

A sertés-parainfluenza vírus 1 prevalenciájának  
felmérése és genetikai jellemzése  
Magyarországon

Prevalence estimation and genetic characterization of  
porcine parainfluenza virus 1 in Hungary

**Készítette:** Czétényi Anna

**Témavezető:** Igriczi Barbara PhD hallgató

Állatorvostudományi Egyetem  
Patológiai Tanszék

2023

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	2
2. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1. A paramyxovírusok .....	3
2.2. Genetikai áttekintés .....	5
2.3. A PPIV-1 elterjedtsége.....	6
2.4. A PPIV-1 kórokozó képessége .....	8
2.5. PPIV-1 Magyarországon.....	9
3. Célkitűzések.....	10
4. Anyag és módszer.....	11
4.1. A minták forrása, mintagyűjtés.....	11
4.2. Nukleinsav-kivonás .....	11
4.3. Kvantitatív reverz-transzkripció PCR (RT-qPCR) és olvadáspont-elemzés.....	12
4.4. PPIV-1 fúziós (F) fehérje génszekvenálás és filogenetikai elemzés .....	13
5. Eredmények.....	15
5.1. A PPIV-1 kimutatási aránya különböző sertéstelepeken .....	15
5.2. Különböző terjedési minták a négy PPIV-1 pozitív állományban .....	20
5.3. Szekvenciaanalízis és filogenetika .....	22
6. Következtetések .....	25
7. Összefoglaló.....	29
8. Irodalomjegyzék.....	31
9. Köszönetnyilvánítás, egyéb nyilatkozatok .....	34

## 1. Rövidítések jegyzéke

PPIV-1: Porcine parainfluenza virus 1

PRV-1: Porcine respirovirus 1

SeV: Sendai vírus

PPIV-2: Porcine parainfluenza virus 2

PPIV-3: Porcine parainfluenza virus 3

PPIV-5: Porcine parainfluenza virus 5

N fehérje: Nukleokapszid fehérje

P fehérje: Foszfoprotein

M fehérje: Mátrix fehérje

F fehérje: Fúziós fehérje

HN fehérje: Hemagglutinin-neuraminidáz

L fehérje: Nagy polimeráz fehérje

CD/CD: Cesarean-derived colostrum-deprived, császármetszésből származó kolosztrumtól megfosztott

PRDC: Porcine respiratory disease complex, sertés légzőszervi betegség komplex

IFN: Interferon

ISG: Interferon-indukálható gének

PRRSV: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírus

IAV: Influenza A vírus

SOV: Sertés orthopneumovírus

RT-qPCR: Valós idejű kvantitatív reverz-transzkripció PCR

Ct: Cycle threshold, küszöbérték

## 2. Irodalmi áttekintés

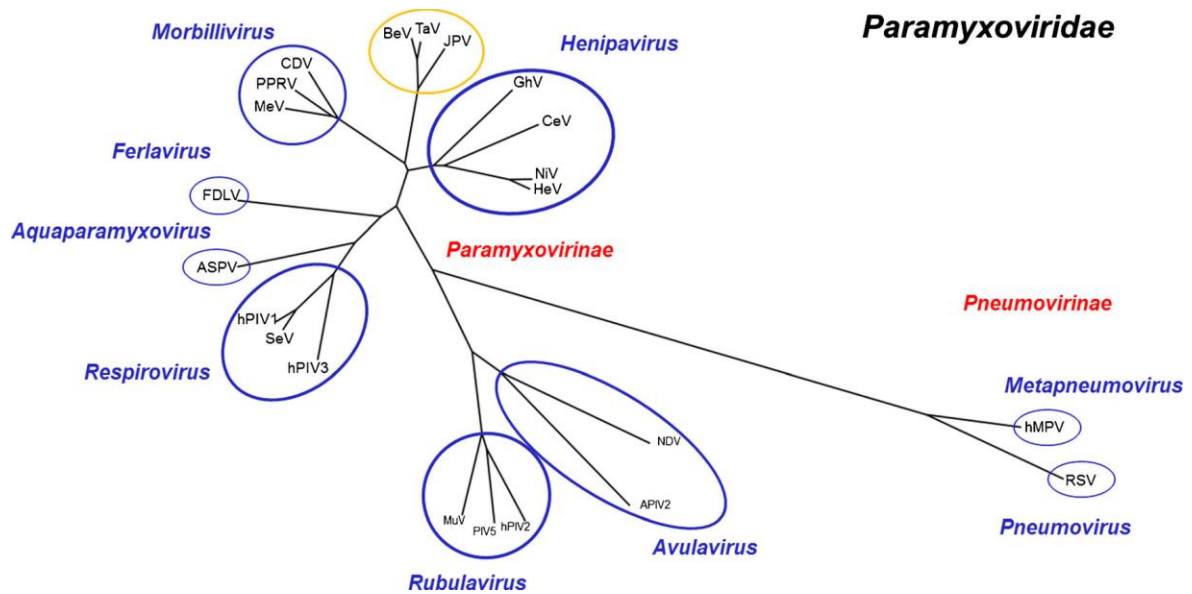
### 2.1. A paramyxovírusok

A *Paramyxoviridae* családon belül négy alcsaládot különböztetünk meg, ezek az *Avulavirinae*-, *Orthoparamyxovirinae*-, *Metaparamyxovirinae*- és *Rubulavirinae* alcsaládok. Az *Orthoparamyxovirinae* alcsaládba tizenhét további nemzetség tartozik. A sertés-parainfluenzavírus 1 (Porcine parainfluenza virus 1, PPIV-1), vagy más néven sertés respirovírus 1 (Porcine respirovirus 1, PRV-1) az *Orthoparamyxovirinae* alcsaládon belül a *Respirovirus* nemzetségébe sorolandó. A *Respirovirus* nemzetség további hat fajt foglal magában, ezek a következők: szarvasmarha respirovírus 3 (BPIV-3), kecske respirovírus 3 (CPIV-3), humán respirovírus 1 (HPIV-1), humán respirovírus 3 (HPIV-3), rágcsáló respirovírus (korábban Sendai vírus, SeV) és mokus respirovírus (GSqV) [1].

A paramyxovírusok különböző légúti, idegrendszeri megbetegedést okozhatnak számos haszon-, és társállat faj esetén, továbbá a család némely tagja zoonotikus tulajdonsággal is bír. A sertéseket megfertőzni képes sertés-parainfluenza vírusnak eddig négy típusát azonosították: PPIV-1, PPIV-2 (Porcine parainfluenza virus 2), PPIV-3 (Porcine parainfluenza virus 3), és PPIV-5 (Porcine parainfluenza virus 5). A PPIV-2-t először egy sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírusra (PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus) jellemző tüneteket mutató tenyészkoca magzatának tüdőszövetéből mutatták ki az 1990-es évek végén Németországban [2]. A PPIV-3-at először 1981-ben és 1992-ben izolálták interstitialis tüdőgyulladásban és agyvelőgyulladásban szenvedő sertésekből az Egyesült Államokban [3]. Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy ezek a vírusok a szarvasmarha respirovírus 3 változatai, és valószínűleg szarvasmarhákról terjedtek sertésekre [4]. A PPIV-5 a PPIV-1-hez hasonlóan potenciális zoonotikus tulajdonsággal bír [5]. Világszerte elterjedt, több állatfaj megbetegedését okozhatja úgy, mint sertés, kutya, szarvasmarha, vörös panda, illetve tigris [6–8]. Sertések légúti traktusából számos esetben izolálták a kórokozót. Egyes esetekben a sertések bélrendszeri megbetegedésével is összefüggésbe hozták, de patogenezise még nem tisztázott [6, 9]. A koreai sertésállományokat vizsgálva PPIV-1 és PPIV-5 egyidejű jelenlétét igazolták egy telepen, amely a kórokozók együttes keringésére utal a régióban [10]. Eddigi ismereteink szerint a *Paramyxoviridae* családnak három egyéb tagja hozható összefüggésbe sertések klinikai tünetekben megnyilvánuló megbetegedésével: a Nipah vírus, a Menangle

vírus és a sertés rubulavírus (kékszem-betegség), amelyek közül a Nipah-, és Menangle vírusok zoonotikus kórokozók. A Nipah vírus Délkelet-Ázsiában és a Csendes-óceán nyugati partvidéke mentén endémiás, járványkitörésekről számoltak be Malajziában, Szingapúrban, a Fülöp-szigeteken, Indiában és Bangladesben. A vírus terjedhet annak rezervoárjai, a gyümölcssevő denevérek által, állati köztigazdákon keresztül (úgy, mint a sertés), illetve emberről emberre történő átvitel is lehetséges. Vezető tünetek az idegrendszeri tünetek, amelyek az agyvelőben történő endothel károsodás és vasculitis hatására jelennek meg. Emellett felső légúti tünetek és láz jellemző sertés esetében [11]. A Menangle vírus fenntartói szintén a denevérek. 1997-ben a reprodukciós zavarokat és veleszületett rendellenességek nagy számú megjelenéséről számoltak be egy sertéstelepen Ausztráliában. Azóta nem jelentettek további járványkitörést. A Menangle vírus halvaszületést, mumifikációt, továbbá a mozgásszervi rendszer és a központi idegrendszer veleszületett rendellenességeit okozza az érintett malacoknál. Kocáknál késői visszaivarzás, valamint álvemhesség is előfordulhat. Élve született malacoknál, illetve idősebb, növendék sertések esetében nem mutatkoznak klinikai tünetek [12]. A kékszem-betegséget először Mexikóban írták le, Európában nincs jelen a vírus. Generalizált fertőzést okoz, az állatok különféle váladékaikkal ürítik. Szopós malacok esetén a mortalitás akár a 90-100%-ot is elérheti. Kórbonctani megjelenését a testszerte megjelenő vérzések, interstitialis pneumonia, encheplaomyelitis és a betegség nevét adó szaruhártya-homály jellemzi [13]. Emellett több humán patogén is tartozik a *Paramyxoviridae* családba, úgy mint a kanyaró (Measles morbillivirus (MeV)), mumpsz (MuV) vagy a humán parainfluenza (hPIV1-3) vírusai [14].

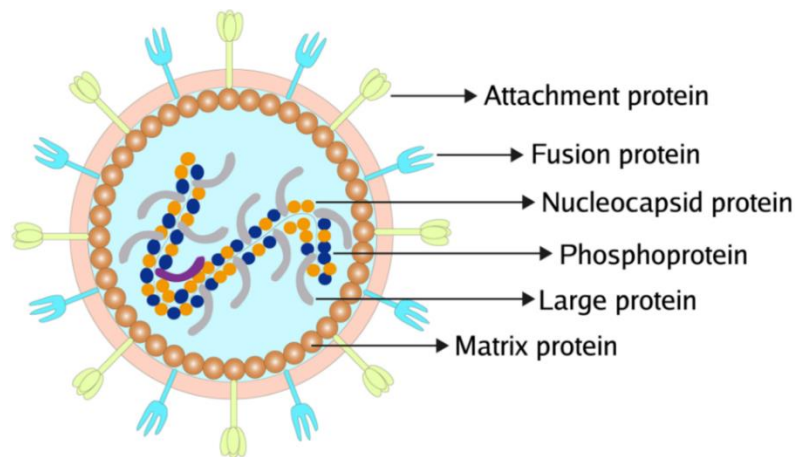
A PPIV-1 kimutatására először Hong Kongban, 2008 és 2012 között vágóhídon gyűjtött rektális-, valamint orrtamponmintákból került sor [15]. A teljes genom szekvenálás és filogenetikai analízis kimutatta, hogy a PPIV-1 a *Respirovirus* genusba tartozó humán parainfluenza 1-es vírussal (HPIV-1) és Sendai vírussal (SeV) van a legszorosabb rokonságban [15] (1. ábra).



