2016). Az ASPV fertőzés során az antitestek által közvetített semlegesítés továbbra is ellentmondásos, az említett fehérjéknek az ASPV virulens törzseivel végzett vakcinakísérletekben való alkalmazása nem hozta meg a várt hatást. Amikor a sertések enyhébb virulenciájú törzsszel fertőződnek, védettséget szereznek a rokon, virulensebb törzsekkel szemben is és bizonyos mértékű keresztvédettséget is megfigyeltek a kutatók

más, távolabbi rokon vírustörzsekkel szemben, azonban ennek pontos mechanizmusa egyelőre nem ismert (Urbano and Ferreira, 2022).

4.6.4. Specifikus gének szerepe a virulencia és az immunitás kialakításában

B119L (9GL)

Az ASPV B119L génje (9GL gén) egy késői, nem strukturális, 14 kDa méretű fehérjét kódol. A gén által kódolt fehérje (p9GL) részt vesz a virionok érésben. A p9GL az Erv1p/Alrp családba tartozik, flavin-adenin-dinukleotidhoz kötött szulfhidril-oxidáz enzimaktivitással rendelkezik. A p9GL fehérje felel a diszulfidkötések kialakulásának katalizálásáért különböző szubcelluláris kompartmentekben lévő fehérje szubsztrátokban (Rodríguez et al., 2006). A 9GL fehérje- és DNS-szinten erősen konzervált az ASPV izolátumaiban, deléciója törzstől függően különböző mértékű attenuációt eredményezett a vizsgált vírusoknál (Lewis et al., 2000; O'Donnell et al., 2015; Carlson et al., 2016), így gyakori célpont módosított élővírusos vakcinák (MLV) fejlesztésére irányuló kutatásoknál. A 9GL gén eltávolítása a magas virulenciával rendelkező Malawi Lil-20/1 izolátumból a virulencia jelentős gyengülését eredményezte *in vivo* kísérletekben (Lewis et al., 2000). A Malawi-Lil-20/1-9GL-hez hasonlóan a 9GL gén kiütése az ASPV magas virulenciájú Georgia 2007/1 izolátumából is korlátozott szaporodást eredményezett primer sertés makrofágokban, azonban a sertések intramuszkuláris oltása magas dózisú (10^4 HAD₅₀) mutáns vírussal a sertések pusztulásához vezetett (O'Donnell et al., 2015). A virulens Pretoriuskop/96/4 törzs 9GL deléciós mutánsa szintén attenuált fenotípust mutatott (Neilan et al., 2004).

EP402R (8-DR/CD2v)

A 8-DR (vagy EP402R) gén egy 402 aminosav hosszú, késői fehérjét (pEP402R vagy CD2v/CD2-like protein) kódol, amely homológiát mutat a T-sejtek CD2 fehérjéjével. A CD2v egy I-es típusú transzmembrán fehérje, és részt vesz a vörösvértestek hemadszorpciójában, ami a sertés vörösvértesteknek a fertőzött sejtek felszínéhez való tapadását jelenti az ASPV esetében (Rodríguez et al., 1993). Az Lv17/WB/Rie1 vírustörzsnél az EP402R génben található egyetlen nukleotid deléció leolvasási kereteltolódást okozó mutációt eredményez, amely egy stop kodon korai megjelenésével jár, így a génről csonka, funkcióvesztett fehérje íródik át, aminek következtében a törzs hemadszorpcióra képtelenné válik (Gallardo et al., 2019).

A sertések vérében lévő mononukleáris sejtek mitogénfüggő limfocita-proliferációja *in vitro* 90-95%-kal csökkent a CD2v-t tartalmazó vírussal való fertőzést követően, de nem változott a CD2v géndelített vírus fertőzése során, ami arra utal, hogy a CD2v *in vitro* immunsuppresszív hatással is rendelkezik (Borca et al., 1998). A CD2v

néhány attenuált törzsben (pl. OURT 88/3) csonka, rövidült vagy deléciókat tartalmaz, ami arra utal, hogy a fehérje részt vesz az ASPV patogenezisében (Chapman et al., 2008).

Fertőzött sejtekben a CD2v és az SH3P7 fehérje kolokalizációja figyelhető meg vírusgyáratok körülvevő és a plazmamembrán periferiáján elhelyezkedő területeken. Az SH3P7 aktin-kötő adaptorfehérje, ami szerepet játszik a fehérjék Golgi-apparátuson keresztüli szállításában, a klatrin-mediált endocitózisban. Az interakció arra utal, hogy a CD2v részt vehet a vírus sejteken belüli mozgásának irányításában (Goatley and Dixon, 2011). A CD2v sertésekben nem esszenciális a vírus szaporodásához, de kullancsok közepbelében elengedhetetlenül fontos ehhez (Rowlands et al., 2009).

A CD2v a vírus gyártásáért felelős régió körül lokalizálódik az ASPV fertőzés során, ami arra utal, hogy szerepe lehet a vírusrészecskék létrehozásában és/vagy a fertőzés dinamikájában. A CD2v kötődni képes a transz-Golgi-hálózat egyik kulcseleméhez, az AP-1-hez, ami a sejt folyamatok megzavarásában lehet fontos tényező (Pérez-Núñez et al., 2015). A sertések CD2v deléció mutáns vírussal történő fertőzése a szülői vírustörzstől függően különböző fertőzési fenotípusokat eredményezett. A CD2v fehérjét nem tartalmazó, rekombináns ASPV Malawi törzssel fertőzött sertésekben a nyirokcsomókban való terjedés és a betegség kialakulása is később következett be a szülői vírussal való fertőzéshez képest, bár az elhullási arány hasonlóan bizonyult, és a virémia szignifikáns csökkenését (30-10000-szeres) is megfigyelték (Borca et al., 1998). A CD2v deléció a BA71 európai izolátumban a vírus attenuációját eredményezte (Monteagudo et al., 2017), illetve attenuált ASPV-törzsekben CD2v génmutációk figyelhetők meg (Lv17/WB/Rie és OURT88/3) (Chapman et al., 2008), ami a CD2v-nek a vírus virulenciájában betöltött szerepére utal. Ezzel szemben a CD2v deléciója a virulens Georgia 2007/1 törzsből nem befolyásolta jelentősen a vírus virulenciáját és patogenitását (Borca et al., 2020a).

EP153R (8CR)

A pEP153R egy 153 aminosav hosszú korai és késői átíródású transzmembrán fehérje. A fehérje egy C-típusú lektin domént hordoz és részt vesz a vírus CD2v fehérje és sejtreceptora közötti kölcsönhatás stabilizálásában. A pEP153R – a pEP402R mellett – szükséges az ASPV hemadszorpciójához (Galindo et al., 2000). A pEP153R valószínűleg az exocitózis folyamatának gátlása révén akadályozza a gazdasejt MHC-I proteinjeinek sejtmembránon való megjelenését (Hurtado et al., 2011), az apoptózist pedig a kaszpáz-3 aktiváció gátlásával befolyásolja (Hurtado et al., 2004). Az EP153R és EP402R génekben frameshift mutációt tartalmazó NH/P68 vírussal való kísérletek során a C-típusú lektin fehérje funkcióját visszaállítva azt tapasztalták, hogy a kullancsvektorban történő replikáció során a vírus titere ezerszeresére nőtt ahhoz a

törzshöz képest, ami mind a két említett génben tartalmazott mutációt (Rowlands et al., 2009). Az EP153R fehérje fokozza a CD2v fehérje által indukált HAD-ot (Galindo et al., 2000), és szerepet játszik az apoptózis gátlásában az apoptotikus kaszkádban és a sejtciklus szabályozásában egyaránt résztvevő transzkripciósfaktor, a p53 transzaktiváló hatásának gátlása révén (Hurtado et al., 2004).

4.7. Az afrikai sertéspestis elterjedése

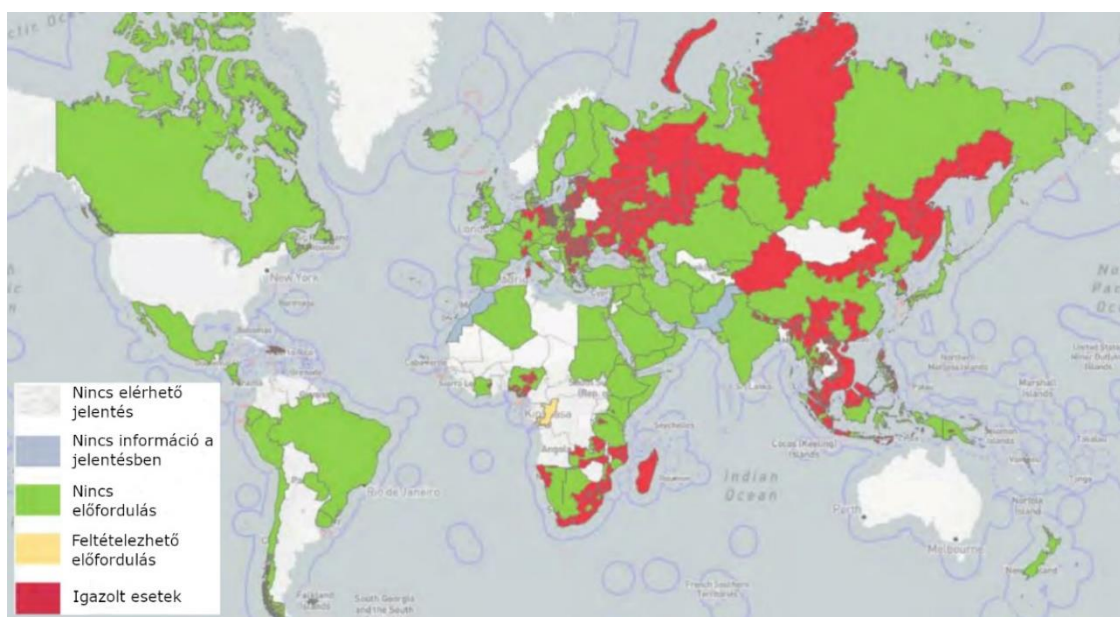
A vírus által okozott betegséget először Kenyában azonosították 1921-ben (Eustace Montgomery, 1921). Az első európai megjelenését 1957-ben Portugáliában regisztrálták, és bár ezt a járványgócot sikeresen felszámolták, 1960-ban újból megjelent az országban és innen terjedt át Spanyolországba, Dél-Amerikába és a Karib-térség területére is (Galindo and Alonso, 2017). Az ezt követő évtizedekben Európa más országaiban is felbukkant a vírus: Franciaországban, Olaszországban, Máltán, Belgiumban és Hollandiában is. Az 1990-es évek közepére drasztikus mentesítési programokkal sikeresen felszámolták a betegséget az említett országokban, Olaszország kivételével, ahol Szardínián továbbra is endemikus maradt (Costard et al., 2009; "WOAH, Situation reports for African swine fever," 2023).

A második nagy európai fertőzési hullám 2007-ben kezdődött a Kaukázuson, Georgiában, ahonnan hamar elterjedt a Kaukázus területén, Oroszországban és a posztszovjet államokban, majd 2014-ben elérte az Európai Unió határait is. Az előző hullámtól eltérően a 2007-ben induló járványt az ASPV II-es genotípusú változatának elterjedése okozta. Lengyelországi megjelenését követően hamar fertőzötté váltak a balti államok, majd 2017-ben Romániát és Csehországot is elérte az afrikai sertéspestis (Sauter-Louis et al., 2021). A kaukázusi és posztszovjet államokban (köztük Oroszországban) előforduló, javarészt házisertéseket érintő fertőzésektől eltérően, ahol az emberi tevékenység nagymértékben közrejátszott az ASP gyors terjedésében, a balti államok és Közép-Európa területén lévő járványterjedés főként a vaddisznókat érintette (Gogin et al., 2013).

Magyarországon 2018-ban jelentették az első esetet, csakúgy, mint Belgiumban és Bulgáriában (Alkhamis et al., 2018). Ugyanebben az évben a vírus elérte Kínát is (Zhao et al., 2019), majd rövid időn belül számos más ázsiai országban is felbukkant, több mint 16 országot érintve (pl. Vietnám, India, Kambodzsa, Pápua Új-Guinea, Dél-Korea) (WOAH, 2023). Az ASP jelentős gazdasági veszteségeket okozott az ázsiai sertéságazatnak, az első ázsiai kitérését követő 2 évben közel 7 millió állat pusztult el a kórban, amely a globális veszteség 82%-át jelenti (Wu et al., 2020).

A betegség közel 40 év után 2021 júliusában ismét megjelent az amerikai kontinensen is (Dominikai Köztársaság és Haiti). Olaszország szárazföldi részén 2022

januárjában az ASPV II.-genotípusát jelentették, szintúgy 40 év mentesség után. Jelenleg mintegy 74 országban azonosították az ASPV különböző variánsait (1. ábra), mely fokozott terjedést mutat a világ minden részén (WOAH, 2023).



1. ábra: Az afrikai sertéspestis 2023. 04.27-ei világszintű jelenléte közigazgatási körzetek szerinti bontásban (WOAH, 2023)

Hazánkban jelen dolgozat megírásakor 10 vármegyében (Komárom-Esztergom, Pest, Heves, Nógrád, Borsod-Abaúj-Zemplén, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Hajdú-Bihar, Békés, Jász-Nagykun-Szolnok, Fejér) és Budapesten jelentettek ASPV előfordulást (NÉBIH, 2023).

4.8. Járványtan

Az ASP fő fertőzési útvonala a fertőzött állatokkal és azok testnedveivel (nyál, vizelet, bélsár, vér) való érintkezés, azonban fontos tényező a terjedésben a különböző vírussal szennyezett anyagokkal (ragályfogó eszközök, járművek, húskészítmények) való közvetlen kapcsolat is.

Míg Európában a kór terjedésében főként a vaddisznók játszanak szerepet, addig Ázsiában jelentős emberi közreműködés mellett a házi sertések érintettek. A vírus eredeti gazdái, az afrikai vaddisznók – a *Phacochoerus* nemzetség tagjai: sivatagi- és szavannai varacskosdisznó (*P. aethiopicus* és *P. africanus*), a *Potamochoerus* nemzetség tagjai: folyami disznó és bojtosfülű disznó (*P. larvatus* és *P. porcus*) valamint az erdei disznó (*Hylochoerus meinertzhageni*) – bár fertőződnek ASPV-vel, általában nem mutatnak klinikai tüneteket, így rezervoárként vesznek részt a vírus terjedésében (Sánchez-Vizcaíno et al., 2012). Az afrikai sertés fajok felnőtt egyedeiben az ASPV fertőzést a célszövetekben lévő vírus alacsony szintje és alacsony vagy kimutathatatlan virémia

jellemzi, a fiatal állatokban azonban jelentős vírusszaporodás és virémia is előfordulhat (Jori and Bastos, 2009).

A vírus természetes rezervoárjai közé tartoznak az *Ornithodoros* nemzetségbe tartozó óvontagok is (WOAH, 2023). Az ASPV terjedésében azonban szűk előfordulási területük miatt csak Afrikában és Európa déli fekvésű területein játszanak szerepet (pl. Ibériai-félsziget). Az óvontagok mind nimfa, mind kifejlett stádiumban vérrel táplálkoznak, így biológiai és mechanikai vektorként is szerepet játszanak az ASPV terjedésében. Kullancsokban epidemiológiai szempontból jelentős a vírus vertikális átvitele, amely történhet a nőténytől az utódok felé vagy a kullancsok fejlődési stádiumai között is (T. Lv et al., 2022).

A kór terjedésében biológiai vektorként nem vesznek részt az Európában széles elterjedéssel bíró kemény testű kullancsok (Guinat et al., 2016). Annak ellenére, hogy a vírus bizonyítottan nem képes replikálódni az *Ixodes ricinus* és a *Dermacentor reticulatus* fajokban, ezekben a kullancsokban hat-nyolc hétig is kimutatható az ASPV DNS-e (de Carvalho Ferreira et al., 2014). Bár jelenleg nincs bizonyíték arra, hogy ezek a kullancsok hordozhatják és továbbadhatják az ASPV-t, érdemes őket potenciális mechanikus vektorokként kezelni (Frant et al., 2017).

Különböző sertéstartó telepeken észlelt, nehezen magyarázható és szezonálisan megfigyelhető járványkitörések felvetették a legyek és egyéb rovarok szerepét is a vírus terjedésében (Fila and Woźniakowski, 2020). Kísérletekkel bizonyították, hogy az istállólegyek (*Stomoxys calcitrans*) képesek mechanikai vektorként részt venni az ASPV terjedésében, a sertések mind csípés, mind a kórokozót tartalmazó egyedek lenyelése útján képesek megfertőződni (Mellor et al., 1987; Olesen et al., 2018a, 2018c).

A betegség elleni védekezést nagymértékben hátráltatja a vírus rendkívüli ellenállóképessége. Az ASPV hetekig fennmaradhat a fertőzött sertések által a környezetbe ürített vérben, ürülékben és vizeletben. A fertőzőképes virionok felezési ideje a rendkívül virulens Georgia 2007/1 törzsszel szennyezett ürülékben 4 °C-on 0,65 nap, 37 °C-on 0,29 nap, vizeletben 4 °C-on 2,19, 37 °C-on pedig 0,41 nap. A virális DNS felezési ideje ugyanezen hőmérsékleten a bélsárban 8-9 nap. A vizeletben 4 °C-on 32,54 nap, ami 37 °C-on 19,48 napra csökkent (Davies et al., 2017). A vírus jól tűri a magas hőmérsékletet, illetve a magas pH-t is: 56 °C-on 70 perc alatt inaktiválódik, míg 13,4 pH-n 1 hétig is fertőzőképes marad. Az ASPV takarmány-összetevőkön keresztül történő átviteli kockázatának csökkentése érdekében kritikus pont a takarmányok megfelelő kezelése hőinaktiválással vagy kémiai anyagok segítségével (Niederwerder et al., 2021; Songkasupa et al., 2022).

Bár a feldolgozott sertésipari termékek általi transzmisszióra pontos járványtani adatok nem állnak rendelkezésre, potenciális terjedési útvonalat jelenthetnek a fertőzött

húskészítmények is. Kísérletek igazolják, hogy a feldolgozott élelmiszerekben hónapokkal a feldolgozást követően is kimutatható és izolálható az ASPV (McKercher et al., 1978; Gogin et al., 2013).

Kutatási eredmények alapján feltételezhető, hogy az ASP sertéstelepeken történő terjedésében szerepet játszhat a mesterséges megtermékenyítéskor történő fertőződés is. Az ASPV-t kan sertések spermamintáiban a fertőzést követően 2 nappal kimutatták, a kocák a mintákkal történő mesterséges megtermékenyítés után is megfertőződhetnek, továbbá a vírust magzatokból is kimutatták (Friedrichs et al., 2022).

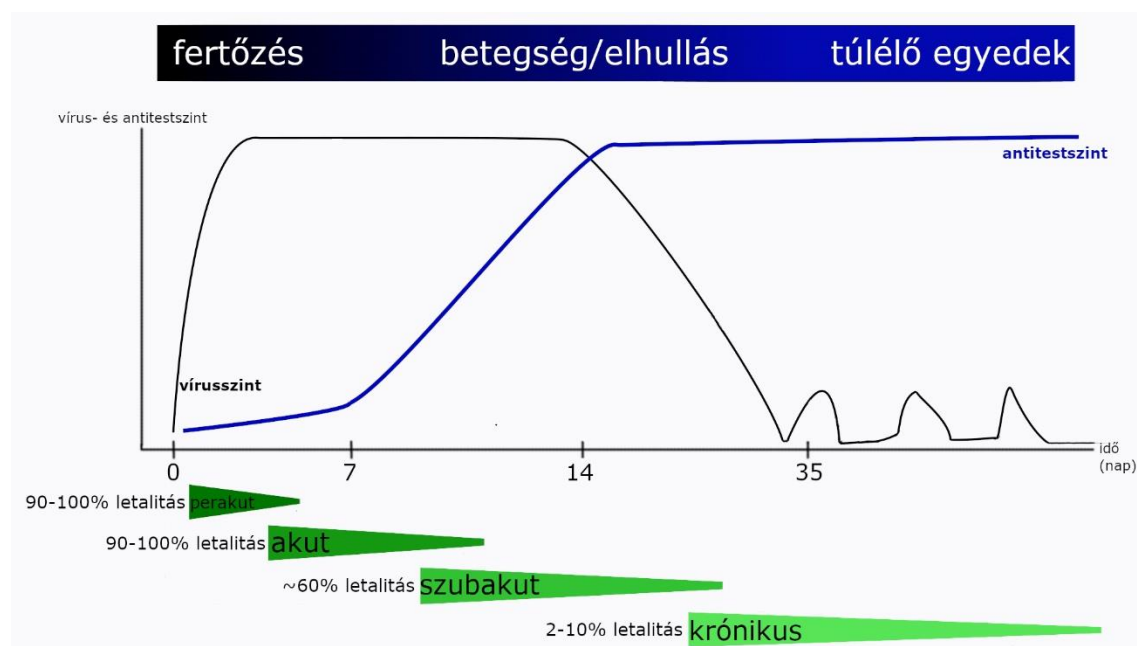
Aggodalomra ad okot, hogy az afrikai sertéspestis aeroszolban, levegő útján is képes terjedni. Fertőzött állományokban a vírus kimutatható a levegőből is, és a kimutathatóság szoros összefüggést mutat a bélsár vírustartalmával (de Carvalho Ferreira et al., 2013).

4.9. Kóroktan, kórfejlődés tünetek

A fertőzés kimenetelét befolyásolja a vírustörzs virulenciája, a kórokozó bejutásának útvonala, a bejutott vírus mennyisége és a fertőzött állat állapota is. Ezen tényezők függvényében a fertőzés lefolyása és a betegség tünetei is eltérők lehetnek.

A nazális fertőződéshez kevesebb vírusrészeg szükséges, mint az orális transzmisszióhoz (Pietschmann et al., 2015; Guinat et al., 2016).

Az ASPV-törzseket magas virulenciájú, közepesen virulens és alacsony virulenciájú kategóriákba sorolják. A betegség lefolyása alapján megkülönböztethetünk túlheveny (perakut), heveny (akut), félheveny (szubakut) és idült (krónikus) formát (2. ábra).



2. ábra: Az ASP fertőzés dinamikája és a betegség formái

A magas virulenciájú törzsek felelősek a betegség perakut és akut formáiért. A perakut fertőződésnél a fertőzés után a sertések 1-4 nappal, míg az akut esetben 3-8 nap után elpusztulnak. A perakut formát gyors klinikai lefolyás jellemzi, mely magas lázzal (41-42°C), étvágytalansággal és bágyadtsággal jár. Néha a betegség megfigyelhető jelei nélkül hirtelen halál következik be, az ASP-t jellemző markáns tünetek, mint a bőrvérzések is kevésbé jelentkeznek. Gyakran fordulnak elő perakut fertőzések korábban ASPV-től mentes gazdaságokban, ahol a nagyszámú klinikai eset kirobbanása előtt néhány állat elpusztul, azonban lázon és légzési nehézségeken túl az ASP-re jellemző markáns elváltozások nem jelentkeznek még a boncolás során sem (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; Salguero, 2020).

Az akut formát a limfociták és monociták számának csökkenése miatti leukopénia is jellemzi. Az ASP orrvérzést, hányást, véres hasmenést és vemhes kocáknál vetélést is képes okozni. Az akut formában a perakut formához hasonlóan szintén magas láz, étvágytalanság és bágyadtság is jelentkezik, azonban a belső szerveken és a bőrön bevérzések jelennek meg. A fellépő tüdőödéma miatt légzési zavarok is megfigyelhetők. *Post mortem* vizsgálatkor a belső szervek elváltozásaira legjellemzőbb a savós hártályokon jelentkező vérzéseken túl a duzzadt, sötét színű lép (Salguero et al., 2002). Az akut ASP-ben leírt második legfontosabb elváltozás a belső szervek bevérzése. A nyirokcsomók területén (főleg a gyomor, máj és vese környékén) multifokális és pontszerű vérzések is előfordulnak. A vese kéregállományában pontszerű vérzések fordulhatnak elő, továbbá a húgyhólyag nyálkahártyájában, a mellhártya alatt, illetve a vékony- és vastagbélben és a szív epi- és endokardiumában is megfigyelhetőek bevérzések (3. ábra) (Gómez-Villamandos et al., 1995; Sánchez-Vizcaíno et al., 2012, 2015).

A közepesen virulens törzsekkel való fertőződésnél az akuton kívül szubakut fertőzési forma figyelhető meg, azonban a magas virulenciájú törzseknél előforduló tünetekhez képest kevésbé súlyos a betegség lefolyása. A fertőződés után az elhullás ideje 10-20 nap közé esik. A belsőszervi vérzések miatt a vérlemezkék számának csökkenése figyelhető meg a betegség korai és középső szakaszában. A lép kezdeti megnagyobbodása után mérete idővel csökken, és sorvadásnak indul. A nyirokcsomó vérzésein túl a vesében is megfigyelhetőek bevérzések, azonban sűrűbben és kiterjedtebben fordulnak elő, mint a magas virulenciájú törzsek okozta akut formánál. A közepesen virulens törzsek mortalitása a magas virulenciájú törzseknél megfigyelt közel 100%-hoz képest 30-70% körül mozog (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; Salguero, 2020).

A krónikus ASP-t közepes és alacsony virulenciájú izolátumok fertőzésével hozták összefüggésbe (Mebus és Dardiri, 1979, McVicar, 1984), amelyeket először Spanyolországban, Portugáliában és a Dominikai Köztársaságban írtak le, amikor az

ASP endémikus volt ezeken a területeken. Feltételezhető, hogy az ezeken a területeken elterjedt alacsony virulenciájú törzs és a hozzá kapcsolódó krónikus forma az 1960-as években az Ibériai-félszigeten végzett korai vakcinakísérletekben használt ASPV-izolátumokból fejlődhetett ki. Más területeken, ahol a vírus hosszú ideig jelen volt, nem detektálható a betegség krónikus formája (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015).



3. ábra: Az afrikai sertéspestis által okozott klinikai tünetek: (a) bevérzések a fülön (b) bevérzések a bőrön, a végtag belső oldalán (c) pontszerű bevérzések a vesén (d) megnagyobbodott nyirokcsomó (e) megnagyobbodott, sötétvörös lép (f) bevérzések a savóshártya alatt

4.10. Vakcinafejlesztés

4.10.1. A vakcinafejlesztés kihívásai

Az ASP-vakcinákkal kapcsolatos kutatások az 1920-as évek óta folynak, és ez idő alatt számos kísérleti ASPV-vakcina jelöltet vizsgáltak, beleértve inaktivált-, aleggység- és élő, attenuált vakcinákat. Több inaktivált ASPV még adjuvánssal és nagy dózisokban sem tudott elegendő védelmet biztosítani a sertések számára. Az eddig vizsgált aleggység-vakcina jelöltek, beleértve a rekombináns vírusfehérjéket, a DNS plazmid-alapú vakcinákat és a több ASPV szerkezeti gént tartalmazó vírusvektorokat, szintén nem indukált elegendő immunvédelmet sertésekben. Számos kísérleti MLV ASP-vakcina pedig a különböző szerotípusokkal szembeni keresztvédelem hiányát mutatta (Zhu, 2022).

A vakcinázás minőségét és a védettség mértékét több változó is befolyásolhatja, például az antigén tulajdonságai és vívíánya, az oltás adagja, helye és ideje, a ráfertőzés ideje, illetve az állatok tulajdonságai. A sikeres vakcinázáshoz elengedhetetlen ezen változók ismerete, aminek eredményeképp olyan vakcina kerülhet kifejlesztésre, mely az adott kórokozó legtöbb ismert törzsével szemben elégséges védelmet biztosít. Az ASP-vakcina kifejlesztésének nehézségei elsősorban a vírus összetettségéből, valamint az immunvédelem mechanizmusaira és az antigénekre vonatkozó ismeretek hiányából adódnak (Arias et al., 2017).

Kereskedelmi forgalomba eddig mindössze 2 vakcinát bocsájtottak, mindkettőt Vietnámban, ezek részletes bemutatása az 4.10.5. alfejezetben található.

4.10.2. Inaktivált vakcinák

Az inaktivált vakcinákról már a vakcinafejlesztések korai szakaszában kiderült, hogy nem hatékonyak (ez nem ritka más nagy méretű, komplex vírusok esetében sem), ennek ellenére később is akadt néhány próbálkozás inaktivált vakcina létrehozására. Glutáraldehiddel inaktivált alveoláris makrofágokkal való immunizáláskor a ráfertőzést követően felgyorsult a szerológiai válasz és kimutatható volt ellenanyagválasz, de a vakcina nem nyújtott védelmet a homológ ráfertőzéssel szemben (Forman et al., 1982). A 2000-es években újonnan megjelenő, celluláris immunválaszt is indukáló adjuvánssok használata szintén nem fokozta az inaktivált ASPV-vakcinák hatékonyságát. Bár az egyik ilyen kísérletben minden vakcinázott egyedben megjelentek ASPV-specifikus antitestek, de ez esetben sem sikerült megfelelő védelmet kiváltani a vírussal szemben, illetve a betegség ellenanyagfüggő felgyorsulását is megfigyelték (Blome et al., 2014).

Az inaktivált vakcinák sikertelenségében közrejátszik a több rétegben több mint 50 fehérjét tartalmazó virion összetettsége, illetve az, hogy az ASPV-nek mind az érett intracelluláris, mind az extracelluláris formája fertőző (Arias et al., 2017).

4.10.3. Alegység vakcinák, vektor vakcinák és DNS-vakcinák

A protektív immunválaszért felelős fehérjék ismeretében és azok kellő mennyiségű termeltetése esetén lehetőség nyílik a komplex vírusok elleni hatékony alegység és rekombináns vektorvakcinák fejlesztésére. Az alegység vakcinák vírusepitópotokat tartalmazó tisztított rekombináns fehérjéket vagy szintetikus peptideket használnak. Ezeket a fehérjéket hagyományos biokémiai vagy rekombináns DNS-technológiák alkalmazásával állítják elő. Hagyományosan az ASPV elleni alegység-, vektor- és DNS-vakcinák fő célpontjai a p54, p30, p72 strukturális fehérjék, valamint a CD2v hemagglutinin. Bakulovírusban kifejezett rekombináns p54 és p30 felhasználásával végzett antigén alapú vakcinázási kísérletek változó mértékű védelmet biztosítottak sertéseknél; egyes egyedeknél megfigyelhető volt a betegség kezdetének késleltetése és a teljes védettség kialakulása is (Gómez-Puertas et al., 1998). Szintén bakulovírus rendszerben kifejezett kiméra p54/p30 fehérjék vakcinaként való alkalmazásával ismét csak mérsékelt sikereket értek el; a sertések túléltek a virulens E75 vírussal való ráfertőzést és neutralizáló antitestek is képződtek, viszont az ASPV-re jellemző klinikai tüneteket mutattak (Barderas et al., 2001). Egy másik vizsgálatban azonban a bakulovírus által expresszált p54, p30 és p72 kombinációja nem tudott védelmet kiváltani a fertőzéssel szemben, neutralizáló antitestek sem termelődtek (Neilan et al., 2004). A bakulovírus által kifejezett CD2v alapú vakcina szintén megakadályozta a sertések tömeges pusztulását a ráfertőzés után, de teljes védelmet nem indukált (Ruiz-Gonzalvo et al., 1996).

