

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Digitális metszetelemzés az állatorvosi
patológiában**

PhD-értekezés

Készítette:
Horváth Dávid Géza

2025

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Balka Gyula

Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

témavezető

Készült 8 példányban. Ez a n. sz. példány.

.....

Horváth Dávid Géza

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
1. Ábrajegyzék	6
2. Rövidítések jegyzéke	7
3. Összefoglalás	8
4. Bevezetés és célkitűzések	11
5. Irodalmi áttekintés	13
5.1. Digitális patológia	13
5.1.1. Fejlődése.....	13
5.1.2. Fogalmak	14
5.1.3. Számítógépes (computational) patológia.....	15
5.1.4. Metszetszkennerek	15
5.1.5. Digitális képelemzés (DIA)	18
5.1.6. Szoftverek	18
5.1.7. Mesterséges intelligencia (AI)	20
5.1.8. Alkalmazási lehetőségek.....	22
5.1.9. Megoldandó problémák és követelmények.....	24
5.1.10. 3DHISTECH.....	25
5.2. A sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS)	26
5.2.1. Kóroktan	26
5.2.2. Előfordulás és járványtan	26
5.2.3. Kórfejlődés.....	27
5.2.4. Tünetek.....	29
5.2.5. Kórbonctan	29
5.2.6. Diagnosztika	30
5.3. A sertés 2-es típusú circovírusa (PCV-2) és a hozzá köthető szisztémás betegség (PCV-2-SD, postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)	31
5.3.1. Kóroktan	31
5.3.2. Előfordulás és járványtan	32
5.3.3. Kórfejlődés.....	32
5.3.4. Tünetek.....	33
5.3.5. Kórbonctan	34
5.3.6. Diagnosztika	35
5. Anyagok és Módszerek.....	36
6.1. Állat-etikai jóváhagyás.....	36

6.2. Légúti PRRSV-fertőzéses kísérlet és mintavétel	36
6.3. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses kísérlet és mintaválasztás.....	37
6.4. PCV-2-SD-esetek.....	39
6.5. Szöveti mintafeldolgozás és rutin festés.....	42
6.6. Manuális pontozás	42
6.6.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell.....	42
6.6.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell.....	43
6.6.3. PCV-2-SD-vizsgálat.....	43
6.7. <i>In situ</i> hibridizáció.....	43
6.8. Immunhisztokémia	44
6.8.1. CD163 IHC.....	44
6.8.2. PCV-2 IHC.....	45
6.9. Digitalizálás és digitális képelemzés	45
6.9.1. Légúti PRRSV fertőzéses modell	46
6.9.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell.....	46
6.9.3. PCV-2-SD	49
6.10. qPCR	50
6.10.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell.....	50
6.10.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell.....	51
6.10.3. PCV-2-SD modell.....	52
6.11. Statisztikai elemzések.....	53
6.11.1. Légúti PRRSV fertőzéses modell	53
6.11.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell.....	53
6.11.3. PCV-2-SD-modell	53
6. Eredmények.....	55
7.1. PRRS kórszövetten és <i>in situ</i> hibridizáció	55
7.2. Digitális képelemzés és manuális pontozás.....	57
7.2.1. Légúti PRRSV fertőzéses modell	57
7.2.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell.....	58
7.2.3. PCV-2-SD modell.....	59
7.3. qPCR	61
7.3.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell.....	61
7.3.2. Szaporodásbiológiai PRRSV-fertőzéses modell	61
7.3.3. PCV-2-SD modell.....	61
7.4. Statisztikai elemzések.....	62
7.4.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell.....	62

7.4.2. Szaporodásbiológiai PRRSV-fertőzéses modell	62
7.4.3. PCV-2-SD-modell	70
8. Megvitatás.....	74
8.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell.....	74
8.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell.....	76
8.3. PCV-2-SD-modell	78
9. Új tudományos eredmények.....	81
10. Irodalomjegyzék	82
11. A doktori kutatás eredményeinek közlései	94
11.1. A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent közlemények	94
11.2. A doktori értekezés témájában tartott előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon.....	94
11.3. A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények, előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon.....	94
12. Függelék	96
Köszönetnyilvánítás.....	100

1. Ábrajegyzék

1. ábra: A digitális és hagyományos patológiai munkafolyamat közötti eltérések.....	13
2. ábra: Szkennelési formák	16
3. ábra: A WSI tárolására szolgáló piramis fájlformátum	17
4. ábra: Mesterséges neurális hálózatok	21
5. ábra: A mesterséges intelligencia részhalmozai	21
6. ábra: PCV-2-SD okozta jellegzetes kórszöveti elváltozások sertés nyirokcsomóban ...	36
7. ábra: A kísérleti csoportok egyszerűsített kialakítása és felosztása a szaporodásbiológiai PRRSV modellünkben	38
8. ábra: A fertőzött sejtek digitális mennyiségi meghatározása QuPath szoftverrel.	46
9. ábra: A gyulladásos sejtek számszerűsítése QuPath szoftverrel.....	48
10. ábra: A gyulladásos sejtek számszerűsítése QuPath szoftverrel.	48
11. ábra: CD163+ macrophagok számszerűsítése QuPath szoftverrel.....	49
12. ábra: Módszertani hibák.....	50
13. ábra: QuPath digitális képelemzés PCV-2-SD-vel érintett sertés nyirokcsomón.....	50
14. ábra: RNAscope segítségével jelölt pozitív PPIB (A) és negatív DapB kontroll (B) próbák eredményei sertés tüdőszövet-mintákban (20×; bar = 50 µm).....	55
15. ábra: PRRSV-pozitív sertés tüdőszövetminta, amely kisszámú fertőzött sejtet tartalmaz (RNAscope ISH, 10×, bar = 100 µm).....	56
16. ábra: PRRSV-pozitív sertés tüdőszövetminta, amely mérsékelt számú fertőzött sejtet tartalmaz (RNAscope ISH, 10×, bar = 100 µm).....	56
17. ábra: PRRSV-pozitív sertés tüdőszövetminta, amely nagyszámú fertőzött sejtet tartalmaz (RNAscope ISH, 10×, bar = 100 µm).....	57
18. ábra: A teljes gyulladásos sejtszám boxplotjai a szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modellünkben	63
19. ábra: Hegedűgrafikonok a qPCR-eredmények eloszlásáról.	64
20. ábra: Hegedűgrafikonok a qPCR eredmények eloszlásáról.	65
21. ábra: Az 1-es vizsgáló manuális endometritis-pontszámainak aránya az összes esethez viszonyítva a teljes gyulladásos sejtszám ± 300 intervallumában.	67
22. ábra: Összefüggések a magzati súly és a teljes gyulladásos sejtszám között.	68
23. ábra: Scatterplot a teljes gyulladásos sejtszám és az endometrium PRRSV GE-értékei közötti összefüggésről.	69
24. ábra: Scatterplot a CD163+ sejtszám és a magzati szérum, a magzati csecsemőmirigy, a méhnyálkahártya és a placentaminták log10 qPCR-értékei közötti összefüggésről.	70
25. ábra: Boxplot a digitálisan azonosított, PCV-2-vel fertőzött sejtek aránya és a második vizsgáló manuális pontszámai közötti összefüggésről.	71
26. ábra: Szórásdiagram a digitálisan azonosított, PCV-2-vel fertőzött/nem fertőzött sejtek aránya és a PCV-2 DNS-kópiaszámok közötti összefüggésről.	73

2. Rövidítések jegyzéke

10% NBF	10% neutral buffered formalin, 10%-os pufferelt formaldehid oldat
AI	artificial intelligence, mesterséges intelligencia
DapB	dihidropikolinát-reduktáz
DP	digitális patológia
DPI	days post-infection, fertőzést követő napok
DIA	digitális képanalízis, digitális képelemzés
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
FFPE	formalinnal fixált és paraffinba ágyazott
GE	genome equivalent, genom ekvivalens
H&E	hematoxinilín és eozin
IHC	immunhisztokémia
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
mRNS	messenger/hírvivő RNS
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome, a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PPIB	peptidil-prolil-izomeráz-B
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction, reverz transzkripció polimeráz láncreakció
RT-qPCR	real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, valós idejű kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, kvantitatív polimeráz láncreakció
PCV-2	sertés 2-es típusú circovírus
PCV-2-SD	PCV-2-höz köthető szisztémás betegség
RNS	ribonukleinsav
WSI	whole slide image, digitális teljes metszetkép

3. Összefoglalás

A digitális patológia (DP), más néven virtuális mikroszkópia a hagyományos kórszövettani metszetek digitalizálást követő, monitoron történő megjelenítését és számítógépes elemzését foglalja magába. A technológiának megoldandó problémái és követelményei ellenére számos előnye van a diagnosztikában, az oktatásban és a kutatási tevékenységben is. A digitalizálást elvégző metszetszkennerek a rutin hematoxilinnal és eozinnal (H&E), továbbá speciális kórszövettani eljárásokkal festett, valamint immunhisztokémiai (IHC) és *in situ* hibridizációs (ISH) módszerekkel jelölt tárgylemezeket nagy felbontásban olvassák be. Az így létrejött digitális teljes metszetképek (Whole Slide Images, WSIs) digitális képelemző (digital image analysis, DIA) programok segítségével vizsgálhatók, lehetőség nyílik az elváltozást mutató (a többitől eltérő méretű, alakú, festődésű és egyéb tulajdonságaikban különböző), továbbá különféle specifikus festési eljárásokkal jelölt sejtek számának és arányának, valamint egyéb elváltozásoknak (pl. fibrózis) az objektív és megismételhető meghatározására.

A DP a diagnosztikában egyes patológiai munkafolyamatok felgyorsítására, távmunka végzésére, valamint a szemikvantitatív eljárások helyettesítésére alkalmazható leginkább. Az utóbbi időben a kvantitatív eljárások mellett egyre nagyobb teret kapnak az olyan döntéstámogató digitális patológiai rendszerek is, amelyek az esetek előzetes szűrésében és a végső diagnózis szempontjából releváns régiók azonosításában segítik a patológusok munkáját. Több nagy diagnosztikai szolgáltató, orvos- és állatorvostudományi egyetem, preklinikai vizsgálatokat folytató cég, ill. kórház tért már át teljesen digitalizált munkafolyamatra, a számuk jelenleg is tovább bővül. A szkennelt metszetek megosztása révén a konzultációs lehetőségek is kibővülnek, azaz egy eset kapcsán kért szakértői segítséghez csak internetelérés szükséges a világ bármely pontjáról.

A DP kutatási alkalmazása manapság meglehetősen gyakori. A morfológiai elváltozások és molekuláris eljárásokkal láthatóvá tett szöveti jelek szemikvantitatív elbírálása meglehetősen szubjektív és gyakran nehezen megismételhető. Az objektivitás és reprodukálhatóság mellett a DIA szoftverekkel nyert numerikus adatok statisztikailag könnyebben kezelhetők. A módszer számos paraméter/elváltozás vizsgálatára alkalmas, ilyen többek között a sejtípusok számának és arányának meghatározása, fehérjekifejeződés változásának mérése, sejtelváltozások kimutatása és kvantifikálása, szöveti elváltozások (pl. fibrózis, amyloid-plakkok) kiterjedésének vizsgálata. Gyógyszerfejlesztések mellett leginkább daganatos és egyéb biomarkerek pontos mennyiségi meghatározására használják potenciális prognosztikai markereket vizsgáló kutatásokban. A viszonylag egyszerű sejtszámlálási eljárások mellett egyre több olyan közlemény jelenik meg, amelyekben mesterséges intelligenciát (artificial intelligence, AI) és az ún. mélytanulási (deep learning) rendszereket

felhasználva a programok képesek hatékonyabban felismerni például daganatos, vagy daganatot megelőző elváltozásokat, továbbá a daganat mintázata alapján pontosabb prognosztikai besorolásokat elvégezni.

Az orvosi és állatorvosi oktatásban is egyre elterjedtebb a DP használata. Az oktatási tevékenység sokkal interaktívabb, az oktató képes mindenki számára egyértelműen kijelölni, bemutatni bizonyos elváltozásokat, akár több speciális festési eljárást egy monitoron megjelenítve is. Nincs szükség hallgatónként külön mikroszkópra, az elhasználódott vagy megrongálódott tárgylemezek utánpótlásáról sem kell többé gondoskodni, a hallgatók pedig hozzáférhetnek a digitális metszetekhez bárhol, bármikor. Több publikáció közli a digitális oktatási módszertan pozitív fogadtatását a hallgatók körében. A rendszer ezen túlmenően vizsgáztatásra is alkalmas.

A QuPath (<https://qupath.github.io>) egy felhasználóbarát, nyílt forráskódú asztali alkalmazás, amelyet digitalizált szövettani metszetek elemzésére terveztek. A program rugalmasan fejleszthető, többek között képes elvégezni az azonosított sejttípusok osztályozását az általunk kijelölt terület minden sejtjének részletes fenotípusos leírásával. A szövetrész kvantitatív celluláris térképe is elérhetővé válik, amelyet kiválaszthatunk, lekérdezhetünk és ábrázolhatunk is. Mindez a hagyományos mikroszkópos értékelés során nem látható azonnal, QuPath szoftverrel viszont percek alatt elérhető, anélkül, hogy speciális hardverre lenne szükség.

A DP és a QuPath előnyeinek, valamint széleskörű alkalmazhatóságának bizonyítására vírusos sertésbetegségeket használtam modellként, ahol az endometrium gyulladásos sejtjeit, valamint nyirokcsomókban IHC-val, tüdőkből ISH-val jelölt fertőzött sejteket vizsgáltam. A sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) és a sertés 2-es típusú circovírusa (porcine circovirus type 2, PCV-2) egyaránt nagy gazdasági jelentőségű és világszerte elterjedt kórokozók, amelyek különösen az általuk okozott megbetegedések kórfejlődése tekintetében ma is aktív kutatás tárgyát képezik. DP felhasználásával a PRRSV-1 által okozott reprodukciós és légúti kórkép patológiájáról és kórfejlődéséről is újabb ismereteket szerezhetünk, valamint a PCV-2 esetében előrelépést hozhat a módszer a vírushoz köthető szisztémás betegség (PCV-2-SD) diagnózisában, ahol elengedhetetlen a vírusnak az elváltozott szövetekben való megjelenítése és szemikvantitatív számszerűsítése, egy digitális módszertan pedig objektívebbé és megismételhetőbbé teheti az esetek elbírálását.

Légúti PRRSV-fertőzéses modellünkben 20 db, 7 hetes malacot vad, virulens PRRSV-1 törzzsel fertőztünk. Mérsékelt fokú pozitív korrelációt állapítottunk meg az *in situ* hibridizációval jelölt, vírussal fertőzött sejtek aránya és az azonos tüdőlebenyből elvégzett, kvantitatív

polimeráz láncreakcióval (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) meghatározott víruskópiaszám között. Kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy az alkalmazott RNAscope ISH digitális képanalízissel kombinálva értékes szemikvantitatív adatokat szolgáltat a tüdő *in situ* PRRSV-fertőzésére vonatkozóan.

Ezt követően a PRRSV-fertőzés szaporodásbiológiai modelljében vakcinázott és nem vakcinázott vemhes kocaüldőket fertőztek gyenge virulenciájú vagy virulens PRRSV-1-törzzsel és képelemző szoftverrel számszerűsítettem az endometrium lamina propriájának gyulladásos sejtes beszűrődését. A gyulladásos sejtszámok és a manuális súlyossági kategóriák között nagyfokú összefüggést állapítottunk meg. Tehát a DIA hatékonyan alkalmazható az endometrium gyulladásának objektív értékelésére, így a szemikvantitatív manuális pontozás mellett vagy helyett megfelelő módszer szövetszövetvizsgálatra hasonló kutatási eljárásokban.

A PCV-2-modell esetében PCV-2-SD-vel érintett állatokból származó, archivált nyirokcsomó FFPE-blokkokból (formalin fixed, paraffin embedded, formalinban fixált paraffinba ágyazott blokkokból) ismételt PCV-2 IHC-festést, szemikvantitatív manuális pontozást, továbbá DIA-módszerrel sejtszámlálást (fertőzött és nem fertőzött sejtszám meghatározást) végeztünk, valamint a vírus genom-kópiaszámát is meghatároztuk a blokkokból qPCR segítségével. A sejtszámok, a manuális pontozás és a qPCR-eredmények nagyfokú összefüggését állapítottuk meg. Eredményeink igazolják a digitális patológiai módszertanunk egyszerű és hatékony alkalmazhatóságát az IHC-jelek objektív számszerűsítésére PCV-2-SD esetekben.

4. Bevezetés és célkitűzések

A DP-t széles körben használják a humán orvostudományi kutatásokban és számos közlemény jelent meg az állatorvosi területen történő alkalmazásáról is. Bertram és mtsai összehasonlították a WSI-k és a hagyományos kórszövettani metszetek értékelésének diagnosztikai teljesítményét kutyából származó bőrdaganatoknál DIA nélkül. Csak csekély különbség volt a két módszer között, a kerek sejtes daganatok esetében a digitális eljárásnak voltak kisebb korlátai (Bertram et al., 2018). A mitotikus szám nagymértékben változhat kutya hízósejtes daganatainak (mastocytomáinak) egyes területei között, és a fejlett gépi tanulási (deep learning) rendszerek pontosabban és reprodukálhatóbban képesek megtalálni a legnagyobb mitotikus számmal rendelkező régiókat, még akkor is, ha a jelenlegi manuális osztályozási (grading) rendszer a legtöbb esetben jól reprodukálható a patológusok között (Bertram et al., 2020). Seung és mtsai kutya emlődaganatainak humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (human epidermal growth factor receptor 2, hEGFR2) mRNS-expressziója és IHC-festődése közötti összefüggését elemezték és szignifikáns összefüggést találtak, vizsgálatukban az ISH-jeleket nyílt forráskódú képelemző szoftverrel számszerűsítették. A kutyák spontán tejmirigydaganatai és az emberi emlőtumорок biológiai hasonlóságai miatt az ilyen jellegű vizsgálatok a humán kutatások számára is értékesek lehetnek (Seung et al., 2020).

2017-es megjelenése óta a QuPath számos, állati szöveteket értékelő tanulmányban volt DIA-szoftver. Megbízhatóan azonosította a gliasejt-expanziót, az axonvesztést és a morfológiai elváltozásokat barna norvég patkányok degenerálódó látóidegeiben, ami arra utal, hogy hasznos lehet a terápiás hatékonyság becslésében a glaukóma preklinikai kezelési kísérleteiben (Mysona et al., 2020). Finney és mtsai automatizált módszert dolgoztak ki a reaktív astrocytás elváltozások számszerűsítésére patkányagy WSI-kben glia fibrilláris savas protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) és 3,3'-diaminobenzidin (DAB) IHC felhasználásával (Finney et al., 2021). A QuPath arra is képes, hogy számszerűsítse az agyszövet diffúz károsodását és minden olyan rendellenességet, amely kiterjedt módon, de csekély mértékben befolyásolja a fehérjék expressziós szintjét (Morris et al., 2020). Russell és mtsai a tasmán ördögök vadon élő populációit veszélyeztető, transzmisszibilis daganatok (devil facial tumor 1, 2) nyirokcsomó-áttétjeinek PD1/PDL1 (programmed cell death protein 1 és programmed death ligand 1) expresszióját számszerűsítették QuPath segítségével. A digitális patológia segíthet a gyenge immunogenitás molekuláris mechanizmusainak feltérképezésében és jövőbeni kezelések potenciális célmolekuláinak azonosításában (Russell et al., 2023). Segítségével új, független klinikai és kórszövettani prognosztikai

faktorokat is megállapítottak kutyák epitheliotrop T-sejtes cutan lymphomáinál, a szoftveresen lement átlagos sejtmag- és sejtméret vonatkozásában (Dettwiler et al., 2023).

Esetünkben PRRSV-1- és PCV-2-modell felhasználásával kívántam a DP lehetőségeit feltérképezni. A szövettani metszetek Pannoramic Midi (3D Histech, Budapest, Magyarország) szövetszkennel való digitalizálását követően QuPath képelemző szoftver segítségével céloztuk meg elvégezni a:

- PRRSV-1 által malacokban okozott tüdőelváltozásokban az ISH-val jelölt, vírussal fertőzött sejtek arányának meghatározását,
- különböző virulenciájú PRRSV-1-törzsekkel fertőzött kocasüldők endometriumában a gyulladásos és CD163+ sejtek számának megállapítását,
- valamint PCV-2-vel fertőzött, PCV-2-SD-ben érintett sertések nyirokcsomó szöveteiben az IHC eljárással jelölt fertőzött sejtek számának meghatározását.

