

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai
Tanszék

Sertés influenzavírus és coronavírus kölcsönhatásának vizsgálata
Examination of interaction between swine influenzavirus and
coronavirus

Készítette: Túri Dániel

Témavezető:

Dr. Lőrincz Márta

egyetemi adjunktus

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

2023

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Bevezetés	6
3.	Irodalmi áttekintés	7
3.1.	Influenzavírusok	7
3.1.1.	Szerkezet.....	7
3.1.2.	Sertésinfluenza.....	10
3.2.	Coronavírusok.....	12
3.2.1.	Szerkezet.....	13
3.2.2.	Sertés coronavirusok	14
3.3.	A fertőzések szempontjából fontos receptorok.....	16
4.	Célkitűzések	19
5.	Anyag és módszer.....	20
5.1.	Minták.....	20
5.2.	Direkt víruskimutatás.....	20
5.2.1.	Nukleinsav kivonás	20
5.2.2.	PCR vizsgálat	21
5.2.3.	Influenza gyorsteszt.....	23
5.2.4.	Vírusizolálás sejttenyészetén.....	23
5.3.	Ellenanyag kimutatás	25
5.3.1.	ELISA-vizsgálat	25
5.3.2.	Vírusneutralizáció.....	25
6.	Eredmények	26
6.1.	Direkt víruskimutatás.....	26
6.1.1.	PCR vizsgálat	26
6.1.2.	Influenza gyorsteszt.....	26
6.1.3.	Vírusizolálás sejttenyészetén.....	26

6.2.	Ellenanyag kimutatás	27
6.2.1.	ELISA-vizsgálat	27
6.2.2.	Vírusneutralizáció.....	27
7.	Megbeszélés.....	29
7.1.	Direkt víruskimutatás.....	29
7.2.	Indirekt víruskimutatás	30
7.3.	Interakció vizsgálata	31
8.	Összefoglalás	33
9.	Summary.....	34
10.	Irodalomjegyzék	35
11.	Köszönetnyilvánítás	39

1. Rövidítések jegyzéke

RNS	Ribonukleinsav
NP	Nukleoprotein
M	Mátrixfehérje
HA/H	Haemagglutinin
NA/N	Neuraminidáz
NS	Nem strukturális fehérje
Cys	Cisztein
RBD	Receptor kötő domén
VE	Csőkevényes észteráz
F	Fúziós fehérje
TM	Transzmembrán
SIV	Sertés influenzavírus
IL	Interleukin
IF	Interferon
TNF	Tumor nekrozis faktor
PRDC	Sertések légzőszervi betegség komplexe
PCR	Polimeráz láncreakció
RT-PCR	Reverz transzkriptáz-PCR
ELISA	Enzimhez kötött immunoszorbens assay
TGEV	Transzmisszibilis gastroenteritis vírus
PRCoV	Sertés légzőszervi coronavírusa
PEDV	Sertés járványos hasmenésének vírusa
PHEV	Malacok agy- és gerincvelő gyulladását okozó haemagglutináló vírus
PDCoV	Sertés deltacoronavírus
SeCoV	Sertés enterális coronavírusa
ACE2	Angiotenzin-konvertáz enzim 2
APN	Aminopeptidáz N
DPP4	Dipeptidil-peptidáz 4

mCEACAM1	Rágcsáló carcinoembrionális antigénnel rokon sejtadhéziós molekula 1
CCoV	Kutya coronavírusa
FCoV	Macska coronavírusa
MHV	Egér hepatitis vírus
HCoV	Humán coronavírús
SARS-CoV	Súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó coronavírús
IBV	Fertőző bronchitis vírus
PRRS	Sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírusa
COVID-19	Coronavírús-betegség 2019
MERS	Közel-keleti légzőszervi coronavírús
DNS	Dezoxiribonukleinsav
MDCK	Madin-Darby kutyavese
SADS-CoV	Sertés akut hasmenés szindróma coronavírusa
S	Tüske
E	Burok
N	Nukleokapszid
BCoV	Szarvasmarha coronavírusa
NTD	N-terminális domén
NNK	Nemzeti Népegészségügyi Központ

2. Bevezetés

Mind a koronavírussok, mind az influenzavírussok okozta megbetegedések, főként az ősztől a tavasz közepéig, gyakran jelentkeznek akár a humán, akár a vírusokra fogékony állatok esetében. Bár a koronavírusról a koronavírus betegség 2019, vagy közismert nevén COVID-19 pándémia előtt a közösségi médiákban kevés információ esett, orvosi és állatorvosi körökben jól ismert kórokozók, amelyek elsősorban felső légúti, illetve hasmenéses tüneteket okoztak. Az influenzavírussok minden évben a figyelem középpontjában vannak a magas mobilitásuknak köszönhetően emberek és madarak tekintetében is.

A kínai Wuhan tartományból kiinduló súlyos akut légzőszervi szindróma-coronavírus 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARSCoV-2) okozta pándémia során figyeltek fel az influenzavírussok visszaszorulására. A SARSCoV-2 okozta fertőzések elterjedésével a Betegségellenőrző és Megelőző Központ (CDC) adatai alapján az influenzás megbetegedések száma nagyjából harmadára csökkent a korábbi évekhez képest. A felsőlégúti megbetegedések számának drasztikus csökkenésének háttérében a személyi higiénia betartását célzó tudatos magatartást és a társadalmi felelősségvállalást gondolják [1, 2].

Sertésekben 2010-2011 és 2014-2016 között végzett vizsgálatok alapján a magyarországi telepeken a sertések légzőszervi coronavirusát (PRCoV) és sertésinfluenzavírussokat egyidejűleg, egy egyedből nem sikerült kimutatni (Lőrincz Márta személyes közlése alapján). Ezt a humán populációban a súlyos akut légzőszervi szindróma-coronavirusa (SARS-CoV), illetve a Közel-keleti légzőszervi coronavirus (MERS) kitörése után is tapasztalták a kutatók, orvosok. Eközben az utóbbi két vírust a lassabb terjedés jellemezte (a globalizáció fejlődésének köszönhetően), miközben – akár a sertéstelepeken – a higiénias szabályok betartását nem gondolták annyira fontosnak. Véleményünk alapján csupán a maszk viselése, a kézmosás és a távolságtartás nem csökkentheti ennyire drasztikusan az influenzavírussok háttérbe szorulását.

3. Irodalmi áttekintés

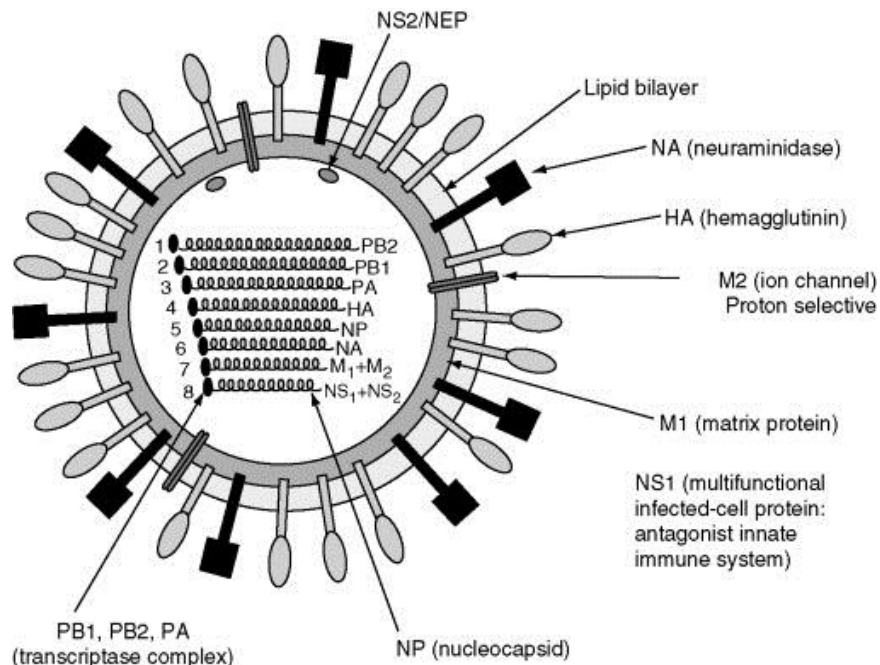
3.1. Influenzavírusok

Az influenzavírusok az egyike a közismert vírusoknak, melyek világszerte előfordulnak. Ezek az *Orthomyxoviridae* családba tartoznak, amelyen belül elkülönítünk 9 nemzetséget (genus-t) is [3]. Állatorvosi szempontból az *Alphainfluenzavirus* nemzetség a kiemelendő (régébbi nevén Influenza A vírus), melybe a sertésinfluenza kórokozói is tartoznak. Emellett fontos csoportot képviselnek még a *Gammainfluenzavirus* nemzetségbe tartozó vírusok, melyek között szintén található sertést is fertőzni képes kórokozó, valamint ugyanez mondható el a *Deltainfluenzavirus* genusról is [4–6]. Ezekkel szemben a betainfluenzavírusok, az alfa- és gammainfluenzavírusokkal együtt, a humán influenza kialakításában játszanak fontos szerepet. A többi genus (*Isavirus*, *Mykissvirus*, *Quaranjavirus*, *Sardinovirus* és *Thogotovirus*) tagjai közül vannak olyanok, melyek megfertőzhetnek halakat, madarakat, emlősöket is, de jelentőségük jelen dolgozat szempontjából nincs [7–11].

3.1.1. Szerkezet

Az influenzavírusok körülbelül 100 nm átmérőjű kórokozók, amelyek negatív, szimpla szálú ribonukleinsavat (RNS) tartalmaznak és lipid burokkal rendelkeznek. Fontos tulajdonsága a genomnak, hogy több szegmensből áll, amely nagyban hozzájárul a vírus nagyfokú változatosságához. Az Alpha-, valamint Betainfluenzavirus genus tagjai 8, míg a Gamma-, és Deltainfluenzavirusok 7 szegmessel rendelkeznek [12]. A vírus genomja 10 fehérjét kódol. Egy része konzervatív génekből áll alacsony mutációs rátával, amelyek alapján lehet nemzetségekbe sorolni a vírusokat. A vírus tartalmaz strukturális és nem strukturális fehérjéket is. Előbbihez tartoznak az RNS-dependens-RNS-polimeráz alkotói: a PA, a PB1 és a PB2 protein. A polimeráz enzim felelős a sejtbejutást követően a transzkripcióért. További strukturális fehérjék közé tartozik a nukleoprotein (NP), a mátrixfehérje (M) – utóbbi kettőt konzervatív gének kódolják – a haemagglutinin protein (HA, illetve a vírusok szerotípusának megadásakor H-ként rövidítem) és a neuraminidáz (NA, illetve a vírusok szerotípusának megadásakor N-ként rövidítem). A HA sejtfelületi receptorához való kötődésért és a sejtbejutásért felelős, az NA pedig a gazdajestből való kiszabadulás folyamatában tölt be fontos szerepet [13]. Ezen két fehérjét kódoló génekben gyakran következnek be pontmutációk, amik egy lassabb változáshoz vezetnek. Ezt

nevezük antigén sodródásnak (drift), mely a szezonális influenzajárványok kialakulásának alapja. Szintén az influenzavírusok változatosságáért felelős az antigén csuszamlás (shift), mely a vírus genomjának szegmentált szerkezetének köszönhető. Ilyenkor az egyes szegmensek kicserélődnek (reasszortáció) abban az esetben, ha két különböző influenzavírus fertőz meg egyazon sejtet. A HA és az NA fehérje alapján az influenza vírusokat altípusokba tudjuk sorolni. Jelenleg 18 HA és 11 NA altípust különböztetünk meg az *Alphainfluenzavirus* genuson belül [14]. A felületi fehérjék közül elsősorban a haemagglutinin fehérjét vizsgáltuk, a koronavírussal való interakció során ezt tartjuk lényegesnek. Emellett a vírus rendelkezik még két nem strukturális fehérjével: az NS1 és az NS2 fehérjével. A vírus fehérjét, valamint sematikus felépítését az 1. ábra hivatott bemutatni.