A módszer használható vektorvakcina létrehozására is, amelynél egy plazmid vagy élő vírussal fertőzött rekombináns konstrukciót állítanak elő, amely tartalmazza a kívánt antigén(ek)e)t kódoló DNS-t *in vivo* expresszió céljából. A vírusvektorok előnye, hogy az alkalmazott módszertől függően képesek lehetnek aktívan behatolni a gazdasejtekbe, ott pedig élő attenuált vakcinaként szaporodva erős celluláris és humorális immunválaszt indukálni a kórokozó ellen, amelyből a transzgen származik. Az ASPV elleni vektoralapú vakcina fejlesztése szempontjából fontos, hogy a vírusvektorok alkalmazása lehetővé teszi olyan immunogének kifejezését és kimutatását is, amelyek markerként szolgálhatnak, ezáltal lehetőséget biztosítanak a fertőzött állatok megkülönböztetésére a vakcinázott állatoktól. Eddig a kísérleti vizsgálatokban a Aujeszky vírust, hímlő vírust, alfavírusokat és adenovírusokat is használták rekombináns élő ASPV vektorvakcina alapjaként (Turlawicz-Podbielska et al., 2021).

Goathly és munkatársai immunogenitásuk alapján kiválasztott ASPV géneket (B602L, B646L/p72, CP204L/p30, E183L/p54, E199L, EP153R, F317L, és MGF-505-5R) kifejező adenovírus 5 és módosított vaccinia Ankara vírusvektorokat tartalmazó „elegyből” álló vakcinákat hoztak létre, azonban a pozitív hatás elmaradt a várttól. Minden

beoltott állatnál virémia volt megfigyelhető, az állatok klinikai tüneteket is produkáltak, illetve a megismételt kísérletnél a mortalitás nagy szórást mutatott az első kísérlethez képest (Goatley et al., 2020). 2020-ban Urbano és Ferreira egy újonnan azonosított fehérjét javasolt alegység vakcinaként történő felhasználásra. A pA104R egyike azoknak a fehérjéknek, amelyekről korábban kimutatták, hogy sertésekben az ellenanyagválaszfő célpontjai. Úgy tűnik, hogy ez a fehérje részt vesz az ASPV genom térbeli szerveződésében és csomagolásában. A pA104R elleni antitestválasz magasabb a tünetmentes állatokban, mint a krónikusan fertőzöttekben, ezért az e fehérje elleni antitestek a hatékony immunválasz indikátorai lehetnek, és valószínűleg részt vesznek a védelemben (Urbano and Ferreira, 2020). A pA104R gén létfontosságúnak tűnik a vírus számára, deléciója a nem patogén Ba71V-ből annyira csökkentette a vírus szaporodását, hogy azt már nem lehetett izolálni (Freitas et al., 2019).

CD2v-antigén extracelluláris doménjával és a p54 illetve p30-al kombinált DNS-alapú immunizálás sertésekben csak részleges védelmet indukált, specifikus ellenanyag-termelést nem tudtak kimutatni, viszont összefüggés volt a protektív hatás és a CD2v-specifikus CD8+ T-sejtek száma között (Argilaguët et al., 2012). Egy 4000 ASPV fragmentet tartalmazó expressziós könyvtárból álló DNS-vakcinával 60%-os védelmet sikerült biztosítani, azonban ellenanyag-termelést ebben az esetben sem sikerült detektálni (Lacasta et al., 2014).

Bár sem a rekombináns technikákkal készülők, sem pedig DNS-vakcinákkal nem sikerült eddig megfelelően hatékony ASPV-vakcinát létrehozni, a kísérletek rámutatnak az ASPV komplexitásából fakadó problémákra és arra, hogy számtalan protektivitást biztosító antigén létezhet, melyek ismeretéhez további kutatások szükségesek. A számos kórokozóval szembeni siker ellenére a DNS-vakcinákkal kapcsolatos egyik korlát az, hogy más módszerekhez képest alacsonyabb immunválaszt indukálnak, különösen nagytestű állatok esetében.

4.10.4. Élő, attenuált törzsek

A jelenleg ismert attenuált törzseket különböző időben és különböző régiókból izolálták, és általában azután jelentek meg, hogy az ASPV virulens törzsek egy bizonyos területen hosszabb ideig jelen voltak. Ezen terepi változatok génszekvencia-változása jelentőséggel bírhat az ASPV evolúciójának tanulmányozása szempontjából, illetve további módosításuk alapot adhat egy hatékony élővírusos vakcina kifejlesztésére.

A GeneBank-ban jelenleg öt, terepről származó attenuált ASPV-törzs teljes genomszekvenciája érhető el. Ezek az NH/P68 (NHV) (GeneBank: KM262845.), OURT 88/3 (GeneBank: AM712240.1), Estonia 2014 (GeneBank: LS478113.1), HuB20 (GeneBank: MW521382.1) és Pig/Heilongjiang/HRB1/2020 (GeneBank: MW656282.1)

(Zhenzhong et al., 2022). Ezen felül bővebb ismertetésre kerül a jelen dolgozat szempontjából fontos Lv17/WB/Rie1 törzs is, amelynek szekvenciája még mindig nem nyilvános.

Az NH/P68 törzset 1968-ban izolálták Közép-Portugáliában ASP-vel krónikusan fertőzött sertésekből. Ez a törzs specifikus antitesteket indukál a gazdaszervezetben, és védelmet nyújt a virulens Lisbon 60 (L60) törzs által okozott fertőzéssel szemben is (Leitão et al., 2001). Feltételezik, hogy az NH/P68 a Lisbon 60 vakcinatörzs evolúciós variációjának terméke lehet, amelyet 1960-ban sertés csontvelő leukocita tenyészetekben izolált Lisbon 60 törzs egymást követő passzázsával nyertek (Gil et al., 2008).

Az OURT 88/3 törzset 1988-ban izolálták egy óvantagból (*Ornithodoros erraticus*) egy portugáliai gazdaságban. Az OURT 88/3 törzs intramuszkulárisan oltva magas szintű p72 kapszidfehérje elleni ellenanyagot indukált, megvédte a sertéseket a virulens, szintén *Ornithodoros* fajból izolált OURT 88/1 törzssel szemben, és a sertésekben detektálható a fertőzést követően (King et al., 2011).

Az Estonia 2014 törzset 2014-ben izolálták északkelet-észtszországi vaddisznókból, ahol váratlanul magas ASPV elleni antitest prevalenciát figyeltek meg a vaddisznók között. Bár a házi sertésekkel és törpedisznókkal ellentétben a vaddisznók körében a kísérleti fertőzések magas letalitást mutattak, a túlélő vaddisznókból ASPV-specifikus antitesteket lehetett kimutatni. Az Estonia 2014 törzs valószínűleg a Georgia 2007/1 kelet-európai elterjedésének eredményeképp evolválódott (Nurmoja et al., 2017a; Nurmoja et al., 2017b; Zani et al., 2018). A genomikai elemzések az Estonia 2014 törzsnél egy közel 15000 bázispár nagyságú deléció jelezték a genom 5'-végen, és a genomvég duplikációval történő átrendeződését is megfigyelték az izolátumban (Zani et al., 2018).

A HuB20 törzset a kínai Hubei tartományban sertésizomszövetből izolálták és sertés alveoláris makrofág (PAM) sejteken tisztították. Enyhe klinikai tüneteket okoz, a sertések 30-40%-ára letális (L. Lv et al., 2022)

A Pig/Heilongjiang/HRB1/2020 törzset sertések lépéből izolálták Harbinban, (Kína). A törzs alacsony virulenciájú, és szintén nem hemadszorbeáló fenotípusú. A vírus perzisztens fertőzést és krónikus betegséglefolyást okozott, de az állatok egy részét nem pusztította el (Sun et al., 2021).

Az ASPV Lv17/WB/Rie1 törzsét 2017-ben izolálták Lettországban, vaddisznóból származó mintából. A vírus egy nukleotidot érintő deléció tartalmaz a CD2v fehérjét kódoló EP402R génben. A mutáció frameshiftet és korai terminációt eredményez a fehérjén (Barasona et al., 2021), emiatt ez a vírus sem hemadszorbeál. Az Lv17/WB/Rie1 vírussal fertőzött házi sertéseknél vagy enyhe klinikai tünetek (cianózis megjelenése a

fülben és ízületi duzzanat) alakulnak ki, vagy tünetmentesek maradnak. A legtöbb esetben csak rövid ideig tartó virémia mutatható ki, és az állatoknál magas ASPV ellenes antitestszint figyelhető meg. A fertőzött állatok azonban olyan mennyiségben ürítik a vírust, hogy a velük érintkező sertések is megfertőződhetnek (Gallardo et al., 2019). A törzset vaddisznók potenciális orális vakcinájaként használva azt találták, hogy az immunizálás 92%-os védettséget biztosíthat a II-es genotípusú ASPV törzsekkel szemben, azonban jelen formában házi sertésekben vakcinaként nem alkalmazható a fellépő mellékhatások miatt (Barasona et al., 2019).

Az említett attenuált törzsek közti különbségek főként a következő régiókban fordultak elő: az MGF-110-et tartalmazó régióban, az MGF-360 10L-től MGF-505 3R-ig terjedő bal oldali variábilis régióban, az A238L-től B602L-ig terjedő régióban, a középső variábilis régióon belül, valamint a jobb oldali variábilis régióban, az MGF-360 17R és a DP60R géneknél. A gének közti különbségek főként az alacsony GC-tartalmú régiókban találhatóak. Az Estonia 2014 törzsnél az MGF-110 család génjeinek jelentős deléciója történt, de az MGF-360 10L - MGF-505 3R régióban nem találtak génvesztést. Az NH/P68 és az OURT 88/3 esetében azonban nem találtak MGF-110 géndeléciót, de az MGF-360 10L és MGF-505 3R között történt génvesztés. Az MGF-360 6L hiányzott az Estonia 2014, NH/P68 és az OURT 88/3 törzsekből. Jelentős különbségek mutatkoznak az EP153R és EP402R génekben is amely jól mutatja a géntermékek virulenciában betöltött szerepét (Zhenzhong et al., 2022).

4.10.5. Élő, attenuált vakcinák

Szövettenyészethez adaptált vírusok

Az ASPV attenuációjának klasszikus eszköze a sorozatpasszálás primer sejteken vagy sejt kultúrában. A passzálások során általánosan megfigyelhető a vírus virulenciájának fokozatos csökkenése, azonban eközben a vírus immunogenitása is csökken, ami sertésekben megnehezíti a megfelelő védelem kialakulását. Az ASPV attenuációja virulencia vagy immunológiai tényezők kódolását végző gének megváltozott expressziójával vagy akár teljes törlésével jár együtt, és a legnagyobb változások az MGF családok figyelhetőek meg (3. melléklet).

Az ASPV genom bal oldali variábilis régiójában található szakaszokat érintő deléciókat mutattak ki a sejt kultúrához adaptált MS14 és MS44 (E70 izolátumból származnak); CV1, (E75 izolátumból származik) és a BA71V (Badajoz 60 izolátumból származik) (Ruiz Gonzalvo et al., 1986; Tabarés et al., 1987; Yáñez et al., 1995) vírusoknál is. Ezek a deléciók általában az MGF-360 és MGF-505 tagjait érintik. Például a legtöbbet vizsgált Vero adaptált Ba71V törzsből az MGF-360 9L és MGF-505 7R, valamint az I7L és MGF-360 18R között nagy géndeléciók következtek be (Rodríguez et

al., 2015). Az ASPV H293T sejteken való passzálásakor a bal oldali variábilis régióban lévő MGF gének fokozatos elvesztését és kumulatív mutációkat fedeztek fel. A 121. passzázs után összesen kb. 25 kbp elvesztését detektálták, beleértve 22 MGF gént (T. Wang et al., 2021). Ahogy korábban ismertetésre került, az MGF gencsalád legtöbb tagjának funkciója ismeretlen, de MGF-360 és MGF-505 egyes génjei bizonyítottan virulencia gének és képesek lehetnek befolyásolni a veleszületett immunitást, amit a különböző sejtadaptált vírusokkal végzett kísérletek is alátámasztanak. Azonban a különböző sejtípusokhoz adaptált vírusok különböző mértékű deléciókat mutattak az MGF régióban (3. melléklet), ami arra utal, hogy az MGF elvesztése specifikus szereppel bír a vírus sejtekhez való alkalmazkodásában (Zhang et al., 2023).

A primer sejtek és a sejt kultúrák között az a tendencia figyelhető meg, hogy az ASPV gyorsabban vagy nagyobb mértékben attenuálódik a sejt kultúrákban kevesebb passzázs idő alatt. Például az E75 törzs már négy egymást követő passzázs során részlegesen elvesztette patogenitását, amikor heterológ (CV-1) eredetű sejteken passzázták (Lacasta et al., 2015), eközben primer sejt kultúrában a virulens törzseknek, mint például a Gasson és a Portuguese, legalább 23, illetve 34 passzázsra volt szükségük ahhoz, hogy részlegesen attenuálttá váljanak (Greig et al., 1967). Az eddig ASPV-vel végzett sejt vonalakon és primer sejteken történő passzálások eredményeit röviden az 1. és 2. melléklet foglalja össze.

A problémák megoldására a kutatók új sejt vonalakat kerestek vagy fejlesztettek. Az eddigi adatok arra utalnak, hogy néhány sertés sejt vonal reális alternatívája lehet a primer makrofágoknak az ASPV kutatásában és a vírus elleni vakcina nagyüzemi előállításában. Jelenleg a WSL, PIPEC, ZMAC-4, PPK-66b, IPAM, A4C2/9K, IPKM sertés eredetű sejt vonalak, illetve az MA104 és a Cos1 zöldmajom eredetű sejt vonalak tűnnek ígéretes jelöltnek a vakcinafejlesztéshez (Meloni et al., 2022; Zhang et al., 2023). Ennek ellenére további mélyreható kutatásokra van szükség az adaptációs folyamat során bekövetkező genomikai változások és a vírus patogenitására gyakorolt hatásának a meghatározásához.

Géndeletéccióval előállított vakcinák

Az ASP elleni élővírusos vakcinák kutatásának szempontjából kritikus fontosságú stratégia a virulenciával kapcsolatos gének vagy az immunválasz megkerülésében szerepet játszó gének homológ rekombinációval vagy CRISPR/Cas9 génszerkesztéssel történő deléciója. Ezt a megközelítést a természetes úton legyengített törzsek biztonsági profiljának javítására és a publikusan elérhető virulens törzsek attenuálására is alkalmazzák. Eddig több gént is célba vettek: a hemagglutinin CD2v/EP402R, a timidin-kináz TK/K169R, az NF- κ B és NFAT gátló A238L, az apoptózist gátló A179L és A224L,

a fehérje-foszfataz-1 aktivátor NL/DP71L gént, az I. típusú interferonok indukciójának gátlásában részt vevő MGF-360 és -505 génjeinek, az immunválaszt befolyásoló I329L, K205R, DP148R és A276R, valamint a különböző ASPV virulens törzsek virulenciájában szerepet játszó, de hatásmechanizmusukban ismeretlen 9GL/B119L, UK/DP96R, I177L, I226R, A137R és E184L géneket (Urbano and Ferreira, 2022).

Az egygén deléciók azonban nem mindig hozták meg a kívánt eredményt. Más specifikus virulencia gének, mint a timidin-kináz K169R és az NL/DP71L deléciója hasonlóan ellentmondásos eredményeket hozott, mint az 4.9. alfejezetben részletezett EP402R gén eltávolítása és a használt vírustörzstől függően eltérő fenotípusokat eredményezett (Neilan et al., 2002; Sanford et al., 2016). A specifikus virulenciafaktorok természetes úton attenuálódott vírusokból való deléciója szintén csökkentheti a szülői vírussal való megfertőzéssel szembeni védekezőképességet, ahogyan azt az OURT88/3 (amelyből az DP71L és DP96R géneket deletálták) és az A238L, A224L, EP153R és A276R delécióval rendelkező NH/P68 esetében kimutatták (Abrams et al., 2013; Gallardo et al., 2018). Ezek a vizsgálatok megerősítik, hogy az ASPV genetikai módosításainak eredményei kiszámíthatatlanok, és a géneltávolítások hatása a vírus immunvédelmet kiváltó képességére sokszor törzs-specifikus.

Több virulenciafaktor egyidejű deléciója alkalmanként túlságosan legyengített vírusokat eredményezhet, amelyek *in vitro* nem szaporíthatók, vagy nem képesek megfelelő immunválaszt kiváltani. Ez a helyzet a 9GL géndeletált Georgia 2007/1 izolátum alapú ASFV-G- Δ 9GL/ Δ CD2v és az ASFV-G Δ 9GL/ Δ NL/ Δ UK kísérleti vakcinatörzsek esetében, amelyek mindegyike jelentősen csökkent védekező potenciállal rendelkezett a szülői törzshöz képest (Ramirez-Medina et al., 2019; Gladue et al., 2020). Figyelemre méltó kivétel a szintén Georgia 2007/1 alapú kettős mutáns, amelyből hiányzik a 9GL és a UK gén, és robusztus védelmet nyújtott a ráfertőzést követően is (O'Donnell et al., 2017).

Egy másik ígéretes vakcinajelölt a Chen és munkatársai által létrehozott HLj/18-7GD vírus, amely egy hét gén delécióját tartalmazó (GF505-1R, MGF-505 2R, MGF-505 3R, MGF-360 12L, MGF-360 13L, MGF-360 14L, CD2v) attenuált törzs. A vakcinajelölt hosszú távú (tíz hét) immunitást biztosított sertésekben ASPV ráfertőzéssel szemben. és a vemhes kocáknál történő alkalmazás biztonságosságát is igazolták. A kísérletben azonban csak a célzott gének hiányát vizsgálták, ezért nem zárható ki a célon kívüli mutációk megjelenése a vírus genomjában (Chen et al., 2020).

Vietnámban először egy MLV vakcinát alkalmaztak, amelyet a Georgia 2007/1 törzsből állítottak elő az ismeretlen funkciójú I177L gén deléciójával (ASFV-G- Δ I177L), azonban a vietnámi kormány 2022 szeptemberében felfüggesztette ennek alkalmazását a sertések tömeges pusztulására hivatkozva ("Feedstrategy.com" 2023). A Vietnámban

jelenleg 2022 júliusától sertéstelepeken szigorú felügyelet mellett alkalmazható második MLV pedig szintén egy Georgia törzs alapú vakcina, amelyből hat, az MGF-360 és MGF-505 géncsaládból származó gént távolítottak el. A vakcina hatékonysága a vietnámi kormány eddigi kiadott információi alapján 95%-osnak bizonyult ("WOAH Vietnam report" 2022; "Vietnamplus.vn" 2023).

A kutatóknak lehetőségük van arra, hogy az irányított géndeléciót és a sejtvonalon való passzálás miatt keletkező mutációs képességet is felhasználják a vakcinafejlesztéshez. Ígéretes jelölt egy ASFV-G- Δ I177L származéktörzs, az ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR, amely az I177L génen kívül 9 további, főként MGF régiókat érintő géndeléciót tartalmaz (MGF-360 6L, X69R, MGF-300 1L, MGF-300 2R, MGF-300 4L, MGF-360 8L, MGF-360 9L, MGF-360 10L), amelyek az ASFV-G- Δ I177L törzs sertés hám eredetű sejtvonalon történő passzálása során jöttek létre. A vakcina a ráfertőző vizsgálatokban megtartotta ugyanazt az attenuációs szintet, immunogén jellemzőket és védőhatást, mint a szülői ASFV-G- Δ I177L vírus (Borca et al., 2021).

5. Célkitűzések

1) Céljaink között szerepelt egy olyan protokoll kidolgozása, amellyel az afrikai sertéspestis vírusának teljes genomja gyorsan és pontosan meghatározható újgenerációs szekvenáló (NGS) módszerekkel. Egy egyszerűen alkalmazható szekvenálási módszer nagymértékben megkönnyíti a vírustörzsekben bekövetkezett változások azonosítását.

Az afrikai sertéspestis elleni egyik legígéretesebb vakcinajelölt egy, a természetben előforduló attenuált törzs, az Lv17/WB/Rie1 (Lv17), azonban mellékhatásai miatt a törzs jelenlegi formájában vakcinaként nem alkalmazható. Fő célunk az Lv17 attenuációjának növelése és élővírus-tartalmú vakcinajelöltek előállítása volt.

2) Az Lv17 attenuációját kétféle úton terveztük elérni; egyrészt célzott génmódosításokkal, másrészt a törzs Cos7 szövettenyészetben való sorozatpasszálása során bekövetkező genetikai változások kihasználásával.

3) A célzott génmódosításokhoz először egy eddig ismeretlen funkciójú multigén családba (MGF) tartozó gén, az MGF 110-11L eltávolítását tűztük ki célul CRISPR-Cas9 rendszer segítségével. Az általunk létrehozott mutáns törzs felhasználásával az MGF 110-11L gén biológiai tulajdonságait kívántuk tanulmányozni sertés alveoláris makrofágokon (PAM), és tesztelni akartuk a módosított Lv17 vírus virulenciára és replikációra gyakorolt hatását.

4) Célunk volt továbbá három, már jól tanulmányozott, az ASPV virulenciájában szerepet játszó gén (B119L, EP402R, EP153R) együttes eltávolítása víruskeresztezéssel az Lv17 genomjából. Szándékunkban állt a gének eltávolításával, majd a homológ rekombinációs események által kiváltott változásokat szintén PAM sejteken vizsgálni. Ezután a létrehozott vírusokat az általunk kifejlesztett szekvenálási módszer segítségével terveztük értékelni.

5) Végül pedig az Lv17 törzs Cos7 szövettenyészetben való sorozatpasszálása során bekövetkező genetikai változásokat terveztük vizsgálni.

6. Anyag és módszer

6.1. Sertés alveoláris makrofágok (PAM) előkészítése és fenntartása

A PAM-okat a WOAHA (korábban OIE) kézikönyve (OIE – World Organisation for Animal Health, 2018) szerint izoláltuk, majd $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on PAM fagyasztófolyadékban tároltuk. Az RPMI-1640 alapú fagyasztófolyadék 30% magzati szarvasmarha szérumot (FBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) és 10% dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazott. A PAM-okat RPMI-1640 alapú tápfolyadékban tartottuk fenn, melyet 10% (v/v) FBS-el, valamint 1X antibiotikum/antimikotikum (10000 U/ml penicillin, 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Amfotericin B) oldattal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 2 mM L-glutaminnal (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) egészítettük ki. A sejteket $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk 5% CO_2 mellett 24 órán át a fertőzés előtt.

6.2. Szekvenálás

6.2.1. Vírusfertőzés

A szekvenálási protokoll kidolgozásához az ÁTKI Funkcionális Virologia Csoportja által izolált ASFV_HU_2018 izolátumot (GenBank azonosító: MN715134) használtuk. A PAM sejteket (10^5 sejt 1 ml PAM tenyésztő tápfolyadékban) 30 μl ASPV-vel fertőzött PAM sejtek felülúszójával fertőztük (titer: $7,2 \times 10^6$ FFU/ml) egy 24 vájatú lemez több vájatában, és $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. A fertőzést követő 72 órában (hpi) a felülúszót eltávolítottuk, egyenlő adagokra osztottuk és $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

6.2.2. DNáz I kezelés

Az ASPV-vel fertőzött PAM sejtek tápfolyadékát 72 óra elteltével összegyűjtöttük, és 13 000 g-nél 3 percig centrifugáltuk, hogy megszabaduljunk a sejtörmelétől. Ezt követően 100 μl felülúszóhoz 100 μl DNáz I oldatot adtunk, amely 20 μl $10\times$ FastDigest puffert (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA), 40 mM MgCl_2 -t és 1,5 μl DNáz I-t (50 U/ μl) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) tartalmazott. A mintákat $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 10 μl 0,5 M etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) adtunk a reakció leállításához.

6.2.3. DNS-tisztítás

A vírus DNS-t a High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Basel, Svájc) segítségével tisztítottuk a gyártó ajánlásait követve. A DNS elúcióját 50 μl elúciós pufferrel végeztük el.

6.2.4. Kvantitatív PCR a DNS tartalom meghatározására

A gazda genomtartalmának és az ASPV virális DNS arányának meghatározására ASPV-specifikus dual kvantitatív PCR-t (qPCR), a Virotype ASFV PCR Kit-t használtunk (Qiagen, Hilden, Németország), melyet a gyártó ajánlása szerint alkalmaztunk.

6.2.5. Aspecifikus DNS-amplifikáció

A vírus DNS-t a REPLI-g Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével amplifikáltuk a gyártó protokollját követve.

6.2.6. Az amplifikált DNS tisztítása

A REPLI-g mintákat a NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit (Macherey-Nagel Düren, Németország) segítségével tisztítottuk. A DNS-t 20 µl elúciós pufferbe vettük fel, és koncentrációját NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel megmértük.

6.2.7. IonTorrent szekvenálás

Az enzimikus fragmentálást 100 ng DNS-el végeztük a NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent kit (New England BioLabs, Hitchin, Egyesült Királyság) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. Az adaptor-ligációt ugyanezen készlet reagenseit használva végeztük, míg a vonalkódolt adaptorokat az Ion Xpress Barcode Adapters (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) készletből nyertük. A vonalkóddal rendelkező könyvtár DNS-mintáit a gyártó utasításai szerint a Gel/PCR DNS-fragmentum extrakciós kit (Geneaid Biotech, Ltd., Taipei, Tajvan) segítségével tisztítottuk. Az eluált DNS-könyvtárakat ezután 2%-os E-Gel SizeSelect II agarózon (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) futtattuk. A 300 és 350 bp közötti termékeket további tisztítás nélkül közvetlenül a NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent kit (New England BioLabs, Hitchin, Egyesült Királyság) PCR-keverékében használtuk fel. A termékeket a Gel/PCR DNS-fragmentumok extrakciós kit használatával tisztítottuk. A könyvtár DNS-ét nukleázmentes vízben eluáltuk, és koncentrációját Qubit 2.0 berendezésen a Qubit dsDNA BR assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével határoztuk meg. Ezt követően a könyvtár DNS-ét 10-14 pM-ra hígítottuk, majd emulziós PCR-rel klonális amplifikációt végeztünk. Ezt a lépést a gyártó utasításai szerint végeztük az Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit használatával Ion OneTouch v2 műszeren. A gyöngyök dúsítását (Ion OneTouch ES készüléken) és a pre-szekvenálási beállítás további lépéseit a gyártó 200-bp protokollja szerint végeztük. Az Ion PGM szekvenáló kitéhez ajánlott szekvenálási protokollt 316-os chipen szigorúan követtük.

6.2.8. Illumina szekvenálás

Az Illumina platformon történő szekvenáláshoz először Illumina-specifikus könyvtárakat készítettünk az Illumina® Nextera XT DNS Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) segítségével. A DNS fragmentek jelöléséhez Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, San Diego, CA, USA) kitet használtunk. A DNS mintákat 0,2 ng/μl-re hígítottuk nukleázmentes vízben (Promega, Madison, WI, USA) 2,5 μl végtérfogatban. A tagmentáló reakcióhoz 5 μl Tagment DNS (TD) puffert használtunk 2,5 μl AmpliconTagment Mix keverékkel. Ezután a mintákat 55 °C-on, 6 percig inkubáltuk a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével. Ezután hagytuk, hogy a minták 10 °C-ra hűljenek, majd azonnal hozzáadtunk 2,5 μl Neutralize Tagment (NT) puffert. A semlegesítést 5 percig végeztük szobahőmérsékleten. Összesen 7,5 μl Nextera PCR Master Mix (NPM) keveréket kombináltunk 2,5-2,5 μl i5 és i7 indexprimerekkel, és hozzáadtuk a tagmentált DNS-mintához. Az indexprimerekkel 12 PCR-ciklust végeztünk. A PCR reakció a következő lépésekből állt: a kezdeti 30 mp-es 95°C-on történő elődenaturációt 95 °C-on 10 mp-es denaturációs lépés követte, az annelláció 55 °C-on 30 mp-ig tartott, majd 72 °C-on 30 mp-ig az extenzió. A PCR-ciklusokat követően a mintákon elvégeztünk egy végső extenziós lépést: 5 p-ig 72 °C-on, majd 10 °C-on tartottuk azokat. A létrehozott indexált NDS könyvtárat a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taipei, Tajvan) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított DNS minták koncentrációját Qubit 2.0 berendezéssel határoztuk meg Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. A könyvtár DNS-eit pooloztuk és denaturáltuk. A denaturált könyvtár poolt 1,5 pM végkoncentrációban NextSeq 500/550 Mid Output áramlási cellára töltöttük, és Illumina® NextSeq 500 szekvenálóval (Illumina, San Diego, CA, USA) szekvenáltuk.

6.2.9. Mapping és a genom szekvenciák összeállítása

Az NGS által nyert szekvenciaolvasásokat a Geneious Prime 2019.0.3 (Biomatters Ltd., Auckland Új-Zéland) segítségével dolgoztuk fel. A readeket a sertésgenomhoz (Sscrofa11.1, GenBank azonosító: GCF_000003025.6) mappeltük a gazdaszervezet DNS-szennyeződésének meghatározása és kiszűrése érdekében. Az így kapott – már csak virális readeket tartalmazó – readeket az ASPV Belgium 2018/1 (GenBank azonosító: LR536725) törzséhez illesztettük és ez alapján határoztuk meg a konszenzus szekvenciát. A mappelés érzékenységét közepesre állítottuk be, a Geneious alapbeállításait használva.