Az objektív sejtarányok és sejtszámok birtokában statisztikai elemzésekkel kívántuk meghatározni:

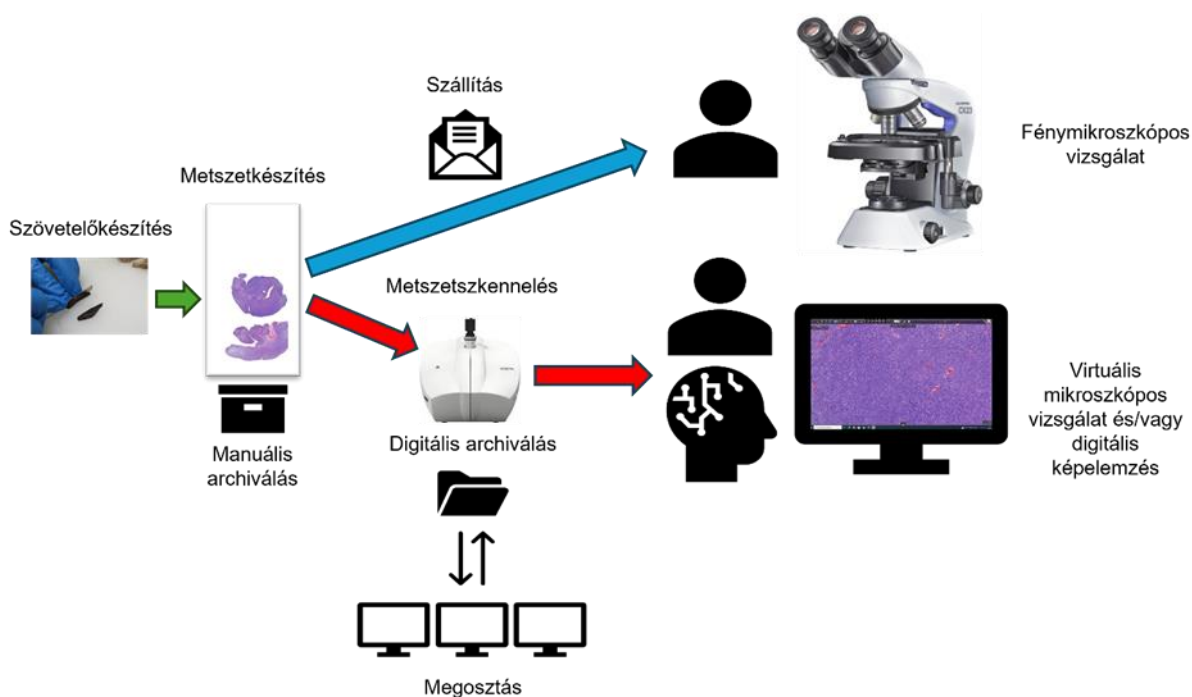
- az RNAscope szemikvantitatív módszerként való használhatóságát,
- valamint a PRRS okozta endometritis elbírálásánál és a PCV-2-SD diagnosztikájánál a digitális módszernek a manuális eljárásokhoz viszonyított hatékonyságát.

5. Irodalmi áttekintés

5.1. Digitális patológia

5.1.1. Fejlődése

A DP a hagyományos kórszövettani metszetek metszetskennernek segítségével történő digitalizálását, majd az így létrejött, digitálisan tárolt WSI-k számítógépes monitoron keresztüli vizsgálatát foglalja magában, DIA használatával vagy anélkül (Bertram és Klopffleisch, 2017). Leegyszerűsítve egyesek úgy értelmezték, mint nem helyhez kötött patológiai diagnosztikai munka (Pallua et al., 2020), és bár ennek a lényeges feladatnak eleget tesz, annál jóval többre képes. A Digitális Patológiai Társaság (Digital Pathology Association) szerint „olyan dinamikus patológiai résztudomány, amely digitalizált metszetekből származó patológiai információk előállítását, kezelését és értelmezését teszi lehetővé” (<https://digitalpathologyassociation.org/about-digital-pathology>) (1. ábra).



1. ábra: A digitális és hagyományos patológiai munkafolyamat közötti eltérések

A szövettani metszetek szkenneres digitalizálásra kerülnek, majd a létrejött digitális teljes metszetképek (WSI-k) számítógépes monitoron vizsgálhatók, akár digitális képelemzés (DIA) és mesterséges intelligencia (AI) segítségével, ahogy azt az alsó folyamatábra bemutatja (forrás: Bertram és Klopffleisch, 2017)

A modern patológia megteremtése Rudolf Virchow nevéhez kötődik, munkássága nyomán a patológusok fénymikroszkóp segítségével állítják fel szövettani diagnózisukat. Ez az esetenként viszonylag szubjektív folyamat kifejezetten idő- és munkaigényes. A megbízható metszetszkennerek elterjedésével és az informatikai technológiák utóbbi években végbement nagyon gyors fejlődésével széles körben meghonosodott a WSI-k használata, amelyek egyenértékű, egyes esetekben még jobb optikai felbontással és vizuális nagyítással alkalmazhatók (Bertram és Klopffleisch, 2017; Pallua et al., 2020; Bruce et al., 2024). A digitális patológia kifejezést először 1986-ban Weinstein használta, aki a telepatológia jövőbeni kilátásait elemezte és már akkor előrevetítette, hogy ez a technológia növelni fogja a patológusi munka hatékonyságát (Weinstein, 1986).

A tudományterület ténylegesen a fénymikroszkópokhoz csatlakoztatható digitális kamerákkal vette kezdetét a korai 90-es években (Zuraw és Aeffner, 2022). A következő mérföldkövek a metszetszkennerek kereskedelmi forgalomba kerülése 1999-ben, a digitális patológia primer diagnosztikai célra történő bevezetése, ami a szigorúbb humán mintaszabályozás miatt széleskörűen először állatorvosi diagnosztikai laboratóriumokban valósult meg 2014-ben (IDEXX, Antech), végül 2017 áprilisa amikor a Philips IntelliSite szkennert megkapta az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatalának (Food and Drug Administration, FDA) jóváhagyását (korlátozott felhasználással) a klinikai patológia humándiagnosztikai alkalmazásaira (Zuraw és Aeffner, 2022; Hosseini et al., 2024). Dél-Koreában, az Egyesült Államokban, az Európai Unióban és Japánban is engedélyeztek és gyakorlati használatba vettek primer diagnosztikai szolgáltatásra digitális patológiai rendszereket, a Semmelweis Egyetem pedig már több mint egy évtizede ilyen munkafolyamatot használ. Egyre több kórházban vezetik be a DP-t, amely úgy tűnik, hogy idővel mindinkább háttérbe fogja szorítani a hagyományos mikroszkópiát (Fónyad et al., 2012; Go, 2022). Manapság a digitális patológia, azon belül egyelőre leginkább a telepatológia fontos szerepet játszik a modern klinikai gyakorlatban. A WSI-k lehetőséget biztosítanak a mesterséges intelligencia (AI) patológiai alkalmazásához, amit a humán orvostudományban eddig főleg képalkotó diagnosztikában, leginkább a radiológiában és kardiológiában használtak (Niazi et al., 2019).

5.1.2. Fogalmak

A kórszövettani metszetek számítógépes monitoron történő vizsgálatához kapcsolódó technikai és technológiai folyamat 3 részre osztható: a digitalizálásra, a digitalizációra és a digitális transzformációra. A *digitalizálás* a szkennerek segítségével a metszetről történő digitális másolat elkészítését jelenti. A *digitalizáció* a digitális technológia napi munkafolyamatokba való integrálására utal, ilyen a digitális patológia primer diagnosztikai

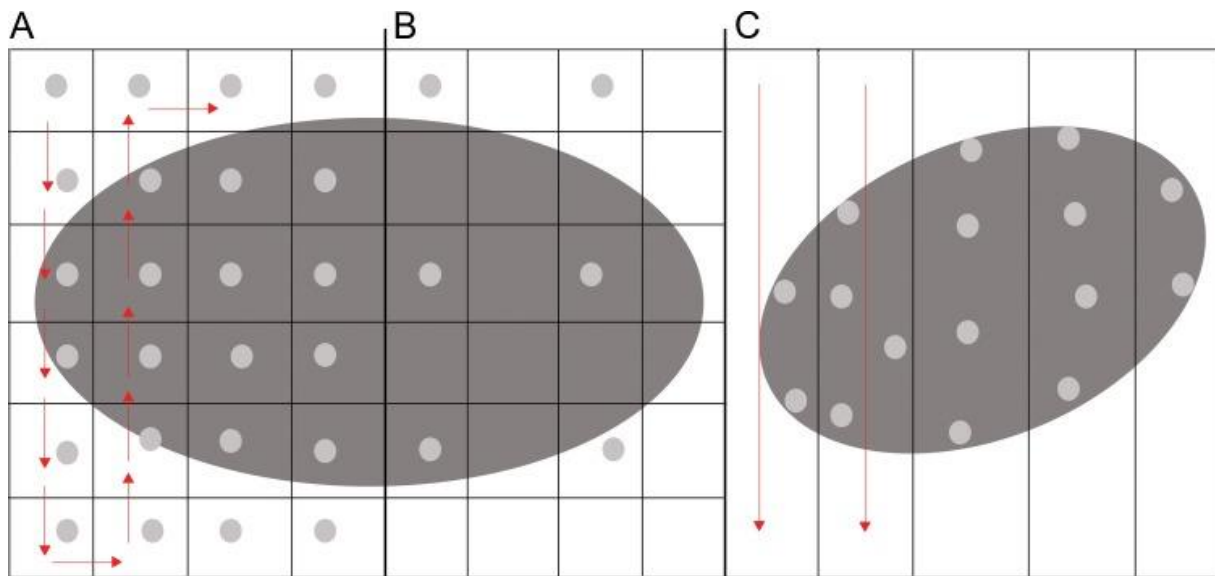
célra történő bevezetése. A *digitális transzformáció* pedig azt fejezi ki, hogy a digitalizáció milyen hatással van az azt megvalósító és használó szervezetre vagy egyénekre. Például a diagnosztikai laboratóriumokban lehetővé vált a távmunka, a digitális leletezés és nyilvántartás, továbbá az átfutási idő és a konzultáció is könnyebbé és gyorsabbá vált (Zuraw és Aeffner, 2022).

5.1.3. Számítógépes (computational) patológia

A digitális patológia nem csupán a hagyományos mikroszkópia modern változata, hanem a számítógépes patológia alapja is egyben. A mesterséges intelligencia a WSI-n kívül más beteginformációs forrásokra is használható a nagymennyiségű adat összesítésére és elemzésére, amely megközelítés megváltoztatja a patológiai gyakorlatot (Plass et al., 2023). A számítógépes patológia olyan diagnosztikai szemléletet jelöl, amely számos adatforrás felhasználásával biológiailag és klinikailag releváns információkat határoz meg, matematikai modelleket használ molekuláris, individuális és populációs szinten is a diagnosztikai következtetések és előrejelzések megállapítására, és ezt a klinikailag praktikus tudást mutatja be az ügyfeleknek, lehetővé téve az orvosok, a betegek, a laboratóriumi munkaerő és az egészségügy minden érdekelt résztvevője számára, hogy a lehető legjobb orvosi döntéseket tudják meghozni. Ez a rendszer messze felülmúlja az információtechnológiai vagy informatika-centrikus szemléletet, és a patológia alapvető erőnyeire épít, azaz a betegségek folyamatainak megértésére molekuláris, egyéni és populációs szinten, valamint a klinikailag hasznosítható ismeretek hatékony integrálására és közlésére (Louis et al., 2014; Zuraw és Aeffner, 2022; Hosseini et al., 2024).

5.1.4. Metszetszkennerek

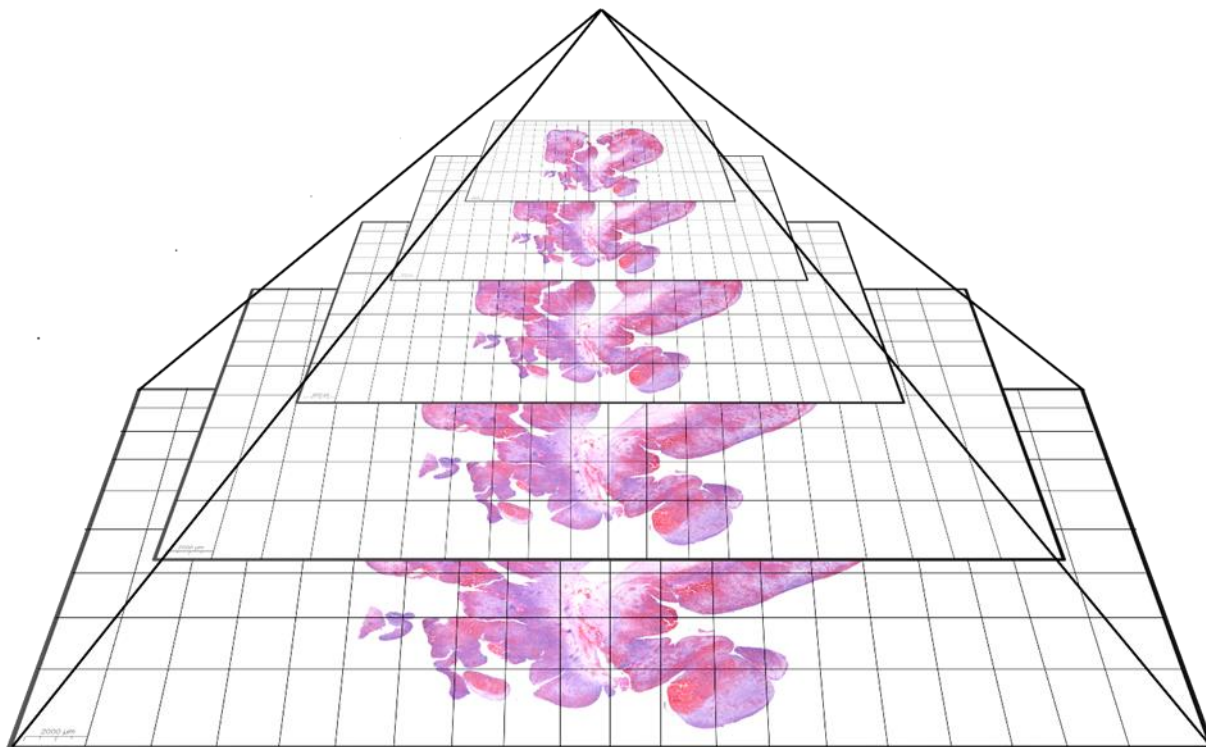
A digitalizálás, amely érintheti a tárgylemezek teljes vagy a vizsgáló által kiválasztott területeit, metszetszkennerek segítségével valósul meg. A szkennerek négy fő összetevőből állnak: fényforrásból, tárgylemeztartóból, objektívlencséből és egy nagy felbontású kamerából (Aeffner et al., 2018). A digitális kép általában a metszet x/y síkja mentén (2 dimenzióban) kerül felvételre vonalak vagy csempék sorozataként, ezek pedig digitális összeillesztésre kerülnek a WSI készítéséhez (2. ábra). A képadatok kinyerése mindkét módszer esetében azonos, a tárgylemez egy finom mozgásokra képes motoros állvány vagy objektív-szerelvény segítségével az objektív alá kerül, a képadatok pedig a metszet áthaladásával gyorsan rögzítésre kerülnek (Hamilton et al., 2014; Aeffner et al., 2018; Zuraw és Aeffner, 2022).



2. ábra: Szkennelési formák

(A) Minden csempe szkennelése a nyilak irányának megfelelően. (B) Minden n -edik csempe szkennelése. (C) Vonalszkennelés. A pontok fókuszpontokat jelölnek (forrás: Aeffner et al., 2018)

Egy WSI-hez számos eltérő felbontású kép tartozik mivel a csempék és vonalak különböző felbontásban tárolódnak és képpiramisként kapcsolódnak össze egy piramis alakú fájlstruktúra részeként. A legkisebb felbontás a piramis csúcsán helyezkedik el, lefele haladva a felbontás növekszik (3. ábra). A piramis minden síkját különálló képcsempék alkotják, amelyek szelektíven betölthetők és megtekinthetők (Hamilton et al., 2014; Zuraw és Aeffner, 2022). Ez a kialakítás megkönnyíti a nagy fájlok részleges betöltését. Ez különbözik az úgynevezett z-stacking-től, ahol a z-tengely mentén többször lezajlik a szkennelési folyamat a finom fókuszkialakítása végett (háromdimenziós digitális metszetek). Megfelelő szoftver alkalmazásával így lehetővé válik a z-síkbeli navigálás, digitális fókuszhatast hozva létre. Ez különösen előnyös citológiai minták digitális patológiai vizsgálatánál (Hamilton et al., 2014; Bertram és Klopffleisch, 2017; Zuraw és Aeffner, 2022).



3. ábra: A WSI tárolására szolgáló piramis fájlformátum

Az egyes területekhez tartozó különböző felbontású képcsempék szelektíven megtekinthetők. Ez a kialakítás megkönnyíti a nagy fájlok részleges betöltését (forrás: Hamilton et al., 2014)

A szkennelési folyamat során elengedhetetlen a pontos fókuszálás, a szkennerek többsége ezt a topográfiai eltérések feltérképezésével végzi el, amelyek még egy nagyon vékony szövetmetszeten is megjelennek (Montalto et al., 2011). A legtöbb rendszerben beállítható a metszetek szkennelésének nagyítása, amely általában 20× vagy 40× nagyítást jelent. A leggyakoribb 20× szkennelés megfelelően alkalmazható az esetek többségében (Hamilton et al., 2014; Zuraw és Aeffner, 2022).

A szkennelés eredményességét alapvetően meghatározza a tárgylemezek minősége és vastagsága. A metszeten lévő apró szennyeződések, a fedőlemez alatti légbuborékok, a túl vastag szövetek vagy azok gyűrődése, a szövetek túl- vagy alulfestődése rossz minőségű WSI-t generál. Ezeket a hibákat érdemes kiküszöbölni még akkor is, ha jelenleg már rendelkezésre állnak olyan eszközök és algoritmusok, amelyek automatikusan észlelik és kizárják a szövettani műtermékeket vagy digitálisan csökkentik a festődési változékonyságot (Zuraw és Aeffner, 2022). A mélytanulási algoritmusok segítségével lehetővé vált a szövettani festési eljárások digitális generálása festetlen tárgylemezeken. Ezek a virtuális festések gyors és költséghatékony alternatívát nyújtanak a tradicionális kémiai festésekkel szemben. A módszer rendkívül ígéretesnek tűnik, de bevezetése klinikai környezetben való elsődleges diagnosztikai alkalmazásra még várat magára (Bai et al., 2023).

5.1.5. Digitális képelemzés (DIA)

A DIA alkalmazásának első kísérletei sejt- és mikroszkópos képek elemzésére irányultak (Mendelsohn et al., 1965). Több mint 50 évvel később, a metszetszkennerek elterjedésével a klinikai és kutatási érdeklődés nagymértékben felerősödött a digitális patológia és képelemzés iránt (Madabhushi és Lee, 2016).

A DIA célja a szövettani mintákból kinyerhető adatok mennyiségének és minőségének növelése, valamint kvantitatív mérése. A képelemző szoftverek segítségével a teljes metszet (WSI) analitikus adatainak objektív, automatizált elemzése válik lehetségessé. Ez lehetőséget biztosít a fejlődésre a leíró értékeléseken alapuló, viszonylag szubjektív patológiai tudománytól egy egyre objektívebb és kvantitatívabb diszciplína felé. Az automatizált DIA alapelve matematikai algoritmusok sorozatának alkalmazása. A képek feldolgozása során megvalósul a képelemek érdeklődési körökbe történő szegmentálása színük, textúrájuk és/vagy kontextusuk alapján (Webster és Dunstan, 2014). A szoftveres vizsgálatok objektívebbek és reprodukálhatóbbak, az elemzett adatok robusztusabbak, továbbá lehetséges, hogy a korábbi módszerekkel vizuálisan nem áttekinthető jellemzők is kiértékelhetők. A nyert numerikus adatok statisztikai módszerekkel egyszerűbben és széleskörűbben elemezhetők (Zuraw és Aeffner, 2022).