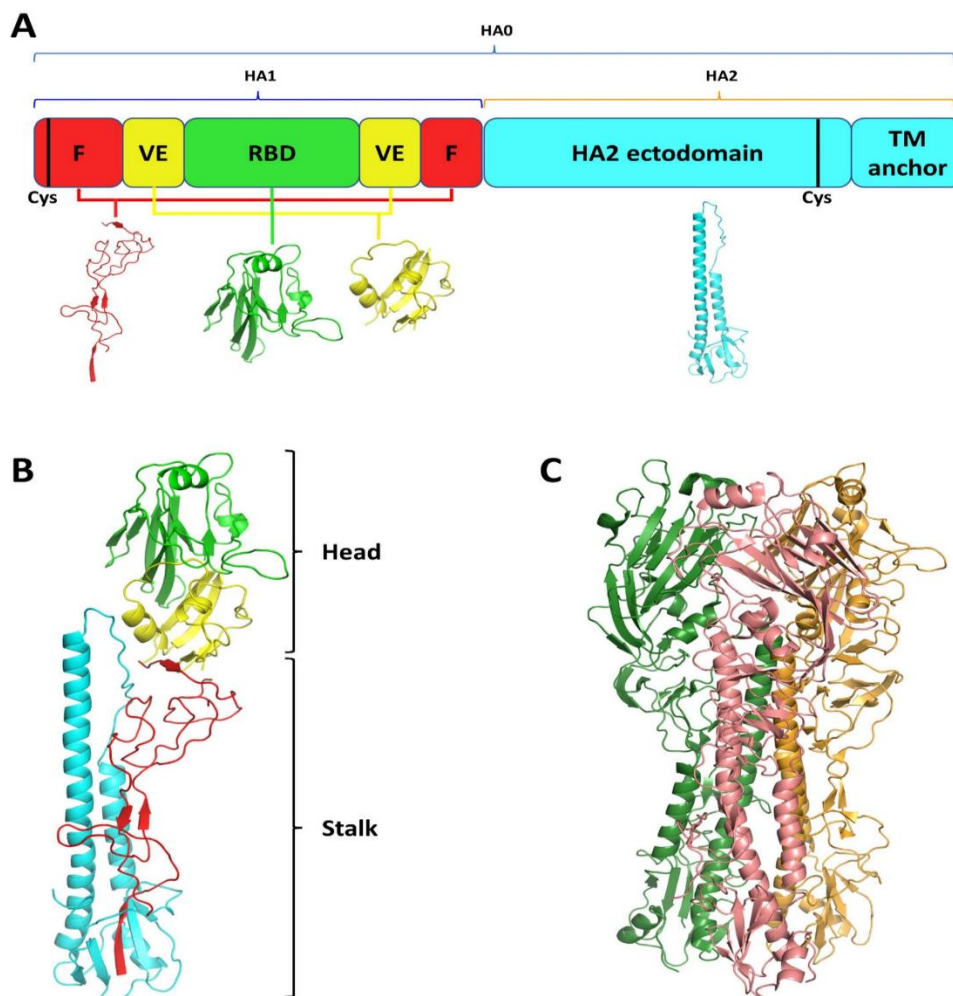


1. ábra: A képen egy *Alphainfluenzavirus* sematikus szerkezete látható. A kép forrása: [15]

A HA a vírus olyan glikoproteinje, ami rendelkezik egy transzmembrán résszel, valamint a vírus felületén egyfajta tüskét képez. Fontos szerepet játszik a gazdasejtbe való bejutás folyamatában. A rajta található antigének ellen a gazdaszervezet B-sejtjei neutralizáló ellenanyagokat termelnek, amelyekkel megakadályozzák a vírus sejthez való kapcsolódását, illetve a sejten belüli replikációt. A virionban a haemagglutinin fehérje prekursor formában található meg, amely egy inaktív forma (HA0-val jelöljük). Ezt a vírus genomjában a negyedik szegmens kódolja és egy trimer komplexet alkot [16]. A HA0-t a különböző tripszin-típusú proteázok (például a plazmin és a triptáz) képesek hasítani. Ezt követően két részre válik a fehérje: egy HA1 és egy HA2 alegységre. A vágási hely

aminosavsorrendje határozza meg, hogy mely enzimek képesek a haemagglutinint hasítani. Ennek megfelelően – amennyiben a vágási helyen nagyobb számban fordulnak elő bázikus aminosavak – egyéb típusú enzimek is aktiválhatják a HA0-t (például a furin-típusú proteázok). Ebből következik, hogy az ilyen HA-val rendelkező virionok (pl.: H5 és H7) képesek szisztémás elváltozásokat okozni, és a fertőzések súlyosabb elváltozásokkal, valamint megnövekedett mortalitással (extrém adat, de 2003-ban a H5N1 madárinfluenza embereknél 52%-os mortalitással járt az Egészségügyi Világszervezet adatai alapján) is járhatnak [17]. Emellett a HA fehérjéhez számos helyen kapcsolódik glükóz molekula, melyet összefüggésbe hoztak a vírus szaporodóképességével [18].

A haemagglutinin két nagyobb részre osztható: egy globuláris, ún. feji-, valamint egy szár doménre (2. ábra/B). Előbbihez tartozik a HA1 nagyobb része, míg utóbbihoz a HA1 kisebb része és a HA2 alegység egésze. A két alegységet diszulfid-híd, valamint hidrogénkötések kapcsolják össze. Előbbi két cisztein (Cys) aminosav között alakul ki [19], amelyek elhelyezkedése a 2/A ábrán látható. A globuláris részen helyezkednek el olyan fontos területek is, melyek a vírus antigenitásáért felelnek, a receptorkötő hely (RBD), valamint egy csökevényes észteráz rész (VE) [19]. Utóbbi a gammainfluenzavírusoknál nagyobb jelentőségű, ahol a gazdasejtekből való kijutásért felelős. Ezt haemagglutinin-észteráz-fúziós glikoproteinnek nevezzük [20]. A szár doménon helyeződik el a membránfúzióért felelős peptid (F), a HA2 ektodomén része, valamint a transzmembrán rész (TM) [19]. Ez utóbbi közvetlen kapcsolatban van az M fehérjével [21]. Ennek megfelelően látható a HA fehérje sematikus felépítése a 2. ábrán. Mutációk bekövetkezhetnek azon génekben, amelyek az RBD, vagy annak szomszédságában lévő aminosavakat kódolják [21]. Ez eredményezi többek között az influenzavírusok nagyfokú változékonyságát. A vírus receptorkötő helye a megfertőzendő sejt felületén található szialinsav-tartalmú receptorhoz kapcsolódik [22]. Attól függően, hogy a szialinsav milyen kötéssel kapcsolódik a galaktózhoz, az eltérő influenzavírusok különböző gazdafajokat preferálnak. Ennek megfelelően α 2-6-kötés esetén embert és sertést, míg α 2-3-kötés esetén madarakat, valamint lovakat fertőz meg [22]. Ezt a preferenciát a HA receptorkötő helyének aminosav-szekvenciája határozza meg.



2. ábra: A, a haemagglutinin fehérje alegységekre bontott sematikus szerkezete (alfainfluenzavírus).
 B, a HA monomer szerkezeti felépítése, kiemelve a feji (head) és a szár (stalk) domént.
 C, a HA fehérje trimer komplexet formáló szerkezete.

Forrás: [19]

3.1.2. Sertésinfluenza

A sertésinfluenza (SIV) egy világszerte endémiásan jelen lévő kórokozó, mely képes nagy gazdasági károkat okozni a sertéstartó üzemekben. A vírust már a XX. század elején leírták és a Spanyolnátha kórokozójával hozták összefüggésbe. Későbbiekben ki is mutatták, hogy a két vírus genetikai rokonságban áll. Jelenleg három altípust lehet megfigyelni a sertés populációkban: a H1N1-et, a H1N2-t és a H3N2-t [14]. Az 1918-ban megjelent influenzavírus a pandémia során mehetett át a sertésekbe. Ez volt a klasszikus sertés H1N1 influenzavírus, amely elterjedt Észak-Amerikában és Ázsiában. A későbbiekben, 1976-ban megjelent Európában is. Három évvel később, 1979-ben mutattak ki egy újabb törzset, amelyet Eurázsiai madárszerű sertés H1N1 influenzavírusnak neveztek. Ez átvette a korábbi törzs helyét a sertéspopulációban. A vírus a későbbiekben többször rekombinálódott

különböző humán influenzavírusokkal. Ez által alakultak ki a már korábban említett altípusok: a H1N1, a H1N2 és a H3N2. 2009-ben jelent meg egy új H1N1 influenzavírus, amely pandémiát okozott. Név szerint a A(H1N1)pdm09 vírus egy tripla reassortáns vírus és az Eurázsiai madárszerű sertés H1N1 kombinációjából jött létre. Ebből is következik, hogy ez a vírus sertés eredetű volt [23].

A vírus általában külső forrásból, új, fertőzött állat behurcolásával kerül be a telepre. Ebben szerepet játszhat a sertés, az ember és a vadmadarak is. Ez utóbbiak a vírus természetes rezervoárjai. Aerogén úton, a légúti váladékokkal terjed aeroszol formájában, vagy direkt kontaktus során. Előbbi terjedési móddal a vírus viszonylag gyorsan képes az állomány nagy részében megjelenni, akár 100%-os morbiditást elérve [12].

A SIV a száj és orrüreg nyálkahártyáján keresztül jut be a szervezetbe, majd az alsó- és felső légutak epitél sejtjeiben szaporodik. Általánosságban a sertésinfluenza vírus az alsó légutak hámsejtjeit preferálja, azaz elsősorban a tüdőben okoz elváltozásokat [24]. Az okozott léziók egy része a vírus közvetlen hatásának tekinthető, a másik része a gazdaszervezet immunreakciójának következménye. A természetes ölüsejtek elpusztítják a vírus által fertőzött sejteket. Eközben gyulladáshoz vezető mediátorok szabadulnak fel. Ezek elsősorban különböző citokinek, mint az interleukinok (IL) – főként az IL-1 és az IL-6 – vagy az interferonok (IF α , IF γ), illetve a tumor nekrozis faktor (TNF) [25]. Pozitív jelzésként (ún. kemotaktikus ingerként) szolgálnak az immunrendszer sejtjeinek, főleg a neutrofil granulocitáknak, monocitáknak és a belőlük származó makrofágoknak, valamint a limfocitáknak is. Ezek a sejtek megjelennek a fertőzés helyén. A limfociták közül a citotoxikus T-sejtek elpusztítják a fertőzött sejteket, még a B-sejtek feladata főleg a nyálkahártyák védelmében részt vevő immunglobulin-A (IgA), valamint a vérkeringésben megjelenő IgG termelése. Ezek összessége felelős a kialakult elváltozásokért.

A sertésinfluenza elsődlegesen légzőszervi tünetekben megnyilvánuló betegség, amely köhögéssel, nehezített légzéssel és magas lázzal (40,5-41,5 °C) jár. A testhőmérséklet emelkedése miatt az állatok elfeksznek, étvágytalanok, legyengülnek. Orrfolyás és könnyezés is megfigyelhető. A gazdasági károkat a másodlagos fertőzések jelentik, de a kifejezett láz miatt szaporodásbiológiai problémák, mint a vetelés, halvafialás is előfordul. A lappangási idő jellemzően 1-3 nap, majd az esetek többségében az állatok 5-7 nap alatt gyógyulnak [12]. Ebből következtethető, hogy a betegség alacsony mortalitással jellemezhető, viszont ezzel szemben a morbiditás közel 100%-os. A betegség lefolyását, valamint kimenetelét számos külső és belső tényező is befolyásolja, mint például a tartástechnológia, a környezet szennyezettsége, a takarmányozás, az állatok kora, valamint

főleg a bakteriális másodlagos fertőzések [26]. Utóbbi során a vírus mellett megjelenhet *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, valamint *Haemophilus parasuis* is. Ezek a kórokozók a tünetek súlyosbodásához vezethetnek. Az így kialakult kórképet nevezzük ma a sertés légzőszervi betegség komplexének (PRDC=Porcine respiratory disease complex) [27].

Patognomikus tünetek hiányában az influenza vírusok diagnosztikája laboratóriumi vizsgálatokon alapul. Elkülönítünk direkt, valamint indirekt kimutatási módokat. Előbbi esetben a kórokozót, annak antigénjét mutatjuk ki, ezzel igazolva a fertőzést. Erre használható a polimeráz-lánreakció (PCR), mely ma már széles körben elterjedt módszer. Előnye, hogy gyors, valamint kis mennyiségű mintából is képes megbízható eredményt adni. Az influenzavírusok esetében ún. reverz transzkripciós polimeráz-lánreakció (RT-PCR) használatos, mely során a folyamat elején a vírus RNS-ét átírjuk dezoxiribonukleinsavra (DNS). A kórokozó emellett kimutatható direkt vírusizolálással, melyhez embrionált tyúktojást, vagy különböző sejtvonalakat (leggyakrabban Madin-Darby kutyavese-MDCK) használnak. A vírus felületi fehérjéje, a HA a nevéből is adódóan képes a vörösvértestek összecsapására, haemagglutinációra. Ezt a diagnosztikában is fel lehet használni többek között csirkevér segítségével [28]. Emellett használhatók még antigént kimutató enzimhez kötött immunoszorbens assay (ELISA) kitek is. Indirekt módszerek esetében a kórokozó ellen termelt ellenanyagok kerülnek detektálásra. Erre alkalmazható haemagglutináció-gátlási próba, ELISA, valamint vírusneutralizációs próba.