1. ábra: A *Paramyxoviridae* család tagjainak filogenetikai fája. Rövidítések: AIV2: madárinfluenza vírus 2, ASPV: atlanti laza c paramyxovírus, BeV: Beilong vírus, CDV: szopomyica vírus, CeV: Cedar vírus, FDLV: Fer-de-Lance vírus, GhV: Ghana vírus, HeV: Hendra vírus, hMPV: humán metapneumovírus, hPIV1: humán parainfluenza vírus 1, hPIV2: humán parainfluenza vírus 2, hPIV3 humán: parainfluenza vírus 3, JPV: J paramyxovírus, PIV5: parainfluenza vírus 5, RSV: légúti syncytial vírus, MeV: kanyaróvírus, MuV: mumpszvírus, NDV: Newcastle disease vírus, NiV: Nipah vírus, PPRV: Peste-des-petits ruminants vírus, TaV: Tailam vírus. Fekete színnel: Paramyxoviridae család, piros színnel: a családok, kék színnel: nemzetségek, sárga színnel jelölve: osztályozatlan [16].

## 2.2. Genetikai áttekintés

A *Paramyxoviridae* család tagjai 150-300 nm méretű, lipidburokkal rendelkező, nem szegmentált, negatív irányultságú szimpla szálú RNS vírusok. Ellenálló képességük gyenge, a környezetben hosszan nem élnek túl. A PPIV-1 genomja hozzávetőlegesen 15 kilobázis hosszú, és 6 fő fehérjét kódol (3'-N-P-M-F-HN-L-5'): nukleokapszid fehérjét (N), foszfo proteint (P), mátrix fehérjét (M), fúziós fehérjét (F), hemagglutinin-neuraminidázt (HN) és a nagy polimeráz fehérjét (L) [17] (2. ábra). A HN és F fehérjék fő felszíni glikoproteinek, amelyek a gazdasejtrel való kölcsönhatásért felelősek. A HN fehérje a vírus gazdasejtbe való kötődését segíti elő, az F fehérje pedig a gazdasejtbe való bejutásban játszik szerepet, és a fertőzött sejtek összeolvadását idézi elő, amelynek nyomán syncytium képződés tapasztalható [18].



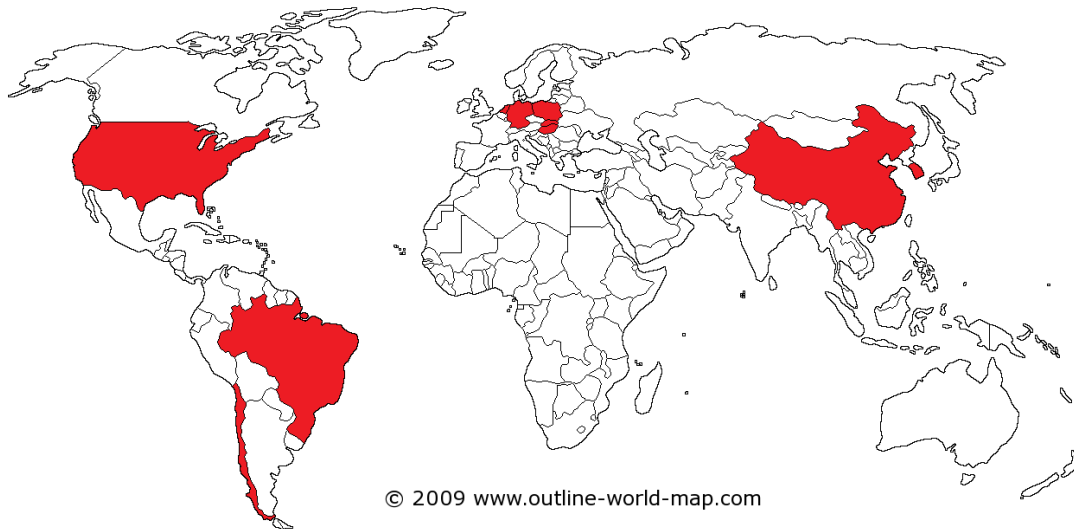
2. ábra: A paramyxovírusok általános szerkezete. Attachment protein: hemagglutinin-neuraminidáz (HN), Fusion protein: fúziós fehérje (F), Nucleocapsid protein: nukleokapszid fehérje (N), Phosphoprotein: foszfoprotein (P), Large protein: nagy polimeráz fehérje (L) Matrix protein: má trix fehérje (M) [19].

A HN és F gének felhasználhatók a PPIV-1 genetikai és epidemiológiai tanulmányozására [20, 21]. A PPIV-1 nukleotidszekvenciák elemzése a vírus bizonyos szintű genetikai diverzitására mutatott rá [20–24]. Azonban nagyon kevés szekvencia érhető el nyilvánosan, és számos sertéstermelő országból nem állnak rendelkezésre genetikai adatok. Ezen okokból kifolyólag a kórokozó evolúciója és molekuláris epidemiológiája nem teljesen ismert. Korábbi tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy a fúziós (F) fehérje, az RdRp polimeráz (L) vagy a hemagglutininneuraminidáz (HN) génelemzése hasonló filogenetikai csoportosítást eredményezett, mint a teljes vagy majdnem teljes genomelemzés [21]. Ebből következően az egyes gének szekvenciájának vizsgálata elegendőnek és költséghatékonynak tűnik a PPIV-1 genotipizálásához. [21].

### 2.3. A PPIV-1 elterjedtsége

A PPIV-1 első leírása után néhány évvel az USA-ban orrtampon-, és rágókötélmintákból, valamint tüdőhomogenizátumból mutatták ki a vírust. Itt a legmagasabb arányban rágóköté- és az orrtamponmintákban detektálták a kórokozót míg a tüdőmintákban alacsony volt a kimutatási arány [20, 22, 25]. Chilében szintén orrtampon-, rágókötélmintákból, valamint tüdőhomogenizátumból [23], Magyarországon orrtamponmintákból [24], Németországban és Hollandiában orrtampon-, valamint rágókötélmintákból [21], Lengyelországban orrtampon- és rágókötélmintákból [26],

továbbá Dél-Koreában rágóköté- és tüdőmintákból [27] is azonosították a vírust. Nemrégiben egy brazíliai nagylétszámú kereskedelmi sertéstartó telepen száj-garatüregi-, és rektális tamponmintákból mutatták ki a PPIV-1-et [28]. Ez arra enged következtetni, hogy a vírus világszerte jelen van (3. ábra).



3. ábra: A PPIV-1 kimutatásának helyszínei világtérképen feltüntetve.

2022-re a PPIV-1 jelenlétét Ázsiában, Amerikában és Európában is kimutatták, de az epidemiológiája és genetikai változatossága tekintetében nagyon kevés ismeret állt még ekkor is rendelkezésre. Stadejek és munkatársai 2022-ben megjelent tanulmányában az F fehérje gén teljes nukleotidsorrendjét elemezték 12 lengyel és 11 amerikai farmról származó minták alapján, és vetették össze a korábban Amerikából, Ázsiából és Európából származó genetikai adatokkal. Az F fehérje teljes nukleotidszekvenciájának filogenetikai elemzése kimutatta, hogy a PPIV-1 két különböző kládba osztható. Az I. kládba tartoznak az Európából és egyes Hongkongból származó szekvenciák, míg a II. kládba az amerikai és ázsiai kontinensekről származó egyéb szekvenciák, ami az európai és amerikai törzsek eltérő evolúciójára utal [29]. A nukleotidszekvenciák\_azonossága 93,2% és 99,9% között mozgott a II. kládban, és 94,6% és 99,9% között az I. kládban. A kládok közötti szekvenciák\_azonossága 88,7% és 91,9% között változott. A két PPIV-1 törzs valószínűleg függetlenül fejlődhetett ki Európában és Amerikában. Különösen az ázsiai vírusokkal kapcsolatos további tanulmányok szükségesek a vírus felbukkanásának és epidemiológiájának megértéséhez, valamint a hordozók szerepének vizsgálatához a PPIV-1 terjedésében [29].



## 2.4. A PPIV-1 kórokozó képessége

A PPIV-1 patogénitásának mértéke még nem tisztázott maradéktalanul, de légúti megbetegedésekkel számos esetben összefüggésbe hozható volt. A vírust gyakran detektálták olyan sertések vizsgálata során, amelyek enyhe, illetve közepes súlyosságú légúti tüneteket mutattak, úgy mint köhögés, tüszögés, illetve orrváladékozás [22, 23, 26, 27]. Egyes tanulmányok beszámoltak olyan esetekről is, hogy tünetmentes sertésekben is kimutatható volt a vírus [15, 21, 22, 24]. Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével megállapították, hogy a vírus egyéb légzőszervi kórokozókhoz hasonlóan az orr és a légcső légzőhámjában replikálódik [22].

Egy kísérlet során 4 hetes természetes úton született, valamint 6 hetes CD/CD (ceserean-derived colostrum-deprived, császármetszésből származó kolosztrumtól megfosztott) malacokat fertőztek meg mesterségesen PPIV-1-gyel. A vizsgált malacok mindegyikénél nagy mennyiségű vírus volt kimutatható a felső és az alsó légutakban egyaránt, de a magas víruskoncentráció ellenére, a CD/CD malacok is mindössze enyhe légzőszervi tüneteket mutattak. Az előbbieket arra engedtek következtetni, hogy a PPIV-1 nem játszik elsődleges szerepet a sertések légúti megbetegedésében, de hozzájárulhat a sertések légúti betegség komplexének (porcine respiratory disease complex, PRDC) kialakulásához, mivel képes replikálódni a felső és alsó légúti traktusban, így potenciálisan hajlamosíthat másodlagos kórokozókra [30]. A paramyxovírusok általában kis mértékű I-es típusú interferon (IFN) választ indukálnak [31]. Li és munkatársai kimutatták, hogy a PPIV-1 különböző mechanizmusokkal gátolja a gazda veleszületett immunválaszát. A PPIV-1 csak korlátozott mértékben serkentette a I-es típusú IFN és az interferon-indukálható gének (ISG) termelését, és erős gátló hatása került kimutatásra a SeV fertőzés által indukált IFN és ISG termelésre. E kutatás eredményei alapján szintén arra következtettek a szerzők, hogy a vírus részét képezheti a sertések légúti betegség komplexének [32].

PPIV-1-gyel és influenza A vírussal (IAV) való egyidejű fertőzés hatását vizsgálták abban a tanulmányban, ahol 5 hetes állatokat influenza A vírussal, PPIV-1-gyel, vagy mindkét kórokozóval együttesen fertőzték meg. Eredményeik alapján a PPIV-1 nem befolyásolta a klinikai betegség súlyosságát, a makroszkópos léziókat, és nem változtatta meg az orrtamponokból vagy a boncolás során kimutatott vírus mennyiségét az influenza A vírussal való koinfekció során [33]. Woźniak és munkatársai PPIV-1 jelentős elterjedéséről számoltak be Lengyelországban, ahol a PPIV-1 pozitív mintákat vizsgálták továbbá PRRSV

és IAV egyidejű jelenlétének felmérése céljából. Egyidejű fertőzöttség volt kimutatható PRRSV-vel a PPIV-1 pozitív minták 11,8%-a, illetve IAV-val 23,5%-a esetén [26]. Németországban olyan multiplex RT-qPCR (valós idejű kvantitatív reverz-transzkripció PCR) módszer segítségével vizsgálták légúti tünetekkel küzdő sertésekből származó egyedi mintákat, amely az IAV és PPIV-1, valamint sertés orthopneumovírus (SOV) együttes kimutatására alkalmas. A minták közel 70%-a IAV-negatív volt, de érdekes módon a PPIV-1 (19,6%) és SOV (14,2%) széles körben jelen lévő kocirkulációja volt megállapítható. A légúti betegségben szenvedő sertések PPIV-1 és SOV fertőzéseinek magas előfordulási gyakorisága miatt ezek a vírusok feltételezhetően szerepelnek a PRDC alkotói között [34].

