**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**ÚJGENERÁCIÓS SZEKVENÁLÁS ALKALMAZÁSA A HAZAI PRRSV FERTŐZÉSEK GENOMI EPIDEMIOLÓGIÁJÁBAN**

Jakab Szilvia

Témavezetők: Dr. Bálint Ádám és Dr. Bányai Krisztián

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

2024

Témavezetők:

…………………………………

Dr. Bányai Krisztián

HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet

…………………………………

Dr. Bálint Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

…………………………………..

Jakab Szilvia

**Tartalomjegyzék**

[Bevezetés 4](#_Toc165618632)

[Célkitűzések 5](#_Toc165618633)

[Anyagok és módszerek 6](#_Toc165618634)

[Eredmények és megbeszélés 8](#_Toc165618635)

[Új tudományos eredmények 14](#_Toc165618636)

[Publikációs lista 15](#_Toc165618637)

[Köszönetnyilvánítás 17](#_Toc165618638)

# Bevezetés

A *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjába tartozó sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának (PRRS) vírusai (PRRSV-1 és PRRSV-2) világszerte elterjedtek és jelentős gazdasági károkat okoznak a sertéstartók számára. A megbetegedés súlyos légzőszervi tüneteket, valamint kocákban magzatkárosodással társuló reprodukciós zavarokat okoz.

Hazánkban a PRRSV-1 endemikus, míg a PRRSV-2 sporadikusan fordul elő. A hazai PRRSV-1-törzsek nagy genetikai diverzitással rendelkeznek, amely nagyrészt a sertésállományok importjához köthető. A PRRSV-2-törzsek elsősorban egy, a hazánkban nem, viszont egyes európai országokban engedélyezett MLV vakcinatörzs leszármazottjai. A 2014-ben indult PRRS-mentesítési program eredményeképp 2022 tavaszára az ország sertésállománya mentes lett a vadtípusú PRRSV-törzsektől.

A PRRSV a legváltozékonyabb vírusok közé tartozik. RNS vírus lévén a magas hibaarányú replikáció következtében a víruspopulációra jellemző a gazdaszervezeten belüli nagy genetikai diverzitás (kvázispecies). A keringő PRRSV-törzsek eltérő virulenciája és antigénszerkezete egyaránt megnehezíti a vakcinák, illetve a diagnosztikai módszerek alkalmazását és fejlesztését.

A GP5 burokfehérjét kódoló ORF5 régió az egyik legváltozatosabb szakasza a genomnak, és mind a mai napig ennek szekvenciavizsgálatával végzik a vírustörzsek klasszifikációját és követik nyomon a molekuláris epidemiológiáját, amelyek támogatják a PRRS elleni védekezést.

Habár a DNS bázissorrendjének meghatározásához a legelterjedtebb módszer a PCR-termékek Sanger-féle szekvenálása, napjainkban a nagykihozatalú újgenerációs szekvenálási technikák (NGS) rohamos fejlődése ahhoz vezetett, hogy állatorvosi vonatkozásban egyre gyakrabban alkalmazzák egyes vírustörzsek célzott genomi régióinak (amplikon-mélyszekvenálás) vagy teljes genomszekvenciájának megismerésére.

Kutatómunkánk során arra törekedtünk, hogy alkalmazzuk, illetve bővítsük a PRRSV molekuláris genetikai vizsgálatait támogató NGS‑módszereket. Továbbá, ORF5 szekvenciaadatok elemzésével feltártuk a hazai PRRSV-törzsek eredetét, elterjedését és genetikai változatosságát.

# Célkitűzések

Tanulmányunk során a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. A PRRSV-1- és PRRSV-2-törzsek hazai előfordulásának és diverzitásának meghatározása.
2. A PRRSV-2 szerkezeti régiójának vizsgálata hagyományos könyvtárkészítő módszer felhasználásával.
3. A kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés és az amplikon-mélyszekvenálás adaptálása és optimalizálása a PRRSV egy-egy adott célrégiójára (ORF5 és ORF7) és teljes genomjára.
4. Az amplikon-mélyszekvenálás lehetséges diagnosztikai felhasználási területének felmérése.
5. A kapott szekvenciaadatok elemzése, fókuszba helyezve a kvázispecies genetikai diverzitásának felmérését.