Az eljárást leginkább biomarkerek azonosítására és mennyiségi meghatározására használják, különösen a humán onkológiában, de felhasználási lehetőségei a patológia területén széleskörűek (Bankhead és Fernández, 2018; Ács et al., 2020; Prelaj et al., 2024). A módszer a kvantitatív eljárásokból a döntéstámogató rendszerek irányába is fejlődik, amely segít a patológusoknak eseteik előzetes szűrésében és a végső diagnózis szempontjából releváns régiók azonosításában (Zuraw és Aeffner, 2022; Wu et al., 2024).

5.1.6. Szoftverek

Napjainkban számos DIA szoftver érhető el, a felhasználóknak lehetőségük van a leendő alkalmazási területhez leginkább illeszkedő és előnyös program kiválasztására. Vannak nyílt hozzáférésű szoftverek, amelyek általában korlátozott ügyféltámogatással jellemezhetők, komplikáltabb vizsgálatokra pedig gyakran kódolási készségeket igényelhetnek, de többnyire rugalmasan fejleszthetők. A kereskedelmi forgalomban kapható programok rendszeres szoftverfrissítéseket és ügyfélszolgálatot foglalnak magukban, gyakrabban felhasználóbarátabbak, továbbá a fejlesztők képzéseket is biztosíthatnak (Zuraw és Aeffner, 2022).

5.1.6.1. QuPath

Az utóbbi években számos nyílt forráskódú képelemző szoftver vált elérhetővé. Kiemelkedik közülük a felhasználóbarát QuPath alkalmazás, amely széleskörű használati

lehetőségekkel rendelkezik a patológia területén. A szoftvert kifejezetten a WSI-k képpalkotási adatainak elemzésére és feltárására tervezték, képes a sejteket különböző kategóriákba (osztályokba) rendszerezni gépi tanulási algoritmusok segítségével hematoxilinnel és eozinnal (H&E) vagy más módszerekkel festett tárgylemezek digitalizált teljes metszetképein (Bankhead et al., 2017). Lehetővé teszi új digitális patológiai algoritmusok létrehozását oly módon, hogy az bármilyen kutató vagy patológus számára azonnal elérhető legyen. A fejlesztőknek lehetőségük van saját kiterjesztések hozzáadására és meglévő eszközök közötti adatcserére (Bankhead et al., 2017).

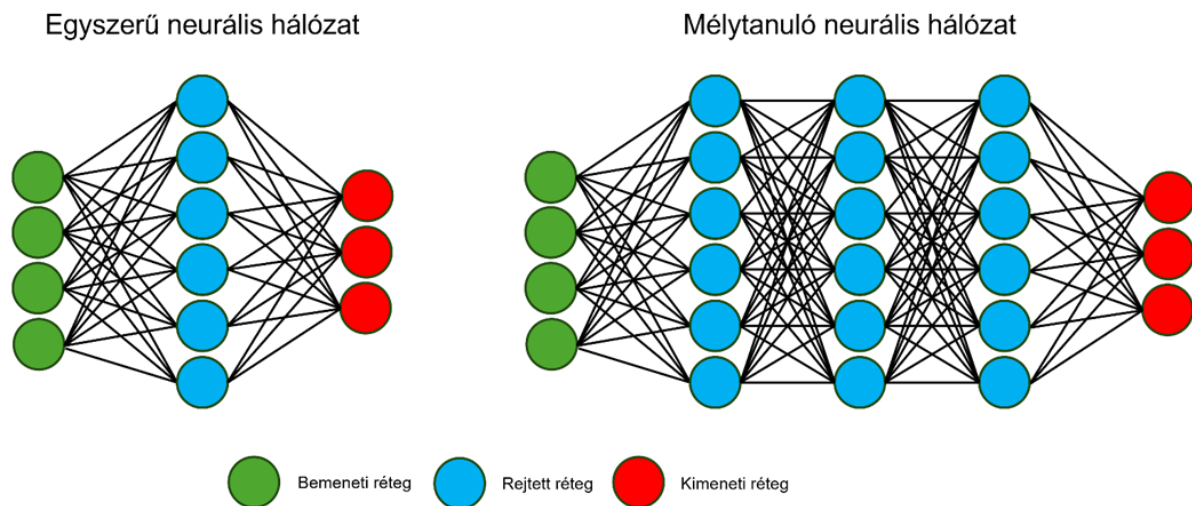
A QuPath hierarchikus, objektumalapú adatmodellel rendelkezik. Az objektum képen belüli struktúrát vagy régiót jelöl, amelyet interaktív rajzeszközökkel vagy automatizált szegmentálási parancsokkal lehet létrehozni és módosítani. Beépített algoritmusai egyetlen WSI-n belül több millió sejtet képesek felismerni objektumként, a sejt morfológiájának kiértékelése és a felhasznált biomarker expressziójának mérése mellett. A szoftver elvégzi a különféle sejttípusok mért jellemzők szerinti osztályozását és megadja a szövetminta minden azonosított sejtjének (objektumának) fenotípusos leírását. Mindez, ami a hagyományos patológiai értékelés során nem látható, azonnal percek alatt elérhetővé válik, anélkül, hogy speciális hardverre lenne szükség (Bankhead et al., 2017).

A közelmúltban számos, a szoftver klinikai applikációját előkészítő tanulmány született. A program Porter és mtsainak (2023) munkája alapján betanítható a vastagbélminták szövettani diagnosztikai mintázatainak és MLH1 (DNA mismatch repair protein Mlh1, MutL protein homolog 1) expressziós állapotának nagyon nagy érzékenységgel és specificitással történő azonosítására. Az eljárás más klinikailag releváns immunfestésekre és szövettani elváltozásokra is alkalmazható, továbbá automatizálható is az összes vastagbéliszövet és daganat MLH1 expressziójának vizsgálatára (Porter et al., 2023). Az U-Net és a QuPath kombinációjával létrehozott automatizált modell növelheti a pontosságát és hatékonyságát a vegyes típusú gyomorrák diagnosztikájának és prognosztikájának (Ning et al., 2023). Alkalmazhatósága a Ki67 (Antigen Kiel 67) proliferációs index medullaris thyroid carcinomában történő mennyiségi meghatározására megerősíti a további kutatás létjogosultságát a klinikai gyakorlatban használható, digitálisan meghatározott Ki67-index létrehozására (Behrman et al., 2023). Szervi szinten alkalmazható, szabadon hozzáférhető QuPath munkafolyamatokat is publikáltak. A MarrowQuant 2.0 a csontvelő cellularitásának vizsgálatára alkalmas és klinikai kutatási eszközként szolgálhat stroma-komponensek új biomarkereinek elemzésére, valamint hozzájárulhat a digitális hematopatológiai diagnosztikai eljárások validálásához (Sarkis et al., 2023). A LiverQuant lehetővé teszi a máj WSI-k adatainak gyorsabb, objektívebb és reprodukálhatóbb számszerűsítését miközben csökkenti a májszövetek tömeges elemzésének elvégzéséhez szükséges időt (Hellen és Karpen, 2023).

5.1.7. Mesterséges intelligencia (AI)

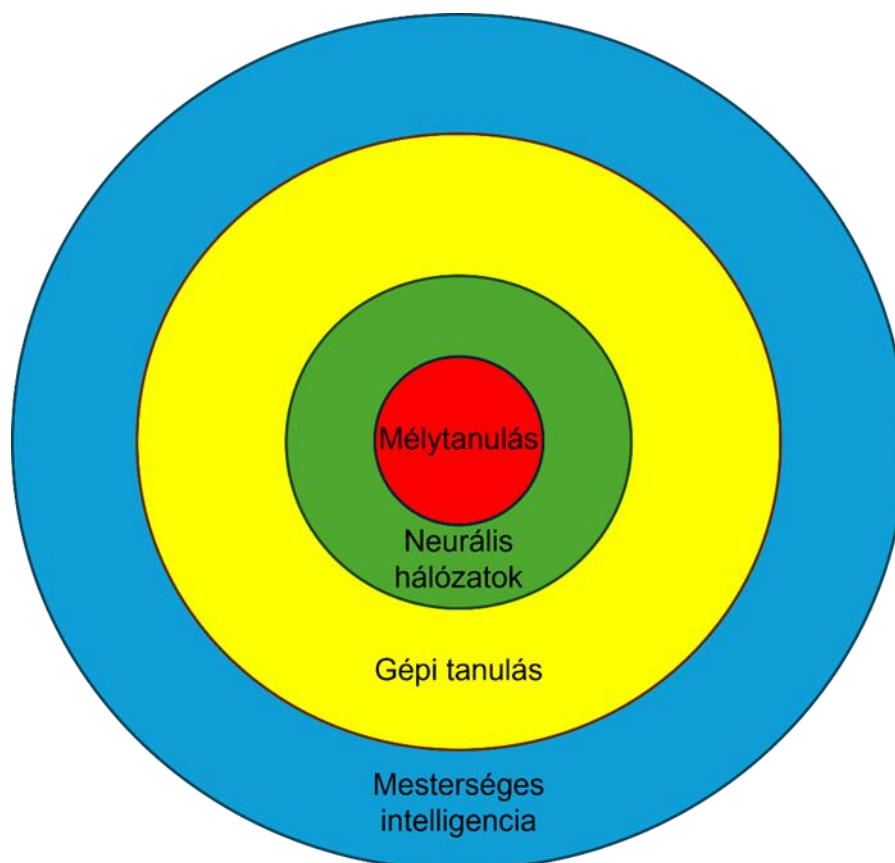
A mesterséges intelligencia gyűjtőfogalma tartalmazza azokat a módszereket, amelyek segítségével a számítógép megközelíti vagy bizonyos mértékig meghaladja az emberi intelligenciát. Széles kategóriát képvisel, a döntéshozatali folyamatokat elősegítő összes számítógépes algoritmussal. A gépi tanulás (machine learning, ML) egy olyan tudományág a mesterséges intelligencia keretein belül, amely lehetővé teszi a számítógépek számára, hogy kifejezett programozás nélkül tanuljanak önállóan, és a tapasztalatból való folyamatos tanulás révén javítsák a teljesítményüket. A digitális képelemzésre képes szoftverek is gépi tanulást használnak. Három ML tanulási kategória létezik: felügyelt, nem felügyelt és megerősítésen alapuló. Jelenleg a felügyelt tanulás dominál az AI és ML alkalmazásokban. Ez a típus azon az elven alapul, hogy egy modellt a felhasználó által meghatározott képzési adatok segítségével optimalizálnak. Egyszerűbben megfogalmazva a felhasználó ellenőrzi és módosítja a program által tanulásra használt adatokat (Ács et al., 2020; Turner et al., 2020).

A mélytanulás (deep learning) a ML egy részhalmaza, amely mesterséges neurális hálózatokat használ (4. és 5. ábra). A mesterséges neurális hálózatok az emberi agy neurális hálózatainak és tanulási képességének modellezésére tervezett számítógépes rendszerek. A mélytanulási modellek rendelkeznek bemeneti réteggel (képadatok), rejtett rétegekkel és egy kimeneti réteggel (előrejelzések). Amint az információ áthalad a rendszer rejtett rétegein, a modell megtanulhatja a bemeneti adatokban lévő összetett minták hierarchikus reprezentációit. A mélykonvolúciós neurális hálózatok a mélytanulási modellek sajátos, képadatok modellezésére használt típusai. A modellt nagy mennyiségű betanítási adatra optimalizálták, a rögzített és tanult minták alkalmazhatóak a korábban nem észlelt megfigyelések válaszainak/jelzéseinek előrejelzésére (Ács et al., 2020; Turner et al., 2020; Nagy et al., 2023).



4. ábra: Mesterséges neurális hálózatok

Egy egyszerű neurális hálózat legfeljebb 2 réteget tartalmaz a bemeneti és kimeneti rétegek között, ellentétben a mélytanuló neurális hálózatokkal melyek segítségével komplex, nemlineáris kapcsolatok is modellezhetők (forrás: Turner et al., 2020)



5. ábra: A mesterséges intelligencia részhalmazai

A legfejlettebb mélytanulási rendszerek a gépi tanulás neurális hálózatokat modellező csoportjába tartoznak (forrás: Turner et al., 2020)

Felmerülhet az a téves elképzelés, hogy az MI széleskörű használata felváltja a patológusokat mivel munkájuk számítógépes rendszerekkel elvégezhetővé válik. A kettő kiegészíti és segíti egymást, az együttműködésük pontosabb és objektívebb eredményekhez vezethet. Az MI továbbra is szűk területeken képes csak döntéseket hozni, ellenben a patológusok több tényezőt vesznek figyelembe és azokat hatékonyabban értelmezik és hangolják össze (Niazi et al., 2019).

5.1.8. Alkalmazási lehetőségek

5.1.8.1. Diagnosztika

A teljesen digitalizált munkafolyamat jelenleg csak korlátozott számú laboratórium számára elérhető, 2014-ben elsőként az Antech és az IDEXX laboratóriumok digitalizálták teljesen a szövettani diagnosztikai szolgáltatásaikat. A WSI-k nemzetközi megosztása megkönnyíti a szakértőkkel való gyors konzultációt és lehetővé teszi a lényegesnek ítélt elváltozásokról készített képek beillesztését a patológiai leletbe, továbbá minimalizálja az értékes metszetek elvesztésének vagy károsodásának kockázatát (Zuraw és Aeffner, 2022; Bruce et al., 2024). A releváns területek gyorsabban felismerhetők WSI-ken, rövidebb vagy hasonló a diagnózishoz szükséges idő. Megjegyzések tehetők és egyszerűbb mérések végezhetők, több metszet párhuzamos vizsgálata is lehetséges, valamint a pozitív jelek/markerek (pl. Ki67 index) gyorsabb számszerűsítése is megvalósítható. Továbbá a WSI-k archiválása egyszerűbb, nincs szükség metszettárolóra (Thorstenson et al., 2014; Bertram és Klopffleisch, 2017).

Patológus szervezetek (pl. College of American Pathologists, Royal College of Pathologists) határozzák meg a DP klinikai validálási irányelveit és optimális gyakorlatait. Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) is engedélyezett digitális patológiai rendszereket primer diagnosztikai célra, beleértve a képelemzést és a gépi tanulási rendszereket. Továbbá számos laboratórium validált és használ klinikai gyakorlatban olyan rendszereket, amelyek nem rendelkeztek FDA engedéllyel. Az intézmények azonban eltérő kockázati profillal rendelkeznek, és dönthetnek úgy, hogy csak a hatóságilag engedélyezett rendszereket validálják (Hanna és Ardon, 2023).

A Semmelweis Egyetem már több, mint egy évtizede használ digitális patológiai rendszert, az ezt validáló kutatócsoportjuk ajánlása szerint minden patológiai osztálynak saját magának kell tesztelnie a kiválasztott rendszert, hogy megbecsülje a felhasználó elégedettségét és a diagnosztikai pontosságot. A digitális metszetek minőségét fontosnak ítélték, de a szkennelési és képminőségi hibák nem veszélyeztetik a beteg biztonságát, mivel ezek a vizsgáló számára észlelhetők. Eredményeik alapján a digitális kórszövettani diagnózisok nagymértékben

koherensek lehetnek a fénymikroszkópos vizsgálattal, a diagnosztikai pontosság legfontosabb tényezője pedig a patológus szakterületen szerzett tapasztalata (Fónyad et al., 2012).

Bár a számítógépes felszereltség minden jelentősebb diagnosztikai intézményben jelen van, még nem áll rendelkezésre digitális patológiai megvalósíthatósági tanulmány állatorvosi területen. Citológiai minták esetében a finomfókusz meghatározása továbbra is kihívást jelent. A szövet- és tárgylemez-előkészítés magasabb fokú szabványosítására van szükség a konstans minőségű, rutin beállításokkal szkennelhető WSI-k létrehozása érdekében. A szkennelési időt minél inkább le kell rövidíteni és az ezt végrehajtó munkaerőre is szükség van. Az adattároláshoz nagy digitális tárolókapacitás és jó információtechnológiai infrastruktúra szükséges. A műszaki meghibásodás lehetőségeit és veszélyeit, beleértve a szkennert- és hálózati problémákat, számításba kell venni (Thorstenson et al., 2014; Bertram és Klopffleisch, 2017).

5.1.8.2. Oktatás

Hagyományosan a kórszövettant mikroszkópokkal és üvegtárgylemezekkel tanítják, ami helyhez és időhöz köti a hallgatókat. Digitális megoldással a tanulók bármikor és bárhol elérhetik a metszeteket, a WSI-k számítógépeken, laptopokon, tableteken és okostelefonokon is megjeleníthetők és vizsgálhatók (Kogan et al., 2014; Bertram és Klopffleisch, 2017; Aeffner et al., 2018). Egy monitoron keresztül könnyebben és gyorsabban lehet navigálni, felfedezni az elváltozást, új metszetre váltani, megtalálni az optimális nagyítást. A hozzáadott megjegyzések segítenek azonosítani a lényeges elváltozásokat. A metszetek minden tanuló számára azonosak és konstans minőségűek, nem kell újakat készíteni esetleges rongálódás esetén. Egyszerűbb az interakció és a kooperáció a hallgatótársakkal és a tanárral is, tesztek írásánál a diákok pedig azonnal értesülhetnek az elért eredményükről (Gatumu et al., 2014; Bertram és Klopffleisch, 2017). Hazánkban a Semmelweis Egyetem és az Állatorvostudományi Egyetem is digitális metszeteket használ a kórszövettan oktatásához (Fónyad et al., 2010).

Fontos megemlíteni, hogy a finom fókusz hiánya a részletes sejtmorfológia elbírálását megnehezítheti, nagyobb nagyítások pedig nem mindig lehetségesek rutin szkennelési folyamatok esetén. A nem csekély anyagi ráfordítást igénylő technológiai kritériumok (nagysebességű internet, elegendő tárolási kapacitás, műszaki támogatás) maradéktalan teljesülése esetén is fennáll a lehetőség a szoftverhibáknak (Neel et al., 2007; Bertram és Klopffleisch, 2017).

5.1.8.3. Kutatás

A tudományos munkákhoz leginkább objektív, reprodukálható és számszerűsíthető adatokat biztosító vizsgálati eljárások szükségesek a humán tényezők és hibalehetőségek kiküszöbölésével. A hagyományos patológia leíró és kvalitatív vagy félkvantitatív tudományos

diszciplína mely esetenként viszonylag szubjektív. Ezen hiányosságok kiküszöbölésére és javítására lehet alkalmas a digitális patológia, amelynek kutatásbeli felhasználási lehetőségei sokrétűek és folyamatosan tovább bővülnek (Webster és Dunstan, 2014; Bertram és Klopfeisch, 2017). A DIA képes számszerűsíteni azokat a jelenségeket, amelyeket a patológus csak kvalitatív állítások segítségével tud leírni, valamint segítségével új, klinikailag releváns, előre meghatározott határértékeket lehet pontosabban meghatározni. Egyre több tudományos projekt integrálja a WSI-ket szöveti microarray (tissue microarray, TMA) adatbázisokba (a TMA több száz különböző esetből származó kisméretű, reprezentatív szövetmintákat tartalmazó paraffin blokk, illetve abból készült metszet). Nagyon gyakori digitális patológiai kutatási témakör a biomarker-tesztelés immunhisztokémiával, immunfluoreszcenciával vagy fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) főleg az onkológia területén. A gyógyszerfejlesztés és a toxikológiai patológia már évtizedek óta használja a módszert, analóg munkafolyamatait egyre inkább kiszorítják a digitális megoldások (Pallua et al., 2020; Szilasi et al., 2020; Turner et al., 2020; Ács et al., 2021; Prelaj et al., 2024).

5.1.9. Megoldandó problémák és követelmények

A különböző metszetszkennerek a gyártó szabadalmazott fájlformátumában készítik el a WSI-ket. Ez megakadályozhatja a különböző szkennertípusokkal rendelkező intézmények közötti együttműködést és a metszetek digitális elemzését, ha az adott fájlformátummal nem kompatibilis a képelemző vagy megtekintő szoftver. Jelenleg a legtöbb DIA-szoftver már több különböző fájlformátumot is képes kezelni, de míg a digitális radiológia a Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM) szabványokon keresztül egységes fájlformátum-stratégiát fogadott el, a szabványosított WSI-formátum a digitális patológiában továbbra is hiányzik (Clunie, 2021).