6.2.10. Sanger-szekvenálás

Három nehezen meghatározható régiót Sanger-módszerrel szekvenáltunk, mely szakaszok amplifikálásához PCR reakciót terveztünk. A primereket SnapGene program (Dotmatics, Bishop's Stortford, UK) segítségével terveztük és a Sigma-Aldrich vállalattól (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) rendeltük. A különböző fragmentumok amplifikálásához használt primerpárok adatait az 1. táblázat tartalmazza. A szekvenáláshoz a szakaszokat Primestar GXL kit GC PCR mix-szel (Takara Bio Inc., Japán), 25 µl végtérfogatban, 1 µl tisztított ASPV DNS-sel, a gyártó utasításai szerint amplifikáltuk. Az amplifikációt a következő PCR programmal végeztük: 98 °C-on 30 sec elődenaturációt 30 ciklus követett (98 °C 10 sec, 60 °C 15 sec, 68 °C 1 min), majd a végső extenzió 68 °C-on 2 percig tartott. Ugyanezeket a primereket használtuk a BaseClear B.V. (Leiden, Hollandia) által végzett Sanger-szekvenáláshoz.

1. táblázat: A poliC/G régiókhoz használt primerek

Régió	Primer neve	Primer szekvenciája
14067–14379	seqASF_1 4234-F	5'- CTGAGATAGCCAAATCAAATAC -3'
	seqASF_1 4234-R	5'- CGATTGTAAACTGTATAGTTAATCG -3'
15551–15809	seqASFV_ 15670-F	5'- CAAAGCAGCCTGTATATGCAATACC -3'
	seqASFV_ 15670-R	5'- CAATCATTCTATTGTAAACTGTAGAG -3'
19845–20072	seqASFV_ 20022-F	5'- TAGTACATCAATGTTGTAAGTTTG -3'
	seqASFV_ 20022-R	5'- CTATCTAAACGTGCTTCTATGAATTC -3'

6.3. A módosított vírusok előállítása

6.3.1. Plazmidtervezés és az Lv17/WB/Rie1/d110-11L konstrukció összeállítása

Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L konstrukciót az Lv17/WB/Rie1 törzsből az MGF 110-11L gén deléciójával hoztuk létre. A 110-11L gént az afrikai sertéspestis vírus p72 promóterének szabályozása alatt álló zöld fluoreszkáló fehérjére (eGFP) cseréltük.

A CRISPR-Cas9 rendszerhez szükséges rekombináns transferplazmid (p14L-eGFP) létrehozásához a pUC19 vektort (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtuk gerincként. A rekombinációs kazetta tartalmazta a bal homológ kart (1108 bp), az ASPV p72 promóterét, az eGFP gént és egy jobb homológ kart (1120 bp) (6. ábra). A p14L-eGFP-t a linearizált pUC19 transfer plazmidból és a rekombinációs kazetta három egymást átfedő fragmentumából állítottuk össze (2. táblázat), amelyet előzetesen PCR-el hoztunk létre a Seamless PLUS Cloning and Assembly Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) használatával, a gyártó utasításai szerint. A transferplazmid létrehozásához szükséges primereket a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük és szekvenciájukat a SnapGene programmal terveztük.



6. ábra: Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L konstrukcióhoz tervezett rekombinációs kazetta sematikus ábrája

2. táblázat: A transzfer plazmid létrehozásához szükséges primerek és szekvenciájuk

Felerősített régió	Primer neve	Primer szekvenciája
pUC19 + 1. homológ kar	reg1_d11_F	5'-ACGGCCAGTGAATTTCGAGCTCGGTA CGTTATGTTGATAGTGTA-3'
1. homológ kar + p72 promóter	reg1_d11_R	5'-ATATAATGTTATAAAAATAATTTATTGTT TTTATTAAATACGTATAAAGGGTTTAGTCATTAATAG-3'
p72 promóter + eGFP	reg2_d11_F	5'-TATTTAATAAAAACAATAAATTATTTT TATAACATTATATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3'
2. homológ kar + eGFP	reg2_d11_R	5'-GCTACTCAGTCCTC ATTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'
eGFP + 2. homológ kar	reg3_d11_F	5'-GCATGGACGAGCTG TACAAGTAAAATGAGGACTGAGTAGCC-3'
pUC19 + 2. homológ kar	reg3_d11_R	5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTAC GCCAAGCTTGCATGCCTCTATAAAGCAATACTGTC-3'

Két gRNS plazmidot hoztunk létre egy upstream és egy downstream kettősszálú protospacer oligonukleotid (3. táblázat) pX330-DNLS1_2-NeoR plazmidba való klónozásával.

3. táblázat: A gRNA kialakításához használt oligonukleotidok

Oligonukleotid neve	Oligonukleotid szekvenciája
CRISPR11_p72F	5'-CACCG CTAAACCCTTTATACGCTGT-3'
CRISPR11L_p72R	5'-AAAC ACAGCGTATAAAGGGTTTAG C-3'
CRISPR11L_endF	5'-CACCG GTAATTCATGTGCAAGAATG-3'
CRISPR11L_endR	5'-AAAC CATTCTTGACATGAATTAC C-3'

6.3.2. Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L konstrukció előállítása

A mutáns vírusok előállítására CRISPR/Cas9-közvetített homológ rekombinációt használtunk Borca és mtsai. (2018) szerint. A PAM sejteket 6 vájatú (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sejttenyésztő lemezre (5×10^6 /vájat) szélesztettük 24 órával a fertőzés és transzfecció előtt. Minden egyes vájatot 3 MOI (multiplicity of infection) Lv17/WB/Rie1 ASPV törzssel fertőztünk 2 ml RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) tápfolyadékban. A transzfeccióhoz tápfolyadékban összekevertünk 1,5 µg transzfer plazmidot és 0,75-0,75 µl gRNS plazmidot 150 µl RPMI-1640 médiumot, majd 10 µl Fugene HD (Promega, Madison, Wisconsin, USA) transzfecció reagenst adtunk a kevert plazmidokhoz.

Szobahőmérsékleten történő 10 perces inkubálás után a keveréket a fertőzött makrofágokhoz adtuk. A transzfektált PAM sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk 24 órán keresztül.

6.3.3. Az Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL konstrukció előállítása

Az ASPV Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL izolátumot homogén mCherry markergént tartalmazó Lv17/WB/Rie1/dGL és eGFP markergént hordozó Lv17/WB/Rie1/dCD mutáns vírusokból történő rekombinációval hoztuk létre, amely konstrukciókat az ÁTKI Funkcionális Virologia Csoport munkatársai terveztek és izoláltak az Lv17/d110-11L vírusról alkalmazott módszer szerint. A PAM-okat a fent leírtak szerint szélesztettük és 3-3 MOI-val fertőztük az Lv17/WB/Rie1/dGL és Lv17/WB/Rie1/dCD vírusizolátumokkal. Az 1 órás inkubáció után a felülúszót eltávolítottuk, és friss PAM-fenntartó tápfolyadékra cseréltük. A felülúszót 3 nap elteltével összegyűjtöttük. A rekombináns vírusokat manuálisan tisztítottuk fluoreszcens mikroszkóp alatt. Miután az állományt homogénnek tekintettük, további két véghígítási lépést végeztünk.

6.3.4. Az Lv17/WB/Rie1/d24 konstrukció előállítása

Az ASPV Lv7/d24 izolátumot sorozatpasszázs útján hoztuk létre. Az első 8 passzázszt Cos7 sejtekben (ATCC CRL-1651) végeztük 80-100%-os konfluencia mellett, 75 cm² -es szövettenyésztő flaskában. A sejteket DMEM tápfolyadékban (Capricorn, Ebsdorfergrund, Németország) tartottuk fenn magas glükózkoncentrációval, amelyet 10% (v/v) FBS-el, 1X antibiotikum/antimikotikum oldattal egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on inkubáltuk 5% CO₂ mellett. A Cos7 sejteket 3 MOI Lv17/WB/Rie1 törzsszel fertőztük. Minden passzázsban 7 nap elteltével 200 µl felülúszót vittünk át új Cos7 sejtekre. A nyolcadik passzázs után a következő 3 passzázszt sertés alveoláris makrofágokban végeztük. Minden 3 nap után 200 µl felülúszót átvittünk friss PAM-okra.

6.4. A vírusok izolálása

A mutáns vírusokat fluoreszcens mikroszkóp alatt izoláltuk manuálisan, úgy, hogy a fluoreszcensen világító (markergént tartalmazó mutáns vírussal fertőzött) sejteket pipetta segítségével elkülönítettük a nem fluoreszcensen világító sejtektől. Az izolált, tehát mutáns vírussal fertőzött sejteket 100 µl RPMI tápfolyadékban lefagyasztottuk, háromszor felolvasztottuk, majd 10-szeres sorozathígítást készítettünk. 96 vájatú lemezre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) szélesztett PAM-okat fertőztünk az izolált vírussal, majd 37 °C-on inkubáltuk 24 órán át. Ezt az eljárást addig ismételtük, amíg az eGFP-t kifejező fertőzött sejtek aránya elérte a 100%-ot.

6.5. A vírus stockok előállítása

Az izolált vírusok nagy mennyiségben történő előállításához – mind a három mutáns vírus esetében – a PAM-okat 75 cm²-es szövettenyésztő flaskára (SARSTEDT AG&Co. KG, Nümbrecht, Németország) szélesztettük, majd 100 µl izolált vírussal fertőztük. A vírust tartalmazó felülúszót három nap múlva háromszori fagyasztással és olvasztással összegyűjtöttük és titráltuk.

6.6. Immunfluoreszcens festés (IF) és titermeghatározás

Az titert IF festés alkalmazásával a legmagasabb hígítási foknak és a fertőzött sejtek számának ismeretében állapítottuk meg, fluoreszcens fókuszegység (FFU) alapú meghatározással.

A vírusokból tízszeres hígítási sort készítettünk, majd 96 vájatú sejtenyésztő lemezre szélesztett PAM sejteket fertőztünk a hígított mintákkal. Huszonnégy órával a fertőzés után a sejteket 3%-os formaldehiddel (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) fixáltuk, amelyet 1x foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Németország) hígítottunk. A formaldehid eltávolítása után a sejteket kétszer mostuk immunfluoreszcens (IF) mosópufferrel (1,5 g BSA, 30 ml 10x PBS desztillált vízzel feltöltve 300 ml-re). Ezt követően a sejtek feltárása érdekében 15 percig, 50 µl, 1%-os Triton X-100-zal kezeltük a mintákat. A Triton X-100 eltávolítása után újabb kétszeri mosás következett.

Az immunfluoreszcens festést sertés anti-ASPV poliklonális antitesttel (Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy, Lengyelország) végeztük, amelyet 5%-os, inaktivált lószérumot tartalmazó PBS-ben 2000-szeresre hígítottunk és 1 órán át inkubáltunk. A másodlagos jelölés CF@568 anti-sertés másodlagos antitesttel (Biotium, Fremont, CA, USA) 1000-szeres hígításban történt. A sejtmagokat 1 µg/ml koncentrációjú Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) reagenssel festettük, majd szintén 1 órán át inkubáltuk. A feleslegben jelen lévő ellenanyagokat IF pufferben történő mosással távolítottuk el. A kiértékelést Axio Observer D1 (Zeiss, Oberkochen, Németország) típusú inverz fluoreszcens mikroszkóppal végeztük.

6.7. Kópiaszám meghatározás

Az ASPV különböző génmódosított izolátumainak kópiaszámának meghatározásához használt reakció során alkalmazott primereket az MN715134 azonosítójú szekvencia alapján terveztük SnapGene program segítségével az ASPV konzervatív p72 génjének egy 328 nukleotid hosszú régiójára.

A qPCR 25 µl végtérfogatú reakcióoldata 12,5 µl 2X DreamTaq PCR Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1,25 µl 20X EvaGreen festéket (Biotium, Fremont, CA, USA), 1 µl forward (F2: 5'-TACGTTGCGTCCGTGATAGG-3') és 1 µl reverse (R2: 5'-AGTTCGGATGTCACAACGCT-3') primereket tartalmazott 1 µM koncentrációban. A primerek a Sigma-Aldrich cégtől származnak.

A keverékhez a húszszorosra hígított felülúszóból 1 µl templát DNS-t adtunk. A fertőzött PAM sejtek hígított felülúszója 72 °C-on történő, 20 perces hőkezelés után közvetlenül templátként került felhasználásra a reakcióban.

A PCR reakció 5 perces 95 °C-on történő elődenaturálással kezdődött, amelyet 35 ciklus követett: denaturálás 95 °C-on 30 másodpercig, az anelláció 62 °C-on 30 másodpercig, az elongáció 72 °C-on 35 másodpercig tartott, melyet egy végső elongációs lépés követett 72 °C-on 5 percig. A qPCR specifikitását olvadási görbeelemzéssel ellenőriztük. A víruskópiaszámokat a tisztított amplikon 10-szeres hígításával készült standard görbe segítségével számoltuk ki.

6.8. A mutáns vírusok szekvencia adatainak vizsgálata

A mutáns vírusok (Lv17/d110, Lv17/dGL-dCD, Lv17/d24) esetében is a szekvenciák összeállítása a Geneious Prime 2019.2.3 programmal történt. Az elemzéshez Bowtie2 és BMAP térképezési módszereket használtunk normál érzékenységgel. Referenciaként az Lv17/WB/Rie1 törzset használtuk.

6.9. Statisztikai elemzés

A vírustítek közötti szignifikanciaszint meghatározására a Mann-Whitney U-tesztet használtuk, az Lv17/d110 vírus specifikus fertőzőképességének statisztikai elemzéséhez a Kruskal-Wallis-tesztet alkalmaztuk. Friedman tesztet használtunk az Lv17/dGL-dCD, Lv17/d24 és az Lv17 vírusok összehasonlítására. A <0,05 p-értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzéseket az R szoftverrel (4.2.2. verzió) végeztük.

7. Eredmények

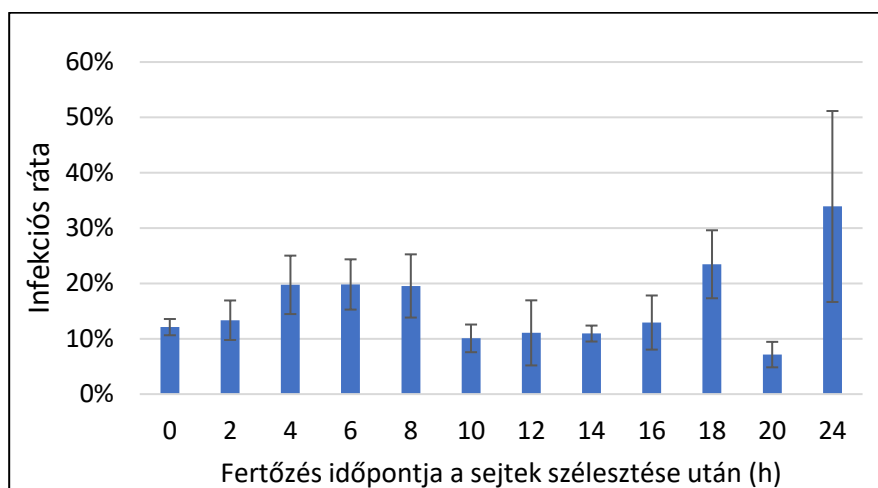
7.1. Újgenerációs szekvenáló módszer fejlesztése

7.1.1. A PAM sejtek fogékonyságának vizsgálata

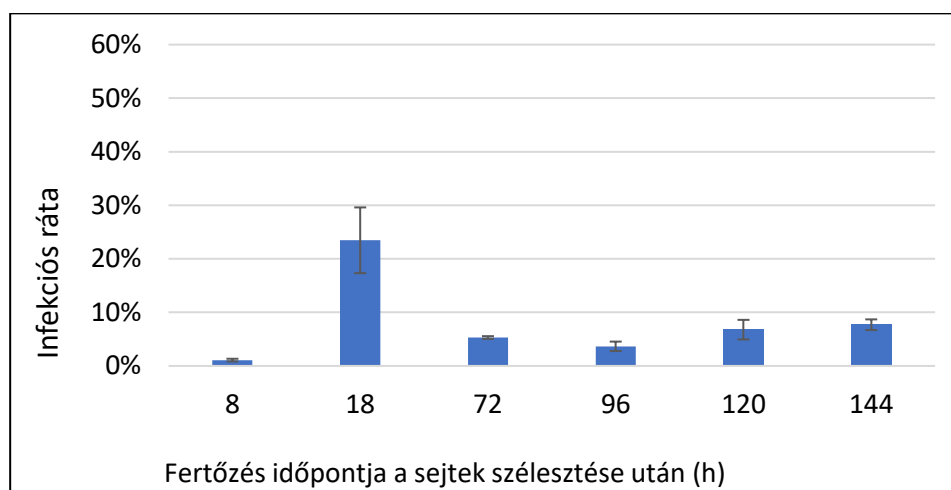
A szakirodalomból ismert tény, hogy a PAM sejtek ASPV-vel való fertőzhetősége rendkívül körülményes és nehezen reprodukálható, a fertőzési körülmények csekély szintű megváltoztatása is a fertőzhetőség nagy mértékű megváltozásával járhat. Emiatt a szekvenálási protokoll kidolgozásához először az PAM-ok fogékonyságát és fertőzési dinamikáját vizsgáltuk és standardizáltuk.

A fogékonyság vizsgálata során a szélesztés után 2 óránként fertőztük a sejteket 24 órán át, illetve egy hosszabb kísérlet során 144 órán át (7. ábra). A fertőzést immunfluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk. A kétóránkénti fertőzéskor a PAM sejtek fogékonyságának oszcillációja figyelhető meg. Bár 4-8 óráig enyhén megugrik a fertőzhetőség, de 8 óra után visszacsökken. A szélesztés után 18 órával azonban ismét megnő a PAM-ok fogékonysága, viszont 20 órával a szélesztés után drasztikusan lecsökken. Ezután ismét egy növekedés figyelhető meg, azonban az eddigiektől eltérően jelentősebb mértékben nő meg a PAM-ok fertőzhetősége. A legnagyobb fogékonyságot a sejtek a szélesztés után 24 órával mutatják. Ezt az eredményt a hosszabb fertőzési kísérlet is alátámasztja; 24 órával a szélesztés után jelentősen magasabb a PAM-ok fertőzhetősége, mint a kísérlet többi időpontjában.

(A)



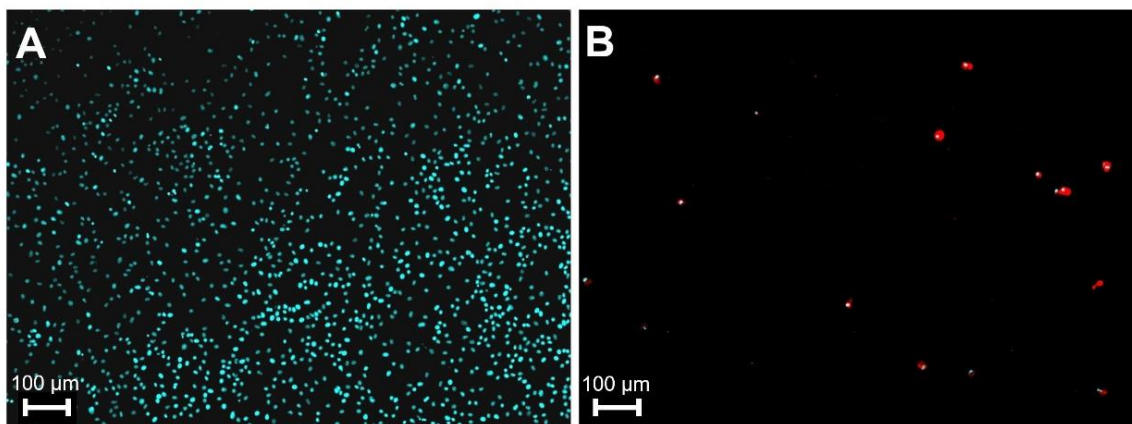
(B)



7. ábra: ASPV-vel fertőzött sejtek aránya a fertőzés (A) első 24 és (B) első 144 órájában

7.1.2. Az ASPV fertőzési dinamikájának vizsgálata

Az ASPV-t PAM sejteken szaporítottuk, a fentebb leírtak szerint 24 órára fertőztük a sejteket, majd a fertőzött sejtek dinamikáját immunfluoreszcenciával követtük nyomon 24, 48 és 72 hpi-nál. A fertőzési arány 24 és 48 hpi-nél nagymértékű variációt mutatott (0,5-20%, illetve 15-60%) még akkor is, ha a párhuzamos fertőzésekhez ugyanazokat a sejt- és víruspreparátumokat használtuk. 24 hpi-től a fertőzési rátától kvázi függetlenül azonban általában 72 órával a fertőzés után a sejtek 90%-ánál lízist figyeltünk meg; a nem lízált sejtek ~90%-a bizonyult fertőzöttnek (8. ábra). A fertőzés után 72 órával a felülúszót összegyűjtöttük és centrifugáltuk, hogy megszabaduljunk a sejtörmeléktől, majd a mintákból kivontuk a DNS-t.



8. ábra: Az ASPV fertőzés hatása a primer makrofágokra 72 óra elteltével. A sejteket próbafertőzéssel (A) vagy ASPV 3 MOI-val (B) fertőztük. A sejtmagokat Hoechst 33342 reagenssel (kék), a fertőzött sejteket (piros) ASPV pozitív szérummal és CF488-mal jelölt anti-sertés másodlagos antitestekkel mutattuk ki.

7.1.3. A DNS mennyiségi meghatározása és a vírus DNS maximalizálása

A DNS mennyiségi meghatározásához használt Virotype ASFV PCR Kite lehetővé tette az ASPV DNS és sertésgenom egyidejű kimutatását dual PCR segítségével. Az eredményeket három párhuzamos mérés átlagából számoltuk. A ciklusszám (Ct)-értékek ~22 és ~29 körül alakultak mindhárom mintánál az ASPV és a sertés DNS esetében (4. táblázat).

4. táblázat: A kezdeti Ct értékek a mintákban

	Kezdeti Ct		
	ASPV	Sertésgenom	Különbség
S1	22,08	28,33	6,25
S2	21,78	28,35	6,57
S3	22,49	29,09	6,6

7.1.4. A gazdagenom DNS-sel való szennyeződésének minimalizálása

A DNáz kezelést és az ultracentrifugálást széles körben használják a szennyező gazdaszervezet DNS-ének eltávolítására az ASPV-mintákból (Chapman et al., 2011; Bacciu et al., 2016; Olesen et al., 2018b). Mivel az ultracentrifugák drágák és messze nem tartoznak az állatorvosi BSL3 laboratóriumok standard eszközei közé, a DNáz kezelések hatékonyságának növelésére és eredményének nyomon követésére koncentráltunk.

A főtális borjú szérummal kiegészített, sejtlyátum tartalmú PAM tenyésztő oldat komplex fehérjeoldat, amely kétértékű kation- és DNS-kötés révén képes gátolni a DNáz I aktivitását (Kroll and Elin, 1985). A hatékony DNáz I kezelés biztosítása érdekében a vírust tartalmazó tápoldatot kétszeresére hígítottuk hozzáadott MgCl₂-t tartalmazó nukleáz pufferben. A 75U DNáz I-el történő 1 órás inkubációt követően a reakciót EDTA-

val leállítottuk, és a vírus nukleinsavat oszlopon tisztítottuk. A kiindulási 3 mintából 3-3 párhuzamos kezelést végeztünk. A vírus DNS detekciója során a legtöbb esetben minimális növekedést (Ct +1-2) észleltünk a kezeletlen és a DNáz I-el kezelt minták Ct-értékei között. A gazdaszervezet DNS-ének mennyisége ezzel szemben jelentősen csökkent, azonban a csökkenés mértéke mintánként eltérő volt, amint azt a HEX (sertés genom specifikus) csatornában a Ct-érték növekedésének széles tartománya (9-től 18-ig) jelzi. Az egyik mintánál pedig a harmadik párhuzamos kezelés nem mutatott eredményt (5. táblázat).

5. táblázat: A DNáz I és EDTA kezelés utáni Ct értékek

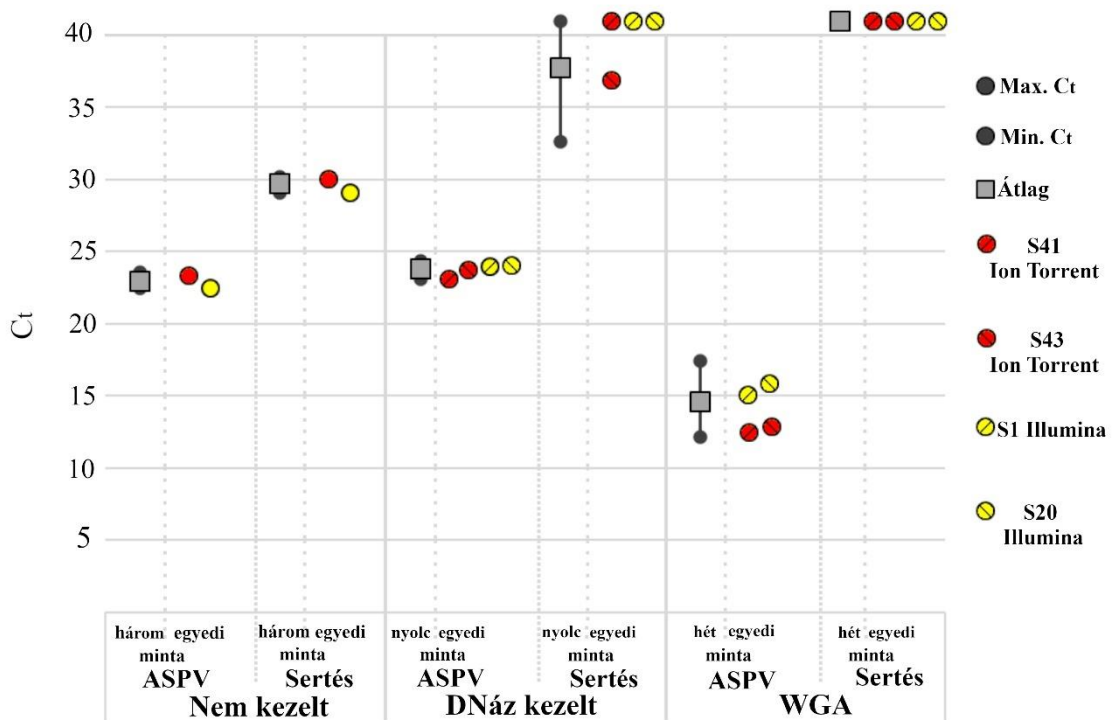
	Dnáz I + EDTA utáni Ct		
	ASPV	Sertés genom	Különbség
S1	24,36	41	16,64
	24,21	41	16,79
	23,1	41	17,9
S2	23,48	32,71	9,23
	23,66	36,86	13,2
	23,67	34,56	10,89
S3	23,74	35,43	11,69
	23,91	32,62	8,71
	N/A	N/A	

7.1.5. A vírus-DNS nem specifikus amplifikációja

A DNS abszolút mennyiségének növelése érdekében az NGS mintaelőkészítési protokollokhoz teljes genom amplifikációt (WGA) végeztünk a REPLI-g Mini Kit segítségével. A reakcióhoz a legmagasabb vírustartalmú (virális Ct ~23, gazdaszervezet Ct >40), tisztított DNS-mintákat választottuk ki. A WGA-reakciót követően a qPCR kimutatta a vírus DNS-tartalom ~1000-szeres növekedését (Ct ~23 vs. Ct ~14), míg a gazdaszervezet DNS-ét – amelyet 41-es számmal jelöltünk a 40 ciklusig tartó PCR reakció miatt – nem lehetett kimutatni (9. ábra és 6. táblázat). A WGA-reakcióból származó DNS-; a tisztítás eredményeként 0,3-0,8 µg DNS/reakció keletkezett. Egy mintánál a Repli-g kezelés után nem kaptunk értékelhető eredményt, a maradék 7 közül pedig a 4 legjobb eredményt mutató mintát Illumina és Ion Torrent NGS szekvenáláshoz használtuk fel.

6. táblázat: A különböző kezelések után mért Ct értékek összehasonlítása

	Kezdeti Ct			Dnáz I + EDTA utáni Ct			Repli-g utáni Ct		
	ASPV	Sertés genom	Különbség	ASPV	Sertés genom	Különbség	ASPV	Sertés genom	Különbség
S1	22,1	28,33	6,25	24,36	41	16,64	13,96	41	27,04
				24,21	41	16,79	12,63	41	28,37
				23,1	41	17,9	17,23	41	23,77
S2	21,8	28,35	6,57	23,48	32,71	9,23	16,25	41	24,75
				23,66	36,86	13,2	12,12	41	28,88
				23,67	34,56	10,89	13,57	41	27,43
S3	22,5	29,09	6,6	23,74	35,43	11,69	12,87	41	28,13
				23,91	32,62	8,71	N/A	N/A	
				N/A	N/A				



9. ábra: Különbözőképpen kezelt ASPV-minták gazdaeredetű- és vírus DNS-tartalma. A kvantitatív kettős PCR-t a Virotype ASFV PCR Kit segítségével végeztük. Az egyedi és átlagolt minták Ct-értékeit színes körök, illetve szürke doboz jelöli. Az átlagokat az X tengelyen feltüntetett minták alapján számítottuk ki. A szürke körök a minimális és maximális értékeket jelzik. A 40-nél magasabb Ct-értékeket (nem kimutatható gazdaszervezeti DNS) 41-es szám jelöli. A teljes genom amplifikációt (WGA) a REPLI-g Mini Kit segítségével végeztük.

7.1.6. Az ASPV genom NGS szekvenciaelemzése

Az elmúlt néhány évben az Illumina és az Ion Torrent rendszerek váltak a mikroorganizmusok teljes genomjának szekvenálására leggyakrabban használt NGS platformjaivá. Az ASPV szekvenálásához a leghatékonyabb megoldás megtalálása érdekében összehasonlítottuk a két módszert úgy, hogy két ASPV-mintát futtattunk a két platformon.

A szekvencia adatok elemzése azt mutatta, hogy a virális readek száma mind a négy mintában meghaladta a szennyező nukleinsavak readjeinek számát (7. táblázat).