3.2. Coronavírusok

A Coronavírus név az elmúlt években széles körben megismertté vált, melynek oka természetesen a COVID-19 világjárvány volt. A Coronavírusok 60-160 nm átmérővel rendelkeznek. A *Nidovirales* rend tagjai, azon belül a *Coronaviridae* családba tartoznak. A családba három alcsalád tartozik, melyek közül ezen dolgozat szempontjából az *Orthocoronavirinae* alcsalád emelendő ki. Ezen belül 4 genust különítünk el: az *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, és a *Deltacoronavirus* genust [3]. A sertést fertőzni képes vírusok a *Gammacoronavirus* genus kivételével bármelyik nemzetséghez tartozhatnak. Az *Alphacoronavirus* nemzetségbe sorolandó a transzmisszibilis gastroenteritis vírus (TGEV=transmissible gastroenteritis virus), valamint ennek a deléciós mutánsa, a sertés légzőszervi coronavírusa (PRCoV=porcine respiratory coronavirus) is. Szintén ezen nemzetségbe tartozik még a sertések játványos hasmenésének vírusa (PEDV=porcine

epidemic diarrhea virus). A *Betacoronavirus* genus tagja a sertések agy- és gerincvelő gyulladását okozó haemagglutináló coronavirus (PHEV=porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus). A *Deltacoronavirus* genus szintén tartalmaz sertéseket fertőzni képes coronavírust (PDCoV=porcine deltacoronavirus). A coronavirusok változékonyságát mutatja, hogy sertésekben megállapításra került egy rekombináns vírus is, a sertések enterális coronavirusa (SeCoV), mely a TGEV és a PEDV rekombinációjából jött létre. Ez a vírus egy TGEV alappal rendelkezik, azonban PEDV-re jellemző tüskefehérje gént hordoz [29]. Emellett nemrégiben leírták a sertés akut hasmenés szindróma coronavirusát (SADS-CoV) is [30].

3.2.1. Szerkezet

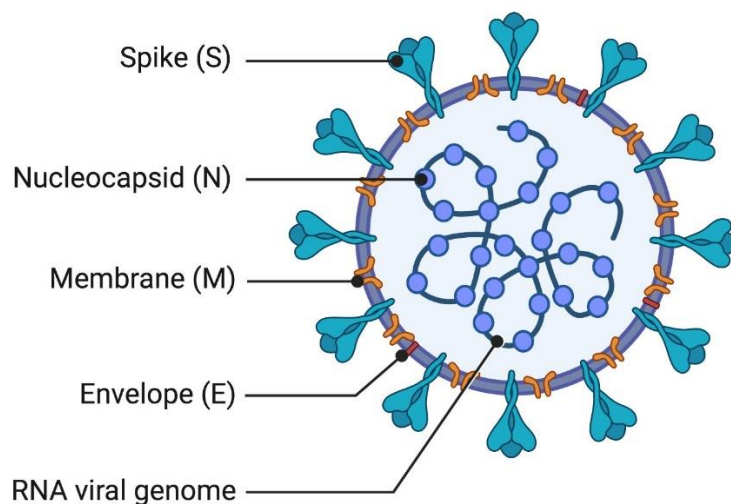
A sertés coronavirusok, mint minden coronavirus pozitív, szimpla szálú RNS genommal rendelkeznek, mely nagyjából 25-30 kilobázisból áll. Pleomorf alakjukat kívülről burok fedi, mely a vírus szaporodását követően a gazdasejtből való kijutás során kapcsolódik hozzá a sejtmembránból [12]. Utóbbinak köszönhetően a legtöbb coronavirus a környezetben detergens oldószerekkel inaktiválni lehet. A legtöbb coronavirus 4 struktúrfehérjéből épül fel: a felületen található tüskefehérjéből (S protein), a burok fehérjéből (E protein), a membrán fehérjéből (M glycoprotein) és a nukleokapszid fehérjéből (N protein) (3. ábra). Ezekon kívül a Bétacoronavirusok rendelkeznek haemagglutinin-észteráz fehérjével is [31].

Az antigenitás szempontjából az S fehérje a legfontosabb, ezért főleg ezzel foglalkozunk.

Az S fehérje felelős a különböző sejtek fertőzéséért. Ezen található meg azok a részek, melyek lehetővé teszik a felületi receptorokhoz való kötődést, valamint a membránfúziót. Ennek a két folyamatnak köszönhetően jut be a megfertőzendő sejtbe a vírus, majd kezdődik meg az új vírus partikulák kialakulása.

Szerkezetileg a fehérje egy rövid farki részből, egy transzmembrán részből, valamint a vírus burkán kívül elhelyezkedő, ún. ektodoménből (extracelluláris domén) épül fel. Utóbbin található a fehérje N-terminális része, míg a farki részen a C-terminális. Az S protein a hasítási helyének megfelelően két alegységre osztható. Az egyik az N-terminális résznél található globuláris, ún. feji rész. Ezt S1 alegységnek nevezzük [33]. Ez az alegység 3 monomerből áll, így kialakítva egy trimert [34]. A súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó coronavirus 2 (SARS-CoV-2) esetében minden egyes monomeren található egy-egy receptorkötő domén (RBD) [35]. Emellett az S1 alegység ellen képes az immunrendszer neutralizáló ellenanyagokat termelni. A másik része az S fehérjének az S2 alegység. Ez egy

vékonyabb, szár formát alkot, valamint ez felelős a virális- és a sejtmembrán fúziójáért [33]. Az S protein, elsősorban az antigenitásért felelős része, az idő folyamán folyamatos evolúción ment keresztül. Ennek egy megjelenési formája a sertések légzőszervi coronavírusa (PRCoV), mely a TGEV-ből alakult ki. Az S fehérjét kódoló génszakaszban deléció, azaz genetikai információ kiesése következett be. A deléció különböző helyeken alakult ki a 621-681-es nukleotidok között [36]. Ezt a változást az S protein szerkezetében összefüggésbe hozták a vírus megváltozott szöveti tropizmusával [37].



3. ábra: A Coronavirus sematikus szerkezete. Az ábrán látható a tüskefehérje (S), a nukleokapszid (N), a membrán fehérje (M), a burok fehérje (E), valamint a vírus genomja. A kép forrása: [32]

A coronavirusok kapcsán az elmúlt években számos receptort azonosítottak, melyekhez az S fehérje képes kötődni. Ezek a következők: az angiotenzin-konvertáz enzim 2 (ACE2), az aminopeptidáz N (APN), a dipeptidil-peptidáz 4 (DPP4) és rágcsáló carcinoembrionális antigénnel rokon sejtadhéziós molekula 1 (mCEACAM1) [33].

3.2.2. Sertés coronavirusok

TGEV, PRCoV:

A sertések transzmisszibilis gastroenteritis vírusa (TGEV) egy korábban nagy jelentőséggel bíró kórokozó volt, mivel világszerte a nagyüzemi telepeken tömeges malacelhullásokat okozott. Mára ezek a heveny járványok megszűntek, ami a vírus deléciós mutánsának köszönhető. Ez a sertések légzőszervi coronavírusa (PRCoV), mely 1984-ben jelent meg Belgiumban [38], majd világszerte elterjedt. A PRCoV szerkezeti hasonlóságából

eredendően keresztvédtettséget biztosít a TGEV-vel szemben [39], ami a klinikai tünetekkel járó megbetegedések előfordulását lecsökkentette. A TGEV elsősorban a vékonybél hámsejtjeiben képes elszaporodni. A sejtek fertőzése a bélbolyhok megrövidüléséhez vezet. Ennek következtében a felület csökken, ami felszívódási zavart okoz. A vírus szaporodását kimutatták még az emlőmirigy sejtjeiben, valamint a tüdőben [12]. A PRCoV ezzel szemben az alsó-, és felső légutak epitél sejtjeit, a pneumocitákat és az alveolaris makrofágokat képes megfertőzni. A fertőzés többnyire tünetmentes, de ritkán intersticiális tüdőgyulladás alakulhat ki [40]. A tünetek legtöbbször társfertőzések háttérében találhatóak meg, melyek között mycoplasma, influenza, vagy a sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírusa (PRRS) okozhat. Ilyen esetekben előfordulhat nehézlégzés, köhögés [12]. A TGE járványtanilag két megjelenési formában fordul elő. Az epidémiás forma elsősorban a téli időszakban jelentkezik fogékony, szeronegatív állományokban. Itt képes gyors terjedésre, közel 100%-os morbiditást elérni 2 hetes kor alatti malacokban [41]. A betegség sárgásfehér hasmenéssel, hányással, étvágytalansággal jár. Az elhullás oka a következményes metabolikus acidózis, kiszáradás és hiperkalémia. Idősebb állatokban többnyire tünetmentes, laktáló kocákban jelentkezhet étvágytalanság és tejtermelés csökkenés vagy elapasztás, melyek a malacok túlélési esélyeit tovább csökkenthetik [12]. A másik megjelenési formája a betegségnek az endémiás TGE. Ez olyan nagyüzemi telepeken fordul elő, ahol a vírus perzisztensen jelen van, az állomány áthangolódott. A betegség megjelenése szempontjából hajlamosító tényező a magas ellétforgó, valamint az állományok keveredése. Az epidémiás formához képest itt egy lassabb terjedés tapasztalható, a mortalitás is jóval alacsonyabb, valamint a tünetek is enyhébbek [41]. Ugyan mára a TGEV prevalenciája jelentősen lecsökkent, mégis a mai napig kimutathatóak a különböző törzsek a sertésállományokban, például Kínában [40]. Emellett megfigyelhető, hogy a vírus folyamatos evolúción megy keresztül, újabb rekombinánsok, mutánsok alakulnak ki, melyek akár magasabb virulenciával is rendelkezhetnek elődjeiknél [40].

PEDV:

A sertések járványos hasmenésének vírusa (PEDV=Porcine epidemic diarrhoea virus) számos tulajdonságában hasonlít a TGEV-re. A betegséget először Angliában, 1971-ben észlelték növendékekben, valamint hízó sertésekben [12]. Ezt a klasszikus PEDV okozta, majd 2010-től új típusú PDEV törzsek okoztak járványokat. Két törzs tartozik ide: az S InDel törzs és a non-S InDel törzs. Az S InDel törzs a vírus S-protein S1 alegységén tartalmaz inzerciókat (In) és deléciókat (Del) [42]. Erre a törzsre alacsonyabb virulencia és patogenitás jellemző [43]. A non-InDel törzsek ilyen eltéréseket nem tartalmaznak. Az okozott tünetek

nagyban hasonlítanak a TGEV által okozott tünetekre. Itt is jellemző a profúz hasmenés, hányás és étvágytalanság [12]. A mortalitás szintén a fiatal, 2 hetes kor alatti egyedekben magasabb, általánosságban 50-100% között mozog. A morbiditás a már coronavírusoknál megszokott közel 100%-os mutatóval jellemezhető [42, 44]. A TGEV-vel ellentétben a vírust kimutatták vastagbél epitéliumban [45], valamint kripta-sejtekben is [46]. A TGEV esetében tisztázott és fontos szerepet betöltő pAPN (sertés aminopeptidáz N) receptor szerepe egyelőre tisztázatlan [44]. Az bizonyítást nyert, hogy a már influenza vírusoknál is megismert szíalsavak, mint a Neu5Ac (N-Acetilneuraminsav) koreceptorként részt vesznek a PEDV sejtbejutása során [47].

További sertés coronavírusok:

Dolgozatom során elsősorban a TGE- és PRCo-vírusokra fókuszáltam, de a PEDV vizsgálatát is elvégeztük. További sertés coronavírusokkal nem foglalkoztunk, ezért ezekről csak röviden emlékezem meg.

A sertés enterális alfacoronavírusát (SeACoV) 2017-ben Kínában mutatták ki először [30], súlyos, akut hasmenéses szopós malacokból. A kórokozó másik elnevezése a sertés akut hasmenés szindróma coronavírusa (swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV) [48]. A vírus denevér-vírus eredetű. Az S-protein szerkezete alapján feltételezhető, hogy alfa-, és betacoronavírus rekombinációjából jött létre [49].

A PHEV haemagglutináló *Betacoronavirus* [3]. A magas mortalitása miatt nagy károkozásra lenne képes [50], azonban klinikai manifesztációra ritkán kerül sor a kolosztrális immunitás miatt [51]. A vírus idegrendszeri formája 3 hetes kor alatt jelentkezik, remegéssel, görcsökkel, garatbénulással, ataxiával és a végtagok bénulásával. Másik formája a „vomiting and wasting syndrome”, mely a 4-6 hetes malacok lesóványodásával, hányásával és kiszáradásával jár [12].

A sertés deltacoronavírus (PDCoV) a *Deltacoronavirus* nemzetségbe tartozik [3, 52]. A megbetegedés enyhébb tünetekkel és alacsonyabb mortalitással (30-40%) jár újszülött malacokban [12]. Számos más állatfaj APN-receptorához is képes kötődni, köztük az emberéhez, mely felveti ugyancsak a zoonótikus potenciál kérdését [44], de receptor hiányában is képes fertőzni [53].