A DP rutinszerű használatának bevezetése jelentős költségekkel járhat nemcsak a nagyteljesítményű szkennerek beszerzése, hanem az informatikai és technológiai infrastruktúra kiépítése, valamint a szakemberek képzése miatt is (Madabhushi és Lee 2016; Zuraw és Aeffner, 2022). Hanna és mtsai létrehoztak egy modellt a rendszer legsikeresebb megvalósítására, amely többek között a személyzetet, a helyet, a szkennereket és a tárolást is számításba veszi. A diagnosztikai laboratórium teljesítményétől függően évente akár milliós nagyságrendű szövettani metszet szkennelésére lehet szükség, ami terabájtnyi (TB) és petabájtnyi (PB) adat keletkezését jelenti, jelentős adatkezelési igényeket és terhet eredményezve. Ez jelentős szerver- és/vagy felhőtároló-kapacitást igényel (Hanna et al., 2019; Zuraw és Aeffner, 2022).

A mesterséges intelligencián belül leginkább a leghatékonyabb, mélytanulási rendszereket kritizálják, mivel egyelőre nem lehet megmagyarázni, hogyan jutnak el

döntéseikhez. Ezeket a folyamatokat összefoglalva black box-nak (fekete doboznak) nevezik. Az ehhez kapcsolódó klinikai és jogi problémákat a jövőben orvosolni szükséges (Niazi et al., 2019).

Összességében bár a technológia sikeres integrációjához technikai, szabályozási és etikai akadályokat kell leküzdeni, a DP felelősségteljes alkalmazása forradalmasítja a patológiai gyakorlatot (Bruce et al., 2024).

5.1.10. 3DHISTECH

Az 1996-ban alapított 3DHISTECH (Budapest, Magyarország) magyar, kizárólag digitális patológiával foglalkozó cég, a digitális patológiai eszközök első európai gyártója, több mint 1500 eladott rendszerével pedig az egyik globális piacvezetője. Számos képminőségi és szkennorsebességi díj büszke nyertese a Nemzetközi Szkennerversenyeken. A vállalat elkötelezett a PANNORAMIC® metszetszkennerek, a Track & Sign™ és a CaseManager™ laboratóriumi és patológiai ügyintézési szoftverek, valamint a CaseViewer™ digitális mikroszkópos és QuantCenter™ képelemző szoftvermegoldások fejlesztése és gyártása mellett. Legfőbb célitűzése a hagyományos patológiai munkafolyamat teljes digitalizálása, hogy a tudományterület az egészségügy egyre növekvő igényeihez alkalmazkodni tudjon (<https://www.3dhistech.com/>).

5.2. A sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS)

5.2.1. Kóroktan

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) a sertések egyik legsúlyosabb gazdasági következményekkel járó fertőző betegsége (Lunney et al., 2016; Balka et al., 2018). Európában és Észak-Amerikában a PRRSV okozta plusz költség sertésenként 6,25–15,25 USD (Zimmerman et al., 2019). A PRRSV-törzsek a *Nidovirales* rendbe és az *Arteriviridae* családba tartoznak (Gagnon et al., 2021). Ezek kisméretű, burkos, pozitív irányultságú egyszálú RNS genommal rendelkező vírusok, amelyek két fajhoz tartoznak: PRRSV-1 (*Betaarterivirus suid 1*, korábban európai genotípus) és PRRSV-2 (*Betaarterivirus suid 2*, korábban észak-amerikai genotípus) (Ruedas-Torres et al., 2024). A genom 15 kb hosszúságú és 10 nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz. A vírust fajok közötti és fajon belüli, nagyfokú genetikai diverzitás és variabilitás jellemzi (Balka et al., 2015; Balka et al., 2018).

5.2.2. Előfordulás és járványtan

A PRRSV hozzávetőlegesen egyidőben jelent meg Európában (1990-es évek eleje) és Észak-Amerikában (1980-as évek vége), azóta mindkét vírushatár világszerte elterjedt és endemikus szinte minden nagyobb sertéstenyésztő országban. A PRRSV-1 Európában domináns, a PRRSV-2 pedig Amerikában és Ázsiában. A sertés és az örvös pekari fogékony a fertőzésre (Balka et al., 2015; Zimmerman et al., 2019, Ruedas-Torres et al., 2024). Magyarország mentesült a betegség alól a PRRS Nemzeti Mentésítési Terv keretében, ahol minden PRRSV-vel fertőzött nagyüzemnek egyedi mentésítési tervet kellett kidolgoznia, beleértve külső és belső járványvédelmi intézkedések használatát (Szabó et al., 2023).

A sertések intranasalis, oralis, transplacentaris, vaginalis és parenteralis úton is fertőződhetnek, a vírust a nyállal, orrváladékkal, vizelettel, ondóval, tejjel és bélsárral ürítik (Arruda et al., 2019). Telepi körülmények között a fertőződés szempontjából az emberi beavatkozások (mint a fül- és farokvágás, fogcsípés, tetoválás, gyógyszeres kezelések, oltások) mellett a fertőzött és fogékony sertések közötti agresszív interakciók során keletkezett harapások és egyéb sérülések szerepe is felmerül. Az indirekt átvitel ragályfogó tárgyakkal, esetleg ízeltlábú vektorokkal is lehetséges (Zimmerman et al., 2019). A szakirodalom ellentmondó eredményei ellenére összességében megállapítható, hogy lehetséges a PRRSV levegőn keresztüli átvitele, de ennek valószínűsége nagy távolságokon keresztül viszonylag kicsi (Arruda et al., 2019). A PRRSV levegőn keresztüli terjedési kapacitását befolyásoló elsődleges tényezők maga a vírustörzs és a jelenlévő további kórokozók, de lényeges az

aeroszol részecskemérete és a környezeti feltételek is (Hu et al., 2023). A PRRSV virémiás kocákból transzplacentárisan áterjedhet a magzatokba. Képes replikálódni akár 2 hetes magzatokban is, de mivel leghatékonyabban csak az utolsó trimeszterben képes átjutni a placentán, a magzati fertőzés a vemhesség első kétharmadában kevésbé gyakori. A PRRSV fiatal állatokban krónikus, perzisztens fertőzést okoz, ez a perzisztencia a vírus állományon belüli fennmaradásának egyik legjelentősebb epidemiológiai jellemzője (Harding et al., 2017; Zimmerman et al., 2019).

5.2.3. Kórfejlődés

A CD163 haptoglobin scavenger receptor a PRRSV nélkülözhetetlen sejtbelépési receptora. A pH-függő, receptor által közvetített endocytosist követően a vírusok elsősorban sertések differenciált alveolaris macrophagjaiban szaporodnak. A teljes CD163 kódoló gén, vagy konkrétan a receptorkötőhely (scavenger receptor ciszteinben gazdag domén 5 vagy SRCR5) kiiktatásával a sertések és alveolaris macrophagjaik rezisztenssé válnak a PRRSV fertőzésekkel szemben (Whitworth et al., 2016; Burkard et al., 2018).

A sialoadhesin (Sn), a szialsavkötő molekulák siglec családjának tagja, szintén részt vesz a PRRSV-1 vírus bejuttatásában és kizárólag a differenciált szöveti macrophagok specifikus alcsoportjain található meg (Karniychuk et al., 2013). Bár a vírus elsődleges célszerve a tüdő és az alveolaris macrophagok, azonosították intravascularis és interstitialis macrophagokban, valamint kisebb mértékben replikálódik dentritikus sejtekben és a legtöbb szervben perivascularisan megtalálható monocyta-eredetű macrophagokban (Zimmerman et al., 2019; Dénes et al., 2021; Ruedas-Torres et al., 2024).

A PRRSV-fertőzés három különböző szakaszra osztható, ezek az: akut fertőzés szakasza, a perzisztencia szakasza és a vírus eliminációjának szakasza. Az akut szakaszt a tüdő- és nyirokszövetek primer replikációs helyeire történő gyors terjedés jellemzi (Lunney et al., 2016). A perzisztencia a virémia után kezdődik, sajátossága a klinikai tünetek hiánya és a fokozatosan csökkenő PRRSV-replikáció és ürítés. Az elimináció szakasza a vírusürítés megszűnésétől a PRRSV immunrendszer általi eliminálásáig tart (Zimmerman et al., 2019). A kórkép lényeges jelensége a fertőzött sejtek, valamint a vírussal nem fertőzött sejtek apoptózisa, az ún. bystander apoptózis, amely virulensebb törzsekkel való fertőzés esetén fokozottabb mértékű. A vírus az alveolaris macrophagokban gasdermin D-indukálta pyroptosist is képes kiváltani. A tüdőben a bystander apoptózis miatt elpusztult sejtek nagyrészt macrophagok, kisebb számban lymphocyták és alveolaris pneumocyták, a nyirokcsomókban és a thymusban pedig többnyire lymphocyták, kisebb számban macrophagok. Ez a jelenség a csontvelő immunsejtjeit és progenitor sejtjeit is érinti (Zimmerman et al., 2019; Wang et al., 2019; He et al., 2022; Ruedas-Torres et al., 2024). Az

immunrendszer sejtjeinek károsításán túlmenően a PRRSV törzsspecifikus módon módosítja a veleszületett immunitást, valamint a gyulladásos és immunszabályozó cytokinek expresszióját is. A neutralizáló antitestek általában a fertőzés után 3–4 héttel mutathatók ki alacsony titerben és jellemzően korlátozott hatékonysággal tudják a nem homológ vírustörzseket keresztneutralizálni. A PRRSV-fertőzés hajlamosít másodlagos bakteriális kórképekre, emellett jelentősen fokozza a PCV-2 replikációját is, ami súlyosabb PRRS tüdőgyulladásához és PCV-2-SD-hez vezet (Zimmerman et al., 2019; Wang et al., 2019; Ruedas-Torres et al., 2024).

Kanadában végzett reprodukciós fertőzéses vizsgálatok alapján a PRRSV-2 szisztémás fertőzés után megjelenik az endometriumban, és a CD163+ macrophagokban replikálódik. Apoptózist indukál számos sejttípusban, beleértve a macrophagokat, más gyulladásos sejteket, a méhnyálkahártya hámsejtjeit és a magzati trophoblastokat. A gyulladással együtt ezek az elváltozások hátrányosan befolyásolhatják a tápanyagok magzatokba szállítását. Az anya-magzat határfelületnek a vírusterheléséből megbízhatóan következtethetünk a magzati vírusterhelésre. Ennek a határfelületnek az alacsony fokú vírusterhelése a magzat thymusának súlyos fokú vírusterhelésével együtt a magzati elhullás megnövekedett valószínűségével jár (Ladinig et al., 2015; Harding et al., 2017). Ezen eredmények szerint a vírus áterjedése az anyai szövetekből a magzati szövetekbe, a magzati fertőzés, a vírus szaporodása a magzati szövetekben és a vírus terjedése a szomszédos magzatokra mind lényeges elemei lehetnek a PRRS által okozott reprodukciós kórképének. További méh-, méhlepény- és magzati tényezők is felelősek lehetnek a betegség kialakulásáért (Ladinig et al., 2015; Harding et al., 2017). A fertőzés időtartama és a magzati vírusterhelés valószínűleg a vezető faktorok a magzati rezisztencia előrejelzésében (Malgarin et al., 2019). Az anya-magzat határfelületen lévő CD163+ és CD169+ macrophagok száma szignifikánsan megemelkedik PRRSV-2-vel fertőzött vemhes kocaüldőkben. A magzati csecsemőmirigy vírusterhelése pozitív korrelációt mutatott az endometriumban található CD163+ macrophagok számával, ami arra utal, hogy ezek a sejtek fontos szerepet játszanak a PRRSV-2 által okozott szaporodásbiológiai rendellenességek patogenezisében (Novakovic et al., 2016b). A macrophagok képesek aktiválni bizonyos immunsejteket, beleértve a természetes ölősejteket (natural killer cells, NK cells), kölcsönhatásukat az emberi méhben igazolták. Az Sn+ macrophagok és a CD8+ T-lymphocyták számának emelkedését figyelték meg PRRSV-1-gyel fertőzött kocák anya-magzat határfelületén. Ezen eredmények alapján az Sn-pozitív macrophagok aktiválhatják az endometrium NK sejtjeit, ami hozzájárulhat a kórszövettani elváltozások kialakulásához (Karniychuk et al., 2013).

5.2.4. Tünetek

A PRRS leggyakoribb tünetei az étvágytalanság, láz, letargia és légúti tünetek (Wang et al., 2019). Kocáknál és kocasüldőknél jellemzően a szaporodásbiológiai rendellenességek dominálnak, meddőség, vetélések (főleg a harmadik trimeszterben), koraellések, mumifikált magzatok és holtellések jelentkeznek, a fertőzött de élő malacok csökkent súllyal és életképességgel születnek. Ritkán a kocákban idegrendszeri tünetek is kialakulhatnak. A túlélő kocákra gyakran visszaivarzás és alacsony fogamzási ráta jellemző. A fejlődő malacok és a hízók légúti, ritkán idegrendszeri tüneteket mutatnak, a kanoknál a libidó hiánya mellett a sperma minősége is romolhat (Rossow, 1998; Schulze et al., 2013; Zimmerman et al., 2019; Wang et al., 2019; Ruedas-Torres et al., 2024). Az immunrendszer károsítása miatt akut PRRS esetén gyakrabban jelentkeznek endémiás megbetegedések is (streptococcusos meningitis, Glässer-féle betegség, exudatív dermatitis, rühösség, paratífusz és bakteriális bronchopneumonia). A vörös csontvelő károsodása pancytopeniát eredményez (Zimmerman et al., 2019; Wang et al., 2019).

A klinikai megjelenés tehát meglehetősen változatos, tünetmentes fertőzés és súlyos megbetegedés is kialakulhat. Ezt többek között a PRRSV törzs virulenciája, a gazdaszervezet immunitása, kora és genetikája, valamint a menedzsment és az egyidejű társfertőzések jelenléte befolyásolja (Lunney et al., 2016; Novakovic et al., 2016a; Wang et al., 2019; Ruedas-Torres et al., 2024). 2006-ban a Távol-Keleten megjelentek nagyon virulens (highly pathogenic) törzsek, amelyek minden korcsoportban súlyos tüneteket (láz, légúti tünetek, cyanosis, hasmenés) és nagyarányú elhullást okoztak. A kitörés óta Európa számos országában észleltek hasonló virulenciájú törzseket (Sinn et al., 2016; Canelli et al., 2017; Martín-Valls et al., 2022).

5.2.5. Kórbonctan

Makro- és mikroszkópos elváltozások a leginkább a tüdőben és a nyirokcsomókban észlelhetők. A tüdőben másodlagos bakteriális fertőzés nélkül jellemzően ödémával kísért változó súlyosságú és eloszlású interstitialis pneumonia alakul ki, legsúlyosabb formában többnyire a fiatalabb korcsoportokban jelentkezik. Testszerte a nyirokcsomók többszörösükre duzzadnak, 2 hetesnél fiatalabb malacokban jellegzetesebb elváltozások a periorcularis, scrotalis és subcutan ödéma. Virulens törzseknél vérzéseket láthatunk a tüdőben, nyirokcsomókban, bőrben, epicardiumban és vesekéregben (Jubb, Kennedy és Palmer, 2016; Zimmerman et al., 2019).

A lympho-histiocytás, 2-es típusú pneumocytá hyperplasiával kísért szövetközi tüdőgyulladás mellett a szabad kromatinaggregátumokkal együtt észlelt nekrotikus alveolaris macrophagok jellegzetesek a PRRS-re. Az interstitialis pneumonia legsúlyosabb formája az

ún. proliferatív-elhalásos pneumonia (Szeredi et al., 2008; Jubb, Kennedy és Palmer; 2016; Ruedas-Torres et al., 2024). A nyirokszövetekben a lymphoid sejtek nekrotizálnak és depletálnak, virulens törzsek esetében szinte teljes thymussorvadás is előfordulhat. Később lymphoid hyperplasia alakul ki. Perivascularis lympho-plasmo-histiocytás beszűrődés számos szervben megjelenhet, leginkább az ornyálkahártyában, a szívben (myo- és epicardialisan), a vesékben és az agyvelőben. Egyéb mikroszkopikus elváltozások közé tartozik az enyhe vagy súlyos fokú, szegmentális, lympho-histiocytás nekrotizáló vasculitis. Olykor enyhe fokú lympho-histiocytás encephalitis is kialakul, ritkán súlyosabb formában lympho-histiocytás necrotizáló vasculitis-szel kísérvé (Rossow, 1998; Jubb, Kennedy és Palmer; 2016; Zimmerman et al., 2019). PRRSV-fertőzés akut vöröscsontvelő-elégtelenséget (hypoplasiát) is okoz, amelyet a myeloid és erythroid prekursorok hiánya/csökkenése és emelkedett M:E (myeloid:erythroid) arány jellemez (Wang et al., 2019).

Az anya-magzat határfelületen mikroszeparációk jelentkezhethetnek az endometrium epitheliuma és a placenta trophoblastjai között. A PRRSV által okozott jellegzetes kórszövettani elváltozások a méhben a vasculitis-szel kísért myometritis és endometritis. Az endometriumban a gyulladásos infiltrátum túlnyomórészt lympho-plasmo-histiocytás. Ha vannak magzati elváltozások, azok változatosak és nem jellegzetesek (szegmentális vagy diffúz köldökszínór vérzés, köldökarteria fibrinoid nekrózis és gennyes gyulladás, enyhe fokú interstitialis tüdőgyulladás, pulmonalis arteritis, lymphocytás myocarditis és encephalitis, retroperitonealis és mesocolon ödéma) (Jubb, Kennedy és Palmer, 2016; Novakovic et al., 2016a; Novakovic et al., 2018). A magzati és köldökszínór-elváltozások azonban szoros összefüggést mutatnak a magzat károsodásával (Harding et al., 2017).

5.2.6. Diagnosztika

A PRRSV nem okoz patognomisztikus tüneteket vagy elváltozásokat, valamint az egyidejű vírusos és/vagy bakteriális társfertőzések jellemzően bonyolítják a klinikai/kórbonctani képet, így értelemszerűen a végleges diagnózishoz laboratóriumi vírus-, vagy ellenanyag-kimutatás szükséges. A szerológia hasznos lehet vakcinázatlan állományok korábbi fertőzésének igazolására, a tüdő és a mandula FFPE mintáin elvégzett IHC pedig gazdaságos, de kevésbé érzékeny módszernek tekinthető (Jubb, Kennedy és Palmer, 2016; Zimmerman et al., 2019).

Analitikailag és diagnosztikailag is a nukleinsav-kimutatáson alapuló módszerek a legérzékenyebbek. Érzékeny és specifikus eljárás a valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripció polimeráz láncreakció (rRT-qPCR), amely a genomkópiaszám mennyiségi meghatározására is alkalmas. Minden laboratóriumi vizsgálathoz gyűjtött mintán elvégezhető, legyen az szérum, vér, szövetek, bronchoalveolaris lavage (BAL), sperma, nyál-, vagy ún.

herélésifolyadék-minta (processing fluid) (Zimmerman et al., 2019; Dénes et al., 2021; Dénes et al., 2022). A processing fluid a malacok kasztrálása és farokkurtítása során gyűjtött savós-véres folyadék (Lopez et al., 2018). A vetélt magzatokban gyakran már nem lehet izolálni a kórokozót, de Ladinig és mtsai szignifikánsan nagyobb vírusterhelést észleltek az endometriumban, valamint a magzati thymusban és szérumban a meconiummal szennyezett, nem sokkal korábban elhullott magzatok esetében, ami arra utal, hogy ezek a legalkalmasabbak a rutin diagnosztikára (Ladinig et al., 2014).

Az ISH leginkább kutatási körülmények között alkalmazható módszer. Különbféle RNS-alapú ISH-eljárásokat fejlesztettek ki a PRRSV kimutatására, beleértve fluoreszcens (FISH), kromogén (CISH) és biotinil-tyramid alapú (TISH) módszereket. Az RNAscope, mint RNS-alapú ISH-módszer alkalmazását a PRRSV kimutatására PRRSV-2-törzseknél, és kutatócsoportunk jóvoltából PRRSV-1-törzsek esetében is publikálták (Cui et al., 2018; Song et al., 2019; Dénes et al., 2021).