# Anyagok és módszerek

**Felhasznált minták eredete**

A vizsgálatainkhoz felhasznált mintákat (szövetfelülúszó, savó, szerv, orrtampon, vakcina) a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága (NÉBIH ÁDI), Dr. Halas Máté (Prophyl Kft.) és Dr. Bálint Ádám (NÉBIH ÁDI) biztosította. A klinikai minták hazai sertéstelepekről származtak, amelyek gyűjtésére a mentesítés keretein belül zajló rutin diagnosztika, vagy PRRSV fertőzés gyanúja miatt került sor.

**A minták feldolgozásához használt általános molekuláris biológiai módszerek**

A minták virális nukleinsav kivonása a Nucleospin RNA virus kittel (Macherey-Nagel) vagy a QIAmp Viral RNA Mini kittel (Qiagen) történt. A Ct‑értékek megállapításához a rutin diagnosztikai eljárásban is alkalmazott, kereskedelmi forgalomban kapható, mindkét PRRSV fajra specifikus virotype PRRSV RT-PCR kitet (Qiagen) használtuk. A PCR-termékek hosszának ellenőrzését agarózgél-elektroforézissel végeztük majd a PCR-terméket kimetszettük és a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd) segítségével kitisztítottuk.

**DNS-könyvtárkészítés és újgenerációs szekvenálás**

A DNS-könyvtárkészítés kétféleképpen zajlott.

Egyes esetekben az adott célkitűzésnek megfelelően készült PCR-termékekből hagyományos, kereskedelmi forgalomban kapható kitekkel végeztünk DNS-könyvtárkészítést és a szekvenálást IonTorrent PGM vagy Illumina NextSeq 500 platformokon hajtottuk végre.

Másrészt adaptáltunk egy Illumina-rendszerekkel kompatibilis, kétlépés PCR-alapú könyvtárkészítési módszert, mely könyvtárak szekvenálása Illumina ISeq100 vagy Miseq600 készülékeken zajlott. Ezen PCR-alapú könyvtárkészítő módszer során a PCR-1-ben olyan fúziós primereket használtunk, amelyeknél az adott célrégióra specifikus szekvencia szakaszok mellett az Illumina szekvenáló primerszekvenciái helyezkednek el. A PCR-2 alatt az Illumina specifikus adaptereket és vonalkódokat az ezen szekvenciákat tartalmazó fúziós primer segítségével kapcsoltuk hozzá a PCR-1 termékéhez. A PCR-2 végével teljes értékű, közvetlenül Illumina készüléken szekvenálható amplikon DNS-könyvtárakra teszünk szert.

**Bioinformatikai módszerek**

Az NGS során kapott „nyers” szekvenciák (read) feldolgozása a Geneious Prime programban történt. A readek minőségi szűrése után az adott vizsgálatban résztvevő genomi régiók vagy teljes genomok konszenzus szekvenciáját referencia szekvenciához történő szekvenciaillesztéssel állítottuk össze. Az egypontos nukleotidvariáns (SNV) pozíciókat a Geneious program beépített algoritmusával kerestük.

A nukleotid- és aminosavszekvencia-adatsorok (nt és as) összerendezését a MUSCLE vagy a MAFFT algoritmusokkal végeztük. A szekvenciák közötti páronkénti nukleotidazonosság értékeit a MEGA X programban p-distance módszerrel számoltuk ki. Az N-glikozilációs pozíciók becslését a NetGlyc 1.0 Server segítségével végeztük. A szelekciós nyomás becslése a Datamonkey webszerverén elérhető FEL, SLAC és FUBAR algoritmusokkal történt. A filogenetikai kapcsolatok rekonstrukciója a MEGA X szoftverrel vagy az IQ-TREE webszerverrel történt.

**Szekvenciaadatok**

A PRRSV-törzsek hazai elterjedésének, valamint molekuláris epidemiológiájának leírásához az ORF5 szekvenciákat (2003–2020) a NÉBIH ÁDI biztosította. A PRRSV-1 adatsorból kiválasztottunk egy reprezentatív adathalmazt, azokat a szekvenciákat megtartva (n=301, teljes ORF5), amelyek sertéstelepenként egyedinek számítottak, azaz több mint 2%-os nukleotideltérést mutattak a korábban azonosított szekvenciaváltozathoz képest. A PRRSV-2 esetében az összes szekvenciaadatot (n=44, részleges ORF5) felhasználtuk.