3.3. A fertőzések szempontjából fontos receptorok

APN:

Az aminopeptidáz-N (APN) egy transzmembrán fehérje, amely peptidáz aktivitással bír. A receptor számos különféle sejten megtalálható, mint például az egyes immunsejteken, a

bélműsejteken, valamint még az idegrendszer egyes sejtjein is [54]. A receptort számos alfacoronavírus használja. Ezek közé tartoznak az alfacoronavírus-1 fajba tartozó kórokozók, mint a kutya coronavírusa (CCoV), a macska coronavírusa (FCoV), valamint két sertés coronavírusa: a TGEV és a PRCoV [33]. Emellett a PEDV-nél szintén felmerült az APN receptor használata, azonban ez egyelőre tisztázatlan [42]. Ezenkívül egy humán patogén vírus, a HCoV-229E is ide tartozik [33]. Az *Alphacoronavirus* genus mellett a *Deltacoronavirus* nemzetségbe tartozó PDCoV szintén ezen fehérjéhez képes kapcsolódni [44]. Fontos kiemelni, hogy a különböző vírusok alapvetően a megfertőzendő állatfajnak megfelelő specifikus APN-t képesek használni. Ez alapján a sertés coronavírussok a sertés aminopeptidáz N-hez (pAPN) tudnak kötődni. Ez alól kivételt képez a macska aminopeptidáz N (fAPN), amelyet a TGEV, a CCoV, az FCoV, valamint a HCoV-229E is képes használatba venni [55].

Sziálsav:

A sziálsav (N-acetil neuraminsav) egy 9 szénatomból álló vázzal rendelkező monoszacharid, amely a szervezetben és a szövetekben széles körben megtalálható. A sejtek felületén gangliozidokhoz, glikolipidekhez, vagy glikoproteinekhez kapcsolódva található meg [33, 54]. Fontos kiemelni, hogy az influenzavírusok szintén a sziálsavat képesek receptorként használni. Lényeges különbség azonban, hogy a coronavírussok nem elsődleges receptorként veszik igénybe a sziálsavat, hanem csak mint kiegészítő faktort. Ez elősegíti a vírus-sejt kapcsolat kialakulását és a sejtek fertőzését. A sziálsavhoz az S1 alegység N-terminális része (NTD) képes kötődni. A coronavírussok közül számos genus tagjai képesek a sziálsavhoz kapcsolódni. Ide tartozik az *Alphacoronavirus* genus tagjai közül a TGEV és a PEDV [54]. A TGEV deletálódott mutánsa, a PRCoV azonban elvesztette ezt a képességét. Ez alapján feltételezhető, hogy a sziálsavhoz való kötődés képessége befolyásolja a szöveti tropizmust, valamint a patogenitást [56]. Emellett a mucinhoz való kötődés elősegítheti ezen enteropatogén alfacoronavírussoknak a bélműsejtek fertőzését. A betacoronavírussok közül a szarvasmarha coronavírusa (BCoV), az egerhepatitis vírusának (MHV) JHM-törzse, a HCoV-OC43, a HCoV-HKU1, a MERS-CoV és a PHEV képes kötődni a 9-O-acetilezett sziálsavhoz [54]. Ezek közül a MERS-CoV az α 2,3-kötésben lévő sziálsavakat preferálja [57] a fertőző bronchitis vírusához (IBV) [33], valamint a madarak influenzavírussaihoz hasonlóan. Az MHV JHM-törzse abból a szempontból különleges, hogy az NTD képes kötődni mind a fehérje receptorához (mCEACAM1), mind pedig a sziálsavhoz [54]. Ezek mellett a SARS-CoV-2-nél is leírták a sziálsav koreceptorként való használatát [58]. A *Gammacoronavirus* genusba tartozó IBV szintén képes kapcsolódni a sziálsavhoz [59]. A

Deltacoronavirus nemzetségbe sorolandó PDCoV-nál szintén kimutatták a szénhidrátokhoz való kötődést, azonban ezen a területen további vizsgálatokra van szükség [60].

Az influenzavírusok olyan szíálsavakat használnak receptorként, melyek galaktóz molekulákhoz kapcsolódnak. A HA fajspecifitását a galaktózmolekula-szíálsav kötése határozza meg. A madárinfluenza vírusok esetében ez α -2,3 kötés, még az emberekben megtelepedő vírusokéban α -2,6. A sertések légúti hámsejtjei mindkét kötést hordozzák, ezért bennük mindkét fajt megbetegítő vírus képes megtelepedni. Ezért tekinthetők az influenzavírusok „keverőtégelyének” [76, 77, 78]. Az aminosav-változással járó mutációk képesek a gazdaspektrumot is megváltoztatni a kötőképesség változtatása miatt, de a sejtropizmusra, illetve neutralizáló ellenanyagokra is befolyással lehet. A kötődő HA fehérjéket enzimek hasítják. A hasítás gyorsasága a patogenitásra van hatással [76].

4. Célkitűzések

A vizsgálataink célja, hogy sertések esetében a koronavírusok és influenzavírusok együttes hatását vizsgáljuk. Ehhez felső légúti tüneteket mutató különböző korú állatokból mutattunk ki vírusokat PCR és gyorseszteszt segítségével, illetve szerológiai vizsgálattal a megjelenő ellenanyagot is vizsgáltuk. Emellett sejttenyészetben (MDCK) együtt szaporítottuk el a vírusokat különböző koncentrációban. A látható citopatogén (CPE) hatás mellett a vírusokra jellemző citokinszintet is néztük.

5. Anyag és módszer

5.1. Minták

A vizsgálatainkhoz felhasznált mintákat négy különböző sertéstelepről szereztük be 2022 decemberében. Ezeken a telepeken azokból az állatokból vettek száraz orrtampon mintát, amelyek felső légúti tüneteket mutattak, jelen esetben köhögtek. A kapott mintákat az 1. táblázat mutatja be. Az első telepen 2022. tavaszán egy másik diagnosztikai laborban elvégzett influenza PCR eredménye alacsony titerben pozitív eredményt adott. A minta tárolása a további vizsgálatokra alkalmatlannak bizonyult, ezért innen kétszer érkezett 3, 4, 5, 6, 7 és 8 hetes malacokból orrtampon minta. A száraz orrtamponokat megérkezésüket követően 7,4-es pH-jú, izotóniás, foszfáttal pufferolt sóoldatba (PBS) helyeztük, ezzel kioldva belőlük a keresendő vírusokat. Az alvadásban gátolt vérmintákról a plazmát leszívtuk és a nem gátolt vérmintákról származó savóval 20 °C-on tároltuk. Az alvadásában gátolt vérmintákból a fehérvérsejteket szelektív lízis után esetleges további felhasználásig - 80 °C-on tároltuk. A szelektív lízis Dr. Tuboly Tamás leírását követi (a laboratórium dolgozóinak személyes közlése).

1. táblázat: A felhasznált mintáink

Telepek:	Korosztály	Minta
1. telep*	3-4 hetes kor	Orrtampon + vér
2. telep	3-9 hetes kor 2-5 hetes kor	Orrtampon Vér
3. telep		
1. telephely	34, 55, 69 napos kor	Orrtampon + vér
2. telephely	25, 70, 46 napos kor	Orrtampon + vér
4. telep	Növendék	Orrtampon

* A 2023-ban érkezett mintákat a táblázat nem tartalmazza.

5.2. Direkt víruskimutatás

5.2.1. Nukleinsav kivonás

A tamponokat a vizsgálatok során nem külön-külön egyesével vizsgáltuk, hanem a mintákból poolokat képeztünk. Ezt mutatja be a 2. táblázat.

A vírusok örökítőanyagának kivonásához Zymo Research (USA) Quick Viral DNA/RNA kit-et alkalmaztuk. Ehhez 400 µl mintát készítettünk elő, majd a gyártó

utasításának megfelelően vontuk ki a nukleinsavat. A kivonás végén 50 µl desztillált vízben oldott RNS-t kaptunk.

2. táblázat: A minták poolozása

Telepek	Orrtampon minták száma	Képzett pool-ok
1. telep*	15 db minta	3 pool (5 minta/pool)
2. telep	Korcsopontonként 14 db minta, összesen: 98 db	3 pool korcsopontonként: 4/5/5 minta/pool
3. telep		
1. telephely	60 db minta/3 istálló	4 pool/1 istálló (5 minta/pool)
2. telephely	20 db minta – 1. istálló	4 pool (5 minta/pool)
	20 db minta – 2. istálló	4 pool (5 minta/pool)
	7 db minta – 3. istálló	2 pool (4 és 3 minta/pool)
4. telep	10 db minta	Egyesével vizsgálva

* A pozitív eredmény után érkezett mintákat a táblázat nem tartalmazza, mivel ezeket egyénileg vizsgáltuk meg.

5.2.2. PCR vizsgálat

A kinyert nukleinsavak vizsgálatát polimeráz-lánreakció (PCR) módszerrel végeztük el. Ez egy olyan molekuláris biológiai technológia, mely során a vizsgálandó nukleinsav szakaszokat amplifikáljuk (megsokszorozzuk). Jelen esetben ún. reverz transzkripció PCR-t alkalmaztunk, mivel a vizsgálandó vírusaink (TGEV, PRCV, PEDV és SIV) RNS-t tartalmaznak. Emiatt szükséges a hagyományos PCR vizsgálatához képest beiktatni egy plusz lépést, amely során az RNS-t átírjuk cDNS-re. Ehhez a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fischer Scientific, USA) kitet használtuk a gyártó utasításának megfelelően, 10 µl nukleinsav mintához. Jelenleg forgalmaznak olyan rendszereket is, melyekben az átírási lépéseket is tartalmazza a PCR reakció. Témavezetőm a külön lépésben való átírást preferálja, főleg abban az esetben, amikor az átírt RNS több vizsgálatához is szükséges lehet.

Ezt követően a PCR reakcióhoz a Thermo Fischer Scientific cég (USA) DreamTaq Green PCR DNA Polymerase enzimjét (5U/µl) alkalmaztuk. A DNS szálak felépítéséhez szükséges nukleotidokat szintén a Thermo Fischer Scientific cég dNTP Set-jéből rendeltük. A megfelelő DNS szakaszhoz kapcsolódó primereket irodalmi adatok alapján választottuk ki és a Merck cégtől (USA) szereztük be (3. táblázat). A reakcióhoz az átírt cDNS-ből 5 µl-

t használtunk fel. A PCR reakció mintánként 5 µl DreamTaq Green puffert (10X), 1-1 µl forward és reverz primert (25 µM), 1 µl dNTP mixet (10 mM), 1 U enzimet tartalmazott, melyet 40 µl Milli-Q vízbe (Merck, USA) kevertük el. Ugyan sokan a reakciót 10-20 µl térfogatban alkalmazzák, de témavezetőm szerint a felhasznált anyagok koncentrációja töményebb, ezért lesz kevesebb a végső oldat. A mérési pontatlanság miatt preferálja a nagyobb térfogatot.

3. táblázat Az általunk használt primer-ek

Primer neve	Írány	Szekvencia	Kimutatható vírus	Hiv.
SVIP-MP-F	F	5'-GGCCCCCTCAAAGCCGA-3'	Influenza-vírus	[61]
SVIP-MP-R	R	5'-CGTCTACGYTGCAGTCC-3'		
Co-F	F	5'-TGATGATGSNGTTGTNTGYTAYAA-3'	Corona-vírus	[75]
Co-R	R	5'-GCATWGTTRTGYTGNGARCARAATTC-3'		
TGE2	F	5'-TAAGGAAGGGTAAGTTGCTCA-3'	TGEV vagy PRCoV	[62]
TGE3	R	5'-TGGTCCATCAGTTACGCCGAA-3'		
TGEN F	F	5'-GCAGGTAAAGGTGATGTGACAA-3'	TGEV és PRCoV	[63]
TGEN R	R	5'-ACATTCAGCCAGTTGTGGGTAA-3'		

A PCR reakciók során 3 lépés különíthető el, amelyek ciklusokban ismétlődnek meg átlagosan 35 alkalommal. Nulladik lépésként a nukleinsav előmelegítése történt 95 °C-on 10 percig. Ezt követte a ciklus első lépése, amely során a DNS szálak szétválása történt meg 95 °C-on, 30 másodperc alatt. Ezt a lépést nevezik denaturálásnak. A második lépés a primerek kapcsolódása a DNS megfelelő szakaszához (annealing). Ez utóbbi 55 °C-on történt a koronavírusok esetében, míg az influenzavírus esetén 60 °C-on, 30 másodperc alatt. A harmadik lépés során történt meg a lánchosszabbítás, 72 °C-on, 40 másodpercig, majd 72 °C-on, 7 percen keresztül végeztük. Ez alatt a DNS polimeráz enzimünk létrehozta a komplementer szálát. A PCR reakcióhoz a TGradient Thermocycler (Biometra, Németország) készüléket használtuk.