## 2.5. PPIV-1 Magyarországon

A PPIV-1 európai előfordulását először egyetemünk kutatócsoportja írta le orrtamponmintákból. A vizsgált állományok közül csak egy (4,5%) volt pozitív PPIV-1-re [24]. A vírus prevalenciája más európai országokban igen magasnak bizonyult, a német és holland telepek feltérképezése során azok 42,3%-ban [21], a lengyel telepek 76,7%-ban számoltak be a jelenlétéről [26]. A magyarországi kimutatás olyan orrtamponmintákból történt, melyeket egy neuroinvaszív astrovírus szűrésének céljából gyűjtöttek. A minták 22 magyar telepről származtak, minden telepről 15 szopós malactól (minden farmról 5 alomból 3 véletlenszerűen választott malactól) gyűjtött orrtamponminta RT-qPCR vizsgálata alapján összesen egy állomány bizonyult pozitívnak. Ezután a pozitív telepről keresztmetszeti módszerrel vettek 20 orrtamponmintát, ezúttal a 2, 4, 6 és 8 hetes malacoktól. E második mintavétel során viszonylag magas pozitívítási arányt találtak a 4, 6, valamint 8 hetes korcsoportokban, ezek az arányok 65%, 40% és 20% voltak sorrendben. A vizsgált korcsoportok mindegyikében előfordult pozitívítás, ám a legmagasabb kimutatási arány 4 hetes állatok között volt megfigyelhető. A részleges F és L gének filogenetikai elemzése alapján megállapításra került, hogy a 3 magyar törzs genetikailag szorosan kapcsolódik az 2013-ban Hongkongban azonosított első PPIV-1 törzshez, míg az összességében genetikai különbség a legutóbb leírt észak-amerikai szekvenciákhoz képest kb. 10% volt [24]. Jelen kutatás során szélesebben körben vizsgáljuk a magyar sertéstartó telepeket, valamint a határhoz közeli további 2 szlovákiai telepet.

### 3. Célkitűzések

Jelen kutatás során azt a célt tűztük ki, hogy ezen közelmúltban felfedezett, potenciális klinikai szereppel bíró vírus jelenléte szempontjából széles körű felmérést végezzünk Magyarországon. 24 magyarországi, valamint 2 felvidéki sertésállományt vizsgáltunk annak érdekében, hogy felmérjük a PPIV-1 törzsek földrajzi eloszlását és korcsoportonkénti előfordulását, valamint genetikai diverzitását.

Célunk a 8-12 hetes választott, valamint a 18-20 hetes hízó sertésektől gyűjtött rágóköttel-, valamint a 2, 4, 6 és 8 hetes állatoktól származó orrtampon mintákban a PPIV-1 kimutatása RT-qPCR módszerrel. További célunk az egyes PPIV-1 pozitív telepről érkező minták esetében a vírus szekvenciájának a meghatározása és az adatok filogenetikai elemzése.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. A minták forrása, mintagyűjtés

Az elemzéshez használt minták 2020-tól 2023-ig terjedő időszakban 24 magyarországi, valamint 2 szlovákiai nagylétszámú sertéstelepről lettek összegyűjtve. A telepek részvétele a mintavételi kampányban önkéntes volt, a telepek különböztek az alapvető termelési paraméterekben, a kocaállomány méretében és genetikájában. A mintavételek ideje alatt a sertésállományokban nem jelentettek járványkitörést, valamint kifejezett klinikai tünetekről sem számoltak be. A legtöbb állományban 5-5 etetési helyhez kötött rágókötél mintát gyűjtöttünk az elválasztott malacoktól (8-12 hetes állatok) és hízósertésektől (18-20 hetes állat). A mintavételhez minden karámba egy darab pamutkötelet akasztottunk, hogy a sertések megrághassák. 15-20 perc elteltével a köteleket eltávolítottuk és külön műanyag zacskókba helyeztük, majd az egyes darabokból a folyadék műanyag csövekbe lett préselve. Ez a nem invazív mintavételi módszer gyors, egyszerű és költséghatékony, továbbá megfelelően reprezentatív is [35].

A sertéstartó telepek tulajdonosainak és/vagy állatorvosainak kérésére - miután igazolást nyert a vírus jelenléte az állományban - további keresztmetszeti mintavételezésekre került sor 3 hazai telep esetében: orrtampon-mintavételezés történt 2, 4, 6 és 8 hetes állatokból. Az egyik szlovákiai telepről származó, légúti tüneteket mutató 2, 6 és 8 hetes malacoktól gyűjtött orrtamponmintákat eredetileg IAV-szűrésre küldték be. A másik vizsgált szlovákiai telepről csak rágókötél minták érkeztek be vizsgálatra. Összesen 236 rágókötélmintát és 181 orrtamponmintát gyűjtöttünk és mindet  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk további felhasználásig.

### 4.2. Nukleinsav-kivonás

A rágókötélminták egyenként kerültek tesztelésre és  $300\times\text{g}$  sebességgel 5 percig centrifugáltuk a nukleinsav kivonás előtt. Az orrtamponokat PBS-be áztattuk, vortexeltük és az azonos korcsoportból származó mintákat, a korcsoportonkénti mintaelemszámtól függően 4 vagy 5 mintánként ( $100\mu\text{l}/\text{minta}$ ) pooloztuk. Az RNS-t  $200\text{--}200\mu\text{l}$  mintából vontuk ki a QIAcube nukleinsav-kivonó automata (Qiagen, Hilden, Németország) és a QIAmp cadior Pathogen Mini Kit (Qiagen) segítségével, a gyártó protokollja szerint. A PPIV-1-pozitív

poolokat alkotó mintákból később egyedileg is elvégeztük a nukleinsav kivonást. Az RNS-mintákat  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további elemzésig.

#### 4.3. Kvantitatív reverz-transzkripció PCR (RT-qPCR) és olvadáspont-elemzés

A mintákat RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk, a PPIV-1 L gén jelenlétének kimutatása céljából. Ezt követően az olvadási hőmérséklet elemzés segítségével értelmeztük az eredményeket (7.ábra). Az RT-qPCR vizsgálatokat Rotor-Gene Q műszeren (Qiagen) futtattuk QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) és specifikus primerek segítségével [15]:

Forward	5'-TACAATATATGTGGGTGATCCTTACT-3'
Reverse	5'-GCCTGAATCTTCATGATCTTCTAAA-3'

1. táblázat: Az RT-qPCR reakciók során használt specifikus primerek.

	1 reakció (20 $\mu\text{l}$ )	Végső koncentráció
2x Sybr Green Master Mix	10 $\mu\text{l}$	1x
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
RT-Mix (enzim)	0,2 $\mu\text{l}$	1x
H <sub>2</sub> O: MilliQ DEPC	5,8 $\mu\text{l}$	
templát RNS	2 $\mu\text{l}$	

2. táblázat: Az RT-qPCR reakciók során használt reagensek és azok mennyisége.

Az alábbi hőmérséklet profilt alkalmaztuk az RT-qPCR reakciók során:

	Hőmérséklet	Idő	Hőmérsékleten tartás / ciklizálás
1.	50 $^{\circ}\text{C}$	10 perc	hőmérsékleten tartás
2.	95 $^{\circ}\text{C}$	30 perc	hőmérsékleten tartás
3.	95 $^{\circ}\text{C}$	5 másodperc	40 ciklus
4.	60 $^{\circ}\text{C}$	30 másodperc	

3. táblázat: Az RT-qPCR reakciók során alkalmazott hőmérséklet profil.

A 37-nél magasabb Ct (Cycle threshold, küszöbérték) értékű mintákat negatívnak tekintettük. Az RT-qPCR eredmények statisztikai elemzését GraphPad Prism 8 segítségével végeztük. A különböző korcsoportok és mintatípusok Ct értékeinek összehasonlítását Mann–Whitney teszttel vizsgáltuk.

#### 4.4. PPIV-1 fúziós (F) fehérje génszekvenálás és filogenetikai elemzés

A PPIV-1 pozitív poolokból származó orrtamponmintákat külön-külön is leteszteltük. Az F gén szekvenálását 30-nál kisebb Ct értékkel rendelkező mintákon kíséreltük meg elvégezni. A reakciókat egy Genesys 96T gradiens PCR gépben (Tianlong, Kína) hajtottuk végre, és ehhez a Qiagen One-Step RT-PCR kitet használtunk. A reakciókban specifikus primer párok kerültek felhasználásra Park és mtsai által leírtak alapján [20]:

F-Rev	5'-TCGTG-CACCCTAAGTTTTCTTTA-3'
F-For int 1	5'-GAGAGAAGAGCTTAACATTACAGGC-3'
F-For	5'-ACTTAGGGTACAAGTTATCCAAAAA-3'
F-Rev int 1	5'-TCATAAATATCTGTYTTCCCGAGATT-3'

4. táblázat: A hagyományos RT-PCR során használt specifikus primer párok.

	1 reakció (50 µl)	Végső koncentráció
5x One-Step Master Mix	10 µl	1x
dNTP mix (10 mM)	2 µl	400 µM
Forward primer (40 µM)	1 µl	0,8 µM
Reverse primer (40 µM)	1 µl	0,8 µM
RT-PCR enzim mix	2 µl	1x
RNáz inhibitor	0,5 µl	20 unit
H <sub>2</sub> O: MilliQ DEPC	26,5 µl	
templát RNS	7,5 µl	

5. táblázat: A hagyományos RT-PCR során használt reagensek és azok mennyisége.

Az RT-PCR reakciók a következő hőmérséklet-profil szerint zajlottak:

	Hőmérséklet	Idő	Hőmérsékleten tartás / ciklizálás
1.	48 °C	20 perc	hőmérsékleten tartás
2.	94 °C	3 perc	hőmérsékleten tartás
3.	94 °C	30 másodperc	40 ciklus
4.	55 °C	50 másodperc	
5.	68 °C	2 perc	
6.	68 °C	7 perc	hőmérsékleten tartás

6. táblázat: A hagyományos RT-PCR során alkalmazott hőmérséklet profil.

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá. A megfelelő méretű amplikonokat manuálisan steril szikével vágtuk ki, majd tisztítottuk QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével a gyártó protokollja szerint. Az amplikonok közvetlen szekvenálásához mindkét irányban a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-et (Thermo Fisher Scientific, Ljubljana, Szlovénia) használtuk. A PCR termékek tisztítására és koncentrálására a DNA Clean & Concentrator®-5-öt (Zymo Research, Irvine, CA, USA) használtuk. A kapilláris elektroforézist egy kereskedelmi szolgáltatónál (BIOMI Kft., Gödöllő, Magyarország) végezték el. A kromatogramokat a Chromas 2.6.6 szoftver (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Ausztrália) segítségével jelenítettük meg. A reverse és forward szekvenciákat az E-INS-I módszerrel illesztettük össze a MAFFT verzió 7 online szoftver segítségével [36]. A MEGAX szoftver használatával készítettük el a filogenetikai fát Maximum Likelihood módszerrel, 1000 ismétléssel végrehajtva a bootstrap elemzést [37]. Az összes elérhető PPIV-1 F génszekvenciát letöltöttük a GenBankból, az egyedi szekvenciáinkhoz illesztettük, és a Stadjek és munkatársai által javasolt módszer alapján osztályoztuk [29].