5.3. A sertés 2-es típusú circovírusa (PCV-2) és a hozzá köthető szisztémás betegség

5.3.1. Kóroktan

A sertés-circovírusok a *Cirivirales* rend *Circoviridae* családján belüli *Circovirus* genusba tartozó burok nélküli, egyszálú cirkuláris DNS-t tartalmazó vírusok (*porcine circovirus 1, 2, 3* és *4*). Közülük a legelterjedtebb, 2-es típus (PCV-2) bír a legnagyobb kórokozó képességgel és gazdasági szempontból is jelentős (Steiner et al., 2008; Zimmerman et al., 2019; Chen et al., 2023). A cirkovírusok a legkisebb DNS-vírusok közé tartoznak, virionjuk átmérője 16–18 nm, cirkuláris genomjuk ~1,7 kb hosszúságú, és 10 leírt nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz. A PCV-2-fertőzés legkorábbi, retrospektív bizonyítékát 1962-re visszamenően találták Németországban, a szisztémás betegség legkorábbi retrospektív esete pedig a 80-as évek közepéből származik (Jacobsen et al., 2019). A kórképet először 1991-ben Kanadában írták le (Clark, 1997). 1995-ben beteg állatok mintáiban cirkovírusnak megfelelő víruspartikulákat észleltek elektromikroszkóppal, a cirkovírusos háttér gyanúját pedig tovább erősítette, hogy a patológusok jellegzetes citoplazmazárványokat észleltek, amelyek madár cirkovírusos betegségeknél is megjelennek. 1996-ban a PK-15 (*porcine kidney 15*, sertésvese 15) sejtvonalat kontamináló sertés cirkovírus antigénjét célzó IHC eljárással láthatóvá tették az elváltozásokban a kórokozót, a későbbi nukleotid-szekvencia elemzések pedig jelentős eltéréseket tártak fel a sejtvonal eredetű PCV törzsekhez képest. A vírusgenom nukleotid-

szubsztitúciós aránya nagyon magas, az RNS-vírusokéhoz hasonló (Segalés és Domingo, 2002; Segalés, 2012; Ellis, 2014; Jubb, Kennedy és Palmer, 2016; Guo et al., 2022; Yu et al., 2023).

5.3.2. Előfordulás és járványtan

A sertés-circovírusok világszerte megtalálhatóak, a PCV-2 ubikviter házi- és vaddisznókban egyaránt. A házisertéseken és vaddisznókon kívül borjak, valamint egerek és patkányok is fogékonyak a fertőzésre. A vírus replikációja után képes bizonyos mértékig az egerek közötti terjedésre is. A PCV-2 azonosítása sertéstelepi rágcsálókban felveti ezen állatfajok alternatív gazdaszerepének gyanúját (Lorincz et al., 2010; Halami et al., 2014; Zimmerman et al., 2019; Chen et al., 2023).

A PCV-2 horizontális és vertikális úton is terjed, a kórokozót az állatok elsődlegesen oronasalis úton veszik fel. Számos szövetnedvben és váladékban hosszú ideig izolálható, megjelenik többek között az orrváladékban, tonsillaváladékban, hörgőváladékban, szemváladékban, bélsár, nyálban, vizeletben, kolosztrumban, tejben és ondóban is. A vírus átvitelének legáltalánosabb módja a fogékony és fertőzött állatok közötti közvetlen érintkezés, és bár a felsorolt váladékok mind potenciális fertőzési forrást jelentenek, úgy gondolják, hogy a spermában természetesen ürített vírusrészecske mennyisége nem elegendő a kocák és a magzatok fertőzéséhez. A sertések virémiás állatok nyers szöveteinek elfogyasztásával és transzplacentarisan is fertőződhetnek (Rose et al., 2012; Zimmerman et al., 2019). A sertéstelepek közötti átvitel módja leginkább fertőzött állatok vagy fertőzött állati termékek behozatalára korlátozódik (Rose et al., 2012).

5.3.3. Kórfejlődés

Meglehetősen hiányosak a PCV-2-fertőzés patogenezisére vonatkozó ismeretek. A monocyták általi vírusfelvételhez a virion elektrosztatikusan kapcsolódik a phosphacan, egy sejtfelszíni proteoglikán glükózaminoglikán láncaihoz melyet clathrin-mediált endocytosis követ. A vírus sejtbefutásának további lehetséges magyarázata, hogy az extracelluláris hialuronsavakhoz vagy a chondroitin-szulfát/dermatan-szulfát proteoglikánokhoz kötődik és internalizációt vált ki a hialuronsav receptor endocytosis jelének aktivációjával (Ouyang és Nauwynck, 2023). A vírus számos sejtféleségben képes szaporodni, többek között hám- és endothel eredetű, továbbá lymphoid és myeloid sejtekben is, de elsődlegesen a sertések nyirokszöveteit célozza, főleg a monocytákat/macrophagokat és dendritikus sejteket. (Meng, 2013; Steiner et al., 2008; Franzo és Segalés, 2020; Fehér et al., 2023). Mivel a kisméretű PCV-2 nem kódol saját DNS-polimerázt, S-fázisban lévő sejteket igényel, így potenciálisan a

magas mitotikus rátájú sejtekben a leghatékonyabb a vírus replikációja. A nyirokszövetek tartalmazzák a legmagasabb koncentrációban a PCV-2-t, PCV-2-SD esetekben ez a monocyta-macrophag sejtvonal sejtjeinek citoplazmájában észlelhető. A vírus kimutatható továbbá a vese és a légutak hámsejtjeiben, endothelsejtekben, lymphocytákban, enterocytákban, hepatocytákban, Kupffer sejtekben, simaizomsejtekben, valamint a hasnyálmirigy acinaris és ductalis sejtjeiben. *In vitro* vizsgálatok alapján ezek a sejtek perzisztensen fertőzötté válnak bennük alacsony fokú vagy megszűnt vírusreplikációval (Meng, 2013; Zimmerman et al., 2019).

A PCV-2-SD elváltozásai immunszuppressziót eredményeznek. A nyirokszövetekben a lymphoid sejtek kiürülése, a macrophagok számának növekedése, valamint a follicularis dendritikus sejtek pusztulása jellemző. A vírus NK-, T- és B-sejtkiürülést az immunsejtek közvetlen pusztításával és egyéb, nem teljesen ismert kórfolyamatok segítségével okoz. A PCV-2 károsítja a citokinreakciót és az immunsejtek aktivációját, megzavarva a veleszületett és adaptív immunválasz működését. Ezek a változások a PCV-2 strukturális alkotói, például a genomiális DNS és a Cap (kapszid) fehérje közvetítésével alakulnak ki. Úgy gondolják, hogy a neutralizáló ellenanyagok és a celluláris immunválasz egyaránt fontos szerepet játszik a gazdaszervezet PCV-2 elleni védekezésében. A számos, hatékony, kereskedelmi forgalomban kapható vakcina mellett a PCV-2-törzsek újonnan megjelent variánsa (PCV-2d) továbbra is világszerte okoz gazdasági károkat vakcinázott állományokban is (Meng, 2013; Zimmerman et al., 2019; Fehér et al., 2023; Sagrera et al., 2024).

Kísérletes fertőzéses vizsgálatok nyomán bebizonyosodott, hogy a PCV-2-SD egy multifaktorális sertésbetegség, amely esetében a PCV-2-fertőzés szükséges, de nem elégséges kiváltó tényező (Segalés, 2012). Nem fertőző rizikófaktorok közé tartoznak az állat ivara, a származási alom, a születési súly, a választási súly és testtömeg-gyarapodás, az adott telepre jellemző járványvédelmi tényezők, a korai választás, valamint süldő- és kocavakcinázások (PRRSV, *Escherichia coli*, orbánc és sertésparvovírus elleniek). A PCV-2-SD (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) kiváltójának tekinthető potenciális fertőző ágensek a sertésparvovírus (PPV), a PRRSV és/vagy a *Mycoplasma hyopneumoniae* (Grau-Roma et al., 2011).

5.3.4. Tünetek

A legismertebb PCV-2 által okozott kórkép a vírushoz köthető szisztémás betegség (PCV-2 systemic disease, PCV-2-SD), korábbi nevén a sertések választás utáni sorvadása (PMWS). A PCV-2-höz kapcsolódó egyéb kórképek a sertés dermatitis és nephropathia szindrómája (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS), reprodukciós zavarok (PCV-2 okozta reprodukciós zavar, PCV-2-RD), légúti betegségek (PCV-2 okozta tüdőbetegség, PCV-2-LD)

és emésztőszervi megbetegedés (PCV-2 okozta emésztőszervi betegség, PCV-2-ED) (Segalés, 2012; Zimmerman et al., 2019). Ezeket Európában összefoglaló néven sertéscircovírus-betegségeknek (porcine circovirus diseases, PCVD), Észak-Amerikában sertéscircovírus-asszociált betegségeknek (porcine circovirus-associated diseases, PCVAD) nevezik. A modern sertéstartásban a PCV2-SD-nek és a szubklinikai fertőzésnek van a legnagyobb gazdasági jelentősége (Segalés, 2012; Zimmerman et al., 2019; Sagrera et al., 2024).

A legtöbb PCV-2-fertőzés szubklinikai, klinikai tünetek megjelenése nélkül az átlagos testtömeg-gyarapodás csökkenésével jár. A fertőzött sertések változatos hányadában alakul ki PCV-2-SD, jellemzően 2–4 hónapos korukban. A morbiditás az érintett gazdaságokban általában 4–30% (legsúlyosabb esetekben 50–60%), a mortalitás 4–20% (Segalés, 2012). A PCV-2-SD klinikai tünetei lehetnek a lesóványodás, anaemia, légzési nehézség, köhögés, láz, hasmenés, idegrendszeri tünetek, icterus és hirtelen elhullás is. A korai stádiumokban a perifériás nyirokcsomók duzzanata gyakran észlelhető (Segalés, 2012; Jubb, Kennedy és Palmer, 2016; Zimmerman et al., 2019). A többi PCVD-kórkép az érintett, károsodott szervrendszereknek megfelelő tünetekkel jár, mint pl. a légzési zavar, nehézlégzés, hasmenés, vetélés, halvaellés, magzati mumifikáció, valamint PDNS esetében jellegzetes a sötétvörös papulák és foltok megjelenése leginkább a hátulsó végtagok és a perinealis régió bőrén (Segalés, 2012).

5.3.5. Kórbonctan

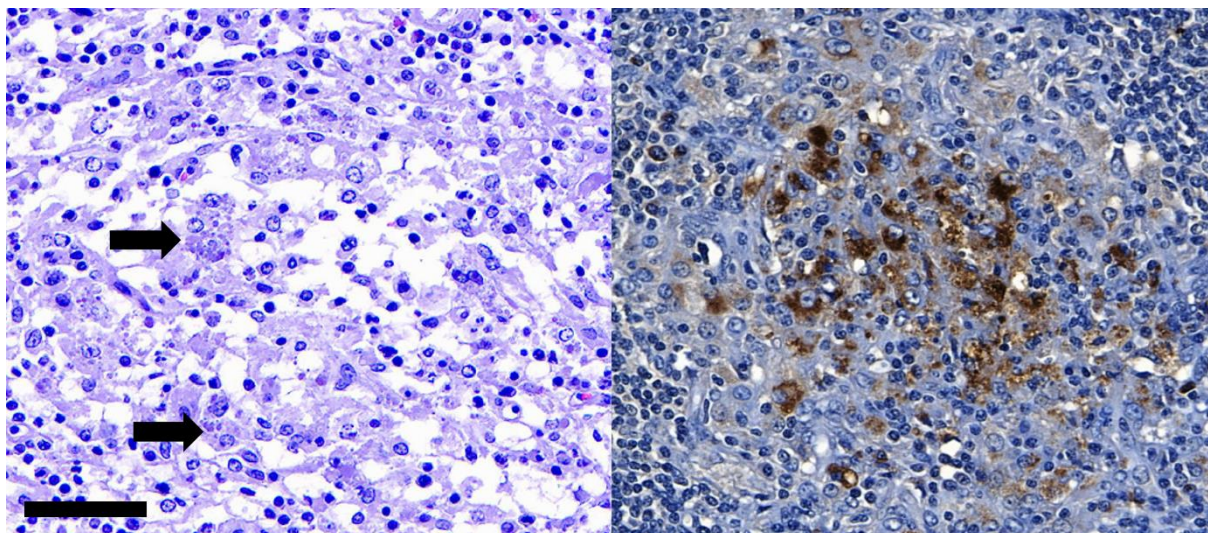
Szubklinikai fertőzésnél nincs látható elváltozás, vagy csak a nyirokszövetekben észlelhető enyhe fokú lymphocytá depletio és granulomatosus gyulladás. A PCV-2-SD korai stádiumaiban nyirokcsomóduzzanatot, késői stádiumaiban sorvadott vagy normális nagyságú nyirokcsomók észlelhetők. Gyakori elváltozás a thymus atrophia (Zimmerman et al., 2019). A PCV-2-SD során a nyirokszövetek mérsékelt-súlyos fokú kiürülését láthatjuk óriássejtképződéssel kísért granulomatosus beszűrődéssel, és ezzel egyidőben az elváltozást mutató területeken nagy mennyiségben kimutatható a vírusantigén, vagy -genom. Jellegzetes elváltozás a histiocytákban és dentritikus sejtekben megfigyelhető intracitoplazmatikus, botryoid jellegű víruszárványok. További elváltozások lehetnek az interstitialis, esetenként a 2-es típusú pneumocyták proliferációjával járó pneumonia, a változó súlyosságú hepatitis/hepatitis, a myocarditis, a mononuclearis interstitialis nephritis és a granulomatosus enteritis. Lympho-histiocytás gyulladásos góccok számos szövetben láthatók. Vasculitis és lymphangitis is rendszeresen megjelenő elváltozás, vasculitis olykor az agyvelőben is észlelhető (Segalés, 2012; Resendes és Segalés 2015; Jubb, Kennedy és Palmer, 2016; Zimmerman et al., 2019).

PCV-2 okozta tüdőbetegség (PCV-2-LD) esetén granulomatosus bronchointerstitialis pneumonia mellett közepes-nagy mennyiségben mutatható ki vírus a tüdőben és negatív eredmény vagy kis vírusrmennyiség várható a lymphoid szövetekben. A PCV-2 okozta emésztőszervi betegségnél (PCV-2-ED) granulomatosus enteritis mellett lymphoid depletio észlelhető a Peyer-plakkokban, más nyirokszövet érintettsége nélkül. Immunhisztokémiával/*in situ* hibridizációval közepes-nagy mennyiségben mutatható ki vírus a bélnyálkahártyában és a Peyer-plakkokban, egyáltalán nem vagy kis mennyiségben egyéb nyirokszövetekben. PCV-2 okozta reprodukciós betegségnél (PCV-2-RD) magzati myocarditis és következményes ödémás elváltozások, májbeli vérpangás és enyhe fokú pneumonia mellett közepes-nagy mennyiségben mutatható ki vírus a magzati myocardiumban. A sertés dermatitis és nephropathia szindrómájánál (PDNS) III-as típusú (immunkomplex-mediált) túlérzékenységi reakció következtében kialakuló, szisztémás, elhalásos vasculitis, valamint glomerulonephritis miatt a bőr alatti kötőszövetben és a vesekéregben vérzéseket látunk, továbbá a nyirokszervekben enyhe-mérsékelt fokú lymphoid depletio jelentkezhethet, bennük nem vagy alig kimutatható vírussal (Segalés, 2012; Zimmerman et al., 2019).

5.3.6. Diagnosztika

A PCV-2-SD diagnózisához 3 feltételnek kell teljesülnie: (i) jelen kell lenniük a klinikai tüneteknek és (ii) a jellegzetes kórszövettani elváltozásoknak, valamint (iii) ezen elváltozásokon belül a kórokozó relatív mennyiségi meghatározása szükséges IHC-val vagy ISH-val történő *in situ* megjelenítést követően (6. ábra). A vírus több sejttípus mellett leginkább a monocyta/macrophag vonal sejteiben, pontosabban a nyirokszövetek gyulladásos histiocytáinak és óriássejtjeinek citoplazmájában látható (Segalés, 2012; Zimmerman et al., 2019; Segalés és Sibila 2022).

A PCV-2 ubikviter jellege miatt PCR és szerológiai eljárások sem alkalmasak egyedi PCV-2-SD diagnosztikára. A PCV-2-antigén és/vagy -nukleinsav mennyisége és a PCV-2-SD kórszövettani elváltozásainak súlyossága között szoros összefüggést figyeltek meg (Zimmerman et al., 2019; Segalés és Sibila 2022). Számos tanulmány valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) küszöbértékeket javasolt a szérumban a PCV-2-SD kórhatározására, de ezen eljárások eredményei jelentős mértékben függenek a vizsgálatot végző laboratóriumtól és az alkalmazott technikától (Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004; Harding et al., 2008; Harding et al., 2009; Segalés és Sibila 2022). A qPCR-vizsgálatok során kapott érzékenységi és/vagy specificitási értékek nem tudják helyettesíteni a kórszövettani vizsgálatot és a PCV-2 szövetekben való kimutatását (Segalés, 2012; Segalés és Sibila, 2022).



6. ábra: PCV-2-SD okozta jellegzetes kórszövettani elváltozások sertés nyirokcsomóban

Lymphoid depletio és granulomatosus beszűrődés intracitoplazmatikus botryoid víruszárványokkal (fekete nyilak). H&E festés. A jobb oldalon hasonló szövet PCV-2 IHC eljárás után látható sötétbarnán festődő nagy mennyiségű vírus jelenlétével (20×; bar = 50 µm)

(Dr. Joaquim Segalés magángyűjteményéből származó minták)

5. Anyagok és Módszerek

6.1. Állat-etikai jóváhagyás

A teljes légúti PRRSV-fertőzőes kísérletet a hatályos magyar állatjóléti előírások szerint végeztük, a BA02/2000-43/2017 etikai engedéllyel.

Az eredeti szaporodásbiológiai PRRSV-fertőzőes állatkísérletet az Intézményi Etikai és Állatjóléti Bizottság (Bécsi Állatorvostudományi Egyetem, Ausztria), továbbá az osztrák nemzeti hatóság felülvizsgálta és jóváhagyta az állatkísérletekről szóló törvény, Tierversuchsgesetz 2012-TVG 2012 26. §§ szerint (csatlakozási szám: GZ 68.205/0142-WF/V/3b/2016).

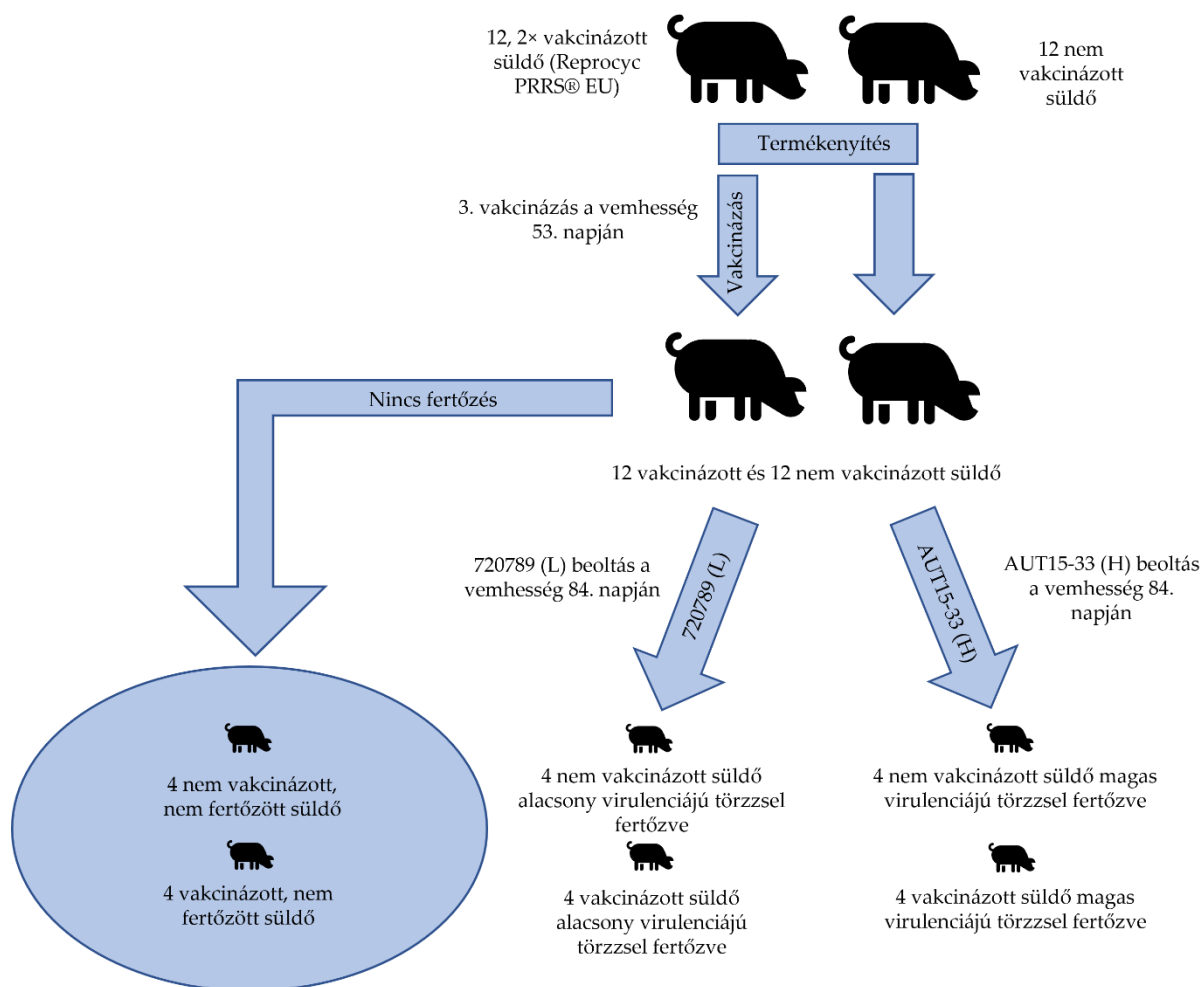
6.2. Légúti PRRSV-fertőzőes kísérlet és mintavétel

A 25 db hét hetes sertésből 20-at intranasalisan beoltottak 2,5 ml sejtenyészettel felülúszójával, amely 10^6 TCID₅₀ vírust tartalmazott az erősen patogén osztrák AUT15-33 PRRSV-1-izolátumból, más néven ACRO-törzsből (Sinn et al., 2016). Öt sertés negatív kontrollként szolgált. A kísérletben használt összes állat humánus elaltatásra került a 14. fertőzést követő napon (days post infection, DPI) 9 hetes korukban. A boncolás során a kiválasztott szervekből, beleértve minden tüdőlebenyt, mintavétel történt, és azok 10%-os semleges pufferolt formaldehid-oldatban (neutral buffered formalin, NBF) fixálódtak későbbi

kórszövettani vizsgálathoz és RNAscope *in situ* hibridizációhoz. Párhuzamosan tüdőlebenymintákat küldtek a Bécsi Állatorvosi Egyetemre a PRRSV RNS-ének mennyiségi meghatározására.