A PCR során keletkezett DNS termékek azonosításához agaróz-gél-elektroforézist alkalmaztunk. Ennek alapja, hogy a negatív töltéssel rendelkező DNS a pozitív töltésű anód felé vándorol. A DNS szálak így méretük alapján, egy DNS-létra segítségével beazonosíthatók. Erre mi a DNA 1 kb ladder (Thermo Fischer Scientific, USA) molekulatömeg markert használtuk. A futtatást 2%-os agarózgélben (Lonza, Svájc) végeztük

el, 110 volt feszültségen. Annak érdekében, hogy a DNS mintáinkat láthatóvá tegyük, GR Safe DNA Stain I (Nzytech, Portugália) festéket használtunk. A futtatást körülbelül 20 percre végeztük.

Az elméletben influenza pozitív (tavaszi) minták esetében a PCR reakciót a Nemzeti Népegészségügyi Központ (NNK) munkatársai is megismételték, illetve vírusizolálás esetében a 3. passzázs után szintén náluk is végeztünk PCR vizsgálatot.

5.2.3. Influenza gyorseszteszt

Az alfainfluenzavírus direkt kimutatására egy gyorsesztesztet is alkalmaztunk. Ez a teszt a CerTest Influenza A+B Tube Test (Spanyolország). A vizsgálathoz szintén poolozott, PBS-ben feloldott orrtampon mintákat használtunk. Poolonként 100 µl-t használtunk a teszthez a gyártó utasításának megfelelően.

5.2.4. Vírusizolálás sejtenyészeten

Kutatásunk során kontrollként, illetve vírusneutralizációhoz is mind influenza-, mind coronavirus referenciatörzseinket elszaporítottuk egyrétegű sejtenyészeten. A sertés transzmisszibilis gastroenteritis (TGE) vírusának laboratóriumi referenciatörzse Kanadából származik. Dr. Tuboly Tamás sertés heresejteken (STC sejtek, ATCC, USA) szaporította el, ezért mi is ezt használtuk. A liofilizált vírust 1 ml tápfolyadékba vettük fel.

Az STC szaporításához 15 ml RPMI 1640 (Merck, USA) tápfolyadékot használtunk. Tápanyagforrásként magzati szarvasmarhaszérumot (FBS, Merck, USA) alkalmaztunk 5%-os arányban, az esetleges bakteriális, illetve gombás fertőzések ellen 10 ml/l mennyiségben antibiotikum és antimikotikum oldatot (Antibiotic Antimycotic Solution, Merck, USA) adtuk a tápanyaghoz.

Amikor a második passzázs elérte a 90%-ot, akkor a tápfolyadékot lecseréltük olyan RPMI1640-re, mely nem tartalmazott FBS-t, csak antibiotikumot és 100 µl vírussal fertőztük meg. A szövetyenyészeten a vírus szaporodását a 3. napon citopatogén hatás jellemezte (sejtlekerekedés és leválás).

Az influenzavírus csak embrionált tyúktojáson, illetve MDCK sejten szaporítható a mi sejteink közül, ezért a TGE törzset hozzászoktattuk ehhez a sejthez. Ehhez a lentebb leírt módszert alkalmaztuk, mert a tripszinnel kezelt sejtekbe a vírus könnyebben be tud jutni.

Az influenzavírus a PR8-as vírus (H1N1 strain A/Puerto Rico/8/1934), amely egy egérhez adaptált humán H1N1 influenzavírus törzs. A vírust MDCK sejteken (ATCC, USA) szaporítottuk el. Ez a sejtvonal egy 1958-ban izolált kutya vese tubulus sejtekből származik.

Médiumként az RPMI 1640-et (Merck, USA) használtunk. A sejtek tápanyagigényeinek kielégítésére 5%, hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérumot (FBS, Merck, USA) használtunk, valamint kiegészítettük 10 ml/l koncentrációjú antibiotikum és antimikotikum tartalmú készítménnyel (Antibiotic Antimycotic Solution, Merck, USA). Miután a sejtek a palack alját benőtték, megpasszáltuk azokat a vírusok felszaporításához. Ehhez 75 cm³ szövettenyésztő palackon (VWR, USA) szaporítottuk el a sejteket. Amikor nagyjából 90%-ban benőtték a sejtek a palackot, posztinokulációs médiumra cseréltük a tápfolyadékot (FBS mentes, 10 ml/l hőstabil tripszint - Thermo Fischer, USA -, antibiotikum és antimikotikumot - Merck, USA - tartalmazó RPMI 1640). Erre tettünk a PR8-as vírusból, TGEV-ből és az általunk PCR-rel kimutatott PRCoV-ból 100-100 µl-t (természetesen vírusonként külön palackot használtunk). A sejteket 37 °C-on inkubáltuk 5%-os CO₂ koncentráció mellett. Fénymikroszkóp segítségével mindennap kerestük a citopatogen hatás jeleit. A vírust a harmadik napon lefagyasztottuk -80 °C-ra.

A 2. és a 3. telep mintáival, illetve a tavasszal érkezett első telep mintáival direkt vírusizolálást is végeztünk. A mintákat egyesével (a második telep esetében poolozva) vizsgáltuk. MDCK sejteket fertőztünk meg 100 µl felhasználásával. Ezt előtte Millipore szűrőn (0,22 µm pórusátmérő; Merck Millipore, USA) átengedtük a bakteriális fertőzés elkerülése miatt. A protokoll a korábban leírtakkal megegyezett. A sejtek elszaporodását követően egy palack tartalmát egy 24 lyukú szövettenyésztő lemezre (Greiner Bio-One, Ausztria) helyeztük. Ezt követte 1 nappal később a mintákkal történő fertőzés, majd 1 héttel később passzáltuk a sejteket. A passzázsokat a korábban már leírt PCR módszerrel, valamint az influenza gyorseszteszt segítségével vizsgáltuk.

A vírusok közti interakció során 24 lyukú szövettenyésztő lemezt (Greiner Bio-One, Ausztria) használtunk. Amikor a szövet 95%-ban benőtte a palackot, a tápfolyadékot a már ismertetett módszer segítségével lecseréltük.

Az első vizsgálat során a vírusokat összekevertük (60-60 µl) és úgy mértük rá a lemezre. Mindkét vírust hígítottuk és a különböző víruskoncentrációkat mértük a lemezre. Kipróbáltuk az influenzát PRCoV-vel és TGEV-vel, valamint a TGEV-t PRCoV-vel is. A második vizsgálat során csak a TGEV-t és az influenza vírust használtuk. A lemezre külön-külön helyeztük rá a vírushígításokat, a két vírus között egy órát várva (a TGEV és az influenza vírus is került előbb a lemezre, és a két vírussal egyszerre is fertőztük a sejteket). A CPE hatás 3 nap után már detektálhatóvá vált.

5.3. Ellenanyag kimutatás

5.3.1. ELISA-vizsgálat

Ellenanyag kimutatásra egy ELISA kitet alkalmaztunk, amely képes a TGEV és a PRCoV ellen termelődött ellenanyagokat elkülöníteni. Ez a INgezim Corona Diferencial 2.0 kit (Ingenasa, Spanyolország). A tesztet a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el.

Miután a sejttenyészeteket megfertőztük influenza- és coronavírussal, ezzel a koinfekciót szimulálva *in vitro*, a felülűzőkből mintát vettünk. Ezekben a mintákban vizsgáltuk a sertés interferon-gamma citokin szintet egy ELISA teszttel. Ehhez a Porcine IFN-gamma ELISA Kit-et (Thermo Fisher Scientific, USA) választottuk, a vizsgálatot a gyártói ajánlásnak megfelelően végeztük el.

Az eredményeket a Labsystem cég (jelenleg Thermo Fischer Scientific, USA) Multiskan Ex ELISA olvasó használatával, az OD értékek alapján számoltuk ki. A citokin mennyiséget standardhez hasonlítottuk, míg a TGEV/PRCoV vizsgálatot az S/P értékek meghatározásával döntöttük el, bár mindkét teszt egyértelmű eredményeket adott.

5.3.2. Vírusneutralizáció

Vírusneutralizációt végeztünk PR8-as, valamint TGE-vírussal.

A 96 lyukú szövettenyésztő lemezre (Greiner Bio-One, Ausztria) a vírusizoláláshoz hasonlóan MDCK, valamint STC sejteket vittünk fel 10000 sejt/lyuk mennyiségben. Ezután megvártuk, míg a sejtek a lyukak 95%-át elfedték. Ezt követően a sejtekről kicseréltük a tápfolyadékot 100 µl posztinokulációs tápfolyadékra és inkubáltuk 1 órán át a vírus-vérsavó mixszel együtt 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében.

Amikor a sejteket a vizsgálatra alkalmasnak gondoltuk, a vizsgálandó savómintákat kettes alapon hígítottuk 96 lyukú steril hígítólemezen (Greiner Bio-One, Ausztria). Ezeket a 2. telep 2-5 hetes állataiból, valamint a 3. telepről kaptuk az 1. táblázatnak megfelelően. A vírushígítást a savóhígításra rámérve a már előzetesen meghatározott TCID₅₀-es vírusokkal végeztük 60 µl/lyuk térfogatban. Mindkét hígításhoz FBS- és tripszinmentes RPMI 1640-es médiumot (Merck, USA) használtunk, a keveréket 37 °C-on 1 órát inkubáltuk.

Amint az inkubációs idő letelt, a sejtekre rámértük a vírus-vérsavó mixből 100 µl-t és 3 napon keresztül inkubáltuk tovább 37 °C-on, 5% CO₂ mellett. Ez idő alatt naponta kerestük fénymikroszkóp segítségével a citopatogén hatás jeleit. A harmadik napon megfestettük a sejteket neutrálvörös festékkel (Merck, USA), majd vizsgáltuk az optikai denzitást. A festési eljárás forrása: [64]

6. Eredmények

6.1. Direkt víruskimutatás

6.1.1. PCR vizsgálat

Az influenzavírusra irányuló PCR vizsgálataink sajnos többnyire negatív eredménnyel zárultak. Egy telepen (2. telep) sikerült kimutatnunk a kórokozót az orrtampon mintákból. Itt a 4 és az 5 hetes állatok közül kerültek ki a pozitív minták. Előbbinél a 2. és a 3. pool, utóbbinál az 1. és a 3. pool adott pozitív eredményt. Érdekes módon a korábbi vizsgálatokban pozitív telepről érkezett mintákból nem tudtunk vírus nukleinsavat kimutatni. A vizsgálatot az NNK munkatársai is megerősítették.

A coronavirusok esetében a PCR vizsgálat pozitív eredményt adott PRCoV-re három telep esetében (2., 3. és 4. telep). Ugyanezt az eredményt kaptuk a kevésbé specifikus, Alphacoronavirusus genus kimutatására képes vizsgálattal is. A 2. telep poolozott mintái közül 18 db lett pozitív a 21 poolból. Itt a 3-9 hetes sertések közül a 3,5,7,8 és 9 hetes állatok mintáiból képzett poolok adtak pozitív eredményt, valamint a 4 hetes állatok mintái közül 1, a 6 hetes állatok mintái közül 2 pool volt pozitív. A 3. telep mintáinál a 22 poolból 18 pozitív eredményt adott. Ez a különböző korosztályok mindegyikénél körülbelül 75% pozitivitást jelentett. A 4. telep esetében 4 pozitív minta lett.

6.1.2. Influenza gyorsteszt

Az influenza gyorsteszt eredményei megegyeztek a PCR vizsgálat eredményeivel.

6.1.3. Vírusizolálás sejtenyészeten

A vírusizolálás sikeres volt, mind a TGEV, mind a PR8-as vírus esetében.

A direkt vírusizolálás során 1 nappal később már citopatogén hatás volt látható. A mintákkal fertőzött sejtek felülúszójából levettünk 100 µl-t, majd ebből kivontuk az RNS-t és PCR-rel vizsgáltuk. A 3. telep/2. telephelyen lévő 70 napos állatok 4 poolja közül 1 db pozitív eredményt adott. A PCR segítségével így egy légzőszervi coronavírust sikerült beazonosítani, amely képes volt az MDCK sejteken is elszaporodni.

Az egyes telepről érkező mintákat sejtenyészeten 3 vakpasszázs után sem tudtuk kimutatni.

Interakció vizsgálata:

A lemezeken a citopatogén hatás nagyjából koncentrációtól függetlenül látható volt. A vírusok csökkenésével arányosan az elhalt sejtek száma is csökkent.

A két vírussal egyidejű fertőzés esetében a várt eredménynek megfelelően a légzőszervi coronavírus izolátum enyhébb CPE-t mutatott. Ez különösen influenzavírussal együtt történt fertőzésnél volt szembeötlő.

A második kísérletnél (mikor egy órás különbséggel fertőztük a sejteket) markáns különbséget lehetett látni. A sejteket a két vírus egyidejű fertőzése károsította a legjobban az azonos víruskoncentrációkat figyelembe véve. A leggyengébb hatás akkor látszott, amikor a TGEV-re került az influenza vírusa.