7. táblázat: A négy szekvenált minta általános adatai

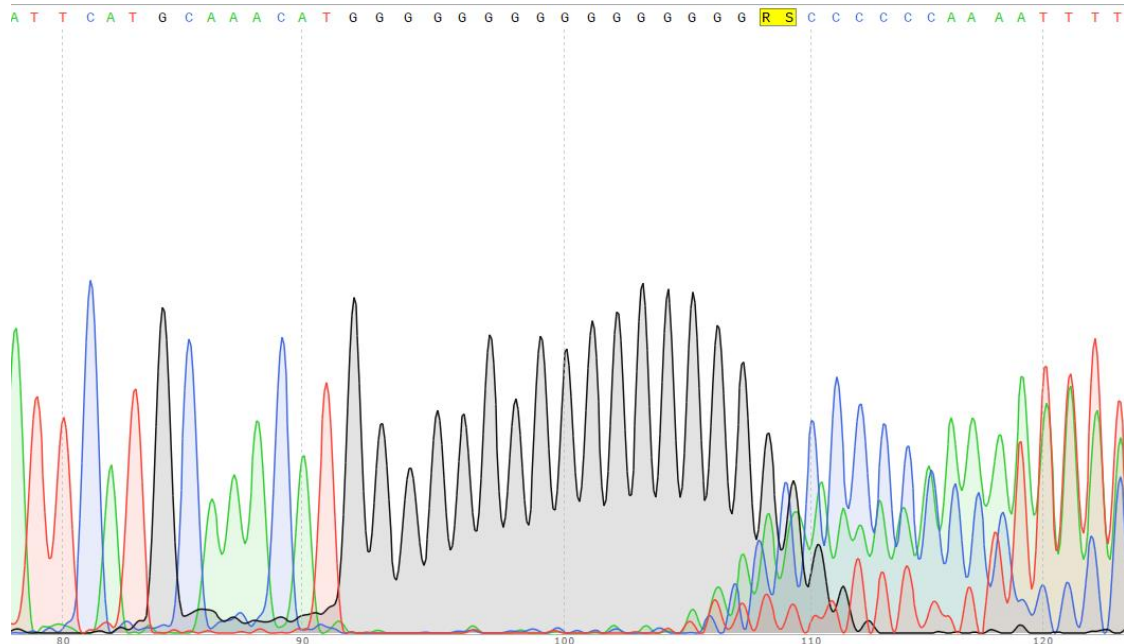
Módszer	Mintaszámok (ASFV_HUN_2018)	Virális readek aránya (%)	Virális readek száma	Átlagos lefedettség	Szórás
Ion PGM System	S43	90.4	179,325	197	129.1
Ion PGM System	S41	87.7	152,865	158	106.5
NextSeq Illumina	S1	50	6,835,057	2557	1624.9
NextSeq Illumina	S20	77	7,115,377	2692	1897.6

A virális readek összeállításához referenciatörzsként az ASFV Belgium 2018/1 (GeneBank azonosító: LR536725.1) törzset használtuk, a bioinformatikai elemzéseket a Geneious Prime 2019.0.3 programmal végeztük.

Az Ion Torrent platformon szekvenált minták (minimális lefedettség 35) homopolimer szakaszaiban a referencia szekvenciához képest számos (~131) nem egyértelműen meghatározható nukleotidot találtunk, főként egy- és két nukleotidos indelek formájában. Ezen felül a platformon a virális readek száma és az átlagos lefedettség is jóval alacsonyabbnak bizonyult az Illumina módszerrel kapott eredményekhez képest (7. táblázat).

Az Illumina platform eredményeiben sokkal ritkábban fordultak elő nem meghatározható nukleotidok. Ezek az egyik minta adatainak feldolgozása után (~7 millió virális read) már csak a három leghosszabb homopolimer régióra (14224-14236 (13C), 15665-15680 (16C), 19991-20001 (11G)) korlátozódtak, amelyek több mint 10 C/G nukleotidot tartalmaztak. Ezeknek a régióknak a pontos szekvenciáját, így a homopolimer régiók pontos hosszát még a két Illumina-mintából származó összes virális read (kb. 14 millió) feldolgozásával sem lehetett egyértelműen meghatározni. Így az ASFV_HU_2018 pontos szekvenciájának meghatározásához ezt a három régiót Sanger-

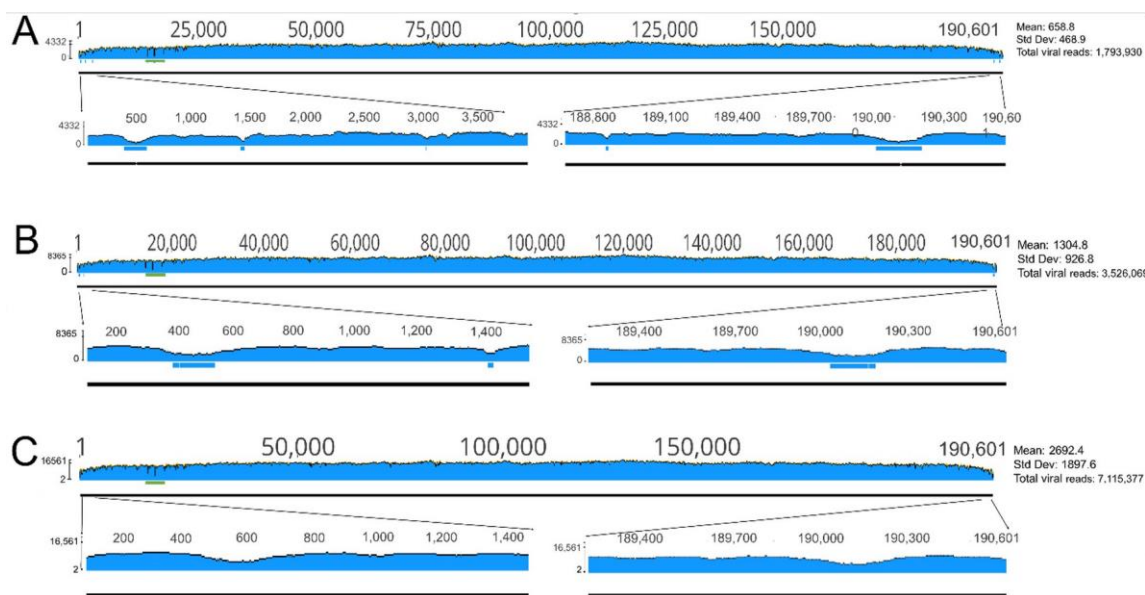
módszerrel kellett vizsgálni. Az amplikonok szekvenciái a poliC/G szakaszokig (upstream) mindkét irányból jól definiáltak voltak, míg a C/G szakaszok után (downstream) minden esetben szekvenciacsúszást észleltünk, ami szintén megnehezítette a pontos C/G számok meghatározását (10. ábra). A poliC/G traktusok méretét és a körülöttük lévő tényleges szekvenciát az ellentétes szálak leolvasásainak összehasonlításával és elemzésével határoztuk meg.



10. ábra: Sanger-szekvenálás után a szekvenogram elcsúszását szemléltető ábra a 10-nél több C/G-t tartalmazó régióknál

E három poliC/G szakaszon kívül az Illumina readek mindkét mintában egyenletes lefedettséget mutattak a genom nagy részén (átlagos lefedettség: 2692,4, szórás: 1897,6, illetve 2557, szórás: 1624,9), kivéve a terminális régiókat, ahol a virális readek lecsökkentek.

A csak egy csatorna adataiból származó adatok feldolgozása (~1,8 millió read) még mindig nagyon jó lefedettséget biztosított a genom nagy részén, és öt rövid (összesen ~440 nukleotidot érintő), nem megfelelő lefedettségű (<10) nukleotidszakaszt eredményezett a két terminális régióban (1-3200 és 188,800-190601), amelyek akadályozták a pontos szekvencia meghatározását (11. ábra). Bár a két (3,6 millió read) vagy három (5,4 millió read) csatorna adatainak feldolgozása csökkentette a hiányos szakaszok szekvencia adatainak kiterjedését, még mindig maradtak nem megfelelő (<10) lefedettségű részek ezekben a régiókban.



11. ábra: Az ASPV genom nukleotidfedettségeinek grafikus megjelenítése az S20 mintában. A vízszintes kék sávok a nem megfelelő (<10) lefedettségű régiókat jelölik a terminális régiókban. A vízszintes zöld sáv a három nem meghatározható homopolimer C/G régiót jelöli. A függőleges skálán lévő számok a minimális és maximális lefedettségi értékeket jelzik. (A), egy csatorna adatai; (B), két csatorna adatai; (C) négy csatorna adatai.

7.2. Az Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L konstrukció tulajdonságai

7.2.1. Az MGF-110 11L gén tulajdonságai

Az MGF-110 11L gén funkciója jelenleg ismeretlen, vizsgálataink során egyedi jellemzői miatt esett választásunk erre a génre.

Az MGF-110 11L gén a különböző törzsekben genetikai szinten rendkívül változatos tulajdonságokkal rendelkezik. A szakirodalom alapján fuzionálhat szomszédos MGF-110 génekkel, például az MWI_LiL_20_1_1983 törzsnél az MGF-110 9L és a 11 L gének között történik fúzió, az NHV izolátumnál a fúzió a teljes MGF-110 14L fehérje, a 13 L fehérje amino-terminális és 11 L karboxi-terminális vége között történik (Upton, 2020).

Az MGF-110 11L gén az MGF 110 géncsalád egyik legkülönösebb tagja, legközelebbi rokona az MGF-110 13L gén. Nukleotid szinten a két gén 80%-os szekvencia azonosságot mutat, aminosav szinten 69%-os az egyezés a két géntermék között (12. ábra).

(A)

```
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L ATGARGGTTCTAGGACTTTGTGGGCTACTCAGTCTCATTCTTGACATGAAATACCAGAAATACCCAGARCCAGCATCCCTCCTRAGGGAGGCTTCATATTGGTGACGTATGTAARAGATTGG
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....
131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L ACTTCTGCTGGGATTGTCARAAATGGCATTGTAAARATAGATAACAAATGAGTCTAATTCGATGAAATTCGATTGTAACGTATAGTTATTCGCARATCCTGGGGGGTGTTTTATGAARATACAGTTAA
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....
261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L AATGCCTAATCATCATAACATGGAGTGTTCACATCTAGACCTATACAGGAATGAATATTCATGGAAATGGGGGGGGTGAATTTGGCCATCATTATAGACATTTGTTTACCCTGTA
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....agGGGGGGGGTGAaccATcaaCaRaTaacTATAAaaCaTaTcTGTcTcTAcTcaTa
391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L TTATGATTTGATTTGTAGGTTACATTTGATTTGCATCTATAAARATTTACATCTAATACCACTATGAACACTTGTCTCTTTATGATTTTGTATTTGGCTATCTCAGCCGGTTTAAATCGACCC
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....ATGGGATTTGCATATACAGGCTGCTTTGTATGCGCTTTGTAAGAACTGCGCTGAGTACACCACTGAACCTTTTCGTTCTTTGGATTTTGGTTGGTATAGCACAGCCAGTTTAAATCGACCC
521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L TTTCATCTTTTATAGAACAAATTTACCAGGACTTATACGCCCTCTATAGAGAGCTTGAATATCGGTCACGATGGAARACACTGTGATTTCTGCTGGAAATGTAAGACGGATTTGTAARAA
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....TTTCATCTTTTATAGAACAAATTTACCAGGACTTATACGCCCTCTATAGAGAGCTTGAATATCGGTCACGATGGAARACACTGTGATTTCTGCTGGAAATGTAAGACGGATTTGTAARAA
651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L TAAAGTGGGATGATGCTCTTATTAACAAATGATATAGTCAATGATGATTTGCCCGCTATTTTGGCCGTTGATGATTTTATTAACCAAAATCACCGATATTCATATATGAGATTG
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....TAAAGTGGGATGATGCTCTTATTAACAAATGATATAGTCAATGATGATTTGCCCGCTATTTTGGCCGTTGATGATTTTATTAACCAAAATCACCGATATTCATATATGAGATTG
781 790 800 810 816
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L TTTCAGCCTACAGCGTATTAAGGGTTTAGTCATTAA
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....TCTCGCCACATATTTTA---GTTAA
TcTcAGCCcACAgagTaTA.....GTTaA.....
```

(B)

```
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L MKVLGILLGYSVLLAHELPELPRTPQHPKKEELPYACTYKNCDFCHDCQNGICKNKITNESNSHNSVNCVNRNSGCFYEISVYKPNHNNHNSHPRPYTGNEIFHEKMGGGDYHPITIRHCFYLV
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....MGGDHQLSIKQCLYFI
MGGDhqqIiIrcCLYI
131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L FSIYFVGYIVFAYYKNLHLNTHKLLALLCLLHL SQPGLNRPLSIFYKQNLPRITYPPIRELEYACTYKHCDFCHDCRNGICKNKVLDHMLIKQNDYISQCSIRYFDRCHYFIEPKSPYIHYHNC
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....IGIAYTGFVCFALCKNLRSTHKLFLVLSLVLHQAQVLRPLSIFYKQNLPRITYPPIRELEYACTYKHCDFCHDCRNGICKNKVLDHMLIKQNDYISQCSIRYFDRCHYFIEPKSPYIHYHNC
igIa%tGciVcAlcKNLrLnTHKLlLaLcLl!HLaQpGLNRPLSIFYKQNLPRITYPPIRELEYACTYKHCDFCHDCRNGICKNKVLDHMLIKQNDYISQCSIRYFDRCHYFIEPKSPYIHYHNC
261 271
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Lv17/WB/Rie1_110-11L FQPTAYKGFSH
Lv17/WB/Rie1_110-13L Consensus
.....SLPTYFS
fQPTa%k....
```

12. ábra: Az LV17/WB/Rie1 MGF-110 11L szekvenciaillesztése A) nukleotid, B) aminosav szinten a legközelebbi rokon MGF-110 13L-hez

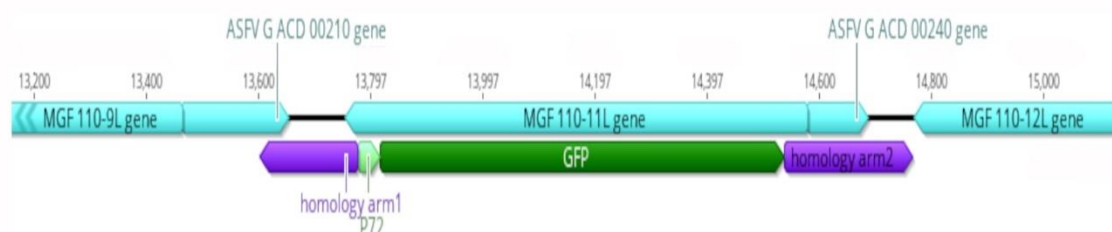
Az MGF-110 11L egy másik érdekes tulajdonsággal is rendelkezik: homopolimer G/C (hpG/C) régiót tartalmaz, amelynek hossza igen nagyfokú variabilitást mutat. A GenBankból nyert (2022.11.29.-én megtalálható) adatokból az MGF-110 11L szekvenciák összehasonlítása alapján 4-től egészen 19 bázis hosszúságú szakaszokat találhatunk a homopolimer régióban (8. táblázat). A homopolimer régió szerepe és a variancia oka ismeretlen, viszont figyelemre méltó, hiszen egy vagy több nukleotid inszerció/delécio a G/C régióban frameshiftet vezethet, és mivel a fehérje az indel nagyságától függően mindhárom leolvasási keretben folytatódhat, ez jelentős variációt okozhat a géntermék szekvenciájában és hosszában.

8. táblázat: A GenBankban elérhető MGF-110 11L génben lévő homopolimer régiók hosszának változatossága

A homopolimer G régió hossza	Izolátumok száma
4 bp	1
7 bp	1
8 bp	50
9 bp	23
10 bp	23
11 bp	17
12 bp	10
13 bp	21
14 bp	15
17 bp	1
19 bp	1
Összesen: 163	

7.2.2. Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L vírus előállítás és szekvenálása

Az MGF-110 11L egyedülálló tulajdonságai, valamint a génre vonatkozó biológiai adatok hiányossága miatt szeretnénk volna megvizsgálni a gén funkcióját az Lv17/WB/Rie1 attenuált törzsből való gén deléció segítségével. Az MGF-110 11L delécióját CRISPR/Cas9 rendszer indukált intercelluláris homológ rekombináció segítségével valósítottuk meg. A gén nagy részét (a 825 bp ORF-ből 760 eltávolításra került) egy ASPV eredetű p72 promóter által szabályozott eGFP riporter génre cseréltük (13. ábra).



13. ábra: Az Lv17/d110-11L konstrukció terve

A transzfer plazmidot, valamint a gRNS-eket és a Cas9 fehérjét egyaránt expresszáló CRISPR/Cas9 plazmidokat együttesen transzfektáltuk Lv17/WB/Rie1-fertőzött PAM sejtekbe. A rekombináns vírust az eGFP riportergént expresszáló PAM sejtekből izoláltuk. Izolálás után a rekombináns, fluoreszcens mikroszkóp alatt a riporter génre homogénnek tűnő vírustenyészetet titrálva azt találtuk, hogy a mutáns vírus titere (3×10^6 FFU/ml) megközelítette a szülői vírusét ($7,2 \times 10^6$ FFU/ml).

Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L mutáns vírust (Lv17/d110-11L) az Illumina platform segítségével szekvenáltuk. Körülbelül 26 millió readból állítottuk össze a szekvenciát, az átlagos lefedettség megközelítette a 42 ezret. A szülői genomhoz képest tizennégy új, nem tervezett pontmutációt találtunk az Lv17/WB/Rie1/d110-11L vírus különböző régióiban (9. táblázat). Két mutáció a szabályozó régiókat érintette: egy szinonim mutáció

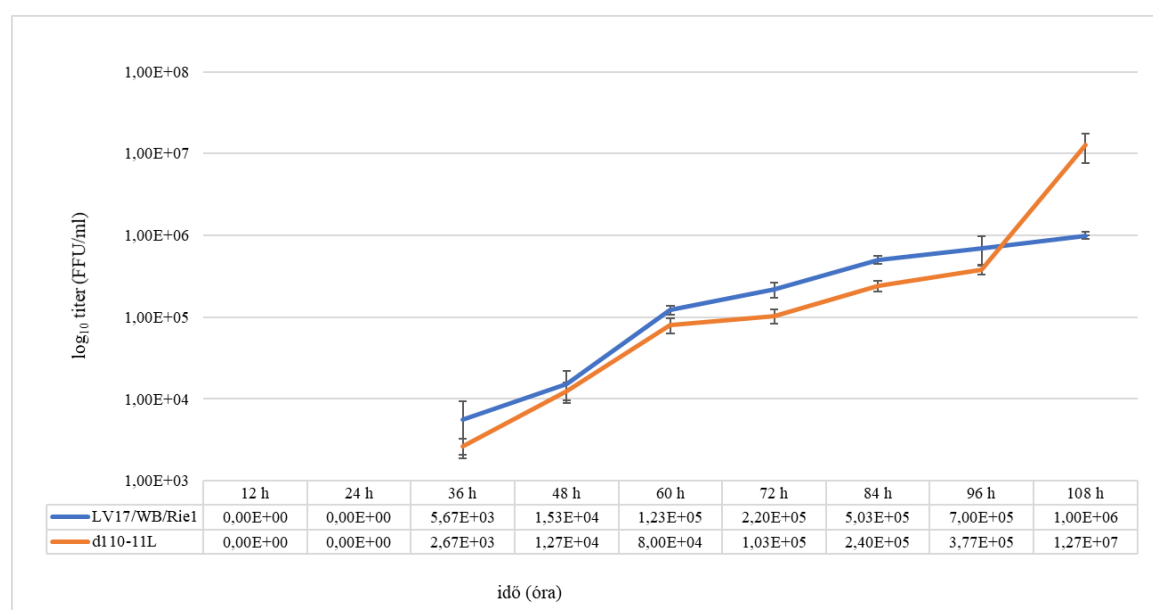
volt, négy aminosavcserét okozott, három korai fehérjelánc-terminációt, és négy helyen nem tudtuk pontosan meghatározni az adott helyen lévő nukleotidot, ami kvázispecíes vírusok jelenlétére utal az izolátumban.

9. táblázat: Az Lv17/d110-11L vírus pontmutációi

Pozíció az Lv7 genomjában	Változások az Lv17/d110-11L vírusnál (n)	Változások az Lv17/d110-11L vírusnál (as)	Gén	Egyéb információk	Gyakori változat
11363	C → T	-	NCR	A 285L gén promóter/regulátor régiója	95.9%
38598	G → A	Val → Ile	<i>MGF-505 5R</i>	alifás oldalláncot hordozó aminosav az eredeti és az új aminosav is	95.6%
76238	+ A	frameshift	<i>EP364R</i>	korai termináció, 364-ről 232 aminosavra csökken a fehérje mérete	85.4%
112655	C → A	Lys → Asn	<i>G1340L</i>	bázikus aminosaból poláris	70.3%
115161	G → T	Gly → Cys	<i>G1211R</i>	apoláris aminosavól poláris	92.4%
119295	C → Y	Gly → Gly/Asp	<i>CP2475L</i>	nem eldönthető aminosav	C/T = 56.8/41.2%
130645	C → Y	Ala → Ala/Thr	<i>NP1450L</i>	nem eldönthető aminosav	C/T = 55.4/42.4%
134614	G → R	Ala → Ala/Val	<i>NP419L</i>	nem eldönthető aminosav	A/G = 55.6/42.9%
166363	G → K	Pro → Pro/Gln	<i>E146L</i>	nem eldönthető aminosav	G/T = 41.1/53.1%
171591	+ A		NCR	Az I267L gén promóter/regulátor régiója	73.7%
172645	- T	frameshift	<i>I243L</i>	korai termináció, 243-ről 158 aminosavra csökken a fehérje mérete	70.0%
176321	C → T	Asp → Asn	<i>I196L</i>	savas oldalláncot hordozó aminosav polárisra cserélődik	98.4%
180817	+ T	frameshift	<i>MGF-100 2L</i>	korai termináció, 141-ről 80 aminosavra csökken a fehérje mérete	69.7%
185263	C → T	Glu → Glu	<i>DP71L</i>	szinoním mutáció	85.6%

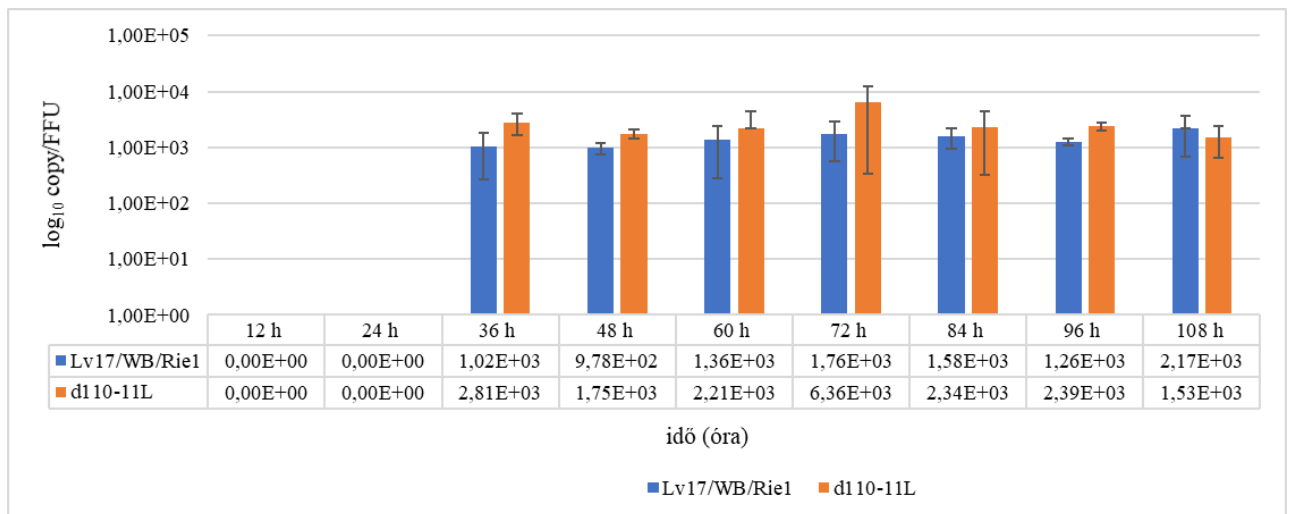
7.2.3. Az Lv17/WB/Rie1/d110-11L szaporodása PAM sejteken

Az Lv17/d110-11L mutáns *ex vivo* replikációs jellemzőinek vizsgálatához PAM sejteket fertőztünk az Lv17/d110-11L mutáns vírussal, kontrollként pedig Lv17/WB/Rie1 vírustörzset használtunk. A fertőzés 0,001 MOI-val történt 3 párhuzamos mintával, a mintákat a fertőzést követően 0, 12, 24, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 és 108 órával vettük. A mintákat ezután PAM sejteken titráltuk és qPCR-rel meghatároztuk a bennük lévő víruskópiaszámokat. A mutáns és a szülői vírusok növekedési kinetikájában 108 hpi-ig nem volt szignifikáns különbség (36 h: $p = 0,1642$; 48 h: $p = 1$; 60 h: $p = 0,07652$; 72 h: $p = 0,08086$; 84 h: $p = 0,08086$; 96 h: $p = 0,08086$), bár a d110-11L fertőző vírustitere minimálisan a szülői törzsé alatt maradt. 108 hpi-nél hirtelen ugrásszerű növekedést tapasztaltunk az Lv17/d110-11L fertőző titerében, a vírusrészecske-szám 12-szeresen meghaladta az Lv17/WB/Rie1 vírusét ($1,27 \times 10^7$ FFU/ml és 1×10^6 FFU/ml) (14. ábra). Mivel a vírusok specifikus fertőzőképessége az utolsó 24 órában nem változott jelentősen, ez a különbség az Lv17/d110-11L lassabb növekedésének és potenciálisan nagyobb vírushozamának következménye lehet.



14. ábra: Az Lv17/d110-11L mutáns vírus és a szülői Lv17 vírus növekedési kinetikája

Mindkét vírus specifikus fertőzőképessége kissé meghaladta a 10^3 kópia/FFU értéket, de viszonylag állandó maradt a vizsgálati időszak alatt (15. ábra). A különböző időpontokban nem találtunk szignifikáns különbséget a két vírus specifikus fertőzőképességében (Lv17/WB/Rie1: $p = 0,458$; Lv17/d110-11L: $p = 0,5278$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az MGF-110 11L gén deléciója és a további mutációk nem befolyásolták jelentősen az Lv17/WB/Rie1 vírus fertőzőképességét PAM sejteken.



15. ábra: Az Lv17/d110-11L és Lv17 vírusok specifikus fertőzőképessége

7.3. Az Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL konstrukció tulajdonságai

7.3.1. Az Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL vírus előállítása és szekvenálása

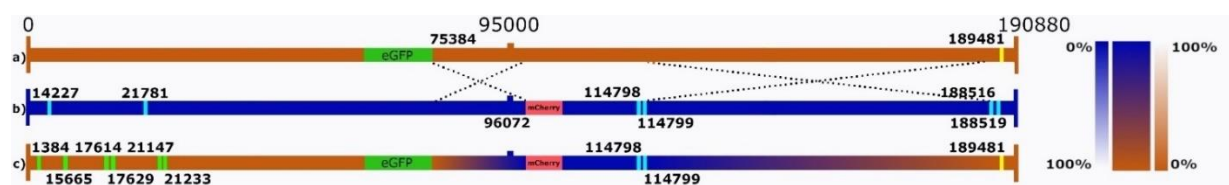
Mivel közvetett szakirodalmi adatok arra utalnak, hogy az ASPV-k között homológ rekombináció történhet (Zhu et al., 2019; Nefedeva et al., 2020), kíváncsiak voltunk, vajon két ASPV-törzs keresztezhető-e *in vitro*, és lehetséges-e vakcina jelölt vírusokat homológ rekombinációval előállítani és izolálni. Ezért PAM sejteket fertőztünk nagy titerben eGFP és mCherry markergéneket hordozó Lv17/WB/Rie1/dCD és Lv17/WB/Rie1/dGL törzsekkel. A kapott vírusokkal három nap elteltével sorozathígítást végeztünk és fluoreszcens mikroszkóp alatt detektáltuk a vörös és zöld fluoreszcens sejteket. A fertőzött sejtek kb. 1-2%-a mutatott vörös és zöld fluoreszcenciát is, ezeket a sejteket izoláltuk, és izolálás után újra PAM sejteket fertőztünk velük. Az izolálás és a fertőzés folyamatának ötszöri megismétlésével olyan homogén izolátumot kaptunk, amelyben minden fertőzött sejt vörös és zöld fluoreszcenciát mutatott. A fertőzött PAM sejtek fixálása után anti-p72 elsődleges és anti-egér másodlagos antitestekkel végzett immunfluoreszcens festéssel igazoltuk a fertőzés sikerességét. Ezután a homogén izolátumot felszaporítottuk és szekvenáltuk. A szekvenálás megerősítette a vírusállomány homogenitását, nem találtunk szülői szekvencia jelenlétére utaló readet. A két szülői törzshez képest hat új mutáció fordult elő a bal oldali variábilis régióban (10. táblázat). Ezek közül négy poliC/G régióban fordult elő, kettő pedig az MGF 300-1L génben, ami egy aminosav cserét is indukált. Még érdekesebb, hogy az Lv17/dGL egyedi szekvencia markereinek (A188516G és C188519T) eltűnése és az Lv17/dCD egyedi markerének (189481+G) megjelenése a rekombináns Lv17/dCD-dGL genomjában (16. ábra) arra utal, hogy a kialakulás során legalább két átkereszteződés történt; az egyik a két fluoreszcens marker végpontjai között (75384-96072), a másik az 114799 és 188516

nukleotidok között. Mindez azt mutatja, hogy *ex vivo* a különböző ASPV-törzsek között rekombináció történhet és történik is viszonylag nagy frekvenciával, és keresztezéssel viszonylag könnyen előállíthatók rekombináns törzsek.

10. Táblázat: Egyedi mutációk az Lv17/dCD, Lv17/dGL és az Lv17/dCD-dGL genomokban. A számozás minden esetben az Lv17 genomja szerint történik.

Pozíció az Lv17 genomjában	Lv17/dCD (n)	Lv17/dCD (as)	Lv17/dGL (n)	Lv17/dGL (as)	Lv17/dCD-dGL (n)	Lv17/dCD-dGL (as)	Gén
1384					+ 1 C		NCR*
14227			+ 3 C	+ G			MGF-110 11L
15665	+ 2 C		+ 2 C		+ 3 C	+ G	MGF-110 13L, 14L*
17614					+ 2 G		NCR*
17829	+ 1 G		+ 1 G		+ 2 G		NCR*
19984	+ 1 G		+ 1 G		+ 1 G		NCR*
21147					C→T		MGF-300 1L
21233					C→T	A→T	MGF-300 1L
21781			+ 2 G				
114798			G→A	G→K	G→A	G→K	G1211R
114799			G→A	G→K	G→A	G→K	G1211R
188516			A→G				MGF-360 21R
188519			C→T				MGF-360 21R
189481	+ 1 G				+ 1 G		NCR

*PoliC/G régió



16. ábra. Rekombináció az Lv17/dCD (a, narancssárga) és Lv17/dGL (b, kék) vírusok között. A narancssárga szín az Lv17/dCD szekvenciáját jelöli, a kék pedig az Lv17/dGL szekvenciáját. A lehetséges rekombinációs helyeket szaggatott vonalak jelzik. A c ábrán az Lv17/dCD-dGL vírus látható. A színátmenetes helyeken nem egyértelműen eldönthető, hogy a genomszakasz melyik szülői vírusból származik.