## 5. Eredmények

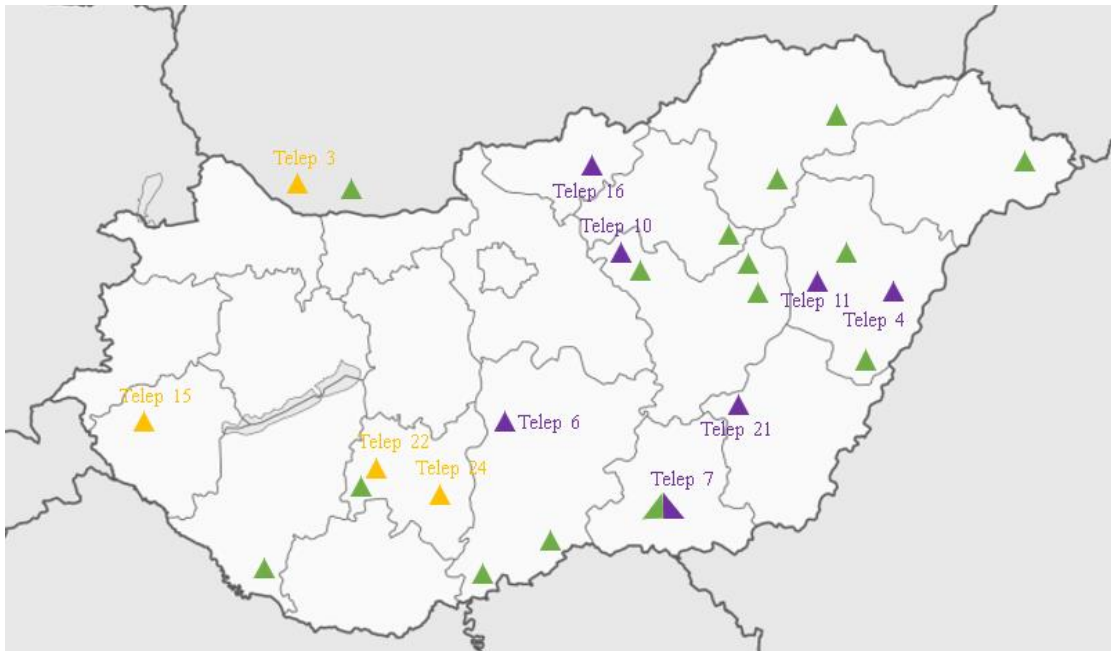
### 5.1. A PPIV-1 kimutatási aránya különböző sertéstelepeken

A vizsgálatba bevont 26 (24 magyar és 2 szlovákiai) sertésállományból gyűjtött 236 rágókötélmintát valós idejű RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a sertés-parainfluenza vírus 1 kimutatásának céljából (4. ábra). A vizsgált állományok közül 11-ben (42,31%) (11/26) bizonyosodott be a PPIV-1 jelenléte, tehát legalább egy pozitív rágókötélmintát sikerült azonosítani. A 11 pozitív állomány 10 magyar és 1 szlovákiai telepet foglal magába így megállapítható, hogy a vírus magyarországi előfordulási gyakorisága 41,66%-ra (10/24) tehető. A 236 rágókötélmintából összesen 25 (10,59%) volt pozitív PPIV-1-re, továbbá a pozitív minták százalékos aránya 10% és 60% között változott az egyes pozitív telepeken (7. táblázat). A PPIV-1-pozitív rágókötélminták aránya az állatok életkorát tekintve a következők szerint alakult: 64% (16/25) választott sertéstől, 36% (9/25) pedig hízó sertéstől származott. A vírusr mennyiség jellemzésére alkalmas Ct érték a választott sertések pozitív rágókötélmintái esetén 21,92 és 35,39 között, hízó sertéseknél 26,05 és 35,79 között változott. A PPIV-1-pozitív 8-12 hetes sertések mintáinak Ct értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak ( $31,27 \pm 3,97$ ), mint a 18-20 hetes sertések mintáiban ( $33,46 \pm 2,94$ ) (5. ábra).

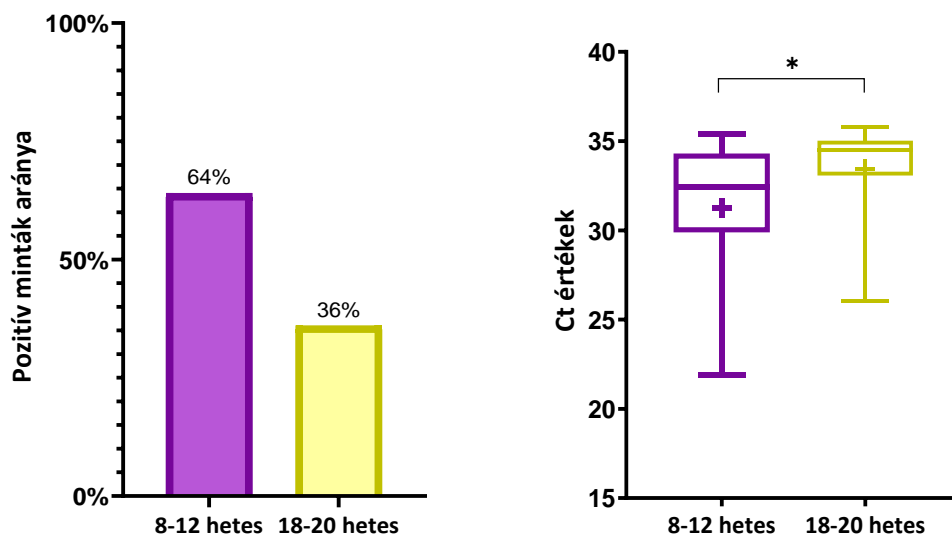


TELEPEK	Összes minta (db)	Pozitív minták (db)	Pozitív minták aránya	Ct min	Kor (hét)
Telep 1	10	0	0 %		
Telep 2	10	0	0 %		
Telep 3	10	3	30 %	29,9	12
Telep 4	12	5	42 %	21,92	8
Telep 5	10	0	0 %		
Telep 6	10	1	10 %	33,6	18
Telep 7	10	1	10 %	32,54	20
Telep 8	10	0	0 %		
Telep 9	10	0	0 %		
Telep 10	10	2	20 %	32,28	10
Telep 11	10	3	30 %	29,93	10
Telep 12	10	0	0 %		
Telep 13	10	0	0 %		
Telep 14	4	0	0 %		
Telep 15	10	2	20 %	34,74	10
Telep 16	10	1	10 %	33,78	10
Telep 17	10	0	0 %		
Telep 18	10	0	0 %		
Telep 19	10	0	0 %		
Telep 20	10	0	0 %		
Telep 21	10	2	20 %	34	10
Telep 22	10	2	20 %	31,57	8
Telep 23	10	0	0 %		
Telep 24	5	3	60 %	28,56	8
Telep 25	10	0	0 %		
Telep 26	5	0	0 %		

7. táblázat: A vizsgálatba bevont sertésstartó telepekről vett rágókötél minták száma, a pozitív minták száma és aránya, a pozitív minta (vagy minták legalacsonyabb) Ct értéke, valamint a sertés a kora, amelyből származó minta Ct értéke fel van tüntetve. Lila színnel a pozitív telepek, sárga színnel azok a pozitív telepek, ahol orrtampon-mintavételezés is történt, zöld színnel pedig azok a telepek lettek megjelölve, melyek negatívnak bizonyultak PPIV-1 vírus jelenlétére.

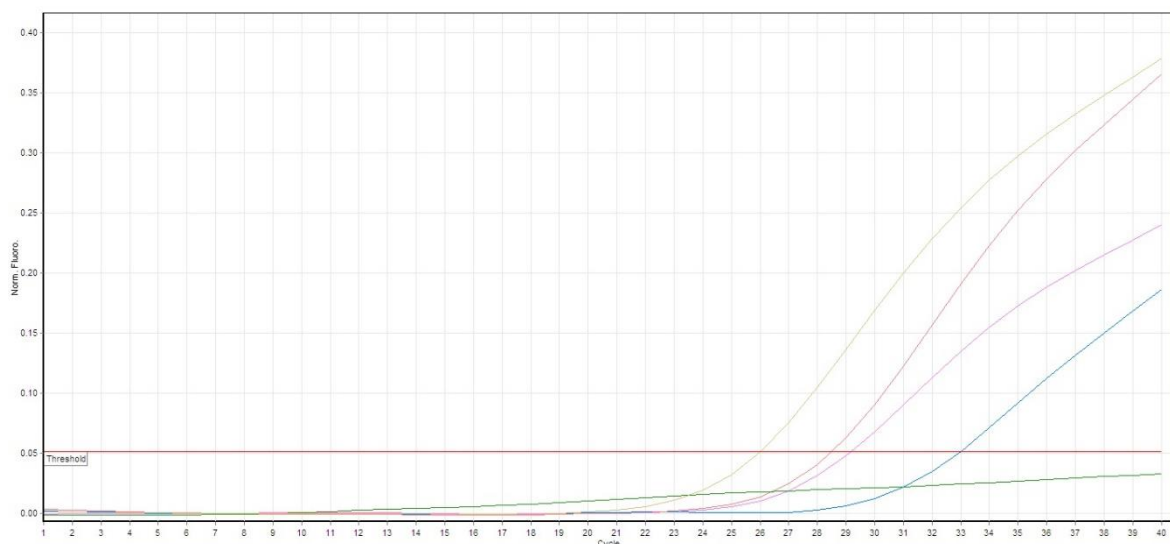


4. ábra: A mintavételezett telepek földrajzi elhelyezkedése látható Magyarországi térképén. Lila színnel a pozitív telepek, sárga színnel azok a pozitív telepek, ahol orrtampon-mintavételezés is történt, zöld színnel pedig azok a telepek lettek feltüntetve, melyek negatívnak bizonyultak PPIV-1 jelenlétére.

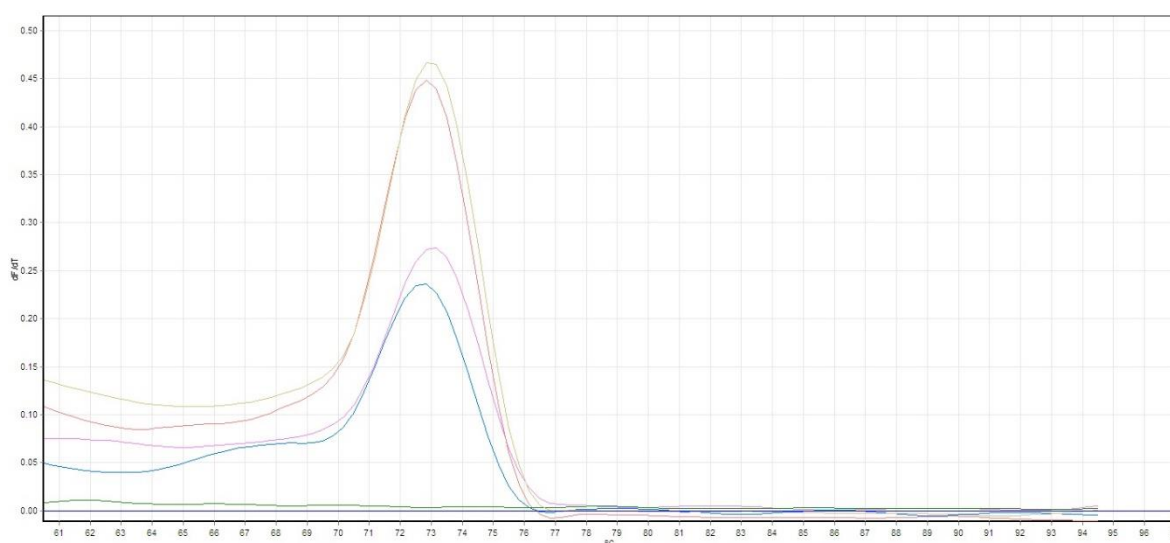


5. ábra: A bal oldalon a választott sertések (8–12 hetes) és hízók (18–20 hetes) PPIV-1 pozitív rágóköttél mintáinak százalékos aránya látható. A jobb oldalon a választott sertések (8–12 hetes) és a hízók (18–20 hetes) PPIV-1 pozitív rágóköttél mintáinak Ct értékeit reprezentáló boxplotok vannak feltüntetve. A bajusz a minimumot és a maximumot mutatja, a „+” jelek pedig az átlagot. A doboz vízszintes vonalai az első kvartilist, a mediánt és a harmadik kvartilist mutatják. Az oszlopok feletti csillag a statisztikailag szignifikáns különbséget jelenti (\*:  $P < 0,05$ ).

A 24-es telep rágókötélmintáinak RT-qPCR vizsgálatát szemlélteti a 6. ábra. Az amplikonok specifikusságának ellenőrzése olvadási görbék elemzésével történt (7. ábra). A pozitív kontroll olvadási hőmérséklete  $73,0^{\circ}\text{C}$  volt, ettől 24-es telepről származó három PPIV-1-pozitív rágókötélminta olvadási hőmérsékletei jelentős mértékben nem tértek el, a következő értékek kerültek megállapításra:  $73,0^{\circ}\text{C}$ ,  $72,7^{\circ}\text{C}$ ,  $72,8^{\circ}\text{C}$ .