# Eredmények és megbeszélés

**Szekvenciaadatok elemzése**

**Hazai PRRSV-1-törzsek ORF5 alapú vizsgálata**

Az értekezésben vizsgált PRRSV-1-törzseket összesen 16 kládba soroltuk (1A, 1B, 1C, 1E, 1F, 1G, 2, 3C, 3D, 3F, Porcilis, Porcilis-like, Spanish, Reprocyc, X1 és X2), amelyek közül 4, ezidáig be nem sorolt szekvenciák alkotta kládot (Porcilis, Porcilis-like, Spanish és Reprocyc), illetve 2 új kládot (X1, X2) írtunk le. A legnagyobb genetikai változatosságot a 3D és az X2 kládok mutatták, míg a legkonzervatívabbnak az 1F, illetve a Porcilis és a Reprocyc bizonyult. Eredetüket tekintve az 1A, 1F, 1G, X2, 2, 3C, 3D, 3F és Spanish klád esetében ismert, hogy külföldről importált sertésállományokhoz köthető. Továbbá három, vakcinaleszármazott törzseket magába foglaló kládot (Porcilis, Reprocyc, Spanish – Unistrain vagy közismerten Amervac) is azonosítottunk, melyeknek a jelenléte nem meglepő, hiszen a hazánkban rendszerint használt PRRSV-1 MLV vakcinákról van szó. Eredményeink alapján telepi körülmények között a Porcilis vakcinatörzs genetikailag stabil, míg a Reprocyc és az Amervac vakcinatörzsek kevésbé.

Az ORF5 régió származtatott aminosavszekvencia elemzése nagyfokú genetikai változatosságot mutatott. Az Európából származó szakirodalmi adatokkal ellentétben az általánosan konzervatív neutralizáló epitópon belül egy aminosavpozíció (as32), valamint több antigenikus régió és T-sejt epitóp szintén változatosnak bizonyult.

Hat potenciális N-glikozilált pozíciót találtunk az aminosavszekvencia-adatok elemzésénél. Az N46 és N53 rendszerint konzervált, azonban a magyar törzseknél az N46 pozícióban láttunk mutációkat, legnagyobbrészt a Spanish kládban, valamint az N46 hiányával párhuzamosan az N37 jelenlétét figyeltük meg. A legtöbb magyar PRRSV-1-törzs az Európa- és Ázsia-szerte is legelterjedtebb N37–N46–N53 glikozilációs mintázatot hordozta.

A GP5 25 db egyedi aminosavpozíciójában mutattunk ki pozitív szelekciós nyomást, főként a N-terminális szignálszekvencia és az ektodomén fehérjerégiókon. Kládonként elemezve a szelekciós nyomást, a diverzifikáló szelekció alatt álló egyedi kodonok száma a Spanish-ben volt a legtöbb (6 db), ami szintén megerősíti ezen klád nagyfokú változatosságát.

**Hazai PRRSV-2-törzsek ORF5 alapú vizsgálata**

A PRRSV-2-vel fertőzött hazai sertéstelepek száma évente maximum 4 vagy 5 db volt a 2005–2021-es időszakban és ezek a sertéstelepek az ország területén szétszórva helyezkedtek el. Vizsgálataink során kizárólag az L5 és L1 lineage-ekbe tartozó PRRSV-2 törzseket detektáltunk.

Az L5-be soroljuk a VR-2332 vadtípusú törzset, valamint az abból származtatott, attenuált vakcinatörzset (Ingelvac MLV) és annak leszármazottjait. A magyar L5 szekvenciák (n=39) a legnagyobb hasonlóságot mind nt, mind as szinten az Ingelvac MLV-vel mutatták. A vakcinaeredet feltételezést szintén támogatja, hogy a legtöbb L5 vírustörzset import sertésállományokból, illetve ilyen állományokkal kapcsolatban álló sertéstelepekről izolálták. Fontos, hogy hazánkban az Ingelvac MLV nem engedélyezett, ellentétben néhány más európai országgal.