7.4. Az Lv17/WB/Rie1/d24 konstrukció tulajdonságai

7.4.1. Az Lv17/WB/d24 vírus előállítás és szekvenálása

Az Lv17/WB/Rie1 Cos7 sejteken történő genomstabilitási vizsgálatát a vírus sorozatpasszálásával valósítottuk meg. Az 5. és 8. passzáznál mintát vettünk, és az így kapott Lv17_cos5 és Lv17_cos8 vírusállományokat Illumina platformon mélyszekvenáltuk. A Rie1_cos5 szekvenciáját 3 millió readból, az Lv17_cos8-ét 2,8 millió readból állítottuk össze. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az Lv17/WB/Rie1 deléciót szenvedett a bal oldali variábilis régióban, és a vizsgált minta különböző hosszúságú deléciós mutánsok keverékét tartalmazza (17. ábra). Az Lv17_cos8-cal ezután újra PAM sejteket fertőztünk és még háromszor passzáltuk. Az új izolátumot (Lv17_cos8_pam3) ismét mélyszekvenáltuk; ebben az esetben 2,2 millió readet használtunk fel a vírus szekvencia összeállításához.

Mindhárom vírus esetében viszonylag homogén lefedettséget figyeltünk meg. Az átlagos lefedettség 1912, 2274, 1719 volt az Lv17_cos5, Lv17_cos8, illetve Lv17_cos8_pam3 esetében, a genomok végeinél a lefedettség csökkenését tapasztaltuk, de a minimális lefedettség még ott is minden esetben meghaladta a 25-öt (27, 207, illetve 43). A három állomány szekvenciaelemzése kimutatta, hogy az Lv17/WB/Rie1 genomja jelentős átrendeződéseket szenvedett el a bal oldali variábilis régióban (LVR) nagy indelek formájában, illetve ezen felül három pontmutációt lehetett kimutatni a vizsgált passzázsokban: egy G inszerciót 189481 bp-nál egy nem kódoló régióban mind a három passzázsban, egy C-T tranzíciót az M1249L génben 77191 bp-nál az Lv17_cos5, Lv17_cos8 passzázsokban, és egy G-A tranzíciót az MGF-360 11L génben 27611 bp-nál az Lv17_cos8_pam3 passzázsban (11. táblázat).

A deléciós és inszerciós töréspontokat a deléciós töréspontok határainál lévő readok ellenőrzésével és *de novo* genomösszeszerelés segítségével is igazoltuk.

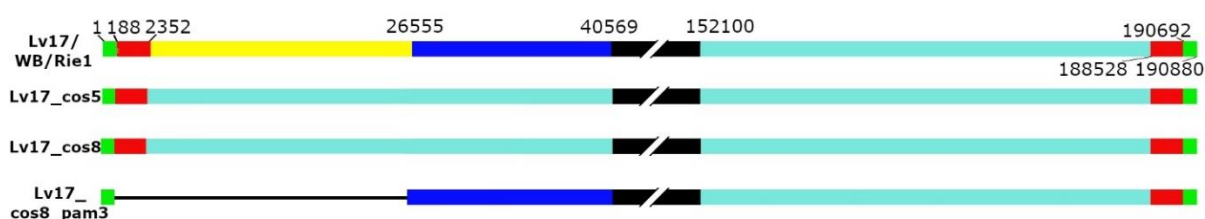
11. táblázat. Egyedi mutációk az Lv17/d24 vírusgenomban. A számozás az Lv17 genomja szerint történik

Pozíció az Lv17 genomjában	Változások az Lv17/d24 vírusnál (n)	Változások az Lv17/d24 vírusnál (as)	Gén	Egyéb információk
2355-26557			MGF-360 1L-2L-3L, MGF- 110-1L-2L-3L-4L-5L-6L-7L-8L, MGF-100-1R, MGF- 110 9L-10L-11L-12L-13L-14L MGF-360 4L-6L, MGF 300 1L-2R-4L, MGF-360 8L-9L.	A mutációt hordozó gének funkciói részt vesznek a patogenitásban és immun-escape mechanizmusokban
27611	G→A	Ala→Val	MGF-360 11L	tranzíció, de az eredeti és az új aminosav is apoláris
77191	C→T	Arg→His	M1249L	A mutáció csak az Lv17_cos5 és Lv 17_cos8 vírusokban van jelen
189481	+ G			A mutáció mindhárom vizsgált passzázsban jelen van

Az Lv17_cos5 és Lv17_cos8 állományokban a kvázispecies fő vírusösszetevője egy olyan vírusgenom volt, ami több mint 40 kb-t (1-40568) veszített az 52 kódoló régiót tartalmazó bal terminális régiójából. A hiányzó régió helyén egy, a genom jobb terminális régiójából származó, közel hasonló méretű (38780 bp, 51 gént kódoló) vírusfragmentum található. Az Lv17_cos5 és Lv17_cos8 állományokban még mindig mappelhető volt néhány read (907 és 3 read) a genom fordítottan ismétlődő régiójának proximális végpontja és a deléciós töréspont közötti régiója között (2352 és 40568 bp között), ami egyéb genotípus-változatok jelenlétére utal.

Az Lv17_cos8 titere PAM-on alacsony volt ($<10^4$ FFU/ml), majd fokozatosan nőtt, és a harmadik passzázsban meghaladta a 10^6 /ml-t. Az Lv17_cos8_pam3-ban az Lv17/WB/Rie1 egy jóval hosszabb, de szintén nagy deléciókat tartalmazó változata lett a fő variáns. Ez egy rövidebb deléciókat tartalmazott, amely most a genom 187 és 26554 bp-ja közötti régiót érintette, és 42 gén deléciójával járt. Mivel a deletált régióhoz még mindig 63 read mappelődött, még két véghígítási és passzázsciklust végeztünk, hogy biztosítsuk az állatkísérletekhez szükséges homogén állományt. Ez az állomány (Lv17/WB/Rie1/d24) homogénnek tűnt (187 és 26554 között nem találtunk readet), még magasabb titerrel rendelkezett ($4,5 \times 10^7$ FFU/ml), mint az Lv17_cos8_pam3 a PAM-okban, és ezt használták az állatkísérletek végrehajtásához.

(A)



(B)

Vírus neve	Readok száma a genom különböző régióiban				
	1-187 bp	188-2351 bp	2352- 26554 bp	26555- 40568 bp	40569- 190880 bp
Lv17_cos5	777	12890	13	894	3 060 000
Lv17_cos8	2716	25329	2	1	2 821 000
Lv17_cos8_pam3	742	0	63	18 152	2 187 000

17. ábra: A passzált Lv17/WB/Rie1 genomok nukleotidfedettségének grafikus és numerikus ábrázolása. (A) A négy sematikus panel a szülői Lv17/WB/Rie1, illetve az Lv17_cos5, Lv17_cos8 és Lv17_cos8_pam3 genomját ábrázolja. A szaggatott fekete sávok a genomok központi részeit ábrázolják (nem arányosan). A színes sávok a fontos szerkezeti genomrégióknak felelnek meg, amelyeket a következő számok határoznak meg: 188 és 26555 deléciós töréspontok az Lv17_cos8_pam3-ban; 2352 és 188528 ITR-ek proximális vége a szülői és a Cos7-ben passzált vírusokban; 40569 a terminális deléció proximális vége (1-40569) az Lv17_cos5, Lv17_cos8 bal oldali variábilis régiójában; 152100 a duplikált terminális fragmentum proximális vége (152100-190880) az Lv17_cos5, Lv17_cos8 jobb oldali variábilis régiójában. A számozások az Lv17/WB/Rie1 szekvenciája szerint történtek. (B) Az ITR-ek végpontjai és a deléciók által meghatározott öt szignifikáns régióban található leolvasások száma.

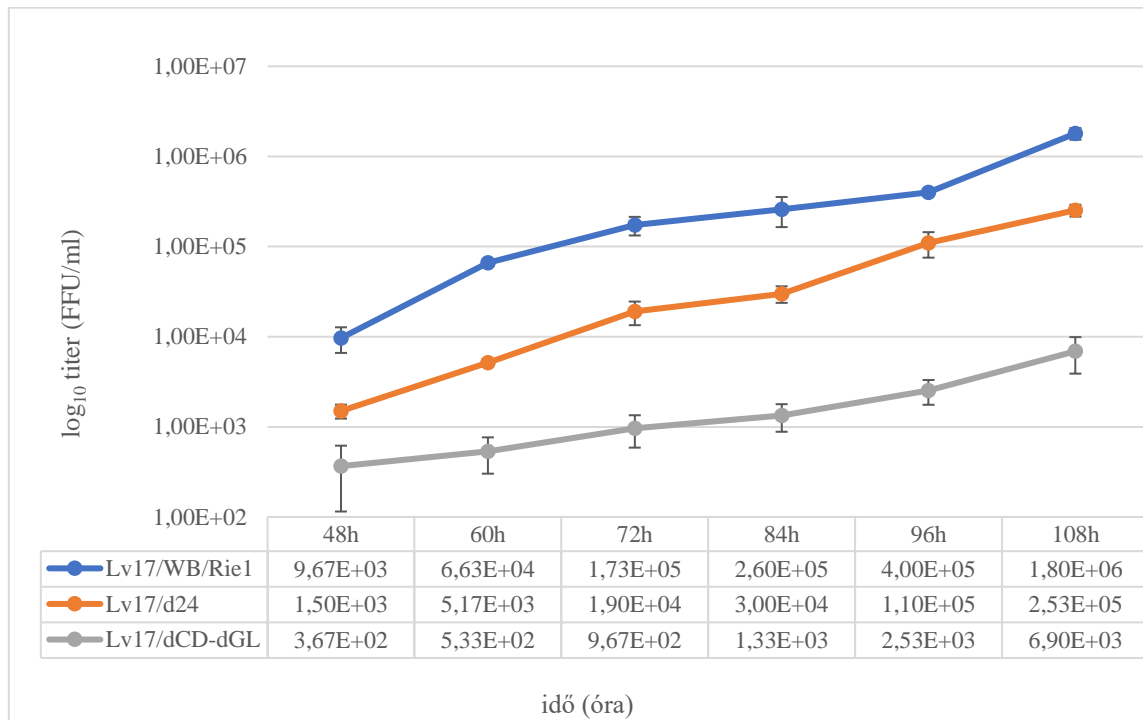
7.4.2. Az Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL és Lv17/WB/Rie1/d24 vírusok szaporodása PAM sejteken

Annak vizsgálatára, hogy az Lv17/dCD-dGL és az Lv17/d24 mutánsok hogyan szaporodnak *ex vivo*, PAM-okat Lv17/dCD-dGL és Lv17/d24 vírusokkal, valamint kontrollként Lv17 vírussal fertőztük 0,01 MOI-val, és különböző időpontokban (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 és 108 órával a fertőzés után) mintát vettünk a felülúszóból. Ezután

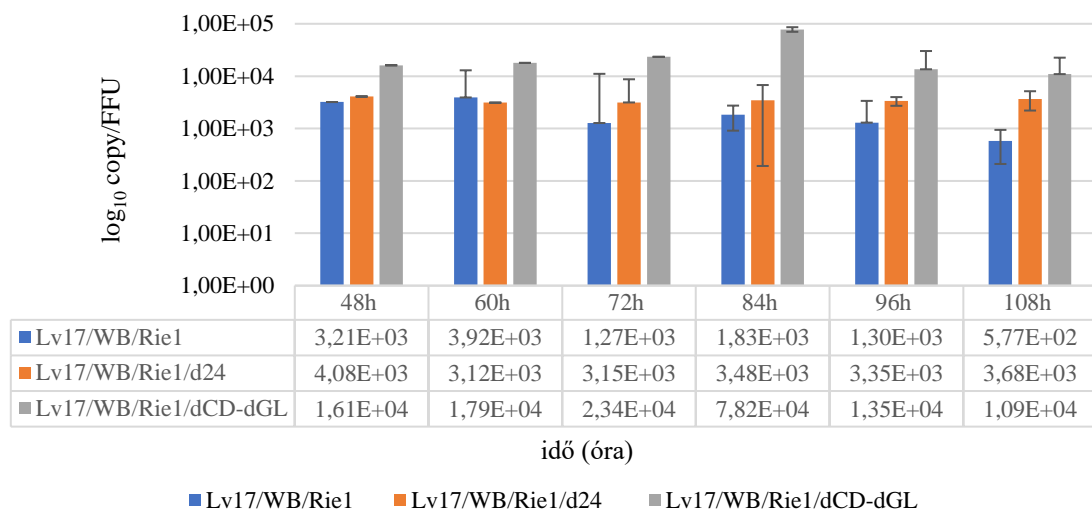
a begyűjtött mintákat PAM-okon titráltuk, majd qPCR-t alkalmaztunk az aliquotokban lévő víruskópiaszámok meghatározására. Jelentős különbségek mutatkoztak a három vírus növekedési kinetikájában. Mindkét mutáns vírus lassabb növekedési sebességet mutatott mint az Lv17, és végtiterek ($6,9 \times 10^3$ és $2,5 \times 10^5$ FFU/ml az Lv17/dCD-dGL és Lv17/d24 esetében) 108 hpi-nál jelentősen alacsonyabbak voltak, mint az Lv17-é ($1,8 \times 10^6$) (18. ábra).

Nyilvánvaló, hogy a mutáns vírusok genetikai módosításai gyengítették a PAM-ban való replikációs képességüket, ami valószínűleg nagyrészt a fertőzőképességük csökkenésének köszönhető, ahogy azt specifikus fertőzőképesség (SI) értékeik is jelzik (Lv17 vs Lv17/d24: $p=0,07817$; Lv17 vs Lv17/ dCD-d8CR-dGL: $p=0,00395$). Attól a legkorábbi időponttól kezdve, amikor az egyes vírusoknál mérhető növekedést lehetett kimutatni (48 hpi), az Lv17/dCD-d8CR-dGL vírus SI értéke szignifikánsan (Lv17 vs Lv17/dCD-dGL: $p=0,00395$) magasabb volt, mint az Lv17-é, amely a kísérlet során 10^3 copy/FFU körül változott. Bár az Lv17/d24 SI-jének p-értéke kissé a szignifikancia-határ felett maradt (Lv17 vs. Lv17/d24: $p=0,07817$), az Lv17/d24 SI-értékei szinte mindig meghaladták a szülői Lv17-ét. A vírus növekedési fázisának késői (legintenzívebb) időszakában (72-108 hpi) a mért adatok kevésbé voltak variábilisak, és szórásuk kisebbnek bizonyult, a rosszabbul növekvő Lv17/dCD-dGL SI értékei közel két nagyságrenddel meghaladták a vad típusét, míg az Lv17/d24 mutáns SI értékei a másik két vírus értékei között maradtak, akárcsak a titerük (18. ábra).

(A)



(B)



18. ábra: A szülői Lv17/WB/Rie1 és a mutáns Lv17/d24, illetve Lv17/dCD-dGL vírusok növekedési jellemzői. A sertés alveoláris makrofágokat a vírusokkal fertőztük (MOI = 0,01), 12 és 108 óra között és 12 óránként mintát gyűjtöttünk. Az ábrán azokat az adatokat ábrázoltuk, ahol mindhárom vírus titere és kópiaszáma mérhető volt (48 órától). (A) Három párhuzamos kísérlet átlagai és standard hibái a vírusztálás tekintetében. (B) A specifikus fertőzőképesség változása (a genomkópia/ml és az FFU/ml arányként számítva).

8. Megbeszélés

8.1. Újgenerációs szekvenáló módszer fejlesztése

A szakirodalomban számos problémáról számolnak be az ASPV teljes genom szekvenálásának során (Chapman et al., 2011; Bao et al., 2019; Forth et al., 2019; Wen et al., 2019). A problémák részletes kifejtése a 4.5.1. alfejezetben került bemutatásra. A legtöbb közölt módszer a hatékonyság, a biztonsági előírások betartásának veszélyeztetése (BSL3 szint), idő és pénzbefektetés szempontjából nehezen megvalósítható, a Sanger-módszerrel való szekvenálás a vírus nagy mérete miatt rendkívül lassú és körülményes. A szekvenálási nehézségek miatt kidolgoztunk egy egyszerű és megbízható NGS-alapú ASPV szekvenálási protokollt, amelyhez nem szükséges állatok fertőzése vagy ultracentrifugálás, az ASPV-specifikus PCR-ek száma minimálisra csökkenthető, és a legtöbb laboratóriumban standard berendezésekkel elvégezhető. A protokoll kifejlesztésénél az ASPV genom dúsítására és a DNS-mintákban a szennyező gazdag genom mennyiségének csökkentésére koncentráltunk a rendelkezésünkre álló legegyszerűbb eszközökkel. A szekvenálási protokollt az ÁTKI Funkcionális Virologia Csoport által izolált magyarországi ASPV izolátumon, az ASFV_HU_2018 (MN715134.1) törzsön fejlesztettük és standardizáltuk. A protokoll kidolgozásához három párhuzamos mintából indultunk ki (S1, S2, S3), és az eredmények függvényében dolgoztunk velük tovább.

8.2. Szekvenálási eredmények

8.2.1. A vírus DNS-tartalom maximalizálása

A szekvenálási protokoll kidolgozásához először elvégeztük a PAM sejtek fertőzhetőségének standardizálását. A PAM sejtek fogékonyságával kapcsolatos eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy ezek a sejtekkel végzett munka, bár a sejtvonalakhoz képest nem túl jól, mégis elfogadható mértékben standardizálható, viszont a fertőzhetőség gyorsan, akár 2 órán belül is jelentősen meg tud változni. A sejtek a lerakás utáni 24. óra körül mutatják a legnagyobb fogékonyságot az ASPV-re, így további kísérleteinkben a fertőzést a PAM-ok lerakása utáni 24. órában hajtottuk végre.

Továbbá megfigyelések arra utaltak, hogy a fertőzött sejtek felülúszójában a mérhető vírus produkció 72 óránál a legnagyobb, így a felülúszókat 72 hpi-nál célszerű vizsgálni a további lépésekhez.

A mintagyűjtés után qPCR-rel megmértük a vírus- és sertésgenom mennyiségét a mintákban. Az ASPV genom magas arányát jelezték a 22 és 28 Ct körül mért értékek. Végső célunk azonban az volt, hogy magas szekvenálási arányt kapjunk a vírus és a gazdaszervezet között, és ez csak akkor érhető el, ha az NGS bemeneti mintában

a két genom tömegaránya magas. A gazdaszervezet és az ASPV genom Ct-értékeinek és méretének ismeretében nagyjából kiszámíthatjuk a két genom tömegarányát. Például, feltételezve az azonos hatékonyságú amplifikációkat és figyelembe véve a gazdaszervezet ($2,5 \times 10^9$ bp haploid genom) és az ASPV (2×10^5 bp) genom méretkülönbségét, legalább $\sim 13,6$ ciklusnyi különbség ($2,5 \times 10^9 / 2 \times 10^5 = 1,25 \times 10^4 = 213,6$) várható egy olyan mintában, amely azonos tömegű vírus és gazdaszervezet DNS-t tartalmaz. Ez minden bizonnyal torzított arány a vírusgenom javára, mivel a méréseinkhez használt dual PCR kitesztet úgy optimalizálták, hogy a vírus PCR érzékenységének növelése érdekében csökkentse a gazdaszervezet specifikus PCR hatékonyságát (Virotype ASFV). Mindazonáltal, a fent bemutatott logikát követve, a vírus DNS és a kontamináló gazdaszervezet DNS-ének tömegaránya kiszámítható a „ $(2 \times 10^5 / 2y) / (2,5 \times 10^9 / 2z) \times 100$ ” képlettel, ahol y és z a dual PCR két csatornájában (ASPV specifikus FAM és sertés-genom specifikus HEX) mért Ct-értékek. Az egyik konkrét mintában: $(2 \times 10^5 / 221,6) / (2,5 \times 10^9 / 229,1) \times 100 = \sim 1,44\%$. Így a HEX csatornában mért viszonylag magas Ct-számok (~ 29) igen magas sertés-genom-tartalomra ($>98,56\%$) utaltak.

8.2.2. A gazdagenom DNS-sel való szennyeződésének minimalizálása

A DNáz I kezelés hatására bekövetkező ASPV-specifikus Ct-k minimális növekedése azt jelzi, hogy a felülúszóban lévő vírus DNS jelentős része (25-50%) a DNáz I-rezisztens virionokba csomagolódott. Úgy tűnt, hogy a DNS-tisztítás előtt a DNáz I inaktiválására szolgáló EDTA hozzáadása szintén döntő fontosságú. E lépés elhagyása a vírus DNS teljes elvesztését eredményezte a következő DNS-tisztítási lépésben, ami arra utal, hogy a nagy koncentrációjú DNáz I inaktiválása az alkalmazott tisztító kit kötőpufferében viszonylag lassú folyamat (meglepő módon a gyártó a kötőpufferében nem jelzi az EDTA-tartalmat).

Ezen megfigyelések a vírust tartalmazó sejtlizátum összetettségére és kiszámíthatatlanságára utalnak, és kiemelik a qPCR-monitorozás fontosságát a megfelelő minták kiválasztásában. Eredményeink azt mutatták, hogy a DNáz I kezelés az alkalmazott monitoring eljárással együtt valóban képes garantálni, hogy az ASPV-mintákban lévő DNS nagy része a vírusgenomból származzon.

8.2.3. Teljes genom amplifikáció és a szekvenálási eredmények értékelése

A gazdaszervezet és a vírus DNS véletlenszerű és egyenletes felszaporítása után azt tapasztaltuk, hogy a kezelést követően a vírus DNS és a gazda DNS mennyiségének különbségei nőttek.

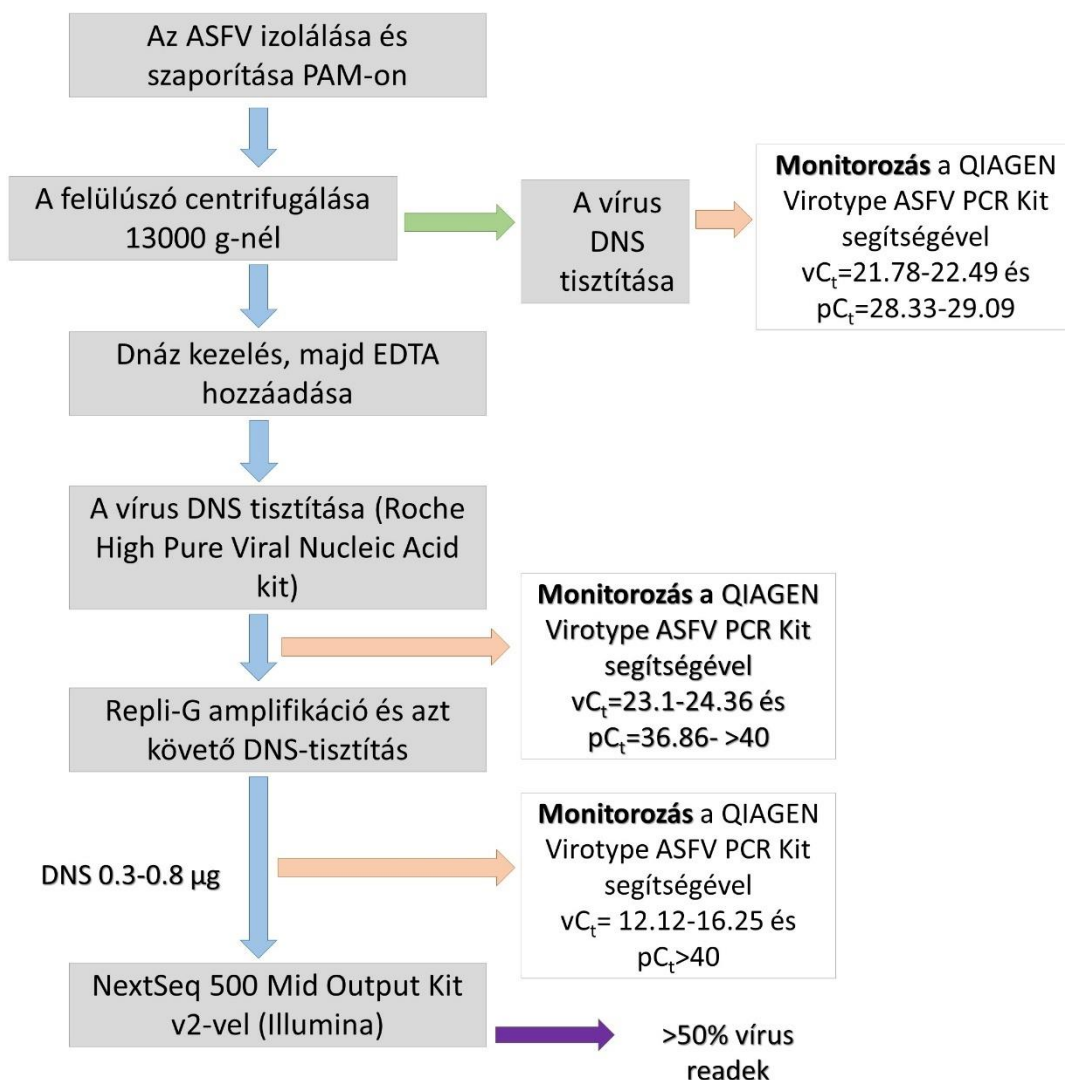
Mivel az NGS szekvenálás utáni nem egyértelműen meghatározható readok nagy száma megkérdőjelezte az Ion Torrent platform használhatóságát, ezért a továbbiakban

az ASPV genom szekvenálásához nem alkalmaztuk ezt módszert. A Sanger-módszer használata a három problémás homopolimer C/G tartalmú régióra valóban lehetővé tette az izolátum teljes szekvenciájának kiegészítését Illumina szekvenálást követően. A genom végeinek alacsonyabb lefedettsége valószínűleg abból ered, hogy a Repli-g Mini Kit kevésbé amplifikálta ezeket a régiókat. A vírus terminusai kovalensen zártak és invertált ismétlődéseket (ITR) tartalmaznak, amelyek megkönnyítik a templát szálak gyors rehibridizációját. Így az ITR-ek akadályozhatják a véletlenszerű primerek kötődését ezekhez a régiókhoz, ami az átlagosnál alacsonyabb amplifikációhoz és e régiók alulreprezentáltságához vezet a szekvenálásokban.

Mindenesetre úgy tűnik, hogy a mi protokollunkkal körülbelül 7 millió read és 3 Sanger-szekvenálás elvégzése szükséges egy ASPV izolátum teljes szekvenciájának összeállításához, ha minimalizálni akarjuk a Sanger-szekvenálások számát. Az NGS readok jelentős csökkenése a genom végeinél szükségessé teheti azonban a Sanger-módszerrel történő szekvenálások növelését a terminális régiókban.

8.2.4. A szekvenálási protokoll munkafolyamata

Munkánk során tehát egy olyan ASPV szekvenálási protokollt dolgoztunk ki, amely egyszerű és hatékony megoldást nyújt az ASPV-minták gyakori szekvenálási problémájára, amely a minták magas gazdaeredetű DNS tartalmára, valamint alacsony vírus DNS tartalmára vezethető vissza. A nukleáz kezelés megfelelő alkalmazása, a teljes genom amplifikálása, és ami a legfontosabb, a mintaelőkészítés különböző fázisainak folyamatos ellenőrzése és értékelése lehetővé tette, hogy teljes mértékben kihasználjuk az NGS előnyeit az ASPV genom szekvenálásához. Az első magyar ASPV-izolátum szekvenálásán keresztül kiemeltük a fontos lépéseket, hogy segítsük a reprodukálhatóságot, és megkönnyítsük a protokoll sikeres alkalmazását más ASPV-kutatók számára (19. ábra).



19. ábra: Az ASFV szekvenálási protokoll munkafolyamata. vC_t , a vírusgenom C_t értéke; pC_t , a sertésgenom C_t értéke

8.3. Az Lv17/WB/d110-11L vírus tulajdonságai

Az élővírusos vakcinafejlesztések során felmerülő problémák megoldása érdekében deletáltunk egy MGF-110 géncsaládba tartozó gént; ettől azt vártuk, hogy a változás mérsékelt hatással jár az Lv17/WB/Rie1 virulenciájára, és nem gyengíti túlzottan a vírust (Gallardo et al., 2018).

Bár az MGF-110 11L pontos funkciója még ismeretlen, az MGF-110 család néhány tagja immunosuppresszív tulajdonságokkal rendelkezik (Netherton et al., 2004b; Zhong et al., 2022). Az MGF-110 11L érdekessége, hogy egy hosszú homopolimer C/G régiót tartalmaz, amely régió más vírusokban és sejtes szervezetekben fontos szabályozó szerepet tölt be. A G/C szakaszok *Caenorhabditis elegans*ban befolyásolják a regionális génexpressziót (Zhao et al., 2007). A humán mitokondriális DNS-ben a 2. konzervált szekvenciablokk guanin-traktusa hosszának megváltoztatása a transzkripció

terminációját eredményezte (Tan et al., 2016). A poliC-kötő fehérjék részt vesznek az mRNS stabilizálásában, a transláció folyamatában, illetve az egy- és kétszálú DNS-hez való kötődésük képes mediálni a génexpressziót (Choi et al., 2009). A pikornavírusokban a poliC-traktus szükséges az immunsejtekben történő replikációhoz és a poliC-traktus deléciója a virulencia és a patogenitás elvesztésével jár, de *in vitro* nem befolyásolja a replikációs képességet (Martin et al., 2000; Penza et al., 2021).

A hivatkozott szakirodalmi adatok alapján ezért feltételeztük, hogy az MGF-110 11L gén eltávolítása pleiotróp hatások révén jelentős attenuációt okozhat, egyrészt a fehérje, másrészt a poliC/G traktus potenciális szabályozó funkciójának megszüntetésével. Valóban tapasztaltunk attenuációt, azonban nem a várt mértékben. Meg kell jegyeznünk, hogy az MGF-110 11L deletált része tartalmazza az ACD 00240 ORF transzkripció starthelyét is (amelyet az ASPV Georgia 2007/1-ben Cackett és munkatársai 2022-ben határoztak meg, a mi konstrukcióink és mutánsaink megtervezése után), ezért nagy valószínűséggel annak transzkripcióját is zavarja.

Kevés kivételtől eltekintve az ASPV-ben a génkiütések nem járnak nagyszámú mutáció megjelenésével a genomban (Borca et al., 2020b; Ramirez-Medina et al., 2021b, 2022; Vuono et al., 2022; Zhou et al., 2022), három további mutáció megjelenése pedig ritka (Y. Zhang et al., 2021).