6.3. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses kísérlet és mintaválasztás

Az általunk használt vizsgálati anyag méhnyálkahártya-szövetek formalinnal fixált és paraffinba ágyazott (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) blokkjaiból állt, amelyeket egy korábbi fertőzéses kísérletből nyertünk. Ebben a vizsgálatban a jelölt nem vett részt. Ennek során 24 vemhes kocasüldőt fertőztek alacsony virulenciájú (720789, Stas et al., 2022), ill. egy erősen patogén (AUT15-33) PRRSV-1-törzzsel, amely megegyezett a malacokban légzőszervi fertőzésre használt törzzsel, és amelyet több korábbi kísérleti fertőzéses vizsgálatban is használtak (Kreutzmann et al., 2021; Duerlinger et al., 2022). A részletes kísérleti elrendezést Kreutzmann és mtsai publikálták (Kreutzmann et al., 2022). Összegezve: az állatok fele ($n = 12$) kétszer kapott attenuált élővírusos vakcinát (Reprocyc PRRS® EU, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Németország) a termékenyítés előtt, majd a vemhesség 53. napján a gyártó protokollja szerint. A kocasüldők véletlenszerűen hat csoportba kerültek: nem vakcinázottak és nem fertőzöttek, vakcinázottak és nem fertőzöttek, nem vakcinázottak és alacsony virulenciájú törzzsel fertőzöttek, vakcinázottak és alacsony virulenciájú törzzsel fertőzöttek, nem vakcinázottak és magas virulenciájú törzzsel fertőzöttek, valamint vakcinázottak és a magas virulenciájú törzzsel fertőzöttek (4 koca/csoport). A csoportok neve no_vacc/no_chall, vacc/no_chall, no_vacc/chall_L, vacc/chall_L, no_vacc/chall_H és vacc/chall_H volt. Az eredeti kísérleti elrendezés arra törekedett, hogy elkerülje a keresztfertőzést és az eredmények kiértékelését befolyásoló, torzító tényezőket. Négy vakcinázott és négy nem vakcinázott kocasüldőt 3×10^5 TCID₅₀ AUT15-33 vírussal (H) vagy 720789 vírussal (L) oltottak be, összesen 4 ml térfogatban. 2 ml-t intramuscularisan, 2 × 1 ml-t intranasalisan kaptak a vemhesség 84. napján. Az egyszerűsített kísérleti elrendezés a 7. ábrán látható.



7. ábra. ábra: A kísérleti csoportok egyszerűsített kialakítása és felosztása a szaporodásbiológiai PRRSV modellünkben

A negatív kontrollcsoport Dulbecco MEM tápfolyadékkal oltották be. 21 ± 2 DPI-nél az állatok humánus módon elaltatásra kerültek. Iv. ketamint (Narketan® 100 mg/ml, Vetoquinol Österreich GmbH, Bécs, Ausztria; 10 mg/testtömeg-kg) és azaperont (Stresnil® 40 mg/ml, Elanco GmbH, Cuxhaven, Németország; 1,5 mg/testtömeg-kg) kaptak a T61® (embutramid, mebezónium-jodid és tetrakain-hidroklorid; Intervet GesmbH, Bécs, Ausztria; 1 ml/10 kg testtömeg) intracardialis injekciója előtt. Ladinig és mtsai protokollja alapján minden magzat egyedi elbírálásra és boncolásra került (Ladinig et al., 2014). Vizsgálatunkhoz a boncolás során gyűjtött méhnyálkahártya mintákat használtuk fel melyek az egyes magzatokhoz tartozó placentációs területekből származtak.

Kiválasztottunk minden H&E-festett méhnyálkahártya metszetet, amelynek manuálisan meghatározott endometritis pontszáma legalább 1 ($n = 131$) volt. 50 tárgylemez származott nem vakcinázott és alacsony virulenciájú törzzsel (no_vacc/chall_L) fertőzött kocasüldőkből,

45 tárgylemez nem vakcinázott, erősen patogén törzzsel fertőzöttekből (no_vacc/chall_H), 21 tárgylemez erősen patogén törzzsel (vacc/chall_H) fertőzött nem vakcinázott koca-süldőkből, 15 pedig alacsony virulenciájú törzzsel fertőzött, vakcinázott esetekből (vacc/chall_L). A manuális pontozással végzett statisztikai számításokhoz további 10 metszetet használtunk, amelyek az endometritisre és vasculitisre is 0 pontszámot kaptak. Ezek a metszetek nem fertőzött és fertőzött koca-süldőkből egyaránt származtak, de gyulladásos elváltozás bennük nem volt észlelhető.

6.4. PCV-2-SD-esetek

Összesen 53 sertés 54 nyirokcsomómintáját értékeltük ki, mindegyikük az Universitat Autònoma de Barcelona (Spanyolország) archivált gyűjteményéből származott. A formalinnal fixált és paraffinba ágyazott szövetblokkok általában egynél több nyirokcsomót és más, vizsgálatunkban nem értékelt szervrészletet tartalmaztak. A vizsgálatunk előtt elvégzett PCV-2 IHC és egyéb diagnosztikai vizsgálatok eredményeit, az állatok életkorát, valamint a klinikai anamnézist és a nyirokcsomók kórszövettani elváltozásait az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Az állatok életkora, a klinikai anamnézis, a szövettani elváltozások, az IHC eredmények és a PCV-2-SD esetek egyéb vizsgálati leletei. Ezek az adatok saját tanulmányunk előtt Spanyolországban kerültek összegyűjtésre

Eset	PCV-2 IHC	Kor (hetek vagy időszak)	Kórtörténet	Szövettan	Egyéb
Eset 1	++	Battéria/Hízlalda	-	Mérsékelt lymphoid depletio és súlyos histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: P
Eset 2	++	Battéria/Hízlalda	-	Enyhe lymphoid depletio	PRRSV IHC: N
Eset 3	+++	18	Növekedésben visszamaradás	Lymphoid depletio, mérsékelt histiocytás infiltráció és centrollicularis nekrosis	PRRSV IHC: N
Eset 4	+++	15	-	Súlyos lymphoid depletio, mérsékelt histiocytás infiltráció és intracitoplazmatikus zárványok	PRRSV IHC: N
Eset 5	+++	Battéria/Hízlalda	-	Elhalásos lymphadenitis	PRRSV IHC: N
Eset 6	+++	Battéria/Hízlalda	Növekedésben visszamaradás	Granulomatosis-elhalásos lymphadenitis, lymphoid depletio és intracitoplazmatikus zárványok	PRRSV IHC: P
Eset 7	Negatív	Battéria/Hízlalda	-	-	PRRSV IHC: N
Eset 8	++	12	-	Enyhe lymphoid depletio	PRRSV IHC: P

Eset 9	Negatív	6–7	-	Enyhe centrofollicularis lymphoid depletio	n/a
Eset 10	Negatív	Battéria/Hízlalda	Növekedésben visszamaradás	-	PRRSV IHC: P, SIV IHC: N
Eset 11	Negatív	Battéria/Hízlalda	-	-	n/a
Eset 12	Negatív	Battéria/Hízlalda	Növekedésben visszamaradás	-	PRRSV és SIV IHC: N
Eset 13	Negatív	12	Elsorvadás szindróma	-	PRRSV IHC: N
Eset 14	+++	18	Növekedésben visszamaradás	Lymphoid depletio és mérsékelt histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: N
Eset 15	+	6	Elsorvadás szindróma	Enyhe lymphoid depletio	PRRSV IHC: P
Eset 16	+++	18	Növekedésben visszamaradás	Lymphoid depletio és mérsékelt histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: N
Eset 17	+	4	Anorexia, cachexia, bőrelváltozások, láz	Enyhe lymphoid depletio	-
Eset 18	Negatív	Battéria/Hízlalda	Elsorvadás szindróma	-	PRRSV és SIV IHC: N
Eset 19	+	4	-	Enyhe lymphoid depletio és enyhe histiocytás infiltráció	PRRSV és SIV IHC: N
Eset 20	Negatív	4	-	Reaktív hyperplasia	PRRSV és SIV IHC: N
Eset 21	Negatív	6–7	-	-	-
Eset 22	Negatív	Battéria/Hízlalda	-	Enyhe centrofollicularis lymphoid depletio	-
Eset 23	+	14	-	Mérsékelt granulomatosus-elhalásos lymphadenitis	-
Eset 24	Negatív	Battéria/Hízlalda	Növekedésben visszamaradás	-	PRRSV és SIV RT-PCR: N
Eset 25	Negatív	Battéria/Hízlalda	Növekedésben visszamaradás, fekélyek, a farm PRRS negatív	Enyhe centrofollicularis lymphoid depletio	-
Eset 26	Negatív	Battéria/Hízlalda	Növekedésben visszamaradás	-	PRRSV és SIV RT-PCR: N
Eset 27	Negatív	14	Cachexia, hasmenés, dyspnoe, 90-100% mortalitás	Enyhe centrofollicularis lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: N
Eset 28	++	Battéria/Hízlalda	-	Mérsékelt lymphoid depletio, granulomatosus lymphadenitis és intracitoplazmatikus zárványok	PRRSV IHC: P, SIV IHC: N

Eset 29	+	Battéria/Hízallda	-	Enyhe lymphoid depletio	-
Eset 30	+	Battéria/Hízallda	-	Enyhe lymphoid depletio	PRRSV IHC: N
Eset 31	+	Battéria/Hízallda	Bronchointerstitialis pneumonia, gyomorfekélyek	Mérsékelt lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	PRRSV és SIV IHC: N
Eset 32	++	Battéria/Hízallda	Elsorvadás szindróma	Lymphoid depletio, histiocytás infiltráció és multifokális elhalásos lymphadenitis	PRRSV IHC: N
Eset 33	+	14	-	Mérsékelt lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: N
Eset 34	+	7	-	Enyhe lymphoid depletio és fibrinoid depletio	PRRSV IHC: N
Eset 35	+++	11	Elsorvadás szindróma	Súlyos lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	-
Eset 36	+	10	-	Enyhe centrofollicularis lymphoid depletio	-
Eset 37	++	42	-	Mérsékelt diffúz lymphoid depletio és enyhe histiocytás infiltráció	-
Eset 38	+	10	-	Mérsékelt diffúz lymphoid depletio és enyhe histiocytás infiltráció	-
Eset 39	+	15	-	Enyhe-mérsékelt lymphoid depletio	PRRSV IHC: N
Eset 40	+++	6–7	-	Mérsékelt lymphoid depletio és enyhe histiocytás infiltráció	-
Eset 41	+++	Battéria/Hízallda	-	Súlyos lymphoid depletio, histiocytás infiltráció, centrofollicularis nekrosis és intracitoplazmatikus zárványok	-
Eset 42	++	12	-	Mérsékelt lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	-
Eset 43	+	Battéria/Hízallda	Növekedésben visszamaradás	Mérsékelt lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	PRRSV és SIV RT-PCR: N
Eset 44	++	14	-	Mérsékelt lymphoid depletio és mérsékelt histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: N
Eset 45	++	Battéria/Hízallda	-	Mérsékelt lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: P
Eset 46	+++	15	-	Súlyos lymphoid depletio és mérsékelt histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: N

Eset 47	+++	11	Elsorvadás szindróma	Mérsékelt lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	-
Eset 48	+++	Battéria/Hízlalda	-	Mérsékelt lymphoid depletio és enyhe histiocytás infiltráció	-
Eset 49	+++	4	-	Mérsékelt lymphoid depletio, mérsékelt histiocytás infiltráció és intracitoplazmatikus zárványok	PRRSV és SIV IHC: N
Eset 50	++	12	-	Mérsékelt lymphoid depletio és mérsékelt histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: P
Eset 51	++	-	Választás óta légúti tünetek	Mérsékelt lymphoid depletio és histiocytás infiltráció	-
Eset 52	+++	Battéria/Hízlalda	-	Multifokális elhalásos lymphadenitis	-
Eset 53	++	12	-	Mérsékelt lymphoid depletio és mérsékelt histiocytás infiltráció	PRRSV IHC: P

N = negatív, P = pozitív, SIV = sertés influenza vírus

6.5. Kórszövettani mintafeldolgozás és rutin festés

A szervekből vett, kórszövettani vizsgálatra szánt szervmintákat 24 óráig szobahőmérsékleten, 10% NBF-oldatban rögzítettük, ezután kivágtuk, majd etanol és xilol hígítási sorozattal automatikus szövETFeldolgozóban dehidratáltuk. A dehidratált szövetmintákat paraffinba ágyasztuk, és 4 µm vékony metszeteket vágunk belőlük, utána Superfrost+ adhézíós tárgylemezekre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) rögzítettük. A festetlen metszeteket deparaffináltuk és xilolban, illetve alkoholban rehidratáltuk. A rutin H&E festést egy automata festőműszer végezte.

6.6. Manuális pontozás

6.6.1. Légúti PRRSV-fertőzőes modell

A légúti elváltozások súlyosságát és eloszlását a korábbi vizsgálataink során kidolgozott módszer szerint egy vizsgáló bírálta el (Balka et al., 2013). Az értékelt elváltozások a következők voltak: (1) pneumocytá-hypertrophia és -hyperplasia, (2) septalis mononuclearis infiltráció, (3) intraalveolaris nekrotikus törmelék, (4) intraalveolarisan gyulladásos sejtek felhalmozódása és (5) perivascularisan gyulladásos sejtek felhalmozódása. A léziókat mind a hét tüdőlebenyben értékeltük súlyosság (0–3) és eloszlás (0–3) alapján, majd ezeket összeadtuk, hogy megkapjuk az egyes lebenyekre és a teljes tüdőre vonatkozó pontszámot (a maximális pontszám 30 egy lebenyre, és 210 az egész tüdőre).

6.6.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell

A méhnyálkahártya-gyulladását Novakovic és mtsainak módszere szerint a jelölt és egy másik vizsgáló pontozta, akik nem ismerték az állatok csoportjait, az endometritis (0–4) és a vasculitis (0–3) súlyosságára összpontosítva (Novakovic et al., 2016a). Endometritis esetén a módszer 200×-os nagyítással határozza meg a gyulladásos sejtekkel beszűrt terület százalékos arányát és az elváltozások eloszlását. A 0. fokozat esetén gyulladásos sejtek elszórtan voltak megfigyelhetők, az 1. fokozatban a gyulladásos sejtek a tárgylemez kevesebb, mint 10%-ában voltak jelen multifokálisan, a 2. fokozatban az endometrium 10–25%-án multifokális-összefolyó jelleggel, a 3. fokozatban az endometrium 25–50%-án, diffúzan, a 4. fokozatban pedig több, mint 50%-ban diffúzan voltak jelen gyulladásos sejtek. Vasculitis esetén három, 200×-os nagyítású látómezőt választottunk ki véletlenszerűen, majd bennük három véreret 400×-os nagyítással értékeltünk az érfal gyulladásos sejtes beszűrődése és/vagy degenerációs foka alapján. Az 1. fokozatban gyulladásos sejtek jelentek meg az érfalban, a 2. fokozatban a gyulladásos sejtek mellett az érfal elfajulása (vakuolizáció és simaizom-károsodás) vagy elhalása volt megfigyelhető, a 3. fokozatban pedig egyidejűleg voltak jelen a korábban említett elváltozások. Egyetlen vasculitis súlyossági pontszámot kaptunk a kilenc vizsgált ér pontszámainak átlagolásával.

6.6.3. PCV-2-SD-vizsgálat

A nyirokcsomókban lévő sejtek PCV-2-fertőzöttségének mértékét egy spanyol kutatócsoport (Rosell et al., 1999) által használt módszertől kissé eltérő immunhisztokémiai eljárásunk alkalmazása után bíráltuk el. Erre a reakcióhoz szükséges egyes anyagok beszerzési nehézségei miatt volt szükség, azonban saját eljárásunk tapasztalataink alapján megfelelően alkalmazható. A jelölt antigének mennyiségét szemikvantitatív módon (–/negatív, +/enyhe, ++/mérsékelt, +++/súlyos) két vizsgáló pontozta egymástól függetlenül az előzetes eredmények ismerete nélkül, Rosell és mtsainak (1999) módszere szerint. Ha az antigén ritkán, fokálisan vagy multifokálisan volt jelen a sejtek kis hányadában, mennyiségét + pontozással értékeltük. A ++ pontszám esetén a pozitív jel nagyobb számú sejtben vagy sejtcsoportban volt megfigyelhető, nagyobb összefüggő antigénmentes területekkel. A +++ pontszámnál a nyirokcsomószövet jelentős részében multifokális vagy multifokális-összefolyó pozitivitás volt megfigyelhető.

6.7. *In situ* hibridizáció

A vírusspecifikus RNAscope próbát (katalógusszám: 519 571) az AUT15-33-törzs szekvenciája alapján terveztük (nyilvántartási szám: MT000052.1), amely a vírusgenom ORF7 régióját célozta meg. Pozitív kontrollként a mindenütt jelen lévő, széles körben expresszáldó housekeeping gén peptidil-prolil-izomeráz-B (Sus scrofa-PPIB, kat. sz. 428591) mRNS-ét

céloztuk, míg negatív kontrollként a bakteriális dihidropikolinát-reduktáz (DapB, kat. sz. 310043.) mRNS-ét célzó próbákat használtuk. Az ISH-eljárást az állatok tüdejének bal cranialis lebenyének pars caudalis területéből (bal középső lebeny) végeztük. Ezt a lebenyt azért választottuk ki, hogy kiküszöböljük a különböző elváltozások eloszlásából adódó lehetséges zavaró hatásokat (az elülső és középső lebenyek mindig súlyosabb elváltozásokat mutattak, mint a hátulsó lebenyek). A hibridizációt a gyártó protokollja szerint végeztük.

Az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása után a lemezeket az előzőleg elkészített 1× Target Retrieval oldatban 15 percig forraltuk, ezt követően kétszer mostuk desztillált vízzel, majd 96%-os etanolban. A mintákat szobahőmérsékleten, levegőn szárítottuk. RNAscope® Protease Plus oldatot adtunk hozzájuk, és a lemezeket hibridizációs kamrában (HybEZ™ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) 30 percig 40 °C-on inkubáltuk. A következő lépésben minden mintához 200 µl megfelelő hibridizációs próbát adtunk. A mintákat hibridizációs termosztátban (HybEZ™ Oven) 2 órán át 40 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után a tárgylemezeket kétszer mostuk az előzőleg elkészített 1× mosópuffer oldatban 2 percig, szobahőmérsékleten. A felesleges folyadék leitatása után az amplifikációs reagenseket (Amp-1–6) egymás után adtuk a mintákhoz. Ezt követően a metszeteket körülbelül 120 µl Fast RED-B és Fast RED-A oldatok 1:60 arányú keverékével kezeltük, és 10 percig inkubáltuk a hibridizációs kamrában szobahőmérsékleten. Desztillált vízzel történő mosás után a tárgylemezeket Gill No. 2 hematoxin oldatba (Merck, Darmstadt, Németország) helyeztük 2 percre. Ezt követte kétszeri desztillált vizes mosás, a minták 0,02%-os ammóniaoldatba helyezése 10 másodpercre, majd ismételt desztillált vizes mosás, végül 60 °C-on 15-25 perces szárítás. Száradás után a tárgylemezeket xilolba merítettük, EcoMount oldatot cseppentettünk rájuk, majd fedőlemezekkel lefedtük.