Az interferon-gamma ELISA vizsgálat negatív eredménnyel zárult.

6.2. Ellenanyag kimutatás

6.2.1. ELISA-vizsgálat

Az ELISA-vizsgálat során a TGEV és a PRCoV ellen termelődött ellenanyag elkülönítése volt a cél. Erre egy blokkoló típusú ELISA-t használtunk. Itt a színreakció a negatív esetekben következett be, így az alacsony OD érték jelenti a pozitív eredményt. A lemez páros soraiban a TGEV ellen termelődött ellenanyagokat mutattuk ki, míg a páratlan sorok mindkét típusú ellenanyag jelzésére alkalmasak. Egyik telepen sem találtunk TGEV-re specifikus ellenanyagot. Kíváncsiságból a páratlan sorok esetében negatív kontrollként PEDV ellen termelt ellenanyagot is használtunk, mely a várakozásoknak megfelelően negatív eredményt adott.

6.2.2. Vírusneutralizáció

A TGEV-vel történő vírusneutralizáció sikeres volt. A 2. telep mintái közül a 2 hetes állatok mintái adtak pozitív eredményt. A három hetes malacok mintái negatív eredményt, vagy alacsony titeret mutattak. A 4 és az 5 hetes állatokban viszont találtunk neutralizáló ellenanyagokat. A 3. telep/1. telephely mintái közül csak a 69 napos állatokban mutattunk ki neutralizáló ellenanyagokat, a 34 és 55 napos állatok mintái negatív eredményt adtak. A 2. telephely mintái közül a 25 napos malacokban még nem találtunk, vagy csak alacsony titerben neutralizáló ellenanyagot. A 46 és 70 napos malacok mintái már magasabb titerben tartalmaztak immunglobulinokat.

A PR8-as influenzavírust nem sikerült neutralizálnunk egyik telep savómintáival sem.

A vírusneutralizáció és ELISA eredményeit összefoglaló táblázat (4. táblázat) témavezetőm sertés szakállatorvosi szakdolgozatából származik.

4.táblázat TGEV/PRCoV szerológiai eredmények

Telep	Minta	Vírusneutralizáció TGE vírussal									ELISA PRCoV		
		-	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	+	±	-
2	2 hét	1	0	4	4	5	0	0	0	0	13	0	0
2	3 hét	8	2	2	2	0	0	0	0	0	5	2	7
2	4 hét	3	1	1	0	3	2	3	1	0	10	1	3
2	5 hét	0	4	1	1	3	1	0	0	0	12	0	2
3/1	34 n	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
3/1	55 n.	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
3/1	69 n.	1	5	5	6	3	0	0	0	0	15	0	5
3/2	25 n.	12	4	3	0	1	0	0	0	0	3	0	27
3/2	70 n.	1	2	2	1	4	0	0	0	0	3	1	3
3/2	46 n.	0	0	0	0	3	2	8	6	1	20	0	0

n=nap

7. Megbeszélés

7.1. Direkt víruskimutatás

Mindkét vírus szövettanyészeten izolálható. A hőstabil tripszin felhasználása egy nagyon jó trükk a vírusok elszaporodására. Várakozásainknak megfelelően a két vírus egyikének kimutatása se ment gördülékenyen. Azzal, hogy olyan telepeket választottunk, ahol az influenzavírus jelen volt, részünkről tudatos döntés. Feltételeztük, hogy mivel a TGEV-t nem detektálták már egy ideje, de a PRCoV-t senki nem keresi, ezért valószínűleg jelen lehet a telepeken. A két vírus közti interakcióra akkor van a legnagyobb esély, ha az influenzavírus kimutatható. A vizsgált állatok légzőszervi tüneteket mutattak, de sajnos az influenzavírust csak egy telepen, a 4-5 hetes korosztályban mutatták ki. Járványtani adatok alapján a vírus ürítése két hét alatt le is csenghet, ezért még azon a telepen is, ahol aktuálisan a közelmúltban tényleg kimutatták a vírust, már nem tudtuk detektálni.

Magyarországon a PRCoV vizsgálata nem elterjedt. Mivel a vírus klinikai tünetekben nem manifesztálódik általában, ezért sem a vírus, sem az ellenanyag kimutatással nem foglalkozik senki. A TGEV utolsó kimutatása 2013-ban volt Magyarországon [62]. Azóta PEDV előfordulásáról vannak információink, illetve a rekombináns vírusról is. Az ellenanyagszintek vizsgálata alapján a telepeken a PRCoV ellen lehet ellenanyagot találni, de a veszélye fennáll egy TGE járvány kitörésének is [41]. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a légzőszervi coronavírus az általunk vizsgált telepeken – egy kivétellel – jelen van az orrváladékban. A kimutatott vírusok egyértelműen PRCoV-k, de szekvenciaanalízist nem végeztünk további meghatározásra. Egy esetben a vírust izoláltuk is, ezt az N2/3 néven -80 °C-on tároljuk.

Védő ellenanyagokat is lehetett találni. Együttműködés keretein belül szándékunkban áll egy közeli laboratóriummal dolgozni, akik más coronavírusokat is kimutathatnak a háttérből (akár gamma- vagy deltacoronavírusokat is). Jelenleg a rendszer beállításánál tartanak.

Egy olyan telepet találtunk, ahol a két vírus együttesen jelen volt, de izolálni csak egy esetben, a légzőszervi coronavírust lehetett. A mintákból nem volt elegendő, hogy a poolokat szétszedjük, és egyenként nézzük meg. Így elméletünket sem igazolni, sem cáfolni nem tudjuk, hiszen ebből nem következik, hogy egy állatból származnak-e. Amit biztosan kimondhatunk, hogy azon a telepen a két vírus jelen van, de a telepet ellátó állatorvos véleménye alapján az enyhe légzőszervi tüneteken (köhögés, orrfolyás) kívül mást nem

tapasztaltak. Az állatoknál lázat, étvágytalanságot, elfekvést nem figyeltek meg. Újabb mintákat kértünk, de a tavaszi időjárás a köhögések elmaradását hozta, így értelmetlen lett volna vizsgálni.

7.2. Indirekt víruskimutatás

Az influenzavírus ellen termelt ellenanyagok kimutatása sikertelen volt. Mivel a vírusneutralizációs teszthez csak egér PR8-as törzs állt rendelkezésünkre, az eredmény annyira nem meglepő. A törzs leírásában szerepelt, hogy a rokon antigének kimutatásánál a tesztek negativitása nem jelenti az ellenanyagok hiányát [65]. Ellenben egy publikáció alapján a humán vírusok esetében ugyan nem tisztázott a keresztneutralizáció, de megfigyelték, hogy a szezonális vakcinával oltott egyedek a pandémiás influenza ellen is védelemmel rendelkeztek [66].

Sertésből detektált vírus sajnos nem áll rendelkezésünkre. Az ismerten vakcinázott telepen sem tudtunk ilyen ellenanyagokat kimutatni (igaz, hogy ezen a telepen mutatható ki a vírus is). Előfordulhat, hogy a minták egyedi vizsgálatával kellett volna kísérletezni, ami abban az esetben meg is történik, amennyiben az erre beadott pályázat nyerni fog. A vérben lévő IgM és IgG vizsgálata egyszerű megoldásnak tűnhet, de egyáltalán nem biztos megoldás. Az IgM friss fertőzést jelent, de az antigénspecifitása rosszabb, az IgG jelenléte pedig nem jelenti a vírus jelenlétét. A nyálkahártya IgA tartalma lenne a legjobb választás. Annak detektálása nem egyszerű, a vérből az IgA kimutatása pedig ugyancsak kérdéses, rövid idejű stabilitásuk miatt. A memóriasejtek a teljes testfelületen jelen vannak, de ezek aktiválása nem jelent friss fertőzést [79]. Tanulásként levontuk, hogy mindenképpen sertésvírust kell izolálni, ezzel már tudunk heamagglutináció-gátlási próbát, vírusneutralizációt, immunfluoreszcens vagy akár ELISA vizsgálatokat is végezni, akár többféle ellenanyagra is.

A négy telepről háromból érkezett vérsavó (az első telepről a tavaszi időszakban, és mivel az influenza detektálása nem volt sikeres, így a neutralizációt el se végeztük a korábbi sikertelen tapasztalatok miatt). A második telepen a 2-5 hetes korosztályokból kaptunk mintát. A kocaállomány inaktivált influenzavírus vakcinát kapott. Irodalmi adatra alapozva a kolosztrális védelem 4-8 hetes korig tart [77], így a korosztály fertőződése ennek megfelelően alakult.

Mind a négy telep magas állategészségügyi státuszú telep, szigorú vakcinázási programok mentén védik az állatokat a fertőzésektől. A sertések légzőszervi coronavírusa

önállóan elváltozást ritkán okoz. Ezért a tünetek hátterében ugyan ott lehet a vírus, de nem önállóan okozza azokat. A telepek a másodlagos bakteriális kórokozókra a szakma szabályait betartva antibiotikumos kezelést alkalmaznak, a harmadik telep az autovakcinázás híve.

A második telepen a koronavírusok esetében az ellenanyagok az elvártnak megfelelően alakulnak. A jelenlévő légzőszervi vírus miatt a kocák kolosztrális védelme feltehetően két hétig tart, majd a malacok fertőződve aktív védelemre tesznek szert.

A harmadik sertéstartó telepen két telephely van. Kapcsolat a két telep között van, de a rendszer a fertőzések keveredését a lehető legjobban próbálja meg kivédeni. A telepet ellátó állatorvos szerint a telephelyre bekerülés idejével összhangban jelentkeznek a légzőszervi tünetek. Az áthangolódás üteme nem azonos a két telephelyen. Ez a 2.-4. hétre tehető.

A TGEV/PRCoV differenciáló ELISA teszt blokkoló teszt. Ez azt jelenti, hogy színváltozás akkor következik be, ha nincs ellenanyag a vizsgált savóban. Mivel a konjugátum nem a sertés ellenanyagaihoz kapcsolódik, ezért nem is lehet az ellenanyagok típusát meghatározni a teszttel. Ebből kifolyólag a fertőződés idejének megközelítő meghatározására sincs mód, ahogy a vírusneutralizációs teszteknel sincs. Az IgG és IgM is képes mindkét tesztben pozitív eredményt adni.

7.3. Interakció vizsgálata

A koronavírusok régóta ismert humán patogének, melyek a szezonális nátha tüneteinek nem mutatnak túl néhány kivételtől eltekintve (SARS-CoV, MERS-CoV, illetve jelenleg az 1889-1894 közötti orosz influenzát is koronavírusnak [67] gondolják). Ezekben az esetekben rendre kiderült, hogy akár csak a SARS-CoV 2 esetében egy állati vírus adaptációja történt. Ezekben az esetekben a vírus magas mortalitással és morbiditással járt.

Az emberekben a COVID-19 pándémia előtt a koronavírusok kimutatására nem helyeztek nagy hangsúlyt, de a két vírus egyidejű fertőzése ritka [68]. A COVID-19 idején az influenzás esetek száma csökkent, ami nem magyarázható azzal, hogy nem végeztek tesztek [1, 69]. Ha a két vírus mégis egyszerre okoz fertőzést, akkor a tünetek a vártnál erősebbek voltak az esetek egy részében [70]. A COVID-19 pándémia előtt a két vírus interakcióját humán vonalon nem vizsgálták.

Az állatorvosi vonalon a sertések, madarak és a lovak influenzás megbetegedései a legismertebbek, de kutyákban, macskákban, szarvasmarhákban is előfordul. Ezekben az állatfajokban a koronavírusos megbetegedések is előfordulnak. A baromfi koronavírus (IBV) ellen széleskörben vakcináznak, a szarvasmarha esetében influenzavírus D fordul elő

(Magyarországon is megtalálták – Biksi Imre személyes közlése –), de izolátumunk nincs, ahogy házikedvencekből sincs, ezért esett vizsgálatunkhoz a választás a sertésekre.

A sertésekről – ahogy az irodalmi áttekintésben is írtam – ismeretes, hogy humán- és madár influenzavírusokkal is képesek megfertőződni. A koronavírussal jobbra emésztőszervi megbetegedéseket okoznak, de a légzőszervi koronavírus alkalmas lehet az interakció vizsgálatára. A PRDC háttérében mindkét vírus előfordulhat.

A szakirodalomban a két vírus kombinált fertőzésével kísérletesen foglalkoztak.

Élő állatokban ellentmondásos eredményeket kaptak a klinikai tünetek alapján. Leírták a patogenitás fokozódását [71], de ennek ellentétét is [72]. Saját vizsgálataink alapján egy telepen tudtuk a PRCoV-t és influenza vírust kimutatni, de ez nem feltétlenül egy állaton belül történt. Minden esetre a tünetek enyhék voltak.