Az izolálás után azonban az Lv17/WB/Rie1/d110-11L szekvenálása váratlanul nagy számú mutációt mutatott ki a vírusgenomban a deléciós régió kivül. Számos mutálódott gén olyan folyamatokhoz köthető, amelyek potenciálisan befolyásolhatják az immunrendszert és a vírus virulenciáját. Bár az MGF-505 5R pontos funkciója ismeretlen, más MGF-505 gének elnyomják az I. típusú interferonválaszt és növelik a virulenciát sertésekben. Az MGF-505 1R, 2R és 3R deléciója csökkenti a vírus replikációs képességét makrofágokban és az ASPV attenuációjához vezet (Rathakrishnan et al., 2022). Az MGF-505 7R gátolja a cGAS-STING jelátvitelt, és csökkenti az IFN- β termelést (Li et al., 2021b). Azonban az általunk detektált helyen lévő mutációt az MGF-505 5R génben kimutatták virulens lengyel izolátumban is (Mazur-Panasiuk et al., 2019), ami ellentmond a mutáció jelentőségének. Az EP364R szintén részt vesz az IFN-válasz csökkentésében. Foszfodiészterázként működik, a 2',3'-cGAMP hasításával károsítja a STING aggregációját, és gátolja az I. típusú IFN-t stimuláló cGAS-STING útvonalat (Dodantenna et al., 2022).

Az érintett gének közül legalább három vélhetően a vírus transzkripciójában vesz részt. A pG1340L a VACV A7 korai transzkripció faktor nagy alegységéhez hasonlít (Cackett et al., 2020). A pNP1450L egy RNAP-szerű enzim, amely homológ az eukarióta RNS-polimeráz II legnagyobb alegységével, míg az I243L a transzkripció elongációs faktor S-II (TFIIS) homológját kódolja (Kim et al., 2007; Dixon et al., 2013). Érdekes

módon az eukarióta TFIIS az RNS-polimeráz II preiniciációs komplexének alkotórésze, és elengedhetetlen az aktív preiniciációs komplexek hatékony kialakításához. A CP2475L a pp220-at kódolja, amely a core fő összetevője, közvetíti a különböző virionrétegek közötti kölcsönhatásokat (Andrés et al., 1997, 2002, p. 220). Az MGF-100 2L fehérje szerepe valószínűleg a virulenciával kapcsolatos (Cackett et al., 2022).

Az irodalomban a legtöbb mutációt (11) az MGF-110 9L és az MGF-505 7R gének egyidejű kiütését követően jelentették (Ding et al., 2022). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az MGF-110 és MGF-505 családok valamely génjének egyidejű funkcióvesztése kompenzációs mutációk sorozatát váltaná ki, ez azonban ellentmond annak a ténynek, hogy a 11 és 14 mutáns gén listáján csak egy átfedő gén (CP2475L) található. Az Lv17/WB/Rie1 több PAM-ban történő passzázs után is stabil maradt laboratóriumainkban, és az Lv17/WB/Rie1/d110-11L a genetikai stabilitás tekintetében kivételnek mutatkozott számos más Lv17/WB/Rie1 deléciós mutáns között (nem publikált adat).

Mindenesetre az MGF-110 11L gén deléciója és a további mutációk nem okoztak jelentős hátrányt a vírus *in vitro* szaporodásában, és a szülői vírus által okozott tünetek enyhe csökkenését okozták, bár nem a kívánt mértékben. További vizsgálatok szükségesek annak felderítéséhez, hogy a nem tervezett mutációk hogyan járulnak hozzá az Lv17/WB/Rie1/d110-11L fenotípusához.

8.4. Az Lv17/WB/dCD-dGL vírus tulajdonságai

Annak ellenére, hogy egyes vírusizolátumok szekvenciája (Bastos et al., 2004; Zhu et al., 2019; Li et al., 2020; Zhao et al., 2023) és a rekombináns vírusok előállítására használt technikák sikeressége (Neilan et al., 2002; Borca et al., 2018; Hübner et al., 2018) egyértelműen arra utal, hogy a különböző ASPV-törzsek között homológ rekombináció történik, ASPV-ben nagyon keveset tudunk erről a jelenségről. Tudomásunk szerint a mi munkánk az első, amely közvetlen tapasztalati bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az ASPV homológ rekombinációja makrofágokban megtörténik. Munkánk során könnyűszerrel izolálni tudtuk a rekombináns vírust, amely két fluoreszcens markert hordozó vírus keresztezéséből keletkezett, ez pedig arra utal, hogy amennyiben koinfekció történik, a homológ rekombináció viszonylag nagy gyakorisággal történhet a vírustörzsek között is. Az a tény, hogy az egyedi szülői genetikai markerek alapján legalább két rekombinációs esemény egyértelműen kimutatható a rekombináns vírus génállományában (15. ábra), erősen alátámasztja az előző állítást. Az általunk alkalmazott viszonylag egyszerű módszer lehetővé teszi, hogy a jövőben *ex vivo* és *in vivo* tanulmányozhassuk a különböző ASPV törzsek közötti homológ rekombinációt. Ezek a kísérletek nemcsak elméleti kérdésekre adhatnak választ, hanem döntő

jelentőségűek lehetnek az élő attenuált vírusvakcinák szabályozása és biztonságos alkalmazása (a vakcinatörzsek vagy a terepi és a vakcinatörzsek közötti *in vivo* rekombináció előfordulásának korlátozása) szempontjából is.

Az MLV-k racionális tervezését megnehezíti, hogy az egyes gének eltávolításának hatása vírustörzsről vírustörzsre jelentősen eltérhet, és több gén deléciójának hatása kiszámíthatatlan, és nem lineárisan additív. Például az EP153R gén deléciója egy természetesen előforduló, nem hemadszorbáló és nem halálos kimenetelű fertőzést okozó izolátumból (ASFV/NH/P68) a nem rokon vírusokkal szembeni védőhatás elvesztését eredményezi (Gallardo et al., 2018). Az EP402R gén deléciója a BA71 gyengüléséhez vezet, és védelmet mutat a szülői vírus ellen. Azonban az EP402R és a BL119 gén kiütése egy rendkívül virulens Georgia/07 izolátumból attenuált fenotípust eredményezett, de az elvesztette a védelmet a csak a B119L géndeletált változathoz képest (Gladue et al., 2020).

A pEP402R és a pEP153R nem nélkülözhetetlen a vírus sejtekben való szaporodásához, és az eredmények azt mutatják, hogy egy korábban attenuált vírus felhasználásával (a Benin izolátum DP148R génjének deléciójával) az EP402R és az EP153R szinergista szerepet játszik a klinikai tünetek, a virulencia és a vírus vérben való perzisztenciájának további csökkentésében (Petrovan et al., 2022). Ezzel szemben az ASFV-G izolátumból a három gén (B119L, EP402R és EP153R) együttes kiütése jelentősen csökkentette a védekező potenciált ahhoz képest, mint amikor csak a B119L gént távolították el az ASFV-G izolátumból (Xie et al., 2022). Hasonló védettségvesztést találtunk, amely az *in vitro* (17. ábra) replikációs képesség csökkenésével járt együtt, amikor ugyanezt a három gént töröltük az Lv17 genomjából.

8.5. Az Lv17/WB/d24 vírus tulajdonságai

A szakirodalomban számos példa található arra, hogy az ASPV sejtvonalakon történő sorozatpasszálása nagy deléciókat eredményezhet a vírus genomjában, leggyakrabban a bal és jobb oldali variábilis régióban (LVR és RVR). Az MS zöld majom sejtvonalhoz adaptált E70 törzsben 44 passzázs után az LVR-ben 15,2 kb-os deléció, az RVR-ben pedig 2,4 kb-os deléció következett be (Tabarés et al., 1987). A Vero sejtekben végzett 60. passzázs után hat pontmutáció mellett jelentős változásokat figyeltek meg az ASFV-G törzs jobb és bal variábilis régióiban egyaránt. Az RVR 5 kb deléciót szenvedett, míg az LVR-ből közel 7 kb hiányzott. A deléciók elsősorban az MGF-100, MGF-360 és MGF-505 géncsaládokat érintették (Krug et al., 2015). A szintén Vero sejtekhez adaptált BA71 (BA71V) vírus 30 pontmutáción kívül két nagyobb deléciós helyet tartalmazott a bal, és egyet a jobb variábilis régióban. A legnagyobb (8238 bázisú) deléció az RVR-ben az MGF-360 és -505 családokhoz tartozó géneket is érintette. A vírusgenom LVR

részében az 1707 bp és a 2669 bp hosszú deléciók az MGF-100 és -360 géncsaládok tagjait érintették (Rodríguez et al., 2015).

Az Lv17/WB/Rie1 esetében nyolc passzázs után a genom 5' végén egy körülbelül 40 kb-os deléciót mutattunk ki, ami 52 gén elvesztését eredményezte. Azonban egy hasonló méretű inszerció a 3' végéről majdnem visszaállította a genom eredeti méretét, és *de facto* egy ~40 kb ITR-t eredményezett a genom mindkét végén, 51 gén duplikációjával. A bal oldali 5' vég ilyen mértékű elvesztése és 3' végi szekvenciával való helyettesítése sem példa nélküli. Hasonló duplikatív transzlokációt figyeltek meg az ASPV Estonia genomjában, ahol a 3' vég 7,3 kb-os duplikációja helyettesítette az 5' végi 14,5 Kb-os deléciót (Zani et al., 2018). Az alkalmazott szekvenálási technika nyilvánvalóan alkalmas az egy nukleotidot érintő változások, vagy akár a polimorfizmusok kimutatására is, ha azok dominánsak a kvázispeciesben. A teljes genom amplifikáció additív torzító hatásai, valamint az NGS-eljárásban rejlő szisztematikus torzítások és egyenetlenségek miatt nagyon nehéz megbecsülni a fő genetikai komponensek arányát a különböző mintákban. Ennek az aránytalanságnak a következménye, hogy általában nem lehet abszolút bizonyossággal meghatározni, hogy egy adott víruspopuláció genetikailag homogén-e (vagy sem), mivel kisebb számú komponensekre jellemző readok nagy valószínűséggel nem mutathatók ki a mintában. Az ilyen readok bármilyen kis számban történő kimutatása azonban egyértelműen jelzi a genetikai variánsok jelenlétét a kvázispeciesben.

Tudomásunk szerint az Lv17/WB/Rie1/d24-hoz hasonló nagy, összefüggő deléciókat tartalmazó vírusok ritkán a szaporíthatók PAM-on. A szakirodalom szerint eddig egy hasonló méretű (~24,5 kb az ASFV- Δ LVR-nél és ~26,5 kb az Lv17/WB/Rie1/d24-nél) deléciót találtak (Luo et al., 2022) PAM sejtekben szaporított ASPV-nél ez is az Lv17/WB/Rie1/d24-hez hasonlóan csökkentette az ASFV- Δ LVR replikációs képességét.

Az Lv17/WB/Rie1 2352 és 26554 régió közötti ORF-jei nem szükségesek az *in vitro* replikációhoz sem a PAM, sem a Cos7 sejtekben. Viszont az Lv17/d24 vírus állatokba történő beoltását követően úgy tűnik, hogy a szóban forgó ORF-ek hiánya esetén a vírus még viszonylag nagy dózisu (10⁴ FFU) beoltás után sem képes védő immunitást kiváltani sertésekben. Nem valószínű, hogy ezeket az MGF fehérjéket közvetlenül a semlegesítő antitestek célozzák, az elégtelen protekció inkább az e gének által kódolt fehérjék hiányában csökkent *in vivo* replikációnak tudható be. Másrészt a 26554 és 40568 közötti régióknak tartalmaznia kell (MGF-360 11L, MGF-360 12L, MGF-360 13L, MGF-360 14L, MGF-505 2R, MGF-505 3R, MGF-505 4R, MGF-505 5R, MGF-505 6R) fontos géneket a PAM hatékony *in vitro* replikációjához. Érdekes módon úgy

tűnik, hogy ezek a gének nem alapvető fontosságúak, sőt akár károsak is az ASPV Cos7-ben történő replikációjához.

8.6. Az Lv17/Rie/d110-11L, Lv17/WB/d24 és az Lv17/WB/dCD-dGL vírusok *in vivo* tulajdonságai

Egy olaszországi együttműködés keretében lehetőségünk nyílt az említett három törzs *in vivo*, házisertéseken való tesztelésére is.

A vakcinajelölt Lv17/WB/Rie1/d110-11L *in vivo* tesztelése során a vírus patogenitása és letalitása egyértelmű csökkenést mutatott a szülői törzshez képest, illetve a beoltott állatok csekély szintű védettséggel rendelkeztek a vírus ellen. A ráfertőző törzs beoltása sokkal kevesebb káros hatással járt, mint a kontroll állatoknál megfigyelt mellékhatások, amelyek a betegség erősebb tüneteit mutatták, annak ellenére, hogy akut forma nem volt kimutatható az alacsony fertőző dózissal való oltás miatt. ASPV elleni ellenanyag szint a fertőzés utáni 14. naptól kezdve mérhető volt, míg virémiát a fertőzés utáni 7. naptól kezdve lehetett detektálni. Mindazonáltal az állatkísérlet során kapott eredmények vakcinafejlesztés szempontjából nem tekinthetők kielégítőnek. Számos klinikai tünetet figyeltek meg, amelyek bár enyhék voltak, a vakcina beadásának tulajdoníthatók (hasmenés, bőrbevérzés, az Lv17 csoportnál pedig remegés). Az Armenia/07 törzsszel való ráfertőzés után láz és fülön látható bevérvések jelentkeztek több állatnál is. Sajnos hasonló tüneteket figyeltek meg korábbi kísérletekben, amelyekben csökkentett virulenciájú ASPV-törzseket használtak, ezért az Lv17/WB/Rie1/d110-11L vakcinaként jelen formájában nem használható. Nyilvánvaló, hogy az MGF-110 11L eltávolítása önmagában nem elegendő a vakcina engedélyezéséhez szükséges biztonsági javulás eléréséhez, azonban nagyon valószínű, hogy a kívánt eredmény további vagy más célzott genetikai módosításokkal elérhető.

Az Lv17/d24 és Lv17/dCD-dGL törzsekkel való fertőzéskor eredményeink egybeváltak az *in vitro* eredményekkel, *in vivo* is a vírusok replikációs képességének csökkenését tapasztaltuk. Továbbá sertések enyhe klinikai tüneteket (láz, hasmenés, étvágytalanság, bevérvések a fülön) mutattak annak ellenére, hogy az ASPV-t nem lehetett kimutatni a vérükben az Armenia/07 törzsszel való ráfertőzésig. Az Lv17/d24 és Lv17/dCD-dGL törzsekkel való *in vivo* fertőzési kísérletek során emlékeztető oltást is alkalmaztak, ami után a klinikai tünetek növekedését észlelték mindkét törzsszel való fertőzéskor, amely a ráfertőzés után még jobban fokozódott. Az Lv17/WB/Rie1-d24 csoportban összességében kevesebb tünetet észleltek, mint az Lv17/WB/Rie1-dCD-dGL csoportban. A klinikai tünetek ellenére az Lv17/WB/Rie1-d24 csoportban csak egy állatban indukáltak mérhető ellenanyag szintet az első dózist követő harmadik héten. A második, magasabb dózis négy állatban viszonylag alacsony ellenanyag választ indukált,

míg az Lv17/WB/Rie1-dCD-dGL csoportban csak egy állatnál lehetett ellenanyagszintet mérni. Sajnos a ráfertőzést követő elfogadhatatlanul magas elhullási arány (8/13) megerősíti, hogy ezek a vírusok jelenlegi formájukban nem alkalmasak vakcinaként való felhasználásra.

9. Új tudományos eredmények

- 1) Munkánk során kifejlesztettünk egy újgenerációs szekvenálási technikát, amellyel egyszerűen és pontosan meghatározható az afrikai sertéspestis vírusának teljes genomja.
- 2) Három különböző rekombinációs technikával előállítottunk három különböző ASPV vírust az Lv17/WB/Rie1 törzsből (Lv17/WB/Rie1/d110-11L, Lv17/d24, Lv17/dCD-dGL). CRISPR-Cas9 technikával eltávolítottuk az MGF 110- 11L gént az attenuált Lv17/WB/Rie1 törzs genomjából, majd jellemeztük a vírust.
- 3) Bebizonyítottuk, hogy a különböző ASPV törzsek PAM sejteken történő koinfekciója során homológ rekombinációs események következnek be, és az így keletkezett vírusok könnyűszerrel izolálhatóak.
- 4) Megállapítottuk, hogy az Lv17 Cos7 sejteken való passzálásakor is jelentős változások következnek be az vírus genomjában.
- 5) Az előállított vírusok jelenlegi formájukban vakcinának nem alkalmasak, viszont bebizonyítottuk, hogy az Lv17/WB/Rie1 nemkívánatos mellékhatásai további mutációkkal a védőképesség jelentős csökkenése nélkül enyhíthetők.

10. Irodalomjegyzék

Abrams, C.C., Goatley, L., Fishbourne, E., Chapman, D., Cooke, L., Oura, C.A., Netherton, C.L., Takamatsu, H.-H., Dixon, L.K., 2013. **Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus.** *Virology* 443, 99–105. doi:10.1016/j.virol.2013.04.028

Afonso, C.L., Piccone, M.E., Zaffuto, K.M., Neilan, J., Kutish, G.F., Lu, Z., Balinsky, C.A., Gibb, T.R., Bean, T.J., Zsak, L., Rock, D.L., 2004. **African Swine Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Affect Host Interferon Response.** *J Virol* 78, 1858–1864. doi:10.1128/JVI.78.4.1858-1864.2004

Agüero, M., Blasco, R., Wilkinson, P., Viñuela, E., 1990. **Analysis of naturally occurring deletion variants of african swine fever virus: Multigene family 110 is not essential for infectivity or virulence in pigs.** *Virology* 176, 195–204. doi:10.1016/0042-6822(90)90244-L

Alkhamis, M.A., Gallardo, C., Jurado, C., Soler, A., Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2018. **Phylogenetics and evolutionary epidemiology of African swine fever p72-CVR genes in Eurasia and Africa.** *PLoS ONE* 13, e0192565. doi:10.1371/journal.pone.0192565

Almendral, J.M., Almazán, F., Blasco, R., Viñuela, E., 1990. **Multigene families in African swine fever virus: family 110.** *J Virol* 64, 2064–2072. doi:10.1128/jvi.64.5.2064-2072.1990

Alonso, C., Miskin, J., Hernáez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L., Escribano, J.M., 2001. **African Swine Fever Virus Protein p54 Interacts with the Microtubular Motor Complex through Direct Binding to Light-Chain Dynein.** *J Virol* 75, 9819–9827. doi:10.1128/JVI.75.20.9819-9827.2001

Andrés, G., Charro, D., Matamoros, T., Dillard, R.S., Abrescia, N.G.A., 2020. **The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes.** *Journal of Biological Chemistry* 295, 1–12. doi:10.1074/jbc.AC119.011196

Andrés, G., García-Escudero, R., Salas, M.L., Rodríguez, J.M., 2002. **Repression of African Swine Fever Virus Polyprotein pp220-Encoding Gene Leads to the Assembly of Icosahedral Core-Less Particles.** *J Virol* 76, 2654–2666. doi:10.1128/JVI.76.6.2654-2666.2002

- Andrés, G., García-Escudero, R., Viñuela, E., Salas, M.L., Rodríguez, J.M., 2001. **African Swine Fever Virus Structural Protein pE120R Is Essential for Virus Transport from Assembly Sites to Plasma Membrane but Not for Infectivity.** *J Virol* 75, 6758–6768. doi:10.1128/JVI.75.15.6758-6768.2001
- Andrés, G., Simón-Mateo, C., Viñuela, E., 1997. **Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220.** *J Virol* 71, 2331–2341. doi:10.1128/jvi.71.3.2331-2341.1997
- Angulo, A., Viñuela, E., Alcamí, A., 1992. **Comparison of the sequence of the gene encoding African swine fever virus attachment protein p12 from field virus isolates and viruses passaged in tissue culture.** *J Virol* 66, 3869–3872. doi:10.1128/jvi.66.6.3869-3872.1992
- Argilaguuet, J.M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Gallardo, C., Accensi, F., Lacasta, A., Mora, M., Ballester, M., Galindo-Cardiel, I., López-Soria, S., Escribano, J.M., Reche, P.A., Rodríguez, F., 2012. **DNA Vaccination Partially Protects against African Swine Fever Virus Lethal Challenge in the Absence of Antibodies.** *PLoS ONE* 7, e40942. doi:10.1371/journal.pone.0040942
- Arias, M., De La Torre, A., Dixon, L., Gallardo, C., Jori, F., Laddomada, A., Martins, C., Parkhouse, R.M., Revilla, Y., Rodriguez, F.A.J.-M., Sanchez-Vizcaino, 2017. **Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines.** *Vaccines* 5, 35. doi:10.3390/vaccines5040035
- Arias, M., Jurado, C., Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2018. **Gaps in African swine fever: Analysis and priorities.** *Transbound Emerg Dis* 65, 235–247. doi:10.1111/tbed.12695
- Bacciu, D., Deligios, M., Sanna, G., Madrau, M.P., Sanna, M.L., Dei Giudici, S., Oggiano, A., 2016. **Genomic analysis of Sardinian 26544/OG10 isolate of African swine fever virus.** *Virology Reports* 6, 81–89. doi:10.1016/j.virep.2016.09.001
- Bao, J., Wang, Q., Lin, P., Liu, C., Li, L., Wu, X., Chi, T., Xu, T., Ge, S., Liu, Y., Li, J., Wang, S., Qu, H., Jin, T., Wang, Z., 2019. **Genome comparison of African swine fever virus China/2018/Anhui XCGQ strain and related European p72 Genotype II strains.** *Transbound Emerg Dis* 66, 1167–1176. doi:10.1111/tbed.13124
- Barasona, J.A., Cadenas-Fernández, E., Kosowska, A., Barroso-Arévalo, S., Rivera, B., Sánchez, R., Porras, N., Gallardo, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2021. **Safety of African Swine Fever Vaccine Candidate Lv17/WB/Rie1 in Wild Boar: Overdose and Repeated Doses.** *Front. Immunol.* 12, 761753. doi:10.3389/fimmu.2021.761753

Barasona, J.A., Gallardo, C., Cadenas-Fernández, E., Jurado, C., Rivera, B., Rodríguez-Bertos, A., Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2019. **First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II.** *Front. Vet. Sci.* 6, 137. doi:10.3389/fvets.2019.00137

Barderas, M.G., Rodríguez, F., Gómez-Puertas, P., Avilés, M., Beitia, F., Alonso, C., Escribano, J.M., 2001. **Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins.** *Arch. Virol.* 146, 1681–1691. doi:10.1007/s007050170056

Bastos, A.D.S., Penrith, M.-L., Macome, F., Pinto, F., Thomson, G.R., 2004. **Co-circulation of two genetically distinct viruses in an outbreak of African swine fever in Mozambique: no evidence for individual co-infection.** *Veterinary Microbiology* 103, 169–182. doi:10.1016/j.vetmic.2004.09.003

Bishop, R.P., Fleischauer, C., de Villiers, E.P., Okoth, E.A., Arias, M., Gallardo, C., Upton, C., 2015. **Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X.** *Virus Genes* 50, 303–309. doi:10.1007/s11262-014-1156-7

Blasco, R., Agüero, M., Almendral, JoséM., Viñuela, E., 1989. **Variable and constant regions in african swine fever virus DNA.** *Virology* 168, 330–338. doi:10.1016/0042-6822(89)90273-0

Blome, S., Gabriel, C., Beer, M., 2014. **Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation.** *Vaccine* 32, 3879–3882. doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.051

Borca, M.V., Carrillo, C., Zsak, L., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Burrage, T.G., Rock, D.L., 1998. **Deletion of a CD2-Like Gene, 8-DR, from African Swine Fever Virus Affects Viral Infection in Domestic Swine.** *J Virol* 72, 2881–2889. doi:10.1128/JVI.72.4.2881-2889.1998

Borca, M.V., Holinka, L.G., Berggren, K.A., Gladue, D.P., 2018. **CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses.** *Sci Rep* 8, 3154. doi:10.1038/s41598-018-21575-8

Borca, M.V., O'Donnell, V., Holinka, L.G., Risatti, G.R., Ramirez-Medina, E., Vuono, E.A., Shi, J., Pruitt, S., Rai, A., Silva, E., Velazquez-Salinas, L., Gladue, D.P., 2020a. **Deletion of CD2-like gene from the genome of African swine fever virus strain Georgia does not attenuate virulence in swine.** *Sci Rep* 10, 494. doi:10.1038/s41598-020-57455-3

- Borca, M.V., Rai, A., Ramirez-Medina, E., Silva, E., Velazquez-Salinas, L., Vuono, E., Pruitt, S., Espinoza, N., Gladue, D.P., 2021. **A Cell Culture-Adapted Vaccine Virus against the Current African Swine Fever Virus Pandemic Strain.** J Virol 95, e00123-21. doi:10.1128/JVI.00123-21
- Borca, M.V., Ramirez-Medina, E., Silva, E., Vuono, E., Rai, A., Pruitt, S., Holinka, L.G., Velazquez-Salinas, L., Zhu, J., Gladue, D.P., 2020b. **Development of a Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine by Deletion of the I177L Gene Results in Sterile Immunity against the Current Epidemic Eurasia Strain.** J Virol 94, e02017-19. doi:10.1128/JVI.02017-19
- Burrage, T.G., Lu, Z., Neilan, J.G., Rock, D.L., Zsak, L., 2004. **African Swine Fever Virus Multigene Family 360 Genes Affect Virus Replication and Generalization of Infection in *Ornithodoros porcinus* Ticks.** J Virol 78, 2445–2453. doi:10.1128/JVI.78.5.2445-2453.2004
- Cackett, G., Matelska, D., Sýkora, M., Portugal, R., Malecki, M., Bähler, J., Dixon, L., Werner, F., 2020. **The African Swine Fever Virus Transcriptome.** J Virol 94, e00119-20. doi:10.1128/JVI.00119-20
- Cackett, G., Portugal, R., Matelska, D., Dixon, L., Werner, F., 2022. **African Swine Fever Virus and Host Response: Transcriptome Profiling of the Georgia 2007/1 Strain and Porcine Macrophages.** J Virol 96, e01939-21. doi:10.1128/jvi.01939-21
- Carlson, J., O'Donnell, V., Alfano, M., Velazquez Salinas, L., Holinka, L., Krug, P., Gladue, D., Higgs, S., Borca, M., 2016. **Association of the Host Immune Response with Protection Using a Live Attenuated African Swine Fever Virus Model.** Viruses 8, 291. doi:10.3390/v8100291
- Carrascosa, JoséL., Carazo, JoséM., Carrascosa, A.L., García, N., Santisteban, A., Viñuela, E., 1984. **General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles.** Virology 132, 160–172. doi:10.1016/0042-6822(84)90100-4
- Chapman, D.A.G., Darby, A.C., Da Silva, M., Upton, C., Radford, A.D., Dixon, L.K., 2011. **Genomic Analysis of Highly Virulent Georgia 2007/1 Isolate of African Swine Fever Virus.** Emerg. Infect. Dis. 17, 599–605. doi:10.3201/eid1704.101283
- Chapman, D.A.G., Tcherepanov, V., Upton, C., Dixon, L.K., 2008. **Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates.** Journal of General Virology 89, 397–408. doi:10.1099/vir.0.83343-0

- Chaulagain, S., Delhon, G.A., Khatiwada, S., Rock, D.L., 2021. **African Swine Fever Virus CD2v Protein Induces β -Interferon Expression and Apoptosis in Swine Peripheral Blood Mononuclear Cells.** *Viruses* 13, 1480. doi:10.3390/v13081480
- Chen, W., Zhao, D., He, X., Liu, R., Wang, Z., Zhang, X., Li, F., Shan, D., Chen, H., Zhang, J., Wang, L., Wen, Z., Wang, X., Guan, Y., Liu, J., Bu, Z., 2020. **A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs.** *Sci. China Life Sci.* 63, 623–634. doi:10.1007/s11427-020-1657-9
- Choi, H.S., Hwang, C.K., Song, K.Y., Law, P.-Y., Wei, L.-N., Loh, H.H., 2009. **Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 380, 431–436. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.136
- Correia, S., Ventura, S., Parkhouse, R.M., 2013. **Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV.** *Virus Research* 173, 87–100. doi:10.1016/j.virusres.2012.10.013
- Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D.U., Dixon, L.K., 2009. **African swine fever: how can global spread be prevented?** *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2683–2696. doi:10.1098/rstb.2009.0098
- Davies, K., Goatley, L.C., Guinat, C., Netherton, C.L., Gubbins, S., Dixon, L.K., Reis, A.L., 2017. **Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate.** *Transbound Emerg Dis* 64, 425–431. doi:10.1111/tbed.12381
- de Carvalho Ferreira, H.C., Tudela Zúquete, S., Wijnveld, M., Weesendorp, E., Jongejan, F., Stegeman, A., Loeffen, W.L.A., 2014. **No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks.** *Ticks and Tick-borne Diseases* 5, 582–589. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.12.012
- de Carvalho Ferreira, H.C., Weesendorp, E., Quak, S., Stegeman, J.A., Loeffen, W.L.A., 2013. **Quantification of airborne African swine fever virus after experimental infection.** *Veterinary Microbiology* 165, 243–251. doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.007
- De Oliveira, V.L., Almeida, S.C.P., Soares, H.R., Crespo, A., Marshall-Clarke, S., Parkhouse, R.M.E., 2011. **A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV).** *Arch Virol* 156, 597–609. doi:10.1007/s00705-010-0894-7
- Ding, M., Dang, W., Liu, H., Zhang, K., Xu, F., Tian, H., Huang, H., Shi, Z., Sunkang, Y., Qin, X., Zhang, Y., Zheng, H., 2022. **Sequential Deletions of Interferon Inhibitors MGF110-9L and MGF505-7R Result in Sterile Immunity against the Eurasia Strain of Africa Swine Fever.** *J Virol* 96, e01192-22. doi:10.1128/jvi.01192-22