6.8. Immunhisztokémia

6.8.1. CD163 IHC

A 131 gyulladásos elváltozást mutató, méhből származó FFPE-blokk közül véletlenszerűen kiválasztottunk 35-öt a CD163 IHC-jelölésre. Nyúleredetű polyclonalis antitesteket (ab87099, Abcam, Cambridge, MA, USA) használtunk a CD163 glikoprotein elleni elsődleges antitestként. A metszeteket xilolban deparaffináltuk és etanolos hígítási sorozatban rehidratáltuk. A 15 perces endogénperoxid-gátlást (97 ml desztillált víz + 3 ml H₂O₂) foszfátpufferelt sóoldattal (phosphate buffered saline, PBS) végzett öblítés követte. Az antigénfeltárást citrát pufferben (pH 6,0) végeztük mikrohullámú sütőben (800 Watt-on 5 percig, majd 180 Watt-on 10 percig), majd a metszeteket PBS-sel átöblítettük. A lemezeket 2%-os sertésalbuminban (Albumin sertésszérumból, Sigma Aldrich) 1 órán át nedves kamrában inkubáltuk, majd öblítés nélkül hozzáadtuk az elsődleges antitestet és 1:500

hígításban nedves kamrában 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A tárgylemezeket PBS-ben öblítettük a másodlagos antitest 20 perces inkubálása előtt és után (Dako, EnVision Flex HRP, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A festést DAB Chromogen-nel (Dako Envision Flex DAB + Chromogen 1 csepp + 1 ml Envision Flex szubsztrát puffer) 3–4 percig végeztük, majd a metszeteket PBS-ben öblítettük. A tárgylemezeket hematoxilinnel festettük GILL II szerint 30 másodpercig, a kékítést PBS-ben végeztük. Etanolban és xilolban történő dehidratálás után a tárgylemezeket fedőlemezekkel lefedtük. A negatív kontrollmintákat primer antitest hozzáadása nélkül festettük meg, míg a pozitív kontroll az egyik magzat nyirokcsomója volt.

6.8.2. PCV-2 IHC

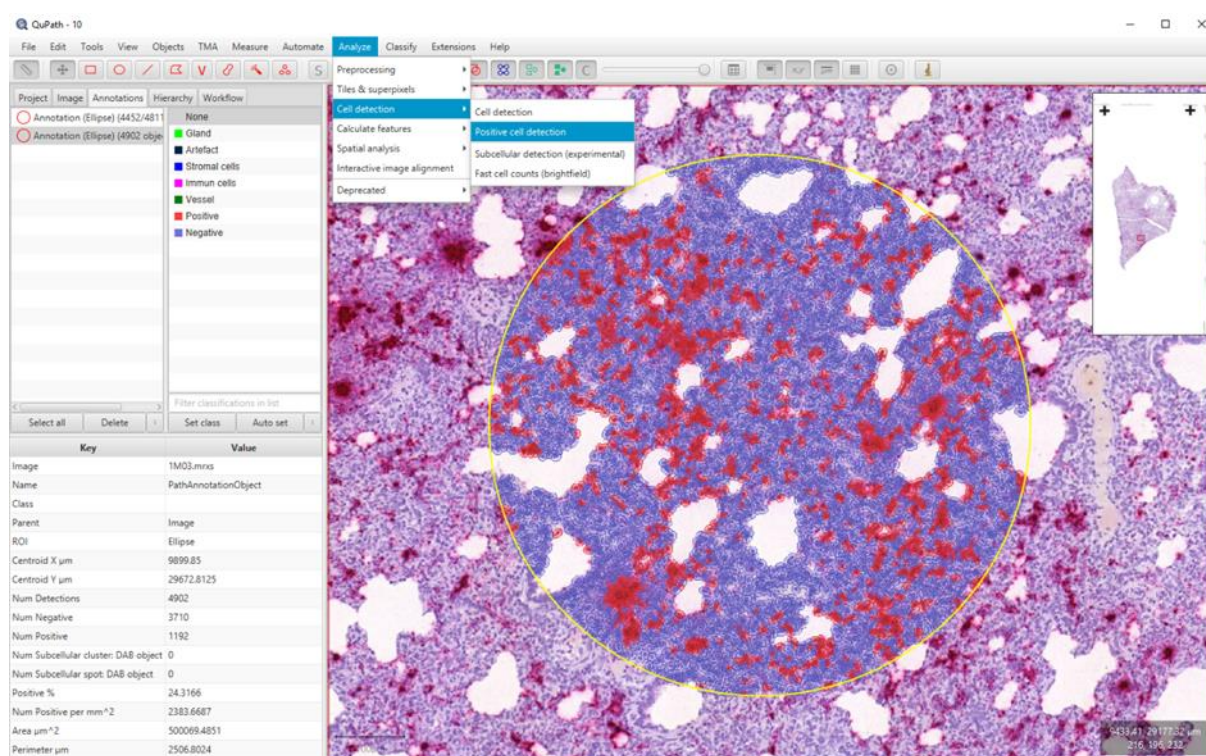
A retrospektíven gyűjtött FFPE-blokkokon a vizsgálat részeként új IHC festést végeztünk a VP2 kapszidfehérjére. A metszeteket xilolban deparaffináltuk, és etanolsorozatban rehidratáltuk. PBS-sel végzett öblítést 0,1%-os pronáz enzimes kezelés követte 10 percig (CustomBiotech, Roche, Basel, Svájc), majd egy újabb PBS-öblítés. A fehérjeblokkolást 5%-os szarvasmarha-szérumalbuminban (bovine serum albumin, BSA) (VWR, Avantor, Radnor, PA, USA) végeztük 1 órán keresztül, majd öblítés nélkül hozzáadtuk az elsődleges antitestet (36A9 egér monoclonális antitest, Ingenasa, Madrid, Spanyolország) és inkubáltuk 1:500 hígításban és 4°C-on nedves kamrában egy éjszakán át. A tárgylemezeket PBS-ben öblítettük a másodlagos antitest 20 perces inkubálása előtt és után (Dako, EnVision Flex HRP, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A festést DAB Chromogennel (Dako Envision Flex DAB + Chromogen 1 csepp + 1 ml Envision Flex szubsztrát puffer) 3–4 percig végeztük, majd a metszeteket PBS-ben öblítettük. A tárgylemezeket hematoxilinnel festettük GILL II szerint 30 másodpercig, a kékítést PBS-ben végeztük. Etanolban és xilolban történő dehidratálást követően a tárgylemezeket BioMount DPX médiummal (BioGnost, Zagreb, Horvátország) és fedőlemezekkel fedtük le. A negatív szöveti kontroll mintákat primer antitest hozzáadása nélkül festettük meg, míg a pozitív kontroll egy ismert fertőzött, PCR-pozitív nyirokcsomóminta volt saját gyűjteményünkből.

6.9. Digitalizálás és digitális képelemzés

25 RNAscope módszerrel kezelt sertés tüdőmetszetet, 54 PCV-2 IHC módszerrel festett nyirokcsomót is tartalmazó tárgylemezt, továbbá 141 H&E festett és 35 CD163 IHC eljárással jelölt méhnyálkahártya-metszetet szkenneltünk be Panoramic Midi szövetszkennerral 20×-os objektívet használva (3D Histech, Budapest, Magyarország).

6.9.1. Légúti PRRSV fertőzéses modell

A tüdő WSI-ket QuPath (0.1.2-es verzió) szoftverrel (qupath.github.io) elemeztük (Bankhead et al., 2017). A PRRSV-pozitív sejtek arányát a metszetekre reprezentatívnak tekintett egységekben határoztuk meg. Minden tárgylemezen $2,37 \text{ mm}^2$ nagyságú annotációkat (kijelöléseket) készítettünk, ami megfelel a hagyományos fénymikroszkóp 10 db összefüggő $400\times$ -os nagyítású látóterének (Donovan et al., 2021). Az „analyze” majd „cell detection” fül „positive cell detection” parancsát használtuk (8. ábra). Ezt követően lekértük az eredményeket a „show detection measurements” paranccsal a „measure” fülön belül. Az összes észlelt sejt mennyisége mellett a pozitív sejtek számát és százalékos arányát is megadta a szoftver.



8. ábra: A fertőzött sejtek digitális mennyiségi meghatározása QuPath szoftverrel.

Az RNAscope ISH-val jelölt, PRRSV-1 fertőzött sejtek a QuPath szoftver positive cell detection parancsával számszerűsíthetők

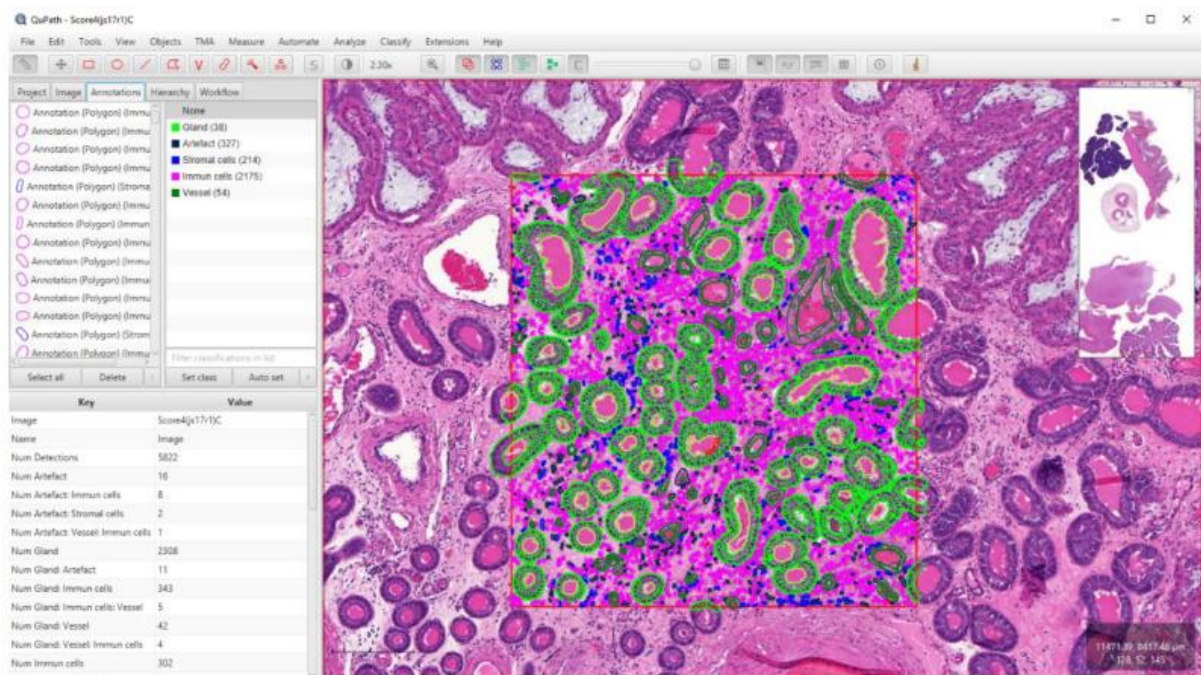
6.9.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell

Az endometrium WSI-ket szintén a QuPath (0.2.3.-as verzió) szoftverrel elemeztük tovább (Bankhead et al., 2017). A hematoxilin és DAB-festési becslések finomításához minden tárgylemezen az „estimate stain vectors” parancsot alkalmaztuk. Ez esetben is $2,37 \text{ mm}^2$ -es annotációkat készítettünk a H&E-festett tárgylemezek endometriumának lamina propriájában (Donovan et al., 2021). A manuális módszerrel ellentétben a vasculitist nem értékeltük külön, gyulladásos sejtjeit a kiválasztott propriaterülettel együtt számszerűsítettük. Az egészséges

anyai méhnyálkahártya sejtszegény, szinte sejtmentes propriarétege még rutinszerű, H&E-festett tárgylemezek esetén is nagymértékben segítette a sejtszám meghatározását. Az alapértelmezett „cell detection” parancsot választottuk az „analyze” fülön belül azzal a különbséggel, hogy a kért pixelméret 1 μm volt. Ezt követően felügyelt gépi tanulási módszert alkalmaztunk a „random trees classifier” módszerrel a „train object classifier” parancson és „classify, object classification” fülön belül. Összesen 15 különböző osztályozót (classifier-t) képeztünk ki, mindegyiket 1 mm^2 -es, különböző színárnyalatú és minőségű tárgylemez-területeken. Erre a változatos metszetminőség és festődés miatt volt szükség. Az összes mérési paramétert (41 morfológiai jellemzőt) minden sejtre kiszámítottuk, és bemenetként használtuk az osztályozáshoz. Mindegyikhez öt osztályt állítottunk be: „immune cells”, „stromal cells”, „vessels”, „glands” és „artefact” (9. ábra). Az „artefact” osztály használatára azért volt szükség, mert a sejtészlelési parancs több olyan nem celluláris struktúrát is azonosított, amelyek megzavarhatták volna a sejtek végső számszerűsítését, annak ellenére, hogy a nagyobb ilyen képleteket a kijelölésnél próbáltuk elkerülni.

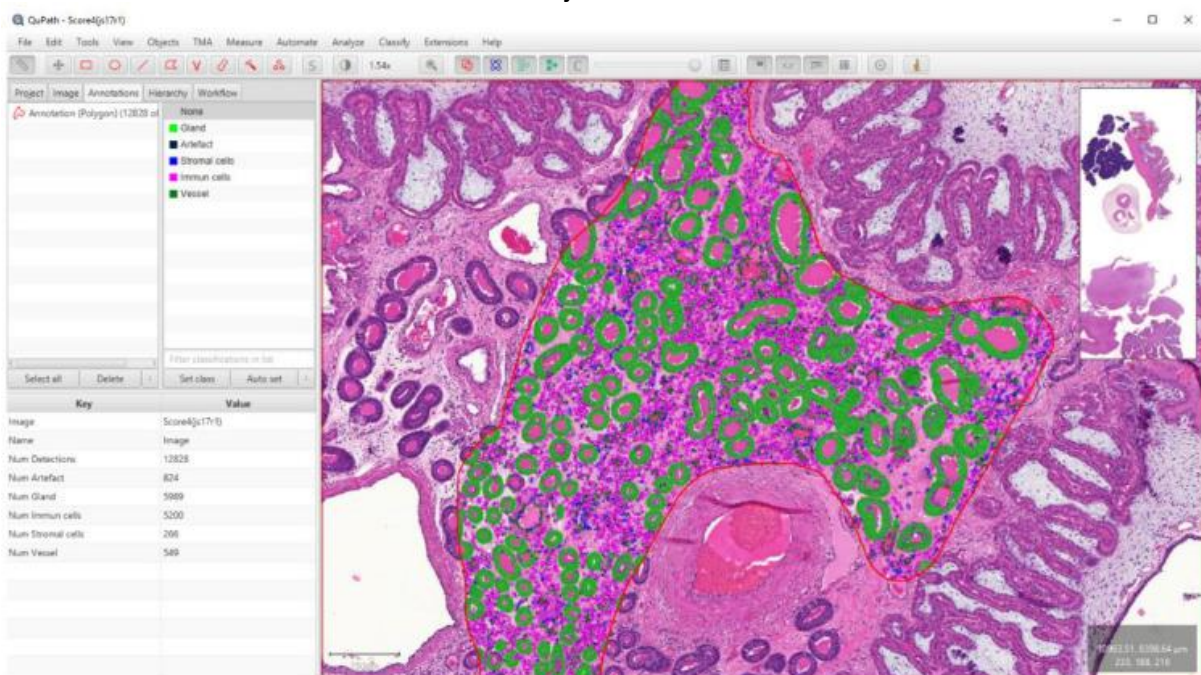
A CD163 IHC-vel jelölt tárgylemezek esetében a módszer azonos volt a „cell detection” parancsig. Ezt követően az „object classification” fülön belül hat „single measurement classifier”-t hoztunk létre. Élő előnézet mellett a következő mérési paramétereket használtuk: object filter: cells; channel filter: DAB; measurement: cell DAB OD std dev; threshold: 0,14, 0,16, 0,20, 0,22, 0,25 és 0,26; above threshold: positive; below threshold: negative.

Minden egyes WSI-nél kiértékeltek és összehasonlítottuk a különböző osztályozókat, és kiválasztották a legpontosabbat (10. és 11. ábra). A lementett, „show annotation measurements” paranccsal lekért adatokat ezután külön Excel munkafájlbba (.xlsx) exportáltuk.



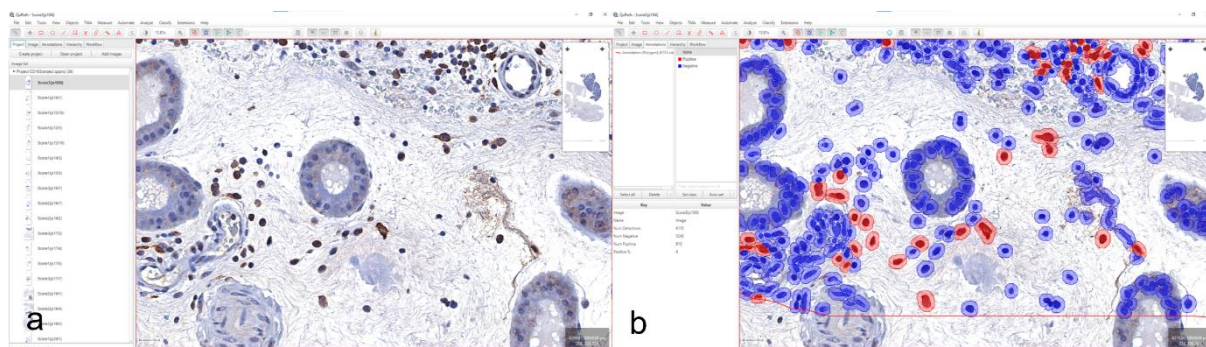
9. ábra: A gyulladásos sejtek számszerűsítése QuPath szoftverrel.

A random trees classifier osztályozók betanításához manuálisan kialakított osztályokba soroltuk az észlelt sejteket 1 mm²-es területeken



10. ábra: A gyulladásos sejtek számszerűsítése QuPath szoftverrel.

A „cell detection” parancs 2,37 mm²-es területen történő használata után az egyik korábban létrehozott „random trees classifier” osztályozót alkalmaztuk. Ha az osztályozási eredmények nem voltak kielégítőek, az adott WSI alapján újat képeztünk ki

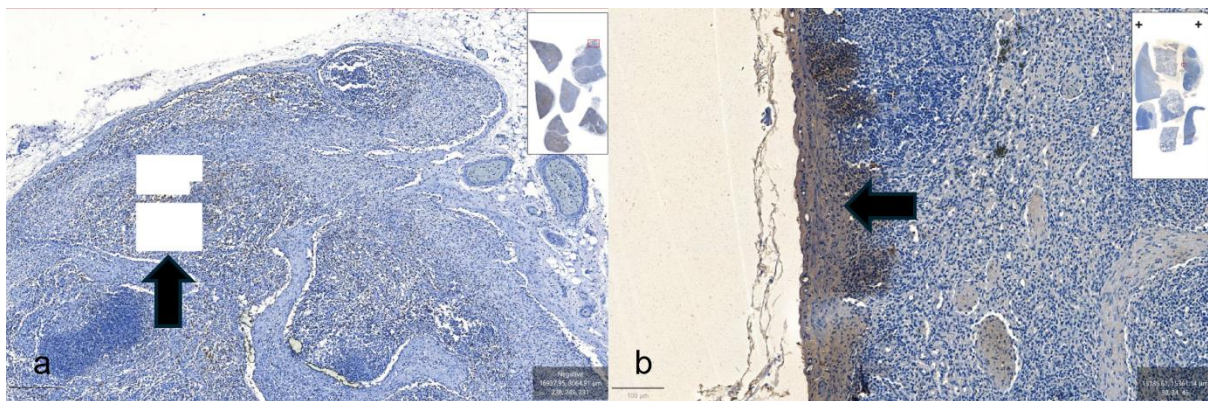


11. ábra: CD163+ macrophagok számszerűsítése QuPath szoftverrel.