A magyar L1 szekvenciák (n=5) a legközelebbi rokonságot egy szlovák szekvenciával mutatták, továbbá a filogenetikai elemzések szerint ezzel együtt egy külön csoportot alkottak az L1-en belül. Az L1 törzsek pontos eredetére vonatkozóan nem rendelkezünk információkkal. Egy tanulmány aktualizálta a PRRSV-2 klasszifikációját és az egyik magyar L1 törzset egy olyan kládba sorolta, amely az USA-ban az egyik uralkodó klád volt az 1990-es évektől 2003-ig. Az L1 törzsek hazai jelenlétét először 2005-ben mutatták ki, és egyetlen integráció különböző sertéstelepeinél kerültek csak azonosításra.

A GP5 aminosavszekvencia elemzésekor mindkét lineage-en belül nagyfokú hasonlóságot találtunk. Egyedül az L5 esetében az as151-nél figyeltünk meg számos szubsztitúciót. Ezen pozíció eltérő a VR-2332 és az Ingelvac MLV között, és a magyar törzsek körülbelül felében a VR-2332 törzzsel egyezett meg. Az irodalmi adatok szerint ebben az aminosav pozícióban jellegzetes tulajdonság a magas mutációs ráta és a pozitív szelekciós nyomás.

**Kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés**

**ORF7 régió (mindkét PRRSV faj)**

Az Illumina-rendszerekkel kompatibilis, kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítést első körben az ORF7 régióra specifikusan terveztük meg, ugyanis ez a PRRSV-genom egyik legkonzervatívabb szakasza, így számos diagnosztikai módszer és filogenetikai elemzés alapját képezi. Az ORF7 amplikon DNS-könyvtárakat Illumina Miseq600 készüléken szekvenáltuk.

A PCR-1-ben alkalmazott fúziós primer PRRSV-specifikus szakaszát univerzálisan alakítottuk ki, ezáltal mindkét faj teljes ORF7 régiójának felsokszorozására alkalmas. Előzetes vizsgálataink során kimutattuk, hogy a PCR-rendszer, mint DNS-könyvtárkészítés megfelelően működik, továbbá a vírustelítettségre vonatkozó érzékenysége hasonló mértékű mindkét vírusfaj esetében (Ct 34).

A kidolgozott könyvtárkészítő módszert hazai sertéstelepekről származó savómintákkal (n=15, az ORF5 diagnosztikai vizsgálata alapján 10 különböző kládba tartoztak) egyaránt teszteltük. Habár a szekvenálási mélység viszonylag tág értékek között változott az egyes minták között (202×–14986×), egy minta kivételével az ORF7 konszenzus szekvenciák összeállítása megvalósult. A közöttük megfigyelt genetikai eltérés a világszerte leírthoz hasonló mértékű volt. Öt minta esetében két konszenzust is találtunk, melyek közül négyben a minor variáns a legközelebbi rokonságot a Porcilis vakcinatörzzsel mutatta (nt azonosság: >99%). Ezen eredményeink szerint az ORF7 amplikon‑mélyszekvenálás hozzájárulhat a PRRS diagnosztikájához, hiszen széles körben alkalmazható, valamint felhívhatja a figyelmet több PRRSV variáns egyidejű keringésére a vizsgált sertéstelepen.

További vizsgálataink során heterogén víruspopulációt azonosítottunk nyolc savómintában. Az összesen 33 db detektált SNV a savóminták között és az ORF7 régió mentén egyenlőtlenül oszlott el, illetve gyakoriságuk 10,2% és 46,7% közé esett. A szakirodalom szerint a kvázispeciesben megfigyelt változatosságot sok tényező befolyásolhatja, például a vizsgált minta típusa, a fertőzés óta eltelt idő, vagy az elemzés módja. Ezen okok miatt nehéz általános következtetéseket levonni.

**Teljes genom (két PRRSV-1 vakcinatörzs)**

Módszerfejlesztési munkánk során kidolgoztunk egy, a Porcilis és Unistrain vakcinatörzsekre és leszármazottjaikra specifikus, multiplex PCR-rendszert, melyet beépítettük a kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés folyamatába. Kísérleteinkhez három, különböző gyártási tételű Porcilis® és egy Unistrain® vakcinából közvetlenül vontunk ki nukleinsavat, majd végeztük el a PCR-alapú könyvtárkészítést, amit Illumina Miseq600 készüléken szekvenáltunk.