- Dixon, L., Sánchez-Cordón, P., Galindo, I., Alonso, C., 2017. **Investigations of Pro- and Anti-Apoptotic Factors Affecting African Swine Fever Virus Replication and Pathogenesis.** *Viruses* 9, 241. doi:10.3390/v9090241
- Dixon, L.K., Chapman, D.A.G., Netherton, C.L., Upton, C., 2013. **African swine fever virus replication and genomics.** *Virus Research* 173, 3–14. doi:10.1016/j.virusres.2012.10.020
- Dixon, L.K., Sun, H., Roberts, H., 2019. **African swine fever.** *Antiviral Research* 165, 34–41. doi:10.1016/j.antiviral.2019.02.018
- Dodantenna, N., Ranathunga, L., Chathuranga, W.A.G., Weerawardhana, A., Cha, J.-W., Subasinghe, A., Gamage, N., Haluwana, D.K., Kim, Y., Jheong, W., Poo, H., Lee, J.-S., 2022. **African Swine Fever Virus EP364R and C129R Target Cyclic GMP-AMP To Inhibit the cGAS-STING Signaling Pathway.** *J Virol* 96, e01022-22. doi:10.1128/jvi.01022-22
- Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M.L., Salas, J., Rodríguez, J.M., 2006. **Generation of Filamentous Instead of Icosahedral Particles by Repression of African Swine Fever Virus Structural Protein pB438L.** *J Virol* 80, 11456–11466. doi:10.1128/JVI.01468-06
- Escribano, J.M., Galindo, I., Alonso, C., 2013. **Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts.** *Virus Research* 173, 101–109. doi:10.1016/j.virusres.2012.10.012
- Eustace Montgomery, R., 1921. **On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony).** *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 34, 159–191. doi:10.1016/S0368-1742(21)80031-4
- Feedstrategy.com, 2023. URL <https://www.feedstrategy.com/animal-health-veterinary/african-swine-fever/article/15443330/vietnam-to-begin-nationwide-distribution-of-asf-vaccine> , Letöltés dátuma: 2023.05.21.
- Fila, M., Woźniakowski, G., 2020. **African swine fever virus – the possible role of flies and other insects in virus transmission.** *Journal of Veterinary Research* 64, 1–7. doi:10.2478/jvetres-2020-0001
- Forman, A.J., Wardley, R.C., Wilkinson, P.J., 1982. **The immunological response of pigs and Guinea pigs to antigens of African swine fever virus.** *Archives of Virology* 74, 91–100. doi:10.1007/BF01314703

Forth, J., Forth, L., King, J., Groza, O., Hübner, A., Olesen, A., Höper, D., Dixon, L., Netherton, C., Rasmussen, T., Blome, S., Pohlmann, A., Beer, M., 2019. **A Deep-Sequencing Workflow for the Fast and Efficient Generation of High-Quality African Swine Fever Virus Whole-Genome Sequences.** *Viruses* 11, 846. doi:10.3390/v11090846

Frant, M., Woźniakowski, G., Pejsak, Z., 2017. **African swine fever (ASF) and ticks. No risk of tick-mediated ASF spread in Poland and Baltic states.** *Journal of Veterinary Research* 61, 375–380. doi:10.1515/jvetres-2017-0055

Franzoni, G., Graham, S.P., Sanna, G., Angioi, P., Fiori, M.S., Anfossi, A., Amadori, M., Dei Giudici, S., Oggiano, A., 2018. **Interaction of porcine monocyte-derived dendritic cells with African swine fever viruses of diverse virulence.** *Veterinary Microbiology* 216, 190–197. doi:10.1016/j.vetmic.2018.02.021

Freitas, F.B., Simões, M., Frouco, G., Martins, C., Ferreira, F., 2019. **Towards the Generation of an ASFV-pA104R DISC Mutant and a Complementary Cell Line—A Potential Methodology for the Production of a Vaccine Candidate.** *Vaccines* 7, 68. doi:10.3390/vaccines7030068

Friedrichs, V., Reicks, D., Hasenfuß, T., Gerstenkorn, E., Zimmerman, J.J., Nelson, E.A., Carrau, T., Deutschmann, P., Sehl-Ewert, J., Roszyk, H., Beer, M., Christopher-Hennings, J., Blome, S., 2022. **Artificial Insemination as an Alternative Transmission Route for African Swine Fever Virus.** *Pathogens* 11, 1539. doi:10.3390/pathogens11121539

Galindo, I., Almazán, F., Bustos, M.J., Viñuela, E., Carrascosa, A.L., 2000. **African Swine Fever Virus EP153R Open Reading Frame Encodes a Glycoprotein Involved in the Hemadsorption of Infected Cells.** *Virology* 266, 340–351. doi:10.1006/viro.1999.0080

Galindo, I., Alonso, C., 2017. **African Swine Fever Virus: A Review.** *Viruses* 9, 103. doi:10.3390/v9050103

Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., Pelayo, V., Gazaev, I., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nieto, R., Fernández-Pacheco, P., Bokhan, S., Nevolko, O., Drozhzhe, Z., Pérez, C., Soler, A., Kolvasov, D., Arias, M., 2014. **Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe.** *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1544–1547. doi:10.3201/eid2009.140554

Gallardo, C., Mwaengo, D.M., Macharia, J.M., Arias, M., Taracha, E.A., Soler, A., Okoth, E., Martín, E., Kasiti, J., Bishop, R.P., 2009. **Enhanced discrimination of African swine**

fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes* 38, 85–95. doi:10.1007/s11262-008-0293-2

Gallardo, C., Sánchez, E.G., Pérez-Núñez, D., Nogal, M., de León, P., Carrascosa, Á.L., Nieto, R., Soler, A., Arias, M.L., Revilla, Y., 2018. **African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses.** *Vaccine* 36, 2694–2704. doi:10.1016/j.vaccine.2018.03.040

Gallardo, C., Soler, A., Rodze, I., Nieto, R., Cano-Gómez, C., Fernandez-Pinero, J., Arias, M., 2019. **Attenuated and non-haemadsorbing (non- HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017.** *Transbound Emerg Dis* 66, 1399–1404. doi:10.1111/tbed.13132

García-Escudero, R., Andrés, G., Almazán, F., Viñuela, E., 1998. **Inducible Gene Expression from African Swine Fever Virus Recombinants: Analysis of the Major Capsid Protein p72.** *J Virol* 72, 3185–3195. doi:10.1128/JVI.72.4.3185-3195.1998

Gil, S., Sepúlveda, N., Albina, E., Leitão, A., Martins, C., 2008. **The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFN α , TNF α and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60.** *Arch Virol* 153, 1845–1854. doi:10.1007/s00705-008-0196-5

Gladue, D.P., O'Donnell, V., Ramirez-Medina, E., Rai, A., Pruitt, S., Vuono, E.A., Silva, E., Velazquez-Salinas, L., Borca, M.V., 2020. **Deletion of CD2-Like (CD2v) and C-Type Lectin-Like (EP153R) Genes from African Swine Fever Virus Georgia- Δ 9GL Abrogates Its Effectiveness as an Experimental Vaccine.** *Viruses* 12, 1185. doi:10.3390/v12101185

Goatley, L.C., Dixon, L.K., 2011. **Processing and Localization of the African Swine Fever Virus CD2v Transmembrane Protein.** *J Virol* 85, 3294–3305. doi:10.1128/JVI.01994-10

Goatley, L.C., Reis, A.L., Portugal, R., Goldswain, H., Shimmon, G.L., Hargreaves, Z., Ho, C.-S., Montoya, M., Sánchez-Cordón, P.J., Taylor, G., Dixon, L.K., Netherton, C.L., 2020. **A Pool of Eight Virally Vectored African Swine Fever Antigens Protect Pigs against Fatal Disease.** *Vaccines* 8, 234. doi:10.3390/vaccines8020234

Gogin, A., Gerasimov, V., Malogolovkin, A., Kolbasov, D., 2013. **African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012.** *Virus Research* 173, 198–203. doi:10.1016/j.virusres.2012.12.007

- Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J.M., Brun, A., Alonso, C., Escribano, J.M., 1998. **The African Swine Fever Virus Proteins p54 and p30 Are Involved in Two Distinct Steps of Virus Attachment and Both Contribute to the Antibody-Mediated Protective Immune Response.** *Virology* 243, 461–471. doi:10.1006/viro.1998.9068
- Gómez-Villamandos, J.C., Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Villeda, C.J., Wilkinson, P.J., Sierra, M.A., 1995. **Pathological changes in the renal interstitial capillaries of pigs inoculated with two different strains of african swine fever virus.** *Journal of Comparative Pathology* 112, 283–298. doi:10.1016/S0021-9975(05)80081-7
- Greig, A.S., Boulanger, P., Bannister, G.L., 1967. **African swine fever. V. Cultivation of the virus in primary pig kidney cells.** *Can J Comp Med Vet Sci* 31, 24–31.
- Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D.U., Dixon, L., 2016. **Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions.** *Veterinary Record* 178, 262–267. doi:10.1136/vr.103593
- Hernández, B., Guerra, M., Salas, M.L., Andrés, G., 2016. **African Swine Fever Virus Undergoes Outer Envelope Disruption, Capsid Disassembly and Inner Envelope Fusion before Core Release from Multivesicular Endosomes.** *PLoS Pathog* 12, e1005595. doi:10.1371/journal.ppat.1005595
- Huang, H., Dang, W., Shi, Z., Ding, M., Xu, F., Li, T., Feng, T., Zheng, H., Xiao, S., 2023. **Identification of African swine fever virus MGF505-2R as a potent inhibitor of innate immunity in vitro.** *Virologica Sinica* 38, 84–95. doi:10.1016/j.virs.2022.11.009
- Hübner, A., Petersen, B., Keil, G.M., Niemann, H., Mettenleiter, T.C., Fuchs, W., 2018. **Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L).** *Sci Rep* 8, 1449. doi:10.1038/s41598-018-19626-1
- Hühr, J., Schäfer, A., Schwaiger, T., Zani, L., Sehl, J., Mettenleiter, T.C., Blome, S., Blohm, U., 2020. **Impaired T-cell responses in domestic pigs and wild boar upon infection with a highly virulent African swine fever virus strain.** *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 3016–3032. doi:10.1111/tbed.13678
- Hurtado, C., Bustos, M.J., Granja, A.G., de León, P., Sabina, P., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Revilla, Y., Carrascosa, A.L., 2011. **The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens.** *Arch Virol* 156, 219–234. doi:10.1007/s00705-010-0846-2

Hurtado, C., Granja, A.G., Bustos, M.J., Nogal, M.L., González de Buitrago, G., de Yébenes, V.G., Salas, M.L., Revilla, Y., Carrascosa, A.L., 2004. **The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression.** *Virology* 326, 160–170. doi:10.1016/j.virol.2004.05.019

ICTV 2023. URL https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202202618,
Letöltés dátuma: 2023. 06.18.

Jia, N., Ou, Y., Pejsak, Z., Zhang, Y., Zhang, J., 2017. **Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection.** *Journal of Veterinary Research* 61, 135–143. doi:10.1515/jvetres-2017-0017

Jori, F., Bastos, A.D.S., 2009. **Role of Wild Suids in the Epidemiology of African Swine Fever.** *EcoHealth* 6, 296–310. doi:10.1007/s10393-009-0248-7

Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M., Wileman, T., 2004. **Transport of African Swine Fever Virus from Assembly Sites to the Plasma Membrane Is Dependent on Microtubules and Conventional Kinesin.** *J Virol* 78, 7990–8001. doi:10.1128/JVI.78.15.7990-8001.2004

Kim, B., Nesvizhskii, A.I., Rani, P.G., Hahn, S., Aebersold, R., Ranish, J.A., 2007. **The transcription elongation factor TFIIIS is a component of RNA polymerase II preinitiation complexes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16068–16073. doi:10.1073/pnas.0704573104

King, K., Chapman, D., Argilaguët, J.M., Fishbourne, E., Hutet, E., Cariolet, R., Hutchings, G., Oura, C.A.L., Netherton, C.L., Moffat, K., Taylor, G., Le Potier, M.-F., Dixon, L.K., Takamatsu, H.-H., 2011. **Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation.** *Vaccine* 29, 4593–4600. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.052

Kroll, M.H., Elin, R.J., 1985. **Relationships between magnesium and protein concentrations in serum.** *Clin Chem* 31, 244–246.

Krug, P.W., Holinka, L.G., O'Donnell, V., Reese, B., Sanford, B., Fernandez-Sainz, I., Gladue, D.P., Arzt, J., Rodriguez, L., Risatti, G.R., Borca, M.V., 2015. **The Progressive Adaptation of a Georgian Isolate of African Swine Fever Virus to Vero Cells Leads to a Gradual Attenuation of Virulence in Swine Corresponding to Major Modifications of the Viral Genome.** *J Virol* 89, 2324–2332. doi:10.1128/JVI.03250-14

Lacasta, A., Ballester, M., Monteagudo, P.L., Rodríguez, J.M., Salas, M.L., Accensi, F., Pina-Pedrero, S., Bensaid, A., Argilaguët, J., López-Soria, S., Hutet, E., Le Potier, M.F.,

Rodríguez, F., 2014. **Expression Library Immunization Can Confer Protection against Lethal Challenge with African Swine Fever Virus.** J Virol 88, 13322–13332. doi:10.1128/JVI.01893-14

Lacasta, A., Monteagudo, P.L., Jiménez-Marín, Á., Accensi, F., Ballester, M., Argilagué, J., Galindo-Cardiel, I., Segalés, J., Salas, M.L., Domínguez, J., Moreno, Á., Garrido, J.J., Rodríguez, F., 2015. **Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection.** Vet Res 46, 135. doi:10.1186/s13567-015-0275-z

Leitão, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R.M.E., Portugal, F.C., Vigário, J.D., Martins, C.L.V., 2001. **The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response.** Journal of General Virology 82, 513–523. doi:10.1099/0022-1317-82-3-513

Lewis, T., Zsak, L., Burrage, T.G., Lu, Z., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Rock, D.L., 2000. **An African Swine Fever Virus *ERV1-ALR* Homologue, *9GL*, Affects Virion Maturation and Viral Growth in Macrophages and Viral Virulence in Swine.** J Virol 74, 1275–1285. doi:10.1128/JVI.74.3.1275-1285.2000

Li, D., Liu, Yinguang, Qi, X., Wen, Y., Li, P., Ma, Z., Liu, Yongjie, Zheng, H., Liu, Z., 2021a. **African Swine Fever Virus MGF-110-9L-deficient Mutant Has Attenuated Virulence in Pigs.** Virol. Sin. 36, 187–195. doi:10.1007/s12250-021-00350-6

Li, D., Yang, W., Li, L., Li, P., Ma, Z., Zhang, J., Qi, X., Ren, J., Ru, Y., Niu, Q., Liu, Z., Liu, X., Zheng, H., 2021b. **African Swine Fever Virus MGF-505-7R Negatively Regulates cGAS–STING-Mediated Signaling Pathway.** The Journal of Immunology 206, 1844–1857. doi:10.4049/jimmunol.2001110

Li, D., Zhang, J., Yang, W., Li, P., Ru, Y., Kang, W., Li, L., Ran, Y., Zheng, H., 2021c. **African swine fever virus protein MGF-505-7R promotes virulence and pathogenesis by inhibiting JAK1- and JAK2-mediated signaling.** Journal of Biological Chemistry 297, 101190. doi:10.1016/j.jbc.2021.101190

Li, X., Xiao, K., Zhang, Z., Yang, J., Wang, R., Shen, X., Pan, J., Irwin, D.M., Chen, R.-A., Shen, Y., 2020. **The recombination hot spots and genetic diversity of the genomes of African swine fever viruses.** Journal of Infection 80, 121–142. doi:10.1016/j.jinf.2019.08.007

Li, Z., Chen, W., Qiu, Z., Li, Y., Fan, J., Wu, K., Li, X., Zhao, M., Ding, H., Fan, S., Chen, J., 2022. African Swine Fever Virus: A Review. Life 12, 1255. doi:10.3390/life12081255

Liu, Y., Li, Y., Xie, Z., Ao, Q., Di, D., Yu, W., Lv, L., Zhong, Q., Song, Y., Liao, X., Song, Q., Wang, H., Chen, H., 2021. **Development and in vivo evaluation of MGF100-1R deletion mutant in an African swine fever virus Chinese strain.** *Veterinary Microbiology* 261, 109208. doi:10.1016/j.vetmic.2021.109208

Lokhandwala, S., Waghela, S.D., Bray, J., Martin, C.L., Sangewar, N., Charendoff, C., Shetti, R., Ashley, C., Chen, C.-H., Berghman, L.R., Mwangi, D., Dominowski, P.J., Foss, D.L., Rai, S., Vora, S., Gabbert, L., Burrage, T.G., Brake, D., Neilan, J., Mwangi, W., 2016. **Induction of Robust Immune Responses in Swine by Using a Cocktail of Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Antigens.** *Clin Vaccine Immunol* 23, 888–900. doi:10.1128/CVI.00395-16

Luo, R., Wang, T., Sun, M., Pan, L., Huang, S., Sun, Y., Qiu, H.-J., 2022. **The 24.5-kb Left Variable Region Is Not a Determinant for African Swine Fever Virus to Replicate in Primary Porcine Alveolar Macrophages.** *Viruses* 14, 2119. doi:10.3390/v14102119

Lv, L., Zhang, T., Jia, H., Zhang, Y., Ahsan, A., Zhao, X., Chen, T., Shen, Z., Shen, N., 2022. **Temporally integrated transcriptome analysis reveals ASFV pathology and host response dynamics.** *Front. Immunol.* 13, 995998. doi:10.3389/fimmu.2022.995998

Lv, T., Xie, X., Song, N., Zhang, S., Ding, Y., Liu, K., Diao, L., Chen, X., Jiang, S., Li, T., Zhang, W., Cao, Y., 2022. **Expounding the role of tick in Africa swine fever virus transmission and seeking effective prevention measures: A review.** *Front. Immunol.* 13, 1093599. doi:10.3389/fimmu.2022.1093599

Malogolovkin, A., Burmakina, G., Tulman, E.R., Delhon, G., Diel, D.G., Salnikov, N., Kutish, G.F., Kolbasov, D., Rock, D.L., 2015. **African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity.** *Journal of General Virology* 96, 866–873. doi:10.1099/jgv.0.000024

Malogolovkin, A., Kolbasov, D., 2019. **Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus.** *Virus Research* 271, 197673. doi:10.1016/j.virusres.2019.197673

Martin, L.R., Neal, Z.C., McBride, M.S., Palmenberg, A.C., 2000. **Mengovirus and Encephalomyocarditis Virus Poly(C) Tract Lengths Can Affect Virus Growth in Murine Cell Culture.** *J Virol* 74, 3074–3081. doi:10.1128/JVI.74.7.3074-3081.2000

Mazur-Panasiuk, N., Woźniakowski, G., Niemczuk, K., 2019. **The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland.** *Sci Rep* 9, 4556. doi:10.1038/s41598-018-36823-0

- McKercher, P.D., Hess, W.R., Hamdy, F., 1978. **Residual viruses in pork products.** *Appl Environ Microbiol* 35, 142–145. doi:10.1128/aem.35.1.142-145.1978
- Mellor, P.S., Kitching, R.P., Wilkinson, P.J., 1987. **Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*.** *Res Vet Sci* 43, 109–112.
- Meloni, D., Franzoni, G., Oggiano, A., 2022. **Cell Lines for the Development of African Swine Fever Virus Vaccine Candidates: An Update.** *Vaccines* 10, 707. doi:10.3390/vaccines10050707
- Monteagudo, P.L., Lacasta, A., López, E., Bosch, L., Collado, J., Pina-Pedrero, S., Correa-Fiz, F., Accensi, F., Navas, M.J., Vidal, E., Bustos, M.J., Rodríguez, J.M., Gallei, A., Nikolin, V., Salas, M.L., Rodríguez, F., 2017. **BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities.** *J Virol* 91, e01058-17. doi:10.1128/JVI.01058-17
- NÉBIH, 2023. URL <https://portal.nebih.gov.hu/hu/afrikai-sertespestis>
- Nefedeva, M., Titov, I., Tsybanov, S., Malogolovkin, A., 2020. **Recombination shapes African swine fever virus serotype-specific locus evolution.** *Sci Rep* 10, 18474. doi:10.1038/s41598-020-75377-y
- Neilan, J.G., Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T.G., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2004. **Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection.** *Virology* 319, 337–342. doi:10.1016/j.virol.2003.11.011
- Neilan, J.G., Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G.F., Afonso, C.L., Rock, D.L., 2002. **Novel Swine Virulence Determinant in the Left Variable Region of the African Swine Fever Virus Genome.** *J Virol* 76, 3095–3104. doi:10.1128/JVI.76.7.3095-3104.2002
- Netherton, C., Rouiller, I., Wileman, T., 2004a. **The Subcellular Distribution of Multigene Family 110 Proteins of African Swine Fever Virus Is Determined by Differences in C-Terminal KDEL Endoplasmic Reticulum Retention Motifs.** *J Virol* 78, 3710–3721. doi:10.1128/JVI.78.7.3710-3721.2004
- Netherton, C., Rouiller, I., Wileman, T., 2004b. **The Subcellular Distribution of Multigene Family 110 Proteins of African Swine Fever Virus Is Determined by Differences in C-Terminal KDEL Endoplasmic Reticulum Retention Motifs.** *J Virol* 78, 3710–3721. doi:10.1128/JVI.78.7.3710-3721.2004

Niederwerder, M.C., Dee, S., Diel, D.G., Stoian, A.M.M., Constance, L.A., Olcha, M., Petrovan, V., Patterson, G., Cino-Ozuna, A.G., Rowland, R.R.R., 2021. **Mitigating the risk of African swine fever virus in feed with anti-viral chemical additives.** *Transboundary Emerging Dis* 68, 477–486. doi:10.1111/tbed.13699

Nurmoja, I., Petrov, A., Breidenstein, C., Zani, L., Forth, J.H., Beer, M., Kristian, M., Viltrop, A., Blome, S., 2017. **Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar.** *Transbound Emerg Dis* 64, 2034–2041. doi:10.1111/tbed.12614

Nurmoja, Imbi, Schulz, K., Staubach, C., Sauter-Louis, C., Depner, K., Conraths, F.J., Viltrop, A., 2017. **Development of African swine fever epidemic among wild boar in Estonia - two different areas in the epidemiological focus.** *Sci Rep* 7, 12562. doi:10.1038/s41598-017-12952-w

O'Donnell, V., Holinka, L.G., Krug, P.W., Gladue, D.P., Carlson, J., Sanford, B., Alfano, M., Kramer, E., Lu, Z., Arzt, J., Reese, B., Carrillo, C., Risatti, G.R., Borca, M.V., 2015. **African Swine Fever Virus Georgia 2007 with a Deletion of Virulence-Associated Gene 9GL (B119L), when Administered at Low Doses, Leads to Virus Attenuation in Swine and Induces an Effective Protection against Homologous Challenge.** *J Virol* 89, 8556–8566. doi:10.1128/JVI.00969-15

O'Donnell, V., Risatti, G.R., Holinka, L.G., Krug, P.W., Carlson, J., Velazquez-Salinas, L., Azzinaro, P.A., Gladue, D.P., Borca, M.V., 2017. **Simultaneous Deletion of the 9GL and UK Genes from the African Swine Fever Virus Georgia 2007 Isolate Offers Increased Safety and Protection against Homologous Challenge.** *J Virol* 91, e01760-16. doi:10.1128/JVI.01760-16

OIE - World Organisation for Animal Health (Ed.), 2018. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 8th edition.** ed. OIE, Paris. Letöltés dátuma: 2018. 12. 15.

Olesen, A.S., Hansen, M.F., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., Bødker, R., Bøtner, A., 2018a. **Survival and localization of African swine fever virus in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) after feeding on viremic blood using a membrane feeder.** *Veterinary Microbiology* 222, 25–29. doi:10.1016/j.vetmic.2018.06.010

Olesen, A.S., Lohse, L., Dalgaard, M.D., Woźniakowski, G., Belsham, G.J., Bøtner, A., Rasmussen, T.B., 2018b. **Complete genome sequence of an African swine fever virus (ASFV POL/2015/Podlaskie) determined directly from pig erythrocyte-**

associated nucleic acid. Journal of Virological Methods 261, 14–16. doi:10.1016/j.jviromet.2018.07.015

Olesen, A.S., Lohse, L., Hansen, M.F., Boklund, A., Halasa, T., Belsham, G.J., Rasmussen, T.B., Bøtner, A., Bødker, R., 2018c. **Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*).** Transbound Emerg Dis 65, 1152–1157. doi:10.1111/tbed.12918

Oura, C.A.L., Denyer, M.S., Takamatsu, H., Parkhouse, R.M.E., 2005. **In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus.** Journal of General Virology 86, 2445–2450. doi:10.1099/vir.0.81038-0

Penza, V., Russell, S.J., Schulze, A.J., 2021. **The long-lasting enigma of polycytidine (polyC) tract.** PLoS Pathog 17, e1009739. doi:10.1371/journal.ppat.1009739

Pérez-Núñez, D., Castillo-Rosa, E., Vígara-Astillero, G., García-Belmonte, R., Gallardo, C., Revilla, Y., 2020. **Identification and Isolation of Two Different Subpopulations Within African Swine Fever Virus Arm/07 Stock.** Vaccines 8, 625. doi:10.3390/vaccines8040625

Pérez-Núñez, D., García-Urdiales, E., Martínez-Bonet, M., Nogal, M.L., Barroso, S., Revilla, Y., Madrid, R., 2015. **CD2v Interacts with Adaptor Protein AP-1 during African Swine Fever Infection.** PLoS ONE 10, e0123714. doi:10.1371/journal.pone.0123714

Petrovan, V., Rathakrishnan, A., Islam, M., Goatley, L.C., Moffat, K., Sanchez-Cordon, P.J., Reis, A.L., Dixon, L.K., 2022. **Role of African Swine Fever Virus Proteins EP153R and EP402R in Reducing Viral Persistence in Blood and Virulence in Pigs Infected with BeninΔDP148R.** J Virol 96, e01340-21. doi:10.1128/JVI.01340-21

Pietschmann, J., Guinat, C., Beer, M., Pronin, V., Tauscher, K., Petrov, A., Keil, G., Blome, S., 2015. **Course and transmission characteristics of oral low-dose infection of domestic pigs and European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate.** Arch Virol 160, 1657–1667. doi:10.1007/s00705-015-2430-2

Pires, S., Ribeiro, G., Costa, J.V., 1997. **Sequence and organization of the left multigene family 110 region of the Vero-adapted L60V strain of African swine fever virus.** Virus Genes 15, 271–274. doi:10.1023/A:1007992806818

Popescu, L., Gaudreault, N.N., Whitworth, K.M., Murgia, M.V., Nietfeld, J.C., Mileham, A., Samuel, M., Wells, K.D., Prather, R.S., Rowland, R.R.R., 2017. **Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine**

fever virus isolate, Georgia 2007/1. *Virology* 501, 102–106.
doi:10.1016/j.virol.2016.11.012

Qu, H., Ge, S., Zhang, Y., Wu, X., Wang, Z., 2022. **A systematic review of genotypes and serogroups of African swine fever virus.** *Virus Genes* 58, 77–87.
doi:10.1007/s11262-021-01879-0

Ramirez-Medina, E., Vuono, E., O'Donnell, V., Holinka, L.G., Silva, E., Rai, A., Pruitt, S., Carrillo, C., Gladue, D.P., Borca, M.V., 2019. **Differential Effect of the Deletion of African Swine Fever Virus Virulence-Associated Genes in the Induction of Attenuation of the Highly Virulent Georgia Strain.** *Viruses* 11, 599.
doi:10.3390/v11070599

Ramirez-Medina, E., Vuono, E., Pruitt, S., Rai, A., Silva, E., Espinoza, N., Zhu, J., Velazquez-Salinas, L., Borca, M.V., Gladue, D.P., 2021a. **Development and In Vivo Evaluation of a MGF110-1L Deletion Mutant in African Swine Fever Strain Georgia.** *Viruses* 13, 286. doi:10.3390/v13020286

Ramirez-Medina, E., Vuono, E., Pruitt, S., Rai, A., Silva, E., Espinoza, N., Zhu, J., Velazquez-Salinas, L., Borca, M.V., Gladue, D.P., 2021b. **Development and In Vivo Evaluation of a MGF110-1L Deletion Mutant in African Swine Fever Strain Georgia.** *Viruses* 13, 286. doi:10.3390/v13020286

Ramirez-Medina, E., Vuono, E., Silva, E., Rai, A., Valladares, A., Pruitt, S., Espinoza, N., Velazquez-Salinas, L., Borca, M.V., Gladue, D.P., 2022. **Evaluation of the Deletion of MGF110-5L-6L on Swine Virulence from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus and Use as a DIVA Marker in Vaccine Candidate ASFV-G-ΔI177L.** *J Virol* 96, e00597-22. doi:10.1128/jvi.00597-22

Ramirez-Medina, E., Vuono, E.A., Rai, A., Pruitt, S., Silva, E., Velazquez-Salinas, L., Zhu, J., Gladue, D.P., Borca, M.V., 2020. **Evaluation in Swine of a Recombinant African Swine Fever Virus Lacking the MGF-360-1L Gene.** *Viruses* 12, 1193.
doi:10.3390/v12101193

Ramírez-Medina, E., Vuono, E.A., Velazquez-Salinas, L., Silva, E., Rai, A., Pruitt, S., Berggren, K.A., Zhu, J., Borca, M.V., Gladue, D.P., 2020. **The MGF360-16R ORF of African Swine Fever Virus Strain Georgia Encodes for a Nonessential Gene That Interacts with Host Proteins SERTAD3 and SDCBP.** *Viruses* 12, 60.
doi:10.3390/v12010060

Rathakrishnan, A., Connell, S., Petrovan, V., Moffat, K., Goatley, L.C., Jabbar, T., Sánchez-Cordón, P.J., Reis, A.L., Dixon, L.K., 2022. **Differential Effect of Deleting**

Members of African Swine Fever Virus Multigene Families 360 and 505 from the Genotype II Georgia 2007/1 Isolate on Virus Replication, Virulence, and Induction of Protection. *J Virol* 96, e01899-21. doi:10.1128/jvi.01899-21

Rock, D.L., 2017. **Challenges for African swine fever vaccine development—“... perhaps the end of the beginning.”** *Veterinary Microbiology* 206, 52–58. doi:10.1016/j.vetmic.2016.10.003

Rodríguez, I., Redrejo-Rodríguez, M., Rodríguez, J.M., Alejo, A., Salas, J., Salas, M.L., 2006. **African Swine Fever Virus pB119L Protein Is a Flavin Adenine Dinucleotide-Linked Sulfhydryl Oxidase.** *J Virol* 80, 3157–3166. doi:10.1128/JVI.80.7.3157-3166.2006

Rodríguez, J.M., Moreno, L.T., Alejo, A., Lacasta, A., Rodríguez, F., Salas, M.L., 2015. **Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the Virulent Parental Strain of the Nonpathogenic and Tissue-Culture Adapted BA71V.** *PLoS ONE* 10, e0142889. doi:10.1371/journal.pone.0142889

Rodríguez, J.M., Yáñez, R.J., Almazán, F., Viñuela, E., Rodríguez, J.F., 1993. **African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells.** *J Virol* 67, 5312–5320. doi:10.1128/jvi.67.9.5312-5320.1993

Rojo, G., García-Beato, R., Viñuela, E., Salas, M.L., Salas, J., 1999. **Replication of African Swine Fever Virus DNA in Infected Cells.** *Virology* 257, 524–536. doi:10.1006/viro.1999.9704

Rouiller, I., Brookes, S.M., Hyatt, A.D., Windsor, M., Wileman, T., 1998. **African Swine Fever Virus Is Wrapped by the Endoplasmic Reticulum.** *J Virol* 72, 2373–2387. doi:10.1128/JVI.72.3.2373-2387.1998

Rowlands, R.J., Duarte, M.M., Boinas, F., Hutchings, G., Dixon, L.K., 2009. **The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*.** *Virology* 393, 319–328. doi:10.1016/j.virol.2009.07.040

Ruiz Gonzalvo, F., Caballero, C., Martínez, J., Carnero, M.E., 1986. **Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs.** *Am J Vet Res* 47, 1858–1862.