6. ábra: Egy RT-qPCR reakció eredményeit ábrázoló PCR görbe. Színkódok: sárga: pozitív kontroll; piros, rózsaszín, kék: pozitív minták (24-es telepről származó rágókötélminták); zöld: negatív kontroll.

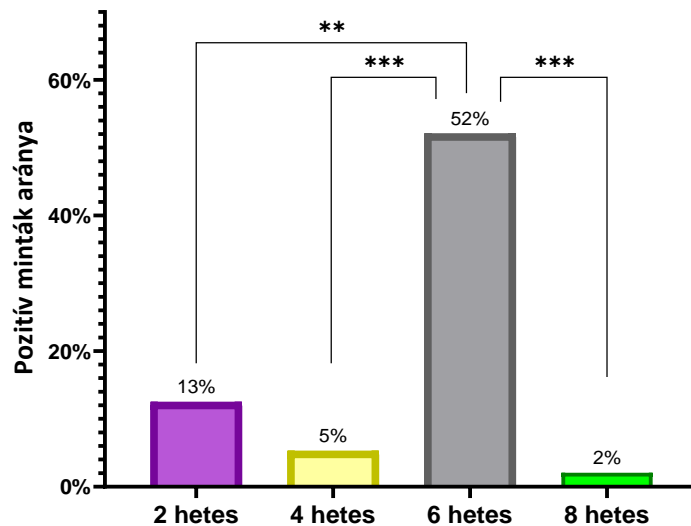


7. ábra: Az amplikonok specifikusságának ellenőrzése olvadási görbék analízisével.

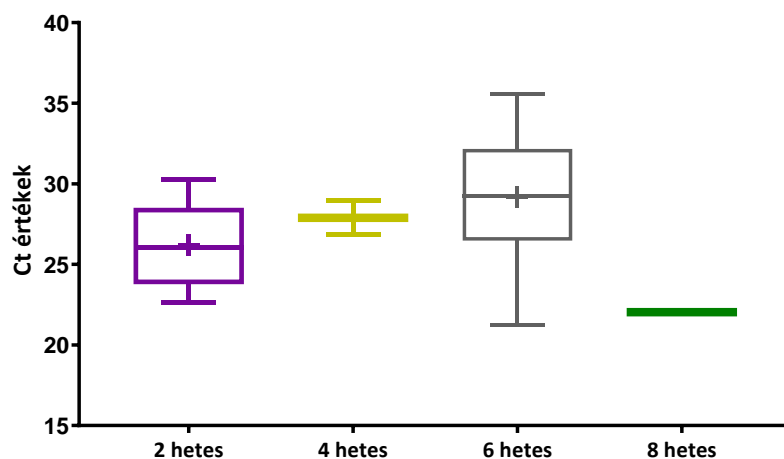
A 3 magyar és 1 szlovákiai PPIV-1 pozitív állományból további keresztmetszeti mintavételezésre került sor, aminek keretein belül a 181 orrtamponminta közül 34 esetben (18,78%) mutattuk ki a vírus jelenlétét (8. táblázat) A különböző korcsoportok közül a 6 hetes állatokból vett mintákban szignifikánsan magasabb volt a kimutatási arány, mint bármely más vizsgált korcsoportban, a 6 hetes állatok esetén a minták több mint fele (52,08%) pozitív eredményt adott (8. ábra). A pozitív orrtamponok Ct értékei 21,24 és 35,06 között változtak, az átlagos Ct érték  $28,37 \pm 3,84$  volt. Az egyes korcsoportokban mért Ct értékek között nem volt szignifikáns különbség (9. ábra).

	Kor (hét)	Összes minta (db)	Pozitív minta (db)	Pozitív minták aránya
4 telep: Telep 3, Telep 15, Telep 22, Telep 24	2	48	6	12,5 %
	4	38	2	5,26 %
	6	48	25	52,08 %
	8	48	1	2,08 %

8.táblázat: A 4 orrtampon-mintavételezett telepen vizsgált sertések kora, az orrtamponminták száma, valamint a pozitív minták száma és aránya.



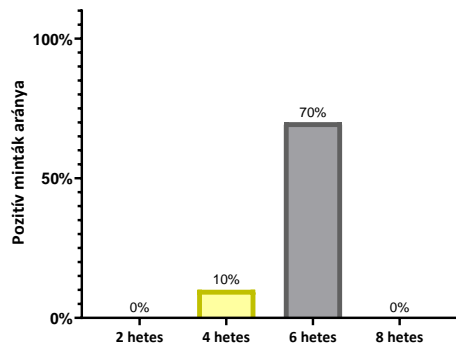
8. ábra: A PPIV-1-pozitív orrtamponok százalékos aránya különböző korcsoportokban. Az egyes korcsoportok PPIV-1 prevalenciájának statisztikai összehasonlítását Fisher-féle egzakt teszttel végeztük. Az oszlopok feletti csillag a statisztikailag szignifikáns különbséget jelenti (\*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ).



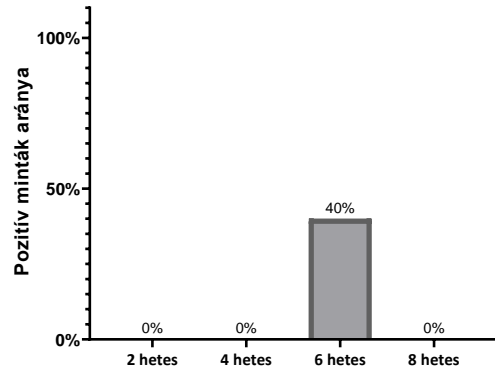
9.ábra: Boxplotok, amelyek a különböző korcsoportok PPIV-1-pozitív orrtamponok Ct értékeit reprezentálják. A bajusz a minimumot és a maximumot mutatja, a „+” jelek pedig az átlagot. A doboz vízszintes vonalai az első kvartilist, a mediánt és a harmadik kvartilist mutatják.

## 5.2. Különböző terjedési minták a négy PPIV-1 pozitív állományban

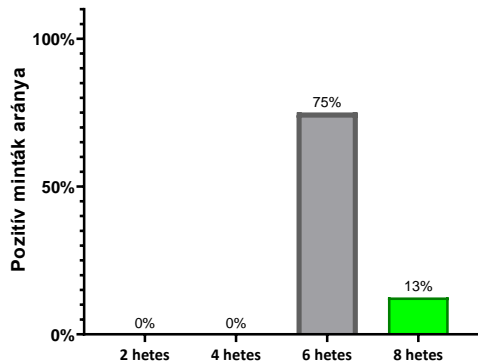
A 4 PPIV-1 pozitív állomány keresztmetszeti orrtampon-mintavételének eredményei alapján információt nyerhettünk a vírus állományon belüli fertőzési dinamikájáról. A PPIV-1 terjedési mintázataiban ezeken a telepeken némi eltérés volt felfedezhető. A 3 magyarországi telepen a 6 hetes malacoknál volt a legmagasabb a kimutatási arány, ezek az arányok az egyes telepeken 75%, 70% és 40% voltak. Mind a négy telepet tekintve a 6 hetes korosztályban  $29,18 \pm 3,88$  volt az átlagos Ct érték. A 22-es telepen a vírus már megjelent a 4 hetes malacokban, a 15-ös telepen pedig a 8 hetes korcsoportból származó minták közül egy volt pozitív. Ezzel szemben a Szlovákiában található 3-as telepen a legmagasabb kimutatási arány (60%) a legfiatalabb, 2 hetes korosztályban volt megfigyelhető. A vírus előfordulása ezen a telepen csökkenő tendenciát mutatott az idősebb korosztályok irányába. A 3-as telepen a legmagasabb genomkópiaszámot is szintén a 2 hetes állatok körében állapítottuk meg, ahol az átlagos Ct érték  $26,18 \pm 2,76$  volt. Szignifikáns különbség a különböző korcsoportokból származó PPIV-1-pozitív orrtamponok Ct értékei között nem volt megfigyelhető. Az 22-es telepen nem volt szignifikáns különbség a 4 és 6 hetes állatoknál megállapított Ct értékek között. A másik három állományban nem lehetett páronkénti statisztikai összehasonlítást végezni, mivel néhány korcsoportban túl kevés volt a pozitív minta. A fenti eredmények a 10. ábrán kerültek szemléltetésre.



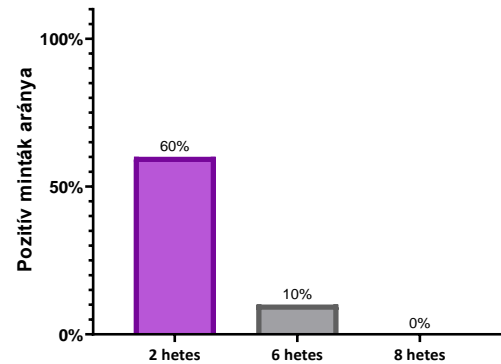
A



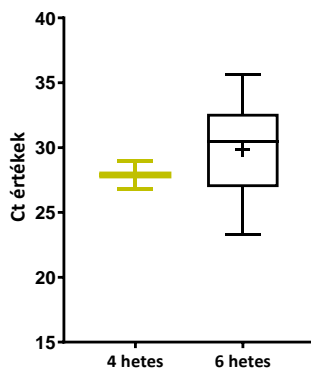
B



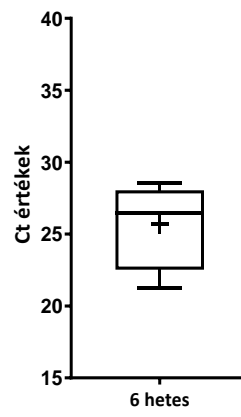
C



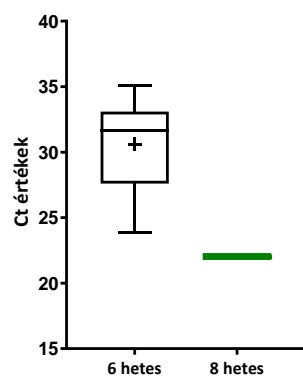
D



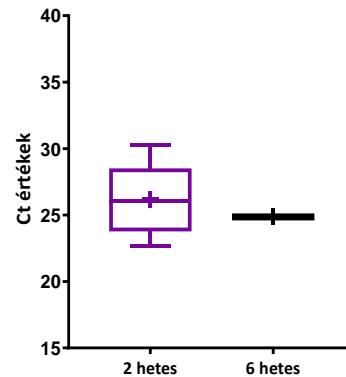
E



F



G

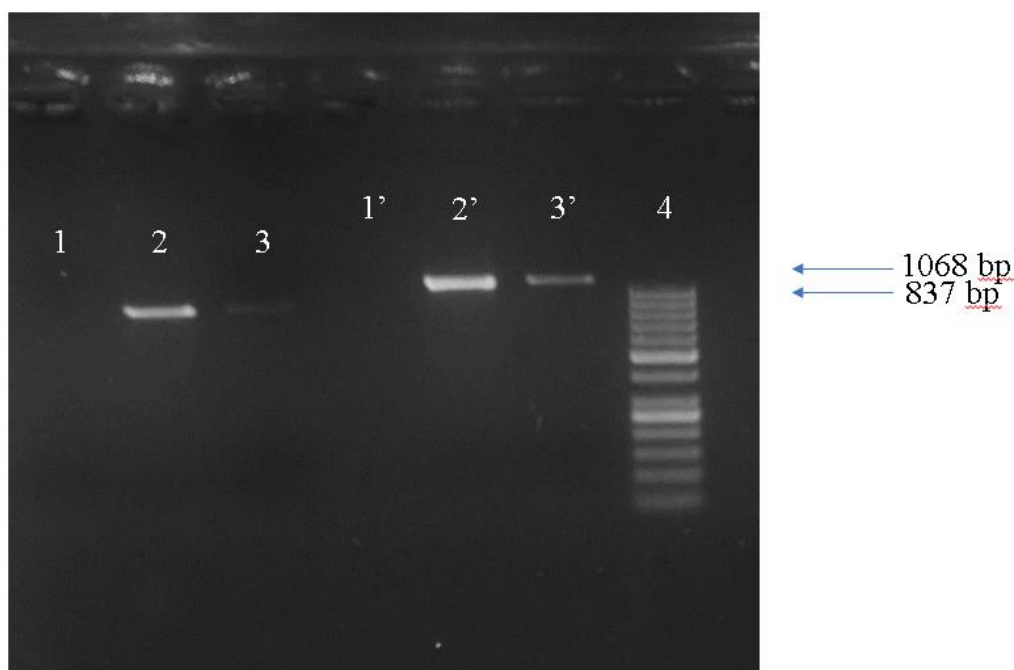


H

10. ábra: A–D: A 22-es (A), 24-es (B), 15-ös (C) és 3-as telep (D) PPIV-1-pozitív orrtamponok százalékos aránya különböző korcsoportokban. E–H: Boxplotok, amelyek a PPIV-1 pozitív orrtamponok Ct értékeit reprezentálják a 22-es (E), 24-es (F), 15-ös (G) és 3-as telep (H) különböző korcsoportjaiban. A bajusz a minimumot és a maximumot mutatja, a „+” jelek pedig az átlagot. A doboz vízszintes vonalai az első kvartilist, a mediánt és a harmadik kvartilist mutatják.