A multiplex PCR-hez (PCR-1) 34 db átfedő amplikont (méret: 544–583 bp) felszaporító primerpárt terveztünk, majd alakítottunk ki fúziós primereket, amelyek 100%-os lefedettséget biztosítanak a genom mentén. A primerszettet két poolra bontottuk (páratlan és páros számú amplikonok) és háromféle módon változtattuk a primerek relatív mennyiségét az adott poolokban. Végül a poolok optimalizálásával sikerült a teljes genom hosszán egységes szekvenálási mélységet elérnünk és az alacsony mélységgel rendelkező régiókat teljes mértékben megszüntetnünk.

Az NGS-adatok elemzésével a Porcilis vakcinák víruspopulációjában jelentős genetikai változatosságot találtunk, illetve valamekkora különbséget a különböző gyártási tételek között szintén felfedeztünk. Eclercy és munkatársai leírták, hogy a Porcilis vakcinákat négy különböző Porcilis-genomszekvenciavariáns (FULL-LENGTH és deléciós variánsok: LONG-DEL, SHORT-DEL, SHIFT-DEL) alkotja, amelyeket mi is felfedeztük az általunk vizsgált vakcinamintákban. Mindemellett, a vakcinamintákban magas genetikai összetettséget találtunk. A kvázispecies egységes mintázatot mutatott, azaz az azonosított SNV-k hasonló helyeken és hasonló gyakoriságban fordultak elő mindhárom vakcinamintában.

A vakcinamintákból nyert, illetve a génbankból letöltött további három teljes genom szekvencia vizsgálatával megállapítottuk, hogy a Porcilis vakcinatörzs konszenzus szekvencia szintjén genetikailag stabil, közöttük mindössze 0,1%-os genetikai eltérést találtunk.

**Hagyományos könyvtárkészítés**

**Kevert fertőzések azonosítása**

A PRRS-mentesítés rutin diagnosztikai vizsgálatainak keretein belül hat hónapon keresztül végeztük a rutin diagnosztikai eljárás során keletkezett PCR-termékekből (ORF5 és ORF7) a szekvenálást hagyományos DNS-könyvtárkészítés és Ion Torrent készülék segítségével.

A feldolgozott minták közül (182 ORF5 és 10 ORF7) két ORF5-ben két minor, illetve egy ORF5-ben és két ORF7-ben egy minor PRRSV-variáns jelenlétét láttuk a major variáns mellett. A nukleotidazonossági értékek alapján egyes kevert mintákban a Porcilis és az Amervac vakcinatörzs együttes előfordulását feltételeztük, míg a többiben az egyik vakcinatörzs mellett egy vadtípusú törzsét.

**PRRSV-2-járványkitörés vizsgálata**

2020 ősz–2021 nyár időszakában két PRRSV-2 járványkitörés (Eset I – 5 db, Eset II – 2 db érintett sertéstelep) felderítését segítettük az ORF2-7 régió (szerkezeti fehérjéket kódol) genetikai vizsgálatával. Ehhez PCR-terméket készítettünk, majd hagyományos DNS-könyvtárkészítést követően végeztünk NGS-t Illumina NextSeq 500 készüléken.

A sikeresen felszaporított és megszekvenált ORF2-7 konszenzus szekvenciák (2 telepnél sikertelen) hasonlóan magas nukleotidazonosságot mutattak a VR-2332 vadtípusú törzzsel és az Ingelvac MLV-vakcinatörzzsel. Az aminosavszekvencia vizsgálatával több aminosavat azonosítottunk, ami az Ingelvac MLV-törzzsel egyezett meg.

A járványkitörésben vizsgált PRRSV-2-törzsek között váratlanul nagy genetikai eltérést láttunk (maximum 2,5%), mindazonáltal az irodalmi adatok alapján az Ingelvac MLV-vakcinaszerű törzsek teljes genomszekvenciájában a maximális nukleotideltérés akár a 6,4%-ot is elérheti egy éven belül.

Az NGS-adatok elemzésével betekintést nyertünk a hazánkban keringő vakcina eredetű PRRSV-2-törzsek kvázispeciesének változatosságába és négy mintában összesen 77 db SNV-t azonosítottunk. Az SNV-k ORF régiókon belüli vagy közötti elhelyezkedésében, valamint a minták fertőzési időrendjében elfoglalt helyében semmilyen mintázatot nem tapasztaltunk. Arra a kérdésünkre, hogy a vakcina-szerű törzsekben megfigyelhető-e a revertálódás tendenciája a kvázispeciesben, azt találtuk, hogy csupán pár SNV egyezett meg a vadtípusú VR-2332 törzzsel.