Salas, M.L., Andrés, G., 2013. **African swine fever virus morphogenesis.** *Virus Research* 173, 29–41. doi:10.1016/j.virusres.2012.09.016

Salguero, F.J., 2020. **Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine.** *Front. Vet. Sci.* 7, 282. doi:10.3389/fvets.2020.00282

Salguero, F.J., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M.J., Sánchez-Cordón, P.J., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C., 2002. **Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90, 11–22. doi:10.1016/S0165-2427(02)00225-8

Sánchez-Torres, C., Gómez-Puertas, P., Gómez-del-Moral, M., Alonso, F., Escribano, J.M., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2003. **Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection.** *Archives of Virology* 148, 2307–2323. doi:10.1007/s00705-003-0188-4

Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J.C., Carrasco, L., 2015. **An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever.** *Journal of Comparative Pathology* 152, 9–21. doi:10.1016/j.jcpa.2014.09.003

Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Martínez-López, B., 2012. **African Swine Fever: An Epidemiological Update: African Swine Fever: An Epidemiological Update.** *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 27–35. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01293.x

Sanford, B., Holinka, L.G., O'Donnell, V., Krug, P.W., Carlson, J., Alfano, M., Carrillo, C., Wu, P., Lowe, A., Risatti, G.R., Gladue, D.P., Borca, M.V., 2016. **Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus.** *Virus Research* 213, 165–171. doi:10.1016/j.virusres.2015.12.002

Sauter-Louis, C., Conraths, F.J., Probst, C., Blohm, U., Schulz, K., Sehl, J., Fischer, M., Forth, J.H., Zani, L., Depner, K., Mettenleiter, T.C., Beer, M., Blome, S., 2021. **African Swine Fever in Wild Boar in Europe—A Review.** *Viruses* 13, 1717. doi:10.3390/v13091717

Schlafer, D.H., Mebus, C.A., McVicar, J.W., 1984. **African swine fever in neonatal pigs: passively acquired protection from colostrum or serum of recovered pigs.** *Am J Vet Res* 45, 1367–1372.

Silva, E.B., Krug, P.W., Ramirez-Medina, E., Valladares, A., Rai, A., Espinoza, N., Gladue, D.P., Borca, M.V., 2022. **The Presence of Virus Neutralizing Antibodies Is Highly Associated with Protection against Virulent Challenge in Domestic Pigs Immunized with ASFV live Attenuated Vaccine Candidates.** *Pathogens* 11, 1311. doi:10.3390/pathogens11111311

- Songkasupa, T., Boonpornprasert, P., Suwankitwat, N., Lohlamoh, W., Nuengjamnong, C., Nuanualsuwan, S., 2022. **Thermal inactivation of African swine fever virus in feed ingredients.** *Sci Rep* 12, 15998. doi:10.1038/s41598-022-20290-9
- Suárez, C., Gutiérrez-Berzal, J., Andrés, G., Salas, M.L., Rodríguez, J.M., 2010a. **African Swine Fever Virus Protein p17 Is Essential for the Progression of Viral Membrane Precursors toward Icosahedral Intermediates.** *J Virol* 84, 7484–7499. doi:10.1128/JVI.00600-10
- Suárez, C., Salas, M.L., Rodríguez, J.M., 2010b. **African Swine Fever Virus Polyprotein pp62 Is Essential for Viral Core Development.** *J Virol* 84, 176–187. doi:10.1128/JVI.01858-09
- Sun, E., Zhang, Z., Wang, Z., He, X., Zhang, X., Wang, L., Wang, W., Huang, L., Xi, F., Huangfu, H., Tsegay, G., Huo, H., Sun, J., Tian, Z., Xia, W., Yu, X., Li, F., Liu, R., Guan, Y., Zhao, D., Bu, Z., 2021. **Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020.** *Sci. China Life Sci.* 64, 752–765. doi:10.1007/s11427-021-1904-4
- Tabarés, E., Olivares, I., Santurde, G., Garcia, M.J., Martin, E., Carnero, M.E., 1987. **African swine fever virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells.** *Archives of Virology* 97, 333–346. doi:10.1007/BF01314431
- Tan, B.G., Wellesley, F.C., Savery, N.J., Szczelkun, M.D., 2016. **Length heterogeneity at conserved sequence block 2 in human mitochondrial DNA acts as a rheostat for RNA polymerase POLRMT activity.** *Nucleic Acids Res* 44, 7817–7829. doi:10.1093/nar/gkw648
- Turlewicz-Podbielska, H., Kuriga, A., Niemyjski, R., Tarasiuk, G., Pomorska-Mól, M., 2021. **African Swine Fever Virus as a Difficult Opponent in the Fight for a Vaccine—Current Data.** *Viruses* 13, 1212. doi:10.3390/v13071212
- Upton, C., 2020. **Multigene Families in African Swine Fever Virus.** [WWW Document]. <https://4virology.net/organisms/dsdna-viruses/asfarviridae/mgf-110/>.
- Urbano, A.C., Ferreira, F., 2022. **African swine fever control and prevention: an update on vaccine development.** *Emerging Microbes & Infections* 11, 2021–2033. doi:10.1080/22221751.2022.2108342
- Urbano, A.C., Ferreira, F., 2020. **Role of the DNA-Binding Protein pA104R in ASFV Genome Packaging and as a Novel Target for Vaccine and Drug Development.** *Vaccines* 8, 585. doi:10.3390/vaccines8040585

- Valdeira, M.L., Geraldés, A., 1985. **Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells.** *Biology of the Cell* 55, 35–40. doi:10.1111/j.1768-322X.1985.tb00407.x
- Vega, I.D.L., Viñuela, E., Blasco, R., 1990. **Genetic variation and multigene families in african swine fever virus.** *Virology* 179, 234–246. doi:10.1016/0042-6822(90)90293-Z
- Vietnamplus.vn, 2023. URL <https://en.vietnamplus.vn/tags/efficacy-rate.vnp>, Letöltés dátuma: 2023.10.09.
- Virotype ASFV, 2019. URL <https://shop.indical.com/en/virotype-asfv-2-0-pcr-kit-96-reactions.html>, Letöltés dátuma: 2019.03.01.
- Vuono, E.A., Ramirez-Medina, E., Pruitt, S., Rai, A., Espinoza, N., Silva, E., Velazquez-Salinas, L., Gladue, D.P., Borca, M.V., 2022. **Deletion of the ASFV dUTPase Gene E165R from the Genome of Highly Virulent African Swine Fever Virus Georgia 2010 Does Not Affect Virus Replication or Virulence in Domestic Pigs.** *Viruses* 14, 1409. doi:10.3390/v14071409
- Vydelingum, S., Baylis, S.A., Bristow, C., Smith, G.L., Dixon, L.K., 1993. **Duplicated genes within the variable right end of the genome of a pathogenic isolate of African swine fever virus.** *Journal of General Virology* 74, 2125–2130. doi:10.1099/0022-1317-74-10-2125
- Wang, G., Xie, M., Wu, W., Chen, Z., 2021. **Structures and Functional Diversities of ASFV Proteins.** *Viruses* 13, 2124. doi:10.3390/v13112124
- Wang, N., Zhao, D., Wang, Jialing, Zhang, Y., Wang, M., Gao, Y., Li, F., Wang, Jingfei, Bu, Z., Rao, Z., Wang, X., 2019. **Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly.** *Science* 366, 640–644. doi:10.1126/science.aaz1439
- Wang, T., Wang, L., Han, Y., Pan, L., Yang, J., Sun, M., Zhou, P., Sun, Y., Bi, Y., Qiu, H., 2021. **Adaptation of African swine fever virus to HEK293T cells.** *Transbound. Emerg. Dis.* 68, 2853–2866. doi:10.1111/tbed.14242
- Wang, Y., Cui, S., Xin, T., Wang, X., Yu, H., Chen, S., Jiang, Yajun, Gao, X., Jiang, Yitong, Guo, X., Jia, H., Zhu, H., 2022. **African Swine Fever Virus MGF360-14L Negatively Regulates Type I Interferon Signaling by Targeting IRF3.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 818969. doi:10.3389/fcimb.2021.818969

Wang, Z., Ai, Q., Huang, S., Ou, Y., Gao, Y., Tong, T., Fan, H., 2022. **Immune Escape Mechanism and Vaccine Research Progress of African Swine Fever Virus.** *Vaccines* 10, 344. doi:10.3390/vaccines10030344

Wen, X., He, X., Zhang, Xiang, Zhang, Xianfeng, Liu, L., Guan, Y., Zhang, Y., Bu, Z., 2019. **Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of African swine fever virus in China in 2018.** *Emerging Microbes & Infections* 8, 303–306. doi:10.1080/22221751.2019.1565915

WOAH, 2023. **Situation reports for African swine fever.** URL <https://www.woah.org/app/uploads/2023/05/asf-report33-002.pdf>, Letöltés dátuma: 2023.04.29.

WOAH, **Situation reports for African swine fever, 2023.** URL <https://www.woah.org/app/uploads/2023/08/asf-report39.pdf>, Letöltés dátuma: 2023.08.03.

WOAH **Vietnam report, 2022.** URL <https://rr-asia.woah.org/wp-content/uploads/2022/12/5-f-viet-nam-asf-country-report.pdf>, Letöltés dátuma: 2022.12.12.

Wu, K., Liu, J., Wang, L., Fan, S., Li, Z., Li, Y., Yi, L., Ding, H., Zhao, M., Chen, J., 2020. **Current State of Global African Swine Fever Vaccine Development under the Prevalence and Transmission of ASF in China.** *Vaccines* 8, 531. doi:10.3390/vaccines8030531

Xie, Z., Liu, Y., Di, D., Liu, J., Gong, L., Chen, Z., Li, Y., Yu, W., Lv, L., Zhong, Q., Song, Y., Liao, X., Song, Q., Wang, H., Chen, H., 2022. **Protection Evaluation of a Five-Gene-Deleted African Swine Fever Virus Vaccine Candidate Against Homologous Challenge.** *Front. Microbiol.* 13, 902932. doi:10.3389/fmicb.2022.902932

Yáñez, R.J., Rodríguez, J.M., Nogal, M.L., Yuste, L., Enríquez, C., Rodríguez, J.F., Viñuela, E., 1995. **Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of African Swine Fever Virus.** *Virology* 208, 249–278. doi:10.1006/viro.1995.1149

Yang, B., Shen, C., Zhang, D., Zhang, T., Shi, X., Yang, J., Hao, Y., Zhao, D., Cui, H., Yuan, X., Chen, X., Zhang, K., Zheng, H., Liu, X., 2021. **Mechanism of interaction between virus and host is inferred from the changes of gene expression in macrophages infected with African swine fever virus CN/GS/2018 strain.** *Virol J* 18, 170. doi:10.1186/s12985-021-01637-6

- Yang, S., Miao, C., Liu, W., Zhang, G., Shao, J., Chang, H., 2023. **Structure and function of African swine fever virus proteins: Current understanding.** *Front. Microbiol.* 14, 1043129. doi:10.3389/fmicb.2023.1043129
- Yozawa, T., Kutish, G.F., Afonso, C.L., Lu, Z., Rock, D.L., 1994. **Two Novel Multigene Families, 530 and 300, in the Terminal Variable Regions of African Swine Fever Virus Genome.** *Virology* 202, 997–1002. doi:10.1006/viro.1994.1426
- Zani, L., Forth, J.H., Forth, L., Nurmoja, I., Leidenberger, S., Henke, J., Carlson, J., Breidenstein, C., Viltrop, A., Höper, D., Sauter-Louis, C., Beer, M., Blome, S., 2018. **Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype.** *Sci Rep* 8, 6510. doi:10.1038/s41598-018-24740-1
- Zhang, J., Zhang, Y., Chen, T., Yang, Jinjin, Yue, H., Wang, L., Zhou, X., Qi, Y., Han, X., Ke, J., Wang, S., Yang, Jinmei, Miao, F., Zhang, S., Zhang, F., Wang, Y., Li, M., Hu, R., 2021. **Deletion of the L7L-L11L Genes Attenuates ASFV and Induces Protection against Homologous Challenge.** *Viruses* 13, 255. doi:10.3390/v13020255
- Zhang, X., Wang, Zhenzhong, Ge, S., Zuo, Y., Lu, H., Lv, Y., Han, N., Cai, Y., Wu, X., Wang, Zhiliang, 2023. **Attenuated African swine fever virus through serial passaging of viruses in cell culture: a brief review on the knowledge gathered during 60 years of research.** *Virus Genes* 59, 13–24. doi:10.1007/s11262-022-01939-z
- Zhang, Y., Ke, J., Zhang, J., Yang, Jinjin, Yue, H., Zhou, X., Qi, Y., Zhu, R., Miao, F., Li, Q., Zhang, F., Wang, Y., Han, X., Mi, L., Yang, Jinmei, Zhang, S., Chen, T., Hu, R., 2021. **African Swine Fever Virus Bearing an I226R Gene Deletion Elicits Robust Immunity in Pigs to African Swine Fever.** *J Virol* 95, e01199-21. doi:10.1128/JVI.01199-21
- Zhao, D., Liu, R., Zhang, X., Li, F., Wang, J., Zhang, Jiwen, Liu, X., Wang, L., Zhang, Jiaoer, Wu, X., Guan, Y., Chen, W., Wang, X., He, X., Bu, Z., 2019. **Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China.** *Emerging Microbes & Infections* 8, 438–447. doi:10.1080/22221751.2019.1590128
- Zhao, D., Sun, E., Huang, L., Ding, L., Zhu, Y., Zhang, J., Shen, D., Zhang, X., Zhang, Z., Ren, T., Wang, W., Li, F., He, X., Bu, Z., 2023. **Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs.** *Nat Commun* 14, 3096. doi:10.1038/s41467-023-38868-w
- Zhao, Y., O'Neil, N.J., Rose, A.M., 2007. **Poly-G/poly-C tracts in the genomes of *Caenorhabditis*.** *BMC Genomics* 8, 403. doi:10.1186/1471-2164-8-403
- Zhenzhong, W., Chuanxiang, Q., Shengqiang, G., Jinming, L., Yongxin, H., Xiaoyue, Z., Yan, L., Najun, H., Xiaodong, W., Zhiliang, W., Yingjuan, Q., 2022. **Genetic variation**

and evolution of attenuated African swine fever virus strain isolated in the field.

Virus Research 319, 198874. doi:10.1016/j.virusres.2022.198874

Zhong, H., Fan, S., Du, Y., Zhang, Y., Zhang, A., Jiang, D., Han, S., Wan, B., Zhang, G., 2022. **African Swine Fever Virus MGF110-7L Induces Host Cell Translation Suppression and Stress Granule Formation by Activating the PERK/PKR-eIF2 α Pathway.** Microbiol Spectr 10, e03282-22. doi:10.1128/spectrum.03282-22

Zhou, P., Li, L.-F., Zhang, K., Wang, B., Tang, L., Li, M., Wang, T., Sun, Y., Li, S., Qiu, H.-J., 2022. **Deletion of the *H240R* Gene of African Swine Fever Virus Decreases Infectious Progeny Virus Production Due to Aberrant Virion Morphogenesis and Enhances Inflammatory Cytokine Expression in Porcine Macrophages.** J Virol 96, e01667-21. doi:10.1128/jvi.01667-21

Zhu, J.J., 2022. **African Swine Fever Vaccinology: The Biological Challenges from Immunological Perspectives.** Viruses 14, 2021. doi:10.3390/v14092021

Zhu, Z., Chen, H., Liu, L., Cao, Y., Jiang, T., Zou, Y., Peng, Y., 2021. **Classification and characterization of multigene family proteins of African swine fever viruses.** Briefings in Bioinformatics 22, bbaa380. doi:10.1093/bib/bbaa380

Zhu, Z., Xiao, C.-T., Fan, Y., Cai, Z., Lu, C., Zhang, G., Jiang, T., Tan, Y., Peng, Y., 2019. **Homologous recombination shapes the genetic diversity of African swine fever viruses.** Veterinary Microbiology 236, 108380. doi:10.1016/j.vetmic.2019.08.003

Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T.G., Neilan, J.G., Kutish, G.F., Moore, D.M., Rock, D.L., 2001. **African Swine Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Are Novel Macrophage Host Range Determinants.** J Virol 75, 3066–3076. doi:10.1128/JVI.75.7.3066-3076.2001

11. Közlemények listája

11.1. A doktori kutatás eredményeiből született, lektorált, impakt faktoralal bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Mészáros I, Olasz F, Tamás V, Bálint Á, Zádori Z. **Az Afrikai Sertéspestis Vírusának Biológiája - Irodalmi összefoglaló.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2019, 144./55-62.

Olasz F, Mészáros I, Tamás V, Bálint Á, Bruczynska M, Wozniakowski G, Zádori Z. **Az Afrikai Sertéspestis járványtana és a védekezés lehetőségei.** Magyar Állatorvosok Lapja. 2019, 141./101-115.

Olasz F, Mészáros I, Marton S, Kaján GL, Tamás V, Locsmándi G, Magyar T, Bálint Á, Bányai K, Zádori Z. **A Simple Method for Sample Preparation to Facilitate Efficient Whole-Genome Sequencing of African Swine Fever Virus.** Viruses. 2019 Dec 6;11(12):1129. doi: 10.3390/v11121129.

Tamás V, Righi C, Mészáros I, D'Errico F, Olasz F, Casciari C, Zádori Z, Magyar T, Petrini S, Feliziani F. **Involvement of the MGF 110-11L Gene in the African Swine Fever Replication and Virulence.** Vaccines, 2023 Apr 14;11(4):846. doi: 10.3390/vaccines11040846.

Franzoni G, Petrini S, Mészáros I, Dei Giudici S, Righi C, Olasz F, Zinellu S, Tamás V, Pela M, Gallardo C, Zádori Z, Oggiano A, Feliziani F. **Evaluation of Haematological and Immunological Parameters of the ASFV Lv17/WB/Rie1 Strain and its Derived Mutant Lv17/WB/Rie1/d110-11L against ASFV Challenge Infection in Domestic Pigs.** Vaccines. 2023; 11(7):1277. doi.org/10.3390/vaccines11071277.

Petrini S, Righi C, Mészáros I, d'Errico F, Tamás V, Pela M, Olasz F, Gallardo C, Fernandez-Pinero J, Göttl E, Magyar T, Feliziani F, Zádori Z. **The production of recombinant ASFV Lv17/WB/Rie1 strains and their characterizations as vaccine candidates.** Vaccines. 2023, 11(12): 1860. doi:10.3390/vaccines11121860

11.2. A doktori disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk

Olasz F, Tombácz D, Torma G, Csabai Z, Moldován N, Dörmő Á, Prazsák I, Mészáros I, Magyar T, Tamás V, Zádori Z, Boldogkői Z. **Short and Long-Read Sequencing Survey of the Dynamic Transcriptomes of African Swine Fever Virus and the Host Cells.** Front Genet. 2020 Jul 28;11:758. doi: 10.3389/fgene.2020.00758.

Kiss I, Szigeti K, Homonnay ZG, Tamás V, Smits H, Krejci R. **Maternally Derived Antibody Levels Influence on Vaccine Protection against PCV2d Challenge.** Animals (Basel). 2021 Jul 29;11(8):2231. doi: 10.3390/ani11082231.

Tombácz D, Kakuk B, Torma G, Csabai Z, Gulyás G, Tamás V, Zádori Z, Jefferson VA, Meyer F, Boldogkői Z. **In-Depth Temporal Transcriptome Profiling of an Alphaherpesvirus Using Nanopore Sequencing.** Viruses. 2022 Jun 13;14(6):1289. doi: 10.3390/v14061289.

Tamás V, Mészáros I, Olasz F, Kiss I, Homonnay ZG, Mortensen P, Zádori Z. **Allele-Specific Dual PCRs to Identify Members of the 27a Cluster of PPV.** Viruses. 2022 Jul 8;14(7):1500. doi: 10.3390/v14071500.

11.3. Konferencia összefoglalók

Tamás V, Mészáros I, Bálint Á, Szűcs G, Zádori Z. **Új adeno-asszociált vírusok azonosítása sertésekből génterápiás alkalmazásokhoz.** Állatorvos-tudományi Akadémiai beszámolók, Budapest 2019.01.22.

Tamás V, Olasz F, Mészáros I, Ursu K, Zádori Z. **Az afrikai sertéspestis vírus policitozin és poliguanin szakaszainak vizsgálata.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2020.01.21.

Tamás V, Mészáros I, Olasz F, Hornyák Á, Kiss I, Zádori Z. **Az afrikai sertéspestis vírus vizsgálata sertés pulmonáris makrofágokon.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2020.01.21.

Mészáros I, Tamás V, Olasz F, Hornyák Á, Kiss I, Zádori Z. **A sertés parvovírus 27a törzs fertőzőképességének vizsgálata sertés here és sertés vese eredetű sejtvonalakon.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2020.01.21.

Tamás V, Olasz F, Mészáros I, Zádori Z. **Az afrikai sertéspestis vírus nagy variabilitást mutató poliC/G régióinak tanulmányozása.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2021. 01. 27.

Olasz F, Mészáros I, Tamás V, Bálint Á, Zádori Z. **Afrikai sertéspestis vírus (ASPV) genetikai módosítása.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2021. 01. 27.

Mészáros I, Tamás V, Olasz F, Varga R, Kiss I, Zádori Z. **A sertés parvovírus 27A törzsének szerológiai vizsgálata vírusneutralizációs kísérletekkel.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2021. 01. 27.

Tamás V, Olasz F, Mészáros I, Kiss I, Homonnya G. Z, Zádori Z. **Development of allele-specific dual PCRs to identify members of the 27a cluster of PPV1.** XVIII International Parvovirus Workshop, Rimini, Italy, 2022. 06. 14-17.

Mészáros I, Tamás V, Olasz F, Zádori Z. **Serological and *in silico* comparasion of 27a viruses with other PPVs.** ESVV2022, Congress for Veterinary Virology Workshop, Ghent, Belgium, 2022. 09. 20-23.

Mészáros I, Olasz F, Tamás V, Magyar T, Zádori Z. **High *in vitro* ASFV recombination rate in porcine alveolar macrophages.** ESVV2022, Congress for Veterinary Virology Workshop, Ghent, Belgium, 2022. 09. 20-23.

Olasz F, Mészáros I, Tamás V, Trembácz N, Göltl E, Bálint Á, Zádori Z. **Influenza hemagglutinin antigének kifejezése *Escherichia coli* külső membránjában.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2023. 01. 30.

Mészáros I, Tamás V, Olasz F, Rapcsák F, Göltl E, Oláh B, Szmolka A, Erdélyi K, Magyar T, Zádori Z. **Rekombináns marker fehérjét kifejező *Escherichia coli* törzsek szukcesszív mennyiségi változásai SPF csirkék bélfloájában.** Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2023. 01. 30.

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Zádori Zoltánnak, hogy lehetőséget biztosított kutatásaimhoz. Köszönöm értékes javaslatait és szakmai támogatását, amelyek alapvetően hozzájárultak a munkám megfelelő minőségben történő elvégzéséhez, illetve disszertáció és a tudományos publikációk megszületéséhez. Köszönöm Dr. Bálint Ádámnak a rendelkezésünkre bocsátott mintákat. Köszönettel tartozom a HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet Új Kórokozók Csoport tagjainak a szekvenálásban nyújtott segítségért és a Légzőszervi Bakteriológia Csoport tagjainak a PAM-ok izolálását.

Köszönöm továbbá a HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet Funkcionális Virologia Témacsoport tagjainak (Dr. Mészáros István, Dr. Olasz Ferenc), hogy hasznos tanácsokkal láttak el munkám során, és kérdéseimmel bármikor hozzájuk fordulhattam.

Köszönettel tartozom barátaimnak, akik türelmesek voltak hozzám amikor ideges voltam, és akiknek mindig volt hozzám egy-két jó szavuk. Külön köszönöm Csizovszky Ferencnek, hogy mindig jókedvre derített amikor szükség volt rá, és mellettem állt a nehéz időszakokban.

Végül pedig szeretném megköszönni a családomnak, hogy tanulmányaim alatt támogattak. Külön köszönöm Édesapámnak, aki sajnos már nem lehet közöttünk, hogy megtanított arra, hogy kitartással bármilyen cél megvalósítható.

A munka anyagi háttérét a VACDIVA és a KDP pályázatok biztosították.

13. Mellékletek

1. melléklet – Különböző ASPV törzsek primer sejteken történő passzálásakor bekövetkező változások összefoglalása

Szülői vírus		Primer sejtvonala	Passzázsszám	A virulencia értékelés	
Törzs	Virulencia			Biztonságosság	Védelem
Lisbon 60	virulens	PBMC	89	/	/
Portuguese 1455	virulens	PBMC	70	attenuált	+
Hinde	virulens	PPK	9	/	/
Spencer	virulens	PPK	44	attenuált	+
Portuguese	virulens	PPK	34	attenuált	+
Gasson	virulens	PPK	23	attenuált	-
Hinde WH II	virulens	BC	60	attenuált	+ (40–59%)
Ugandan	virulens	BC	65	attenuált	+
CV	virulens	PL and PBMC	44	túlattenuált	-
Congo K49	virulens	PBMC	262	attenuált	+
France F-32	virulens	PBMC	135	attenuált	-
Lisbon-57	virulens	PBMC and PL	/	attenuált	+ (50–70%)
Katanga-78	virulens	PBMC	/	attenuált	+ (50–80%)
Congo-49	virulens	PBMC	/	attenuált	+ (75%)
Mozambique-78	virulens	PBMC	/	attenuált	+ (90%)
France-32	virulens	PBMC	/	attenuált	+
Rhodesia	virulens	PBMC and PL	/	attenuált	+

/ : ismeretlen; +: védelmet nyújtott; -: nem nyújtott védelmet

2. melléklet – Különböző ASPV törzsek sejtkultúrákon történő passzálásakor bekövetkező változások összefoglalása

Szülői vírus		Sejtkultúra	Passzázsszám	A virulencia értékelés	
Törzs	Virulencia			Biztonságosság	Védelem
L'60BM89	attenuált	Vero	15	/	/
Hinde	virulens	PK-2a	104	attenuált	/
Tengani	virulens	BHK21	137	/	/
BA71	virulens	Vero	100	attenuált	/
E75	virulens	CV-1	4	attenuált	+ (100%)
ASFV-G	virulens	Vero	110	túlattenuált	-
E70	virulens	MS	44	attenuált	/
Tengani	virulens	Vero	27	attenuált	+
Stavropol	virulens	A4C2/9k	33	attenuált	-
Stavropol	virulens	CV-1	20	túlattenuált	-
Stavropol	virulens	PSGK-60	20	deattenuált	-
TSP-80	virulens	PPK-66b/17, CV, and PBMC	/	attenuált	+ (80–100 %)
TS-7	virulens	PBMC and PPK- 66b	/	attenuált	+
Uganda	virulens	PBMC and PPK- 66b	50	attenuált	+
ASFV-HLJ/18	virulens	HEK293T	121	/	/
Odintsovo 02/14	virulens	CV-1	30	attenuált	+
Odintsovo 02/14	virulens	CV-1	50	attenuált	/
OURT88/3	természetesen attenuált	ZMAC-4	12	/	+ (100%)
Lv17/WB/Rie1	természetesen attenuált	Cos7, PAM	14	deattenuált	-

/ : ismeretlen; +: védelmet nyújtott; -: nem nyújtott védelmet

3. melléklet – Az MGF fehérjék összefoglalása különböző ASPV törzsekben

	Szülői törzs	Adaptált törzs	Szülői törzs	Adaptált törzs					Szülői törzs	Adaptált törzs			Szülői törzs	Adaptált törzs		
				ASFV-G-VP30	ASFV-G-VP60	ASFV-G-VP80	ASFV-G-VP110	ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR		Pig/HU/2018	ASFV-P31	ASFV-P61		ASFV-P101	Lv17 cos8	Lv17_d24
MGF 100	1L	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	1R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	2L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3L	+	+	Cs	Cs	Cs	+	+	Cs	Cs	Cs	+	+	+	+	+
MGF 110	1L	+	+	Cs	Cs	Cs	+	+	Cs	Cs	+	+	Cs	Cs	-	-
	2L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	3L	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	5L	+	+	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	-	-
	6L	+	+	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	-	-
	7L	Cs	Cs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	8L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9L	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	11L	F	F	Cs	Cs	Cs	+	+	Cs	Cs	+	+	+	+	-	-
	12L	F	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	13L	F	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	14L	F	F	F	F	F	+	+	F	F	F	F	F	F	-	-
	MGF 300	1L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2R		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4L		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1L		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MGF 360	2L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	4L	F	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	5L	F	F	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Cs: csonka, F: fuzionált

	Szülői törzs	Adaptált törzs	Szülői törzs	Adaptált törzs					Szülői törzs	Adaptált törzs			Szülői törzs	Adaptált törzs			
				ASFV-G-VP30	ASFV-G-VP60	ASFV-G-VP80	ASFV-G-VP110	ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR		Pig/HLJ/2018	ASFV-P31	ASFV-P61		ASFV-P101	LV17	LV17_cos8	LV17_d24
MGF 360	6L	F	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	
	8L	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	
	9L	+	Cs	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	
	10L	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	
	11L	+	-	+	+	+	+	F	+	+	-	+	+	-	-	+	
	12L	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
	13L	+	-	+	+	Cs	Cs	Cs	+	+	+	+	+	-	-	+	
	14L	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
	15R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	16R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	18R	+	Cs	+	Cs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
21R	Cs	Cs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
22R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MGF 505	1R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
	2R	+	Cs	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	3R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	4R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	5R	+	+	+	+	-	Cs	Cs	+	+	+	+	+	+	+	+	
	6R	F	F	+	+	Cs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	7R	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	9R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	10R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	11L	+	+	+	Cs	Cs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Cs: csonka, F: fúzionált