A sejteket érintő kísérletekben ugyanez a bizonytalanság észlelhető [70, 73, 74]. Tracheagyűrű vizsgálatában a csillók mozgása csökkent koinfekció alkalmával [73, 74]. Saját vizsgálataink alapján és irodalmi adatok alapján az interferencia megkérdőjelezhetetlen, a hatásmechanizmus viszont még nem tisztázott, az azonos receptor használatán (sziálsav) kívül [73]. Azt gondoljuk, hogy ha nem egy egyébként is patogenitás növekedés figyelhető meg a vírusok valamelyikénél, a két vírus együttes hatását a környezeti tényezők befolyásolják. A szövettanyészen kialakuló CPE fokozódás a két patogén kórokozó együttes jelenlétekor detektálható volt, de ebben az esetben a két vírus interakciója a szervezetben legalábbis megkérdőjelezhető (napos malacok hasmenése versus 4 hetes kor feletti légzőszervi probléma). A kérdés mindenképpen kutatásokat igényel még, belevéve a legújabb, egyenlőre tüneteket nem okozó, de érdekes genetikával rendelkező deltainfluenzavírusokat is.

8. Összefoglalás

A COVID-19 pandémia során az emberek és köztük a kutatók, humán orvosok és az állatorvosok figyelme is a koronavírusok felé irányult. A SARS-CoV-2 okozta járvány alatt megfigyelték, hogy a korábban szezonális influenza esetek száma nagy mértékben lecsökkent. Ezt elsősorban a személyi higiénia előtérbe helyeződésének, a gyakoribb kézmosásnak és a maszkhasználatnak a számlájára írták. Erről azonban megoszlanak a vélemények és feltételezik, hogy esetleg a két vírus között egyéb interakció is lehet, mely magyarázná ezt a változást. Ezen TDK-dolgozat is ennek a kérdésnek a miéértjére próbál választ keresni.

Korábbi kísérletek is zajlottak már a sertés influenza- és koronavírus interakciójának kapcsán. Végeztek sejtenyészeti vizsgálatot, valamint kísérleti állatoltást is. Ott azt találták, amit a humán esetekben is megfigyeltek, hogy a két vírus koinfekciója során a sertésekben is a tünetek súlyosbodására lehet számítani.

Saját vizsgálataink során 4 telep mintáit dolgoztuk fel. Ebből három telepről vérsavót is kaptunk, míg orrtampon minta mind a 4 telepről érkezett. Utóbbiból direkt víruskimutatást végeztünk, míg a vérsavót indirekt vizsgálatokra használtuk fel. A direkt víruskimutatás során a második telepről sikerült kimutatnunk mindkét vírust, az első telepen egyik vírust sem sikerült detektálnunk, valamint a többi telepen a légzőszervi koronavírust találtuk meg. A korábban már említett poolozott minták miatt azonban a második telep esetében sem tudtuk megállapítani, hogy vajon a két vírus egy egyedben volt-e megtalálható, koinfekciót okozva. Az ellátó állatorvos beszámolója alapján az állatokban nem jelentkeztek súlyosabb tünetek, ami a korábbi irodalom alapján a koinfekció hiányára utalhat.

Az indirekt víruskimutatási vizsgálataink során a sertés légzőszervi koronavírusa ellen képződött ellenanyagokat találtuk meg. Ez utóbbit a differenciáló ELISA kit segítségével állapítottuk meg. Mind az influenzavírus, mind a sertés transzmisszibilis gastroenteritis vírusa ellen termelődött ellenanyagok kimutatása azonban sikertelen eredménnyel zárult.

Véleményünk szerint a két vírus között kompetíció lehet, azonban kutatásunk ezt sem megerősíteni, sem megcáfolni nem tudta. Emellett amennyiben a két vírus egy egyedben koinfekciót okoz, úgy a tünetek súlyosbodására lehet számítani. Ezen kérdéskör további kutatómunkát igényel a jövőben.

9. Summary

During the COVID-19 pandemic, the attention of the public, including researchers, doctors and veterinarians, was focused on coronaviruses. During the pandemic, it was observed that the number of previously seasonal cases of influenza dropped sharply, mainly due to the emphasis on personal hygiene, more frequent hand washing and the use of masks. However, opinions are divided concerning this topic and it is speculated that there may be other interactions between the two viruses that could explain this change. This TDK thesis also seeks to answer this question.

Previous experiments have been carried out on the interaction of swine influenza and coronavirus. Cell culture studies have been performed as well as experimental animal vaccination. There they found what has been observed in human cases, that when the two viruses co-infect in pigs, a worsening of symptoms can be expected.

In our own studies, we processed samples from 4 colonies. Blood samples were obtained from three of these colonies, while nasal swabs were obtained from all 4 colonies. The latter was used for direct viral detection, while the blood serum was used for indirect testing. In the direct virus detection, both viruses were detected in the second colony, neither virus was detected in the first colony and respiratory coronavirus was detected in the other colonies. However, due to the pooled samples mentioned above, it was not possible to determine whether the two viruses were found in the same individual, causing co-infection, in the case of the second colony. According to the report of the attending veterinarian, the animals did not show any severe symptoms, which based on previous literature may indicate the absence of co-infection.

Our indirect virus detection tests revealed antibodies against porcine respiratory coronavirus. The latter was detected using a differential ELISA kit. However, the detection of antibodies against both influenza virus and porcine transmissible gastroenteritis virus was unsuccessful.

We believe that there may be competition between the two viruses, but our research could neither confirm nor refute this. In addition, if the two viruses cause co-infection in an individual, a worsening of symptoms can be expected. This is an issue that requires further research in the future.

10. Irodalomjegyzék

1. Centre for Disease Control and Prevention (CDC) <https://www.cdc.gov/flu/season/past-flu-seasons.htm>. Accessed 22 Sept 2023
2. Soo RJJ, Chiew CJ, Ma S, Pung R, Lee V (2020) Decreased Influenza Incidence under COVID-19 Control Measures, Singapore. *Emerg Infect Dis* 26:1933–1935. <https://doi.org/10.3201/eid2608.201229>
3. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <https://ictv.global/taxonomy>. Accessed 5 Sept 2023
4. Yuanji (Kuo Yuanchi) G, Fengen J, Ping W, Min W, Jiming (Chu Chinming) Z (1983) Isolation of Influenza C Virus from Pigs and Experimental Infection of Pigs with Influenza C Virus. *J Gen Virol* 64:177–182. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-1-177>
5. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, Wang D, Nelson EA, Li F (2014) Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. *mBio* 5:e00031-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00031-14>
6. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, Armien A, Kaplan B, Chakravarty S, Hoppe AD, Webby RJ, Simonson RR, Li F (2013) Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. *PLoS Pathog* 9:e1003176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003176>
7. Toro-Ascuy D, Santibañez A, Peña V, Beltran-Pavez C, Cottet L, Molina C, Montoya M, Sandoval N, Vásquez-Martínez Y, Mascayano C, Cortez-San Martín M (2020) Development of an Isavirus minigenome system to study the function of the pocket RNA-binding domain of the viral nucleoprotein (NP) in salmon cells. *J Fish Dis* 43:197–206. <https://doi.org/10.1111/jfd.13122>
8. Batts WN, LaPatra SE, Katona R, Leis E, Ng TFF, Briec MSO, Breyta RB, Purcell MK, Conway CM, Waltzek TB, Delwart E, Winton JR (2017) Molecular characterization of a novel orthomyxovirus from rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Virus Res* 230:38–49. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.005>
9. Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Faizah AN, Higa Y, Hayashi T, Sawabe K, Isawa H (2022) Detection of Quarantavirus-Like Sequences from *Haemaphysalis hystricis* Ticks Collected in Japan. *Jpn J Infect Dis* 75:195–198. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2021.129>
10. Samsing F, Alexandre P, Rigby M, Taylor RS, Chong R, Wynne JW (2020) Transcriptome Response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) to a New Piscine Orthomyxovirus. *Pathogens* 9:807. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100807>
11. Temmam S, Chrétien D, Bigot T, Dufour E, Petres S, Desquesnes M, Devillers E, Dumarest M, Youssi L, Jittapalpong S, Karnchanabanthoeng A, Chaisiri K, Gagnieur L, Cosson J-F, Vayssier-Taussat M, Morand S, Moutailler S, Eloit M (2019) Monitoring Silent Spillovers Before Emergence: A Pilot Study at the Tick/Human Interface in Thailand. *Front Microbiol* 10:2315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02315>
12. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (eds) (2019) *Diseases of Swine*. 11th edition, Wiley-Blackwell, USA. ISBN: 9781119350859
13. Gaymard A, Le Briand N, Frobert E, Lina B, Escuret V (2016) Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 22:975–983. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.007>
14. Ma W (2020) Swine Influenza Virus: Current Status and Challenge. *Virus Res* 288:198118. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198118>
15. Lamb RA (2008) Influenza. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of Virology*. 3rd edition, Academic Press, USA pp 95–104
16. Zhang Q, Liang T, Nandakumar KS, Liu S (2021) Emerging and state of the art hemagglutinin-targeted influenza virus inhibitors. *Expert Opin Pharmacother* 22:715–728. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1856814>
17. Sutton TC (2018) The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses. *Viruses* 10:461. <https://doi.org/10.3390/v10090461>
18. Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD (2000) Interdependence of Hemagglutinin Glycosylation and Neuraminidase as Regulators of Influenza Virus Growth: a Study by Reverse Genetics. *J Virol* 74:6316–6323. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6316-6323.2000>
19. Ghafoori SM, Petersen GF, Conrady DG, Calhoun BM, Stigliano MZZ, Baydo RO, Grice R, Abendroth J, Lorimer DD, Edwards TE, Forwood JK (2023) Structural characterisation of hemagglutinin from seven Influenza A H1N1 strains reveal diversity in the C05 antibody recognition site. *Sci Rep* 13:6940. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33529-w>
20. Rosenthal PB, Zhang X, Formanowski F, Fitz W, Wong CH, Meier-Ewert H, Skehel JJ, Wiley DC (1998) Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature* 396:92–96. <https://doi.org/10.1038/23974>

21. Luo M (2011) Influenza Virus Entry. *Viral Mol Mach* 726:201–221. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9
22. Gambelin SJ, Vachieri SG, Xiong X, Zhang J, Martin SR, Skehel JJ (2021) Hemagglutinin Structure and Activities. *Cold Spring Harb Perspect Med* 11:a038638. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038638>
23. Watson SJ, Langat P, Reid SM, Lam TT-Y, Cotten M, Kelly M, Van Reeth K, Qiu Y, Simon G, Bonin E, Foni E, Chiapponi C, Larsen L, Hjulsgager C, Markowska-Daniel I, Urbaniak K, Dürrwald R, Schlegel M, Huovilainen A, Davidson I, Dán Á, Loeffen W, Edwards S, Bublot M, Vila T, Maldonado J, Valls L, Brown IH, Pybus OG, Kellam P (2015) Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol* 89:9920–9931. <https://doi.org/10.1128/JVI.00840-15>
24. Khatri M, Dwivedi V, Krakowka S, Manickam C, Ali A, Wang L, Qin Z, Renukaradhya GJ, Lee CW (2010) Swine Influenza H1N1 Virus Induces Acute Inflammatory Immune Responses in Pig Lungs: a Potential Animal Model for Human H1N1 Influenza Virus. *J Virol* 84:11210–11218. <https://doi.org/10.1128/jvi.01211-10>
25. Rajao DS, Anderson TK, Gauger PC, Vincent AL (2014) Pathogenesis and Vaccination of Influenza A Virus in Swine. In: Compans RW, Oldstone MBA (eds) *Influenza Pathogenesis and Control - Volume I*. Springer International Publishing, Cham, pp 307–326
26. Búza L, Ózsvári L (2019) Comparative study on risk and critical management factors for PRDC from the Central-European vets' and farm managers'. *SEA – Pract Appl Sci* 7(21) 221–227
27. Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG (2011) Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* 12:133–148. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000120>
28. World Organization Animal Health: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023 https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.09.07_INF_A_SWINE.pdf
29. Boniotti MB, Papetti A, Lavazza A, Alborali G, Sozzi E, Chiapponi C, Faccini S, Bonilauri P, Cordioli P, Marthaler D (2016) Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerg Infect Dis* 22:83–87. <https://doi.org/10.3201/eid2201.150544>
30. Pan Y, Tian X, Qin P, Wang B, Zhao P, Yang Y-L, Wang L, Wang D, Song Y, Zhang X, Huang YW (2017) Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Vet Microbiol* 211:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.020>
31. de Groot RJ (2006) Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconj J* 23:59–72. <https://doi.org/10.1007/s10719-006-5438-8>
32. Kwiatkowska A, Granicka LH (2023) Anti-Viral Surfaces in the Fight against the Spread of Coronaviruses. *Membranes* 13:464. <https://doi.org/10.3390/membranes13050464>
33. Cheng YR, Li X, Zhao X, Lin H (2021) Cell Entry of Animal Coronaviruses. *Viruses* 13:1977. <https://doi.org/10.3390/v13101977>
34. Li F (2016) Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* 3:237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
35. Sternberg A, Naujokat C (2020) Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sci* 257:118056. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118056>
36. Costantini V, Lewis P, Alsop J, Templeton C, Saif LJ (2004) Respiratory and fecal shedding of Porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S-gene of the PRCV isolates. *Arch Virol* 149:957–974. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0245-z>
37. Laude H, Godet M, Bernard S, Gelfi J, Duarte M, Delmas B (1995) Functional Domains in the Spike Protein of Transmissible Gastroenteritis Virus. In: Talbot PJ, Levy GA (eds) *Corona- and Related Viruses*. Springer US, Boston, MA, pp 299–304
38. Pensaert M, Callebaut P, Vergote J (1986) Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Q* 8:257–261. <https://doi.org/10.1080/01652176.1986.9694050>
39. Wesley RD, Lager KM (2003) Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with porcine respiratory coronavirus (PRCV). *Vet Microbiol* 95:175–186. <https://doi.org/10.1016/s00705-003-0245-z>
40. Chen Y, Zhang Y, Wang X, Zhou J, Ma L, Li J, Yang L, Ouyang H, Yuan H, Pang D (2023) Transmissible Gastroenteritis Virus: An Update Review and Perspective. *Viruses* 15:359. <https://doi.org/10.3390/v15020359>
41. Valkó A (2019) Vírusok okozta komplex oktanú enterális megbetegedések sertésekben, különös tekintettel a koronavírusra. PhD dolgozat, Állatorvostudományi Egyetem Doktori Iskola. https://univet.hu/wp-content/uploads/2019/04/ValkoA_PhD_final.pdf