Az ORF2–7 régió szekvencia-, filogenetikai- és járványügyi vizsgálatokkal együttesen sikeresen rekonstruáltuk a PRRSV-2 vakcinatörzs lehetséges átviteli útjait. Mindkét esetben Dániában elhelyezkedő gyűjtőállomásokról érkezett sertésszállítmányokból származhatott az Ingelvac MLV-vakcinatörzs, majd élőállatszállítás és más szolgáltató járművek segítségével terjedt el a hazai sertéstelepek között.

# Új tudományos eredmények

1. ORF5 szekvenciaadatok vizsgálatával mindkét PRRSV faj magyarországi elterjedési térképét elkészítettük, valamint genetikai diverzitásukat felmértük.
2. Elsőként adaptáltuk a PRRSV-re az Illumina rendszerekkel kompatibilis, kétlépéses PCR-alapú DNS-könyvtárkészítő módszert és hajtottunk végre amplikon-mélyszekvenálást.

Kidolgoztunk és optimalizáltunk kétféle PCR rendszert:

i.) mindkét PRRSV faj ORF7 régiójára;

ii.) a Porcilis és Unistrain PRRSV-1-vakcinatörzsek és leszármazottjaik teljes genomjára specifikusan.

1. Az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás alkalmazhatóságát sikeresen felmértük hazai sertéstelepekről származó klinikai mintákon. Továbbá megállapítottuk, hogy a Porcilis és Unistrain vakcinatörzsek teljes genomszekvenciájának meghatározása szintén lehetséges. Eredményeink alapján elmondható, hogy mindkét megközelítés egyaránt segíti a PRRSV-t célzó diagnosztikát és kutatást, beleértve a keringő PRRSV-törzsek azonosítását, genetikai diverzitásának és a víruspopuláció komplexitásának felmérését. Kimutattuk, hogy az amplikon-mélyszekvenálás gyors, egyszerű és költséghatékony alternatív opciót kínál az NGS diagnosztikai bevezetéséhez.

# Publikációs lista

**A doktori kutatás eredményeiből született közlemények**

Jakab, S., Marton, S., Szabó, I., Kecskeméti, S., Bálint, Á., Bányai, K.: **Kezdeti tapasztalatok az amplikon-mélyszekvenálás PRRS-mentesítési programba történő integrálásával kapcsolatban.** Magyar Állatorvosok Lapja. 144. 115–128. 2022.

Jakab, S., Kaszab, E., Marton, S., Bányai, K., Bálint, Á., Nemes, I., Szabó, I.: **Genetic diversity of imported PRRSV-2 strains, 2005–2020, Hungary.** Front. Vet. Sci. 9. 1581. 2022.

Jakab, S., Bányai, K., Bali, K., Nemes, I., Bálint, Á., Szabó, I.: **Transmission dynamics of imported vaccine-origin PRRSV-2 within and between commercial swine Integrations in Hungary**. Animals. 13 (19). 3080. 2023.

Jakab, S., Bali, K., Freytag, C., Pataki, A., Fehér, E., Halas, M., Jerzsele, Á., Szabó, I., Szarka, K., Bálint, Á., Bányai, K.: **Deep sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF7: A promising tool for diagnostics and epidemiologic surveillance.** Animals. 13(20). 3223. 2023.

Jakab, S., Bálint, Á., Cseri, K., Bali, K., Kaszab, E., Domán, M., Halas, M., Szarka, K., Bányai, K.: **Genome stability assessment of PRRS vaccine strain with new ARTIC-style sequencing protocol.** Front. Vet. Sci. 10. 1327725. 2024.

Bálint, Á., Jakab, S., Kaszab, E., Marton, S., Bányai, K., Kecskeméti, S., Szabó, I.: **Spatiotemporal distribution of PRRSV-1 clades in Hungary with a focus on the era of disease eradication.** Animals. 14(1). 175. 2024.

**A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények**

Homonnay, Z., Jakab, S., Bali, K., Kaszab, E., Mató, T., Kiss, I., Palya, V., Bányai, K.: **Genome sequencing of a novel variant of fowl adenovirus B reveals mosaicism in the pattern of homologous recombination events.** Arch. Virol. 166(5). 1477–1480. 2021.