### 5.3. Szekvenciaanalízis és filogenetika

A teljes F gén szekvenáláshoz a legalacsonyabb Ct értékű orrtamponokat választottuk ki minden PPIV-1-pozitív farmról. A szekvenáló RT-PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá, melynek eredményét egy pozitív minta esetében a 11. ábra szemlélteti. A két egymással részben átfedő génszakaszt felamplifikáló primerpárral az F fehérjét kódoló gén teljes szekvenciáját öt esetben tudtuk meghatározni, valamint további két részleges szekvenciát is detektáltunk (GenBank hozzáférési számok a teljes F gén szekvenciákhoz: OQ877210–OQ877214).

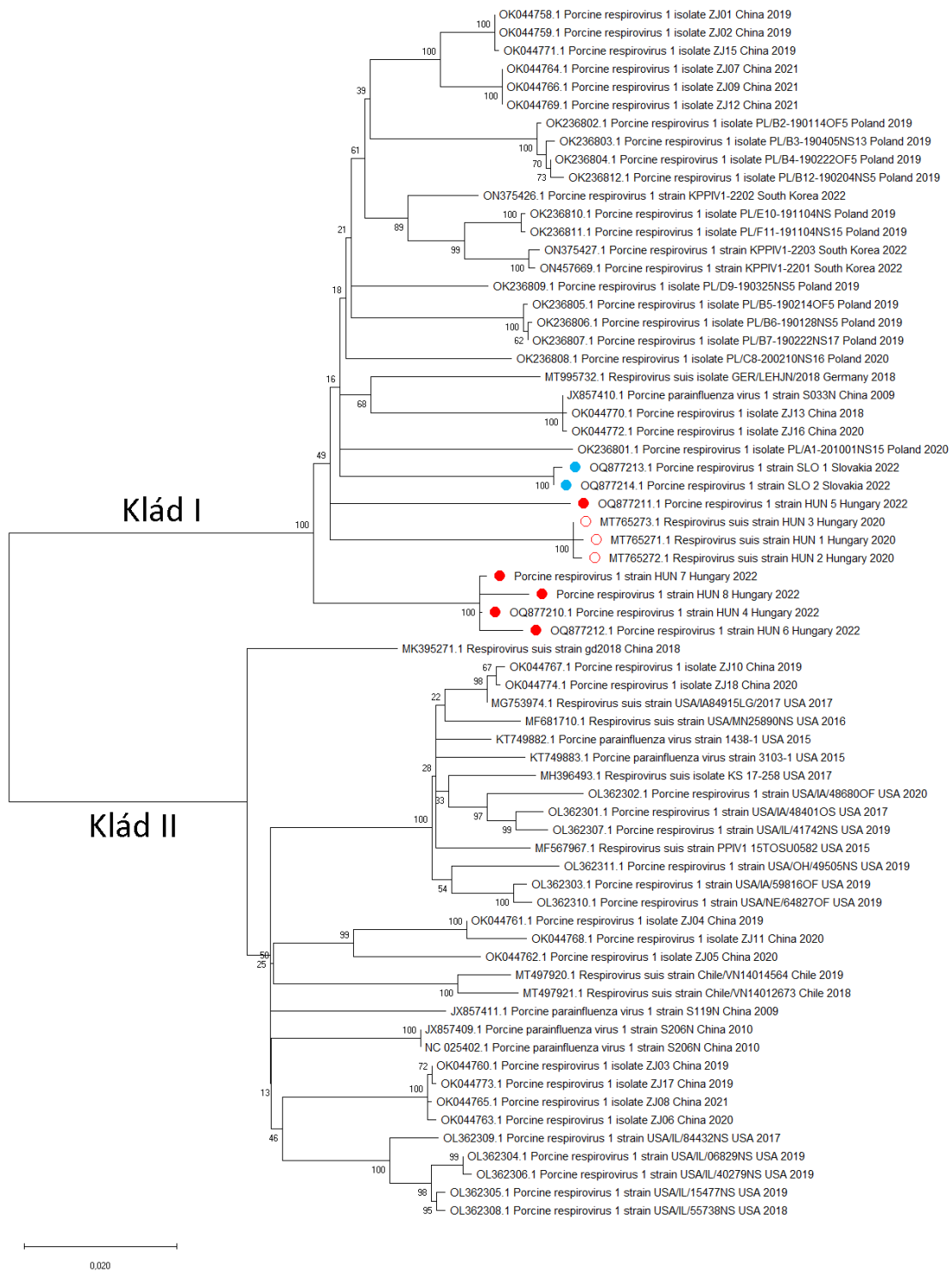


11. ábra: Agaróz gélelektroforézis. 1, 1': negatív kontroll, 2, 2': pozitív kontroll, 3: minta (F-For és F-Rev int 1), 3': minta (F-Rev és F-For int 1), 4: molekulamarker (50 bp DNS létra). A két fragmens 837-, illetve 1068 bázispár hosszúságú.

Összehasonlító nukleotidszekvencia-analízis 93,53-94,65%-os hasonlóságot mutatott ki a magyar és a szlovákiai törzsek F génjeinek szekvenciái között. Az összes PPIV-1 törzs két különálló kládba csoportosul a filogenetikai fákon. A jelen vizsgálatban kimutatott magyar és szlovákiai törzsek az I. kládba tartoztak, hasonlóságuk a korábban leírt szekvenciákkal 65,93% és 95,59% között, illetve 66,29% és 95,18% között volt.

Három újonnan detektált magyar szekvencia (2022), két szlovákiai szekvencia, három korábban leírt magyar szekvencia (2020), valamint két részleges szekvencia is feltüntetésre került a filogenetikai fán (12. ábra). A teljes szekvenciák közül HUN 4-gyel jelölt a 24-es telepről származó mintából, a HUN 5-tel jelölt a 15-ös telepről származó mintából, a HUN 6-tal jelölt a 22-es telepről származó mintából, a SLO 1, illetve SLO 2 pedig a 3-as telepről származó mintákból meghatározott szekvenciák. A részleges szekvenciák a HUN 7-tel jelölt a 24-es telepről származó mintából (994 bp) és a HUN 8-cal jelölt 22-es telepről származó mintából meghatározott szekvenciák (936 bp). Megállapítható, hogy a magyar és szlovákiai szekvenciák más európai törzsekkel szoros filogenetikai rokonságot mutatnak.





12. ábra: Filogenetikai elemzés a PPIV-1 szekvenciák F fehérjét kódoló génjéről. Piros karika jelöli a 2020-as magyar szekvenciákat, piros pötty az újonnan detektált magyar szekvenciákat (2022), kék pötty pedig a szlovákiai szekvenciákat. A filogenetikai fát MEGAX segítségével állítottuk össze Maximum Likelihood módszerrel, 1000 ismétléssel végrehajtva a bootstrap elemzést. Az összes rendelkezésre álló PPIV-1 F gén szekvenciát letöltöttük a GenBank-ból, és az általunk kimutatott szekvenciához igazítottuk.

## 6. Következtetések

A légzőszervi megbetegedések a sertéstartás egyik leggyakoribb kihívását jelentik. A sokrétű etiológia magában foglalja a fizikai-kémiai stresszorokat, valamint a vírusos eredetű és bakteriális kórokozókat. A klinikai tünetek, mint orrváladékozás, köhögés vagy bizonyos esetekben láz, nem elegendőek az oktani diagnózis felállításához. A PPIV-1 klinikai légzőszervi betegségének diagnosztizálása kihívást jelent továbbá azért is, mert a vírus jelenlétéről mind tüneteket mutató [22, 23, 26, 27], mind tünetmentes állományokban beszámoltak [21, 24]. A vírus patogenitásáról és globális elterjedtségéről viszonylag kevés információ áll jelenleg rendelkezésre. Korábbi kutatások arról számoltak be, hogy a PPIV-1 replikációja a sertések légúti traktusát érintő enyhe klinikai betegséget vagy elváltozásokat okozott. Az eddigi irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a PPIV-1 nem játszik elsődleges szerepet a sertések légúti megbetegedéseiben, de hozzájárulhat a PRDC kialakulásához, mivel képes replikálódni a felső és alsó légúti traktusban, így potenciálisan hajlamosít másodlagos kórokozókra [26, 27, 30]. Ezt támasztja alá, hogy a PPIV-1 különböző mechanizmusokkal gátolja a gazdaszervezet veleszületett immunválaszát, így elősegítve a másodlagos kórokozókkal való fertőződést [32]. A légúti betegségben szenvedő sertések PPIV-1 és IAV, illetve SOV fertőzéseinek magas előfordulási gyakorisága miatt szintén feltételezhető, hogy ezek a vírusok szerepelnek PRDC alkotói között [33, 34].

A *Paramyxoviridae* család egyes tagjai képesek fajok közötti átvitelre, ezért kiemelt figyelmet kell fordítani az újonnan megjelenő vírusokra, annak érdekében is, hogy megismerjük megbetegítő képességüket új gazdaszervezetekben. Ez különösen fontos a sertések és más haszonállatok esetében, melyek gyakran érintkeznek emberrel, ahogyan azt a Nipah vírushoz hasonló zoonózisos vírusok magas halálozási aránya is igazolja [11].

A PPIV-1 világszerte jelen van [15, 21–24, 26–28] és az eddigi kutatási eredmények alapján azt feltételezik, hogy két különálló PPIV-1 törzs fejlődhetett ki egymástól függetlenül Európában és Észak-Amerikában, valamint, hogy a vírus fertőzött állatok által juthatott el Ázsiába [29] (3. ábra). Az Európában előforduló PPIV-1-et először egyetemünk kutatócsoportja írta le orrtamponmintákból. A vizsgált állományok közül csak egy (4,5%) volt pozitív PPIV-1-re [24]. A vírus prevalenciája más európai országokban igen magasnak bizonyult, a német és holland telepek feltérképezése során azok 42,3%-ban [21], a lengyel telepek 76,7%-ban számoltak be a jelenlétéről [26].