42. Jung K, Saif LJ, Wang Q (2020) Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Res* 286:198045. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198045>
43. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, Collins J, Saif LJ (2014) Distinct Characteristics and Complex Evolution of PEDV Strains, North America, May 2013–February 2014. *Emerg Infect Dis* 20:1620–1628. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140491>
44. Liu Q, Wang HY (2021) Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis. *Vet Res Commun* 45:75–86. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09808-0>
45. Pensaert MB, Martelli P (2016) Porcine epidemic diarrhea: A retrospect from Europe and matters of debate. *Virus Res* 226:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.030>
46. Valkó A, Tuboly T, Cságola A (2018) A sertések enterális coronavirusai. *Magyar Állatorvosok Lapja* 140:207–216.
47. Deng F, Ye G, Liu Q, Navid MT, Zhong X, Li Y, Wan C, Xiao S, He Q, Fu ZF, Peng G (2016) Identification and Comparison of Receptor Binding Characteristics of the Spike Protein of Two Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains. *Viruses* 8:55. <https://doi.org/10.3390/v8030055>
48. Zhou P, Fan H, Lan T, Yang XL, Shi WF, Zhang W, Zhu Y, Zhang YW, Xie QM, Mani S, Zheng XS, Li B, Li JM, Guo H, Pei GQ, An XP, Chen JW, Zhou L, Mai KJ, Wu ZX, Li D, Anderson DE, Zhang LB, Li SY, Mi ZQ, He TT, Cong F, Guo PJ, Huang R, Luo Y, Liu XL, Chen J, Huang Y, Sun Q, Zhang XLL, Wang YY, Xing SZ, Chen YS, Sun Y, Li J, Daszak P, Wang LF, Shi ZL, Tong YG, Ma JY (2018) Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* 556:255–258. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0010-9>
49. Yang YL, Yu JQ, Huang YW (2020) Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery. *Virus Res* 285:198024. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198024>
50. Roe CK, Alexander TJL (1958) A Disease of Nursing Pigs Previously Unreported in Ontario. *Can J Comp Med Vet Sci* 22:305–307
51. Mora-Díaz JC, Piñeyro PE, Houston E, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG (2019) Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus: A Review. *Front Vet Sci* 6:53. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00053>
52. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, Bai R, Teng JLL, Tsang CCC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY (2012) Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol* 86:3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
53. Xu K, Zhou Y, Mu Y, Liu Z, Hou S, Xiong Y, Fang L, Ge C, Wei Y, Zhang X, Xu C, Che J, Fan Z, Xiang G, Guo J, Shang H, Li H, Xiao S, Li J, Li K (2020) CD163 and pAPN double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance. *eLife* 9:e57132. <https://doi.org/10.7554/eLife.57132>
54. Millet JK, Jaimes JA, Whittaker GR (2020) Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors. *FEMS Microbiol Rev* 45:fuaa057. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa057>
55. Tresnan DB, Levis R, Holmes KV (1996) Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol* 70:8669–8674
56. Krempf C, Schultze B, Laude H, Herrler G (1997) Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* 71:3285–3287. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.4.3285-3287.1997>
57. Li W, Hulswit RJG, Widjaja I, Raj VS, McBride R, Peng W, Widagdo W, Tortorici MA, van Dieren B, Lang Y, van Lent JWM, Paulson JC, de Haan CAM, de Groot RJ, van Kuppeveld FJM, Haagmans BL, Bosch B-J (2017) Identification of sialic acid-binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8508–E8517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712592114>
58. Nguyen L, McCord KA, Bui DT, Bouwman KM, Kitova EN, Elaish M, Kumawat D, Daskhan GC, Tomris I, Han L, Chopra P, Yang T-J, Willows SD, Mason AL, Mahal LK, Lowary TL, West LJ, Hsu S-TD, Hobman T, Tompkins SM, Boons G-J, de Vries RP, Macauley MS, Klassen JS (2022) Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. *Nat Chem Biol* 18:81–90. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00924-1>
59. Winter C, Schwegmann-Weßels C, Cavanagh D, Neumann U, Herrler G (2006) Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* 87:1209–1216. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81651-0>

60. Shang J, Zheng Y, Yang Y, Liu C, Geng Q, Tai W, Du L, Zhou Y, Zhang W, Li F (2018) Cryo-Electron Microscopy Structure of Porcine Deltacoronavirus Spike Protein in the Prefusion State. *J Virol* 92:e01556-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01556-17>
61. Nagy A, Vostinakova V, Pirchanova Z, Cernikova L, Dirbakova Z, Mojzis M, Jirincova H, Havlickova M, Dan A, Ursu K, Vilcek S, Hornickova J (2010) Development and evaluation of a one-step real-time RT-PCR assay for universal detection of influenza A viruses from avian and mammal species. *Arch Virol* 155:665–673. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0636-x>
62. Lőrincz M, Biksi I, Andersson S, Cságola A, Tuboly T (2014) Sporadic re-emergence of enzootic porcine transmissible gastroenteritis in Hungary. *Acta Vet Hung* 62:125–133. <https://doi.org/10.1556/AVet.2013.043>
63. Kim SH, Kim IJ, Pyo HM, Tark DS, Song JY, Hyun BH (2007) Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus. *J Virol Methods* 146:172–177. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.021>
64. Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
65. Gerber P, Hamre D, Loosli CG (1956) Antigenic variants of influenza A virus (PR8 strain). *J Exp Med* 103:413–424
66. Labrosse B, Tourdjman M, Porcher R, LeGoff J, de Lamballerie X, Simon F, Molina JM, Clavel F (2010) Detection of Extensive Cross-Neutralization between Pandemic and Seasonal A/H1N1 Influenza Viruses Using a Pseudotype Neutralization Assay. *PLoS ONE* 5:e11036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011036>
67. Berche P (2022) The enigma of the 1889 Russian flu pandemic: A coronavirus? *Presse Medicale Paris Fr* 1983 51:104111. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104111>
68. Ozaras R, Cirpin R, Duran A, Duman H, Arslan O, Bakcan Y, Kaya M, Mutlu H, Isayeva L, Kebanlı F, Deger BA, Bekeshev E, Kaya F, Bilir S (2020) Influenza and COVID-19 coinfection: Report of six cases and review of the literature. *J Med Virol* 92:2657–2665. <https://doi.org/10.1002/jmv.26125>
69. Stamm P, Sagoschen I, Weise K, Plachter B, Münzel T, Gori T, Vosseler M (2021) Influenza and RSV incidence during COVID-19 pandemic—an observational study from in-hospital point-of-care testing. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 210:277–282. <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00720-7>
70. Trifonova I, Christova I, Madzharova I, Angelova S, Voleva S, Yordanova R, Tcherveniakova T, Krumova S, Korsun N (2022) Clinical significance and role of coinfections with respiratory pathogens among individuals with confirmed severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infection. *Front Public Health* 10:959319. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.959319>
71. Van Reeth K, Pensaert MB (1994) Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am J Vet Res* 55:1275–1281
72. Lanza I, Brown IH, Paton DJ (1992) Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. *Res Vet Sci* 53:309–314. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90131-k](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90131-k)
73. Krimmling T, Schwegmann-Weßels C (2017) Comparison of mono- and co-infection by swine influenza A viruses and porcine respiratory coronavirus in porcine precision-cut lung slices. *Res Vet Sci* 115:470–477. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.07.016>
74. Peng JY, Shin DL, Li G, Wu NH, Herrler G (2021) Time-dependent viral interference between influenza virus and coronavirus in the infection of differentiated porcine airway epithelial cells. *Virulence* 12:1111–1121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1911148>
75. Santana-Clavijo NF, Reyes Romero DP, Arango Fajardo DF, Velandia Muñoz A, Taniwaki SA, de Souza Silva SO, Brandão PE (2020) Molecular diversity of Alphacoronavirus 1 in dogs and cats in Colombia. *Heliyon* 6:e04381. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04381>
76. Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H, Daniels R (2018) Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol*. 9:1581. doi: 10.3389/fimmu.2018.01581.
77. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) A háziállatok fertőző betegségei. Budapest, Magyar Állatorvosi Kamara Kft.
78. Dán Á (2011) Sertés-egészségügyi Szakállatorvosképzés előadás 2021. https://drive.google.com/drive/folders/14fQKm-CIONG92kj1_o58Y0lcs6gnV5LC
79. Valkó A, Lőrincz M (2020) Immunológiai illusztrációk könyve A3 Nyondaipari és Szolgáltató Kft., Budapest, ISBN 978-963-88110-4-2.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Lőrincz Mártának, aki töretlen lelkesedéssel és odaadással segítette dolgozatom elkészülését, valamint megtanította számomra azokat a laboratóriumi munkafolyamatokat, melyek elengedhetetlenek voltak TDK-dolgozatom elkészüléséhez.

Szintén köszönettel tartozom a laboratórium dolgozóinak, akiktől szintén sokat tanulhattam és mindig lelkesen a segítségemre siettek. Külön köszönöm Herbák Józsefné Irénkének a segítséget.

A projekt anyagi támogatását az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

Emellett szintén hálával tartozom barátaimnak, valamint Erdei Nikolett Juditnak, akik támogattak dolgozatom elkészítése alatt.

Témavezetői nyilatkozat TDK dolgozathoz

Alulírott, **Lőrincz Márta**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Túri Dániel**, 6. évfolyamos hallgató „**Sertés influenzavírus és coronavírus kölcsönhatásának vizsgálata**” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023. október 20.

.....*Lőrincz Márta*.....

témavezető

NYILATKOZAT

Alulírott Túri Dániel nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Sertés influenzavírus és coronavirus kölcsönhatásának vizsgálata tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2023. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023.11.13

TURI DÁNIEL Túri Dániel

a hallgató neve és aláírása



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Turi Dániel

Neptun-kódja: ESRA07

A témavezető neve és beosztása: Sóvics Márta egyetemi adjunktus

Tanszék: gárvaanyag és mikrobiológiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: Sertés influenzavírus és coronavirus

előcsönhatásának vizsgálata

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023.	02.	07.	Gyorsteszt és PCR	Sóvics Márta
2.	2023.	03.	20	vírusneutralizáció	Sóvics Márta
3.	2023.	03.	30.	vírusneutralizáció próbák MDCK-sejtek felveteli	Sóvics Márta
4.	2023.	04.	11	vírusneutralizáció 3 vírusal	Sóvics Márta
5.	2023.	04.	14.	szólt felvétel	Sóvics Márta

Érdemjegy az első félév végén: jellel díjazottal (5)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023.	07.	06	vírusneutralizáció sm.	Sóvics Márta
2.	2023	07.	10	ELISA vizsgálatok	Sóvics Márta
3.	2023.	08.	30	eredmények értékelése	Sóvics Márta
4.	2023	09.	25.	Szakdolgozat indárolom	Sóvics Márta
5.	2023	10.	10.	Szakdolgozat megbeszélés	Sóvics Márta

Érdemjegy a második félév végén: jellel díjazottal (5)

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

.....*Anna Lőrincz*.....

témavezető aláírása

Hallgató aláírása:*Tóth Dániel*.....

Tanszéki előadó aláírása:*Juhász K. Anna*..... Átvétel dátuma: *2023. 11. 10.*.....