Fehér, E., Jakab, S., Bali, K., Kaszab, E., Nagy, B., Ihász, K., Bálint, Á., Palya, V., Bányai, K.: **Genomic epidemiology and evolution of duck hepatitis A virus**. Viruses. 13(8). 1592. 2021.

Fehér, E., Bali, K., Kaszab, E., Ihász, K., Jakab, S., Nagy, B., Ursu, K., Farkas, S.L., Bányai, K.: **A novel gyrovirus in a common pheasant (*Phasianus colchicus*) with poult enteritis and mortality syndrome.** Arch. Virol. 167(5). 1349–1353. 2022.

Fornyos, K., Búza, L., Makkai, I., Polyák, F., Pogácsás, I., Savoia, L., Szegedi, L., Bálint, Á., Jakab, S., Bányai, K., Szabó, I.: **Sampling strategies in PRRS elimination in Hungary: An observational study involving four farrow-to-finish swine herds.** Vet. Sci. 10. 546. 2023.

Jakab, S., Bali, K., Homonnay, Z., Kaszab, E., Ihász, K., Fehér, E., Mató, T., Kiss, I., Palya, V., Bányai, K.: **Genomic epidemiology and evolution of fowl adenovirus 1.** Animals. 13(18). 2819. 2023.

**Konferencia közlemények**

Jakab, S., Bálint, Á., Szabó, I., Bányai, K.: **Current situation of the eradication program of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Hungary: The molecular epidemiological perspective.** 10th Jubilee Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, 12-13th of November 2021, Book of Abstracts.

Jakab, S., Bálint, Á., Bányai, K.: **PRRSV törzsek kimutatása és jellemzése NGS-alapú amplikon szekvenálással.** Akadémia Beszámolók, Budapest, 2023. január 30-31.

**A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó könyvfejezet**

Vlasova, A.N., Deol, P., Sircar, S., Ghosh, S., Jakab, S., Bányai, K., Dhama, K, Amimo, J.O., Saif, L.J., Malik, Y.S.: **Animal Rotaviruses.** In: Malik, Y.S., Singh, R.K., Dhama, K. (eds). Springer, Singapore, 163–202. 2020.

# Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy megtisztelt bizalmával és lehetőséget biztosított doktori munkám végzéséhez, valamint, hogy tanácsainak, meglátásainak segítségével az önálló munkavégzés készségét elsajátíthattam. Köszönöm társtémavezetőmnek, Dr. Bálint Ádámnak a rendelkezésünkre bocsátott savó mintákat és szekvenciaadatokat, a publikációk és a dolgozat lektorálását. Külön köszönet illeti, Dr. Szabó Istvánt, aki szakmai tapasztalatával nagyban hozzájárult a publikációk, illetve e dolgozat megírásához.

Köszönettel tartozom a NÉBIH ÁDI és a Prophyl Kft. munkatársainak, külön kiemelve Dr. Halas Mátét, a rendelkezésünkre bocsátott mintákért és adatokért. Köszönöm, Dr. Bali Krisztinának és Dr. Marton Szilviának, valamint Dr. Szarka Krisztinának és Dr. Freytag Csongornak a hagyományos könyvtárkészítési és az újgenerációs szekvenálási folyamatokban nyújtott segítségüket.

Hálásan köszönöm volt harcedzett kollégáimnak, Eninek, Esztinek, Katának, Krisztinek, Mariannak és Reninek, hogy felkaroltak, hogy tartották bennem a lelket, hogy mindenben számíthattam és még mindig számíthatok rájuk, legyen az szakmai, vagy magánéleti probléma. Cserébe, remélem, hogy ez az összetartó csapat megfogadja a „chill tanfolyamom” tanításait. Külön köszönöm, Mariannak és Reninek, hogy elvállalták a dolgozat alapos átolvasását.

Köszönöm a családomnak, hogy támogattak és minden panaszomat meghallgatták, hogy igyekeztek nyugodt hátteret biztosítani a számomra. Köszönöm vőlegényemnek, Gábornak, hogy mindig mellettem állt, bíztatott és teljes odaadással segített a disszertáció írásának időszakában. Köszönöm Vikinek és a „Tűzvarázslóknak”, hogy sommelier estjeinken eloszlatták összes kételyemet.

A PhD munka anyagi feltételeit a Dr. Bányai Krisztián által elnyert Lendület pályázat és a Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programja biztosította.