Munkánk során az eddigi magyarországi eredményekhez viszonyítva szélesebben körben vizsgáltuk a magyar sertéstartó telepeket, valamint a határhoz közeli további 2 szlovákiai telepet. Az elmúlt három évben az egész ország területéről széleskörű, rendszeres mintagyűjtést végeztünk, hogy több információt szerezzünk a PPIV-1 előfordulásáról Magyarországon. A vizsgálatba bevont 26 sertésállományból (236) rágókötelemintát gyűjtöttünk, amelyeket RT-qPCR módszerrel vizsgáltunk. Az eredmények azt mutatták, hogy PPIV-1 vírus széles körben elterjedt Magyarországon, mivel a vírus jelenlétét 10 (42%) magyar állományban igazoltuk, továbbá 1 felvidéki állományban is kimutattuk. Utóbbi eredmény az első, jelenleg még publikálás alatt lévő tudományos bizonyíték a PPIV-1 jelenlétére Szlovákiában. A 8-12 hetes sertések rágókötelemintáiból nagyobb arányban került kimutatásra a PPIV-1, továbbá ezen minták Ct értékei is szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a 18-20 hetes sertések esetében (5. ábra). 3 magyar és 1 szlovákiai PPIV-1 pozitív állományból további keresztmetszeti mintavételezésre került sor, aminek keretein belül a (181 orrtamponminta közül 34 esetben) (18,78%) mutattuk ki a vírus jelenlétét. A vírus mind a négy telepen kimutatható volt, ami folyamatos PPIV-1 fertőzésre utal a pozitív egyedek légúti traktusában.

Egyetemünk kutatócsoportjának PPIV-1-gyel kapcsolatos közleményében leírt alacsonyabb előfordulási gyakoriságot feltehetően az eltérő mintavételi protokollok magyarázhatják, mivel akkor a szerzők 3 hetes állatok orrtamponmintáit gyűjtötték egy neurotróp astrovírus szűrővizsgálat részeként [24, 38]. A jelenlegi kutatás során a választott malacoktól és hízóktól származó rágókötelemintákat használtunk az első körös felméréshez. Ez a módszer lehetővé tette, hogy több állatot egyszerre szűrjünk a kórokozó jelenlétére különböző termelőegységekből.

Hasonlóan eredményeinkhez, Németországban és Hollandiában a vizsgált állományok 42,3%-ában (11/26) igazolták a PPIV-1 jelenlétét [21]. Chilében [23] és Lengyelországban [26] olyan gazdaságokban végeztek vizsgálatot, ahol a mintavétel idején az állatok légzőszervi tüneteket mutattak. Itt a cikk szerzői magasabb előfordulási arányokról számoltak be Magyarországhoz képest, a farmok 100% (6/6) illetve 76,7% (23/30) volt PPIV-1 pozitív. Dél- Koreában 115-ből 16 telepen (13,9%) volt jelen a vírus, abban a felmérésben, melynek során szintén légzőszervi klinikai tüneteket mutató sertéseket vizsgáltak [27]. A légúti betegségben szenvedő állományokban tapasztalható magasabb PPIV-1 előfordulási gyakoriság arra utal, hogy a PPIV-1 fertőzés szerepet játszhat a légúti

megbetegedések patogenezisében, bár a vírussal való fertőzöttség önmagában nem feltétlenül elegendő, ahhoz, hogy a betegség klinikai tünetekben nyilvánuljon meg.

A PPIV-1 állományon belüli fertőzési dinamikáját a négy pozitív telep keresztmetszeti orrtamponmintavételének eredményei alapján elemeztük. A három magyarországi telepen a 6 hetes állatoknál volt a legmagasabb a kimutatási arány (40-75%), míg a szlovákiai telep esetén ez a 2 hetes malacok esetén volt megfigyelhető (60%). A magyarországi telepeken a 2 hetes korcsoportban a vírus nem volt jelen, a 4 hetes állatoknak pedig csupán 10%-a bizonyult pozitívnak. A 8 hetes sertések mintái közül mindössze egy adott pozitív eredményt (10. ábra). Ezek az eredmények az maternális immunitás védő hatására utalhatnak, amely a választásig védelmet nyújthatott az állatoknak ezeken a telepeken, továbbá a választáskor az állatokat érő immunrendszert gyengítő környezeti stressz hatások is állhatnak a 6 hetes korosztályban előforduló magas előfordulási gyakoriság hátterében. Az anyai immunglobulinok mennyisége a választás idejére fokozatosan csökken, ennek szerepét az ezt követő időszakban történő fertőződésben más légzőszervi vírusok esetében is leírták [39–41]. Ezzel ellentétben a szlovákiai telepen a vírus a 2 hetes korcsoportban volt a legelterjedtebb (60%), az idősebb korosztályokban a fertőzöttség csökkenő tendenciája volt megfigyelhető (10. ábra). Ez utalhat a maternális immunitás hiányára a vizsgált malacok körében, abban az esetben, ha nem kaptak megfelelő mennyiségű vagy minőségű kolosztrumot, amely a vírus gyors terjedését tette lehetővé közöttük. Szignifikáns különbség a különböző korcsoportokból származó PPIV-1-pozitív orrtamponok Ct értékei között nem volt megfigyelhető (9. ábra). A szlovákiai telepen a legmagasabb genom kópiaszámot a 2 hetes állatok körében állapítottuk meg (átlagos Ct érték:  $26,18 \pm 2,76$ ). A szlovákiai telepen a légzőszervi tüneteket mutató 2, 6 és 8 hetes malacoktól gyűjtött orrtamponmintákat eredetileg IAV szűrésre küldték be, amelyek közül egy 8 hetes állat mintája adott IAV pozitív eredményt Nagy és munkatársai által publikált protokoll alapján [42]. A PPIV-1 szerepet játszhatott ezen sertések esetén a légúti tünetek kialakulásában, hiszen a IAV jelenléte csupán egy esetben volt igazolt.

Korábbi európai kutatások eredményeivel párhuzam vonható az egyes korosztályok PPIV-1 előfordulási gyakoriságát tekintve [24, 26]. Egyetemünk tanulmányában, ahol hasonló keresztmetszeti mintavételi protokollt alkalmaztak egy PPIV-1 pozitív telepen, a vírus a 4 hetes malacok között volt a legelterjedtebb (65%), de a 6 hetes malacok mintáinak 40%-a is pozitív volt [24]. Egy nemrégiben publikált lengyelországi kutatás során a szopós malacoktól származó orrtamponminták 46,9%-a volt PPIV-1 pozitív, és a vírus a 5 és 7 hetes

malacok között volt a legelterjedtebb [26]. Az USA-ban a sertések minden korosztályából izolálták a kórokozót, de gyakrabban fordult elő választás utáni és növendék sertésekben [20].

A PPIV-1 teljes F gén szekvenciájának alapján a filogenetikai besorolás két különálló kládba történik [29] Kutatásunk során detektált öt magyar és két szlovákiai szekvencia az I. kládba sorolandó, más európai és néhány kínai törzs mellett (12. ábra). A magyar és szlovákiai törzsek nukleotidazonossága több mint 93% volt, és mindkettő közeli genetikai rokonságot mutatott a közelmúltban Lengyelországból származó PPIV-1 szekvenciával.

Kutatásunk eredményei tükrözik, hogy a PPIV-1 sokkal szélesebb körben elterjedt Magyarországon, mint ahogy az egyetemünk korábbi tanulmányában feltételezett volt, továbbá megerősítést nyert a vírus jelenléte Szlovákiában is. További vizsgálatok szükségesek a légzőszervi klinikai tüneteket mutató állományokban a PPIV-1 patogenezisének és klinikai jelentőségének pontosabb megértése, valamint, a PRDC-ben betöltött lehetséges szerepének meghatározása érdekében.

## 7. Összefoglaló

A sertés-parainfluenza vírus 1 a (PPIV-1, Porcine parainfluenza virus 1; species: *Porcine respirovirus 1*) Paramyxovírusok családjába tartozik. E család tagjai különböző légúti, idegrendszeri megbetegedést okozhatnak számos haszon-, és társállatfaj esetén, valamint némely paramyxovírus zoonotikus tulajdonsággal is bír. A PPIV-1-et először Hongkongban írták le 2013-ban sertések vágóhídi végbél- és orrtampon-mintáinak vizsgálata során, majd Amerikában, Ázsiában és számos európai országban is kimutatták jelenlétét. Kutatási eredmények alapján azt feltételezik, hogy két különálló PPIV-1 törzs fejlődött ki egymástól függetlenül Európában és Észak-Amerikában, valamint, hogy a vírus fertőzött állatok által juthatott el Ázsiába. A vírus patogenitásáról és globális elterjedtségéről kevés információ áll rendelkezésre, de az eddigi irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy hozzájárul a sertések légzőszervi betegség komplexének (PRDC) kialakulásához. Korábbi kutatások arról számoltak be, hogy a PPIV-1 replikációja a sertések légúti traktusát érintő enyhe klinikai betegséget vagy elváltozásokat okozott.

Kutatásunk célja a PPIV-1 előfordulási gyakoriságának és genetikai sokféleségének meghatározása volt a magyar sertésállományokban, valamint a Szlovákiában még le nem írt PPIV-1 vírus első kimutatása az országban. A vizsgálatba bevont 24 magyar és 2 szlovákiai, légzőszervi klinikai tüneteket nem mutató sertésállományból 236 rágókötelemintát gyűjtöttünk, amelyeket valós idejű RT-qPCR módszerrel vizsgáltunk. A vírust jelenlétét 10 (42%) magyar, illetve 1 felvidéki állományban mutattuk ki, amely az első tudományos bizonyíték a PPIV-1 jelenlétére Szlovákiában. 3 magyar és 1 szlovákiai PPIV-1 pozitív állományból további keresztmetszeti mintavételezésre került sor, aminek keretein belül a 181 orrtamponminta közül 34 esetben (18,78%) mutattuk ki a vírus jelenlétét. A magyarországi telepeken a 6 hetes állatoknál volt a legmagasabb a kimutatási arány (40-75%), míg a szlovákiai telep esetén ez a 2 hetes malacok esetén volt megfigyelhető (60%). A PPIV-1 F (fúziós) génjének szekvenciáját hét esetben tudtuk meghatározni, a filogenetikai elemzés 93,53% és 94,65% közötti hasonlóságot mutatott a magyar és szlovákiai törzsek között. Az újonnan azonosított magyar és szlovákiai törzseket is az I. kládba soroltuk, más európai törzsekkel együtt.

További tanulmányok szükségesek légzőszervi klinikai tüneteket mutató állományokban a vírus patogenezisének pontosabb megértése, valamint a PRDC-ben betöltött lehetséges szerepének meghatározása érdekében.

## Summary

Porcine parainfluenza virus 1 (PPIV-1) also known as *Porcine respirovirus 1* (PRV-1) belongs to the *Paramyxoviridae* family. Members of this family are known to cause various respiratory and neurological diseases in domestic and companion animal species. Additionally, some paramyxoviruses have zoonotic potential. PPIV-1 was first detected in rectal- and nasopharyngeal swabs obtained from slaughterhouse pigs in Hong Kong in 2013. Since its first detection, it has been identified in America, Asia and several European countries. Recent studies revealed that two separate PPIV-1 lineages might have independently evolved in Europe and North America, potentially making their way to Asia through infected animals. Although, information on the pathogenicity and global prevalence of the virus is sparse, it has been speculated to play a role in the porcine respiratory disease complex (PRDC). Previous experimental studies reported that PPIV-1 replicates in the porcine respiratory tract causing mild clinical disease or lesions.

The objective of this study was to estimate the prevalence and the genetic diversity of PPIV-1 in Hungarian pig farms and to report the presence of the virus in Slovakia for the first time in the country. Altogether 236 oral fluid samples were collected from 24 Hungarian and 2 Slovakian swine herds in a systematic way and tested by real-time RT-qPCR. During the time of the samplings the animals didn't show any respiratory clinical symptoms in the tested herds. We detected the presence of the virus in 10 Hungarian herds (42%), and 1 Slovakian farm, which represents the first scientific evidence of the presence of PPIV-1 in the country. From 3 Hungarian and 1 Slovakian PPIV-1 positive herd nasal swab samples were collected cross-sectionally. The presence of the virus was detected in 34 (18,78%) of the 181 nasal swab samples. The highest prevalence of PPIV-1 was detected in 6-week-old pigs (40-75%) on Hungarian farms and in 2-week-old pigs on the Slovakian one (60%). The sequence of the F (fusion) gene was determined in seven cases and the comparative nucleotide sequence analysis indicated a similarity range of 93,53% to 94,65% between the Hungarian and Slovakian strains. All newly identified PPIV-1 strains were classified within Clade I, alongside with other European strains.

Further studies are needed in herds showing respiratory clinical symptoms to better understand the pathogenesis of the virus and to determine its potential role in PRDC (porcine respiratory disease complex).

## 8. Irodalomjegyzék

1. Zhao J, Sun J, Li X, Xing G, Zhang Y, Lai A, Baele G, Ji X, Su S (2022) Divergent Viruses Discovered in Swine Alter the Understanding of Evolutionary History and Genetic Diversity of the *Respirovirus* Genus and Related Porcine Parainfluenza Viruses. *Microbiol Spectr* 10:e00242-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00242-22>
2. Heinen E, Herbst W, Schmeer N (1998) Isolation of a cytopathogenic virus from a case of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its characterization as parainfluenza virus type 2. *Archives of Virology* 143:2233–2239. <https://doi.org/10.1007/s007050050454>
3. Janke BH, Paul PS, Landgraf JG, Halbur PG, Huinker CD (2001) Paramyxovirus Infection in Pigs with Interstitial Pneumonia and Encephalitis in the United States. *J VET Diagn Invest* 13:428–433. <https://doi.org/10.1177/104063870101300513>
4. Qiao D, Janke BH, Elankumaran S (2010) Complete Genome Sequence and Pathogenicity of Two Swine Parainfluenza virus 3 Isolates from Pigs in the United States. *J Virol* 84:686–694. <https://doi.org/10.1128/JVI.00847-09>
5. Ibrahim YM, Zhang W, Werid GM, Zhang H, Pan Y, Zhang L, Xu Y, Li C, Chen H, Wang Y (2022) Characterization of parainfluenza virus 5 from diarrheic piglet highlights its zoonotic potential. *Transboundary Emerging Dis* 69:. <https://doi.org/10.1111/tbed.14482>
6. Lee YN, Park C-K, Kim S-H, Lee DS, Shin J-H, Lee C (2013) Characterization in vitro and in vivo of a novel porcine parainfluenza virus 5 isolate in Korea. *Virus Research* 178:423–429. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.010>
7. Liu Y, Li N, Zhang S, Zhang F, Lian H, Hu R (2015) Parainfluenza Virus 5 as Possible Cause of Severe Respiratory Disease in Calves, China. *Emerging Infectious Diseases* 21:
8. Chatziandreou N, Stock N, Young D, Andrejeva J, Hagmaier K, McGeoch DJ, Randall RE (2004) Relationships and host range of human, canine, simian and porcine isolates of simian virus 5 (parainfluenza virus 5). *Journal of General Virology* 85:3007–3016. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80200-0>
9. Jiang N, Wang E, Guo D, Wang X, Su M, Kong F, Yuan D, Zhai J, Sun D (2018) Isolation and molecular characterization of parainfluenza virus 5 in diarrhea-affected piglets in China. *The Journal of Veterinary Medical Science* 80:590–593. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0581>
10. Kim J-M, Kim H-R, Jeon G-T, Baek J-S, Kwon O-D, Park C-K (2023) Molecular Detection of Porcine Parainfluenza Viruses 1 and 5 Using a Newly Developed Duplex Real-Time RT-PCR in South Korea. *Animals* 13:598. <https://doi.org/10.3390/ani13040598>
11. Alam AM (2022) Nipah virus, an emerging zoonotic disease causing fatal encephalitis. *Clin Med* 22:348–352. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2022-0166>
12. Philbey A (1998) An Apparently New Virus (Family Paramyxoviridae) Infectious for Pigs, Humans, and Fruit Bats. *Emerg Infect Dis* 4:269–271. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980214>
13. H. A. S, G. M. G, T. C. R (1988) Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet Rec* 1988 Jan 2;122(1):6-10. <https://doi.org/10.1136/vr.122.1.6>
14. Thibault PA, Watkinson RE, Moreira-Soto A, Drexler JF, Lee B (2017) Zoonotic Potential of Emerging Paramyxoviruses. In: *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp 1–55
15. Lau SKP, Woo PCY, Wu Y, Wong AYP, Wong BHL, Lau CCY, Fan RYY, Cai J-P, Tsoi H-W, Chan K-H, Yuen K-Y (2013) Identification and characterization of a novel paramyxovirus, porcine parainfluenza virus 1, from deceased pigs. *Journal of General Virology* 94:2184–2190. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052985-0>



16. Aguilar HC, Henderson BA, Zamora JL, Johnston GP (2016) Paramyxovirus Glycoproteins and the Membrane Fusion Process. *Curr Clin Micro Rpt* 3:142–154. <https://doi.org/10.1007/s40588-016-0040-8>
17. Henrickson KJ (2003) Parainfluenza Viruses. *Clin Microbiol Rev* 16:242–264. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>
18. Morrison TG (2003) Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1614:73–84. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00164-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00164-0)
19. Wang C, Wang T, Duan L, Chen H, Hu R, Wang X, Jia Y, Chu Z, Liu H, Wang X, Zhang S, Xiao S, Wang J, Dang R, Yang Z (2022) Evasion of Host Antiviral Innate Immunity by Paramyxovirus Accessory Proteins. *Front Microbiol* 12:790191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790191>
20. Park JY, Welch MW, Harmon KM, Zhang J, Piñeyro PE, Li G, Hause BM, Gauger PC (2019) Detection, isolation, and in vitro characterization of porcine parainfluenza virus type 1 isolated from respiratory diagnostic specimens in swine. *Veterinary Microbiology* 228:219–225. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.002>
21. Schuele L, Lizarazo E, Cassidy H, Strutzberg-Minder K, Boehmer J, Schuetze S, Loebert S, Lambrecht C, Harlizius J, Friedrich A, Peter S, Rossen J, Couto N (2020) First detection of porcine respirovirus 1 in Germany and in the Netherlands. Preprints
22. Palinski RM, Chen Z, Henningson JN, Lang Y, Rowland RRR, Fang Y, Prickett J, Gauger PC, Hause BM (2016) Widespread detection and characterization of porcine parainfluenza virus 1 in pigs in the USA. *Journal of General Virology* 97:281–286. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000343>
23. Agüero B, Mena J, Berrios F, Tapia R, Salinas C, Dutta J, Van Bakel H, Mor SK, Brito B, Medina RA, Neira V (2020) First report of porcine respirovirus 1 in South America. *Veterinary Microbiology* 246:108726. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108726>
24. Dénes L, Cságotla A, Schönhardt K, Halas M, Solymosi N, Balka G (2021) First report of porcine parainfluenza virus 1 (species Porcine respirovirus 1) in Europe. *Transbound Emerg Dis* 68:1731–1735. <https://doi.org/10.1111/tbed.13869>
25. Park JY, Welch M, Harmon KM, Zhang J, Piñeyro PE, Li G, Gauger PC (2017) Complete Genome Sequence of *Porcine respirovirus 1* Strain USA/MN25890NS/2016, Isolated in the United States. *Genome Announc* 5:e01139-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01139-17>
26. Woźniak A, Cybulski P, Denes L, Balka G, Stadejek T (2022) Detection of Porcine Respirovirus 1 (PRV1) in Poland: Incidence of Co-Infections with Influenza A Virus (IAV) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Herds with a Respiratory Disease. *Viruses* 14:148. <https://doi.org/10.3390/v14010148>
27. Park J, Kim H, Kim J, Lee K, Kim W, Lyoo YS, Kwon O, Park C, Park S (2022) First report of *Porcine respirovirus 1* in South Korea. *Transboundary Emerging Dis* 69:4041–4047. <https://doi.org/10.1111/tbed.14715>
28. Lunardi M, Darold GM, Francescon RRS, Alfieri AA (2023) First report of porcine respirovirus 1 in Brazil. *Microbial Pathogenesis* 182:106222. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106222>
29. Stadejek T, Cybulski P, Gauger PC, Woźniak A (2022) European and American Strains of Porcine Parainfluenza Virus 1 (PPIV-1) Belong to Two Distinct Genetic Lineages. *Pathogens* 11:375. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030375>
30. Welch M, Park J, Harmon K, Zhang J, Piñeyro P, Giménez-Lirola L, Zhang M, Wang C, Patterson A, Gauger PC (2021) Pathogenesis of a novel porcine parainfluenza virus type 1 isolate in conventional and colostrum deprived/caesarean derived pigs. *Virology* 563:88–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.08.015>

31. Ho T-H, Kew C, Lui P-Y, Chan C-P, Satoh T, Akira S, Jin D-Y, Kok K-H (2016) PACT- and RIG-I-Dependent Activation of Type I Interferon Production by a Defective Interfering RNA Derived from Measles Virus Vaccine. *J Virol* 90:1557–1568. <https://doi.org/10.1128/JVI.02161-15>
32. Li Y, Li C (2023) Porcine Respirivirus 1 Suppresses Host Type I Interferon Production and the JAK-STAT Signaling Pathway. *Viruses* 15:1176. <https://doi.org/10.3390/v15051176>
33. Welch M, Krueger K, Zhang J, Piñeyro P, Patterson A, Gauger P (2023) Pathogenesis of an experimental coinfection of porcine parainfluenza virus 1 and influenza A virus in commercial nursery swine. *Veterinary Microbiology* 285:109850. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109850>
34. Graaf-Rau A, Hennig C, Lillie-Jaschniski K, Koechling M, Stadler J, Boehmer J, Ripp U, Pohlmann A, Schwarz B-A, Beer M, Harder T (2023) Emergence of swine influenza A virus, porcine respirovirus 1 and swine orthopneumovirus in porcine respiratory disease in Germany. *Emerging Microbes & Infections* 12:2239938. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2239938>
35. Igriczi B, Dénes L, Biksi I, Albert E, Révész T, Balka G (2022) High Prevalence of Porcine Circovirus 3 in Hungarian Pig Herds: Results of a Systematic Sampling Protocol. *Viruses* 14:1219. <https://doi.org/10.3390/v14061219>
36. Katoh K, Toh H (2008) Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics* 9:212. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-212>
37. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
38. Boros Á, Albert M, Pankovics P, Bíró H, Pesavento PA, Phan TG, Delwart E, Reuter G (2017) Outbreaks of Neuroinvasive Astrovirus Associated with Encephalomyelitis, Weakness, and Paralysis among Weaned Pigs, Hungary. *Emerg Infect Dis* 23:1982–1993. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170804>
39. Loeffen WLA, Heinen PP, Bianchi ATJ, Hunneman WA, Verheijden JHM (2003) Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 92:23–35. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00019-9)
40. Chung W-B, Lin M-W, Chang W-F, Hsu M, Yang P-C Persistence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Intensive Farrow-to-Finish Pig Herds
41. Balka G, Dreckmann K, Papp G, Kraft C (2016) Vaccination of piglets at 2 and 3 weeks of age with Ingelvac PRRSFLEX® EU provides protection against heterologous field challenge in the face of homologous maternally derived antibodies. *Porc Health Manag* 2:24. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0037-y>
42. Nagy A, Čermíková L, Kunteová K, Dirbáková Z, Thomas SS, Slomka MJ, Dán Á, Varga T, Máté M, Jiřincová H, Brown IH (2021) A universal RT-qPCR assay for “One Health” detection of influenza A viruses. *PLoS ONE* 16:e0244669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244669>

## 9. Köszönetnyilvánítás, egyéb nyilatkozatok

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Igriczi Barbara témavezetőmnek a lehetőségért, hogy irányításával készíthettem el a TDK dolgozatomat, valamint a támogatásért, segítségért és türelemért, amivel hozzájárult a munkámhoz. Köszönöm a kutatócsoportunk tagjainak és a Patológiai Tanszék valamennyi munkatársának együttműködését.

A kutatásunk eredményeit feldolgozó cikk „Prevalence estimation and genetic characterization of Porcine Parainfluenza Virus 1 (PPV-1) in Hungary and the first report of the virus in Slovakia” címmel jelenleg publikálás alatt van a Transboundary and Emerging Diseases című folyóiratban

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.