A CD163 IHC esetében a „single measurement classifier”-t alkalmaztuk, amelyet a legmegbízhatóbb módszernek értékeltünk a pozitív macrophagok azonosítására. a) DAB-jelölt sötétbarna macrophagok. b) A digitális osztályozás után a pozitív sejtek élénkpirosak

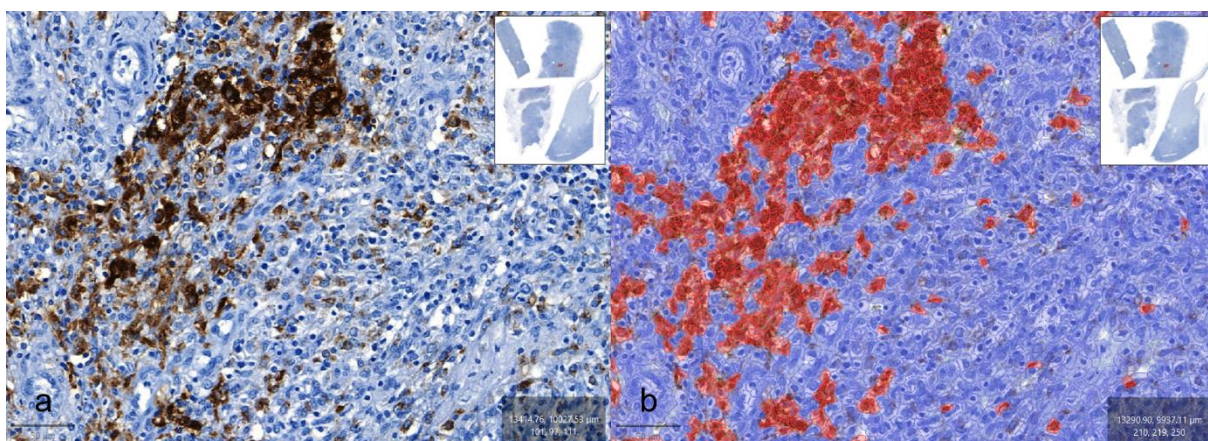
6.9.3. PCV-2-SD

Egy eset kivételével, amely két paraffinblokkot tartalmazott, esetenként egy metszetet, összesen 54 immunhisztokémiailag jelölt WSI-t vizsgáltunk. Ezeket a SlideMaster szoftver segítségével (3D Histech) WS DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) formátumba konvertáltuk és QuPath (0.4.4-es verzió) szoftverrel (qupath.github.io) elemeztük ki. A PCV-2-pozitív és -negatív (fertőzött és nem fertőzött) sejtek mennyiségét többnyire teljes nyirokcsomó-területeken határoztuk meg. A két nyirokcsomót tartalmazó metszet egyik nyirokcsomóját kizártuk az elemzésből nem specifikus festődés miatt, egy másik eset egy kis részét pedig egy nagyobb műtermék miatt (12. ábra). A nyirokcsomókat a „wand” és a „brush” eszközökkel jelöltük ki minden WSI-n, majd az „anayze, cell detection” fül „positive cell detection” parancsát alkalmaztuk (13. ábra). Az összes azonosított sejt (fertőzött/pozitív és nem fertőzött/negatív) mennyisége mellett a pozitív sejtek százalékos arányát is megadta a szoftver. A kiválasztott egyes nyirokcsomó-területek eredményeinek összegzéséhez az „annotations, objects” fülön belül a „merge selected” parancsot kellett alkalmazni, amikor szükséges volt. Ezeket az eredményeket külön Excel (.xlsx) munkalapra exportáltuk.



12. ábra: Módszertani hibák.

- a) A függőleges nyíl az elemzett képfájlban olyan hiányokat mutat, amelyeket kis méretük miatt nem tartottunk lényegesnek. b) A vízszintes nyíl nem specifikus IHC festődést mutat. Ez az eset két nyirokcsomót tartalmazott, ez a darab nem került digitális képelemzésre



13. ábra: QuPath digitális képelemzés PCV-2-SD-vel érintett sertés nyirokcsomón.

- a) A PCV-2-IHC-vel jelölt fertőzött sejtek sötétbarna, intenzív, citoplazmatikus festődést mutatnak.
b) A fertőzött sejteket pirossal jelöli és kvantifikálja a szoftver

6.10. qPCR

6.10.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell

A tüdőszövetmintákat (50 mg) TissueLyser II készülékben (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) 3 percig homogenizáltuk. A kupakkal lezárt csöveket alaposan vortexeltük és centrifugáltuk a fázis-szétválasztáshoz. Ezután a felülúszóból 200 µl-t gyűjtöttünk össze, amelyből a vírusnukleinsav-kivonást QIAcube nukleinsavizoláló automatával, QIAmp cador Pathogen Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével végeztük el, a gyártó protokollja szerint. Az eluált RNS-ből 2 µl-t használtunk az ORF7-specifikus RT-qPCR-hez a Luna Onestep RT-qPCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) segítségével (forward: TCAACTGTGCCAGTTGCTGG, reverse: TGRGGCTTCTCAGGCTTTTC és 5'Fam -

CCCAGCGYCRRRCARCCTAG'G mint Tambe-3). A primer szekvenciákat Egli és mtsainak közleményéből adaptáltuk, hogy illeszkedjen a PRRSV-1 AUT15-33 törzs szekvenciájához (Egli et al., 2001). A genomekvivalensek (GE) abszolút mennyiségi meghatározását a 4872 nt klónozott AUT15-33 cDNS sorozathígítású SP6 transzkriptumából számítottuk ki. Az Acll-vel linearizált pLS69 plazmidból származó SP6 polimeráz segítségével állítottuk elő az átiratokat. A templát DNS-t DNáz I-gyel (NEB) kezeltük, és az RNS-t RNeasy Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk. Az RNS koncentrációt Quantus fluorométerrel és RNS-specifikus fluoreszcens festékkel (Promega GmbH, Walldorf, Németország) határoztuk meg. A genom molekulák számát a <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> által biztosított algoritmus segítségével számítottuk ki. Ennek a készítménynek a számított GE-jét folyadékcsepp-PCR-rel (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) tovább igazoltuk. A qPCR-t Applied Biosystem 7300 készülékkel (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) végeztük.

6.10.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell

A reprodukciós modell esetén a PRRSV genom kimutatására és mennyiségi meghatározására szolgáló RT-qPCR vizsgálatot magzati szérumból és csecsemőmirigyből, valamint endometrium és placenta szöveteken végezték Kreutzmann és mtsainak leírása szerint (Kreutzmann et al., 2022). Röviden, szövet- és szervmetszeteket (50 mg) homogenizálták 600 µl Qiazolban (Qiagen) egy TissueLyser II készülékben (Qiagen) 3 percig. Gyors centrifugálás után 300 µl kloroformot adtak hozzá, és az elegyet alaposan vortexelték. Ezt követően a csöveket 13 000 × g-vel centrifugálták 5 percig. A vízes fázis 200 µl-éből a vírusnukleinsav-kivonást a QIApathogen Mini Kit segítségével végezték el, QIAcube készülékben (Qiagen) a gyártó protokollja szerint. Az ORF7-specifikus RT-qPCR-t a Luna OneStep RT PCR Kit (New England Biolabs) segítségével végezték. A primer szekvenciákat Egli és mtsainak közleményéből adaptálták, hogy illeszkedjen a PRRSV-1 AUT15-33 és 720789 törzsek szekvenciájához (Plana et al., 1992; Egli et al., 2001). Nukleinsav-kivonási kontrollként a sertés β-aktin mRNS mennyiségét qPCR-rel határozták meg minden mintában Toussaint és mtsai szerint (Toussaint et al., 2007). A genomekvivalensek (GE) abszolút mennyiségét egy pGEM-T (Promega GmbH) plazmid (pLS69) klónozott AUT15-33 cDNS 13261-3'-végű SP6-transzkriptumainak sorozathígításából állapították meg (Plana et al., 1992). A RT-qPCR-t Applied Biosystem 7300 készülékben (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) végezték.

6.10.3. PCV-2-SD modell

Az FFPE-szövetmintákból az AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen) segítségével a gyártó utasításait követve kinyertük a DNS-t. A blokkokról eltávolítottuk a felső, oxidált réteget, majd blokkonként két darab 10 µm vastag részletet vágunk rotációs mikrotommal (Leica, Deer Park, TX, USA). Röviden: a részleteket steril gyűjtőcsövekbe helyeztük, és azonnal vortexeltük őket 1 ml xilolban 15 másodpercig, majd centrifugáltuk (2 perc, 12 000 rpm). Óvatosan pipettáztuk le a felülúszót az üledék megzavarása nélkül, majd hozzáadtunk 1 ml abszolút etanolt a maradék xilol eltávolítására. Vortexelés és ismételt centrifugálás után pipettával eltávolítottuk a felülúszót. A pelleteket tartalmazó gyűjtőcsöveket kinyitva, 37 °C-ra előmelegített termosztátba helyeztük és 10 percig inkubáltuk, vagy amíg az etanolos szag már nem volt érezhető. Ezután 150 µl proteináz K puffert és 10 µL proteináz K oldatot adtunk a mintákhoz. 15 másodperces vortexelés után 56 °C-on 15 percig inkubáltuk őket. A hatékony kicsapás fokozása érdekében a mintákat 3 percre jégre helyeztük, majd 15 percig 16 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. Ettől kezdve a teljes DNS-kivonási protokollt a gyártó utasításai szerint végeztük. Centrifugálás után óvatosan pipettáztuk le a felülúszót, áthelyeztük egy új steril gyűjtőcsőbe, és 60 percig 56 °C-on, majd 120 percig 90 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a DNS-tisztítást szilika-membrán alapú oszlopon (MinElute) végeztük. Az FFPE-mintákból kivont nukleinsavat mindig 40 µl elúciós pufferben (EB) (Qiagen, Hilden, Németország) szuszpendáltuk. Ezt követően a mintákat vagy azonnal qPCR elemzésnek vetettük alá, vagy –80 °C-on tároltuk a további vizsgálatokig.

A paraffin blokkokból kivont nukleinsavmintákban a PCV2 jelenlétének kimutatását kvantitatív real-time PCR (qPCR) módszerrel végeztük. A qPCR vizsgálatokat Q qPCR (Quantabio, Beverly, MA, USA) készüléken futtattuk, PerfeCTa MultiPlex qPCR SuperMix (Quantabio) használatával. A reakciókhoz ORF2-specifikus primereket (forward: 5'-GCAGGGCCAGAATTCAACC-3', reverse: 5'-GGCGGTGGACATGATGAGA -3') és a PCV2a, valamint a PCV2b és PCV2d genotípusok kimutatására alkalmas próbákat használtunk (PCV2a próba: FAM-5'-GGGGACCAACAAAATCTCTATACCTTT-3'-BHQ, PCV2b/d próba: HEX-5'-CTCAAACCCCCGCTCTGTGCCC-3'-BHQ) (Opriessnig et al., 2010). A reakciók során a hőmérsékleti profil a következő volt: egyszeri 50 °C -on tartás 2 percig, majd 95 °C -on tartás 3 percig, ezt követően 40 cikluson keresztül 95 °C -on tartás 15 másodpercig, majd 59 °C -on tartás 60 másodpercig. A 37-nél nagyobb Ct (Cycle threshold, küszöbérték) értékű mintákat negatívnak tekintettük. A PCV2-genom kópiaszámának mennyiségi meghatározását a PCV2 ORF2-t tartalmazó ismert koncentrációjú plazmidok hígítási sorozatával végeztük, amelyeket dr. Cságola Attila bocsátott rendelkezésünkre (Brunborg et al., 2004).

6.11. Statisztikai elemzések

6.11.1. Légúti PRRSV fertőzéses modell

Az RNAscope ISH által azonosított fertőzött sejtek aránya és (1) a qPCR-rel ugyanabban a tüdőlebenyben kimutatott PRRS vírusgenom kópiaszámának log₁₀ értéke, (2) ugyanazon tüdőlebeny szövettani súlyossági pontszáma és (3) a teljes tüdő szövettani súlyossági pontszáma közötti összefüggést logit linket tartalmazó béta regressziós modellekkel értékeltük. A számításokat az R (v4.0.3-as verzió) programmal (R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) végeztük, a modellillesztéshez a betareg csomagot használtuk. A becslést statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $p \leq 0,05$.

6.11.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell

A reprodukciós modell statisztikai kiértékeléséhez is az R programot (4.1.1-es verzió) használtuk (R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria). A két vizsgáló manuális pontozásának egyezését Fleiss-kappa segítségével hasonlítottuk össze. Holm-korrekciós Kruskal–Wallis-tesztel ($\alpha = 0,05$) összevetettük a gyulladásos sejtszám (összes és CD163+ sejtek) eloszlását a csoportok és az 1-es számú vizsgáló manuális endometritis pontozási fokozatai között, valamint a log₁₀ transzformált qPCR-eredmények eloszlását is a korábban említett fokozatok között. Ezt a módszert a nem kielégítő normalitási viszonyok miatt választottuk. Az endometritis, a vasculitis pontszámok és a digitálisan számszerűsített gyulladásos sejtszám közötti összefüggést Kendall-korrelációval vizsgáltuk. Az összes gyulladásos sejtszám és az 1-es számú vizsgáló manuális endometritis-pontozása közötti összhangot Fleiss-kappa segítségével számítottuk ki. Az öt endometritis-intervallum közötti sejtszám-küszöbértékeket (0–4) 1000 szimulációval számítottuk ki, az adatok véletlenszerűen kiválasztott 2/3-át figyelembe véve, a fennmaradó 1/3-on pedig validáltuk az eredményeket. Demonstrációs célra különböző sávszélességű görbéket készítettünk, ahol az x tengely a sejtszámot, az y tengely pedig az 1-es vizsgáló endometritis pontszámának arányát mutatja a teljes sejtszám ($x \pm$ sávszélesség) tartományában. Pearson-korrelációs koefficienszt alkalmaztunk a gyulladásos sejtszám és a magzat súlya, valamint a gyulladásos sejtszám és a RT-qPCR-rel mért PRRSV GE-értékek közötti összefüggés értékelésére.

6.11.3. PCV-2-SD-modell

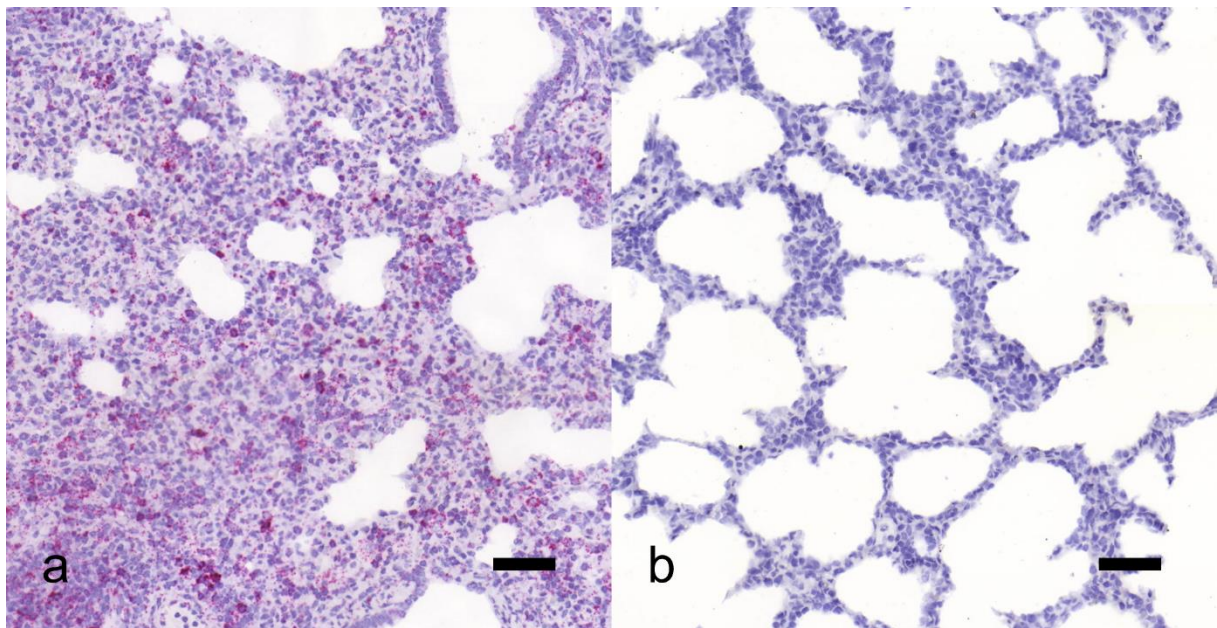
A statisztikai értékeléshez szintén az R programot (4.3.3) használtuk (R Foundation for Statistical Computing). A két vizsgáló pontozásának egyezését Fleiss-kappa segítségével hasonlítottuk össze. A manuális pontozás és a digitálisan számszerűsített fertőzött sejtek közötti összefüggést az aggregált adatok egyváltozós logisztikus regressziós modellje

segítségével értékeltük, függő változóként a fertőzött sejtek arányát alkalmazva. Az esély és a vírus DNS-kópiaszám közötti összefüggést Spearman-korrelációval vizsgáltuk.

6. Eredmények

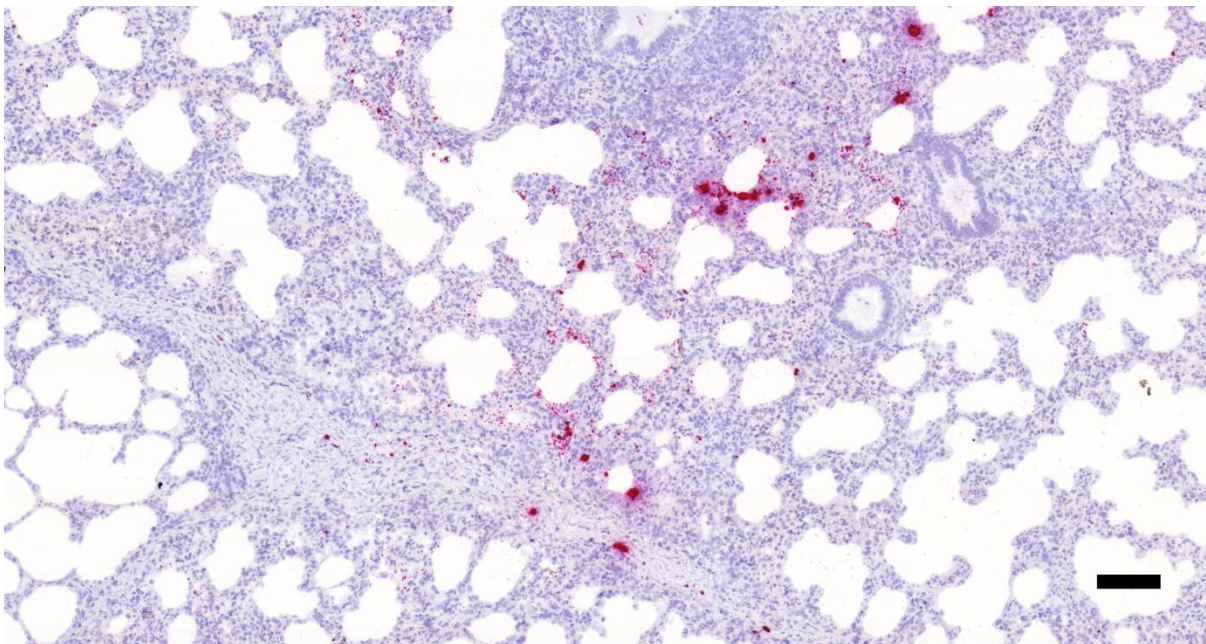
7.1. PRRS kórszövettan és *in situ* hibridizáció

Jelentős különbségeket figyeltünk meg a tüdőelváltozások összpontszámában a fertőzött és a kontrollcsoportok között (az értékek az 2. táblázatban szerepelnek, de a léziók részletes statisztikai jellemzése nem volt a vizsgálatunk célja). Amint a 14. ábrán látható, a *Sus scrofa* PPIB pozitív kontroll próbákkal hibridizált tárgylemezeken diffúz, intenzív, citoplazmatikus vörös festődés volt észlelhető, míg a DapB próbával kezelt negatív kontroll metszeteken nem volt látható jel, ami megfelelő ISH eljárásra, valamint szöveti rögzítésre és integritásra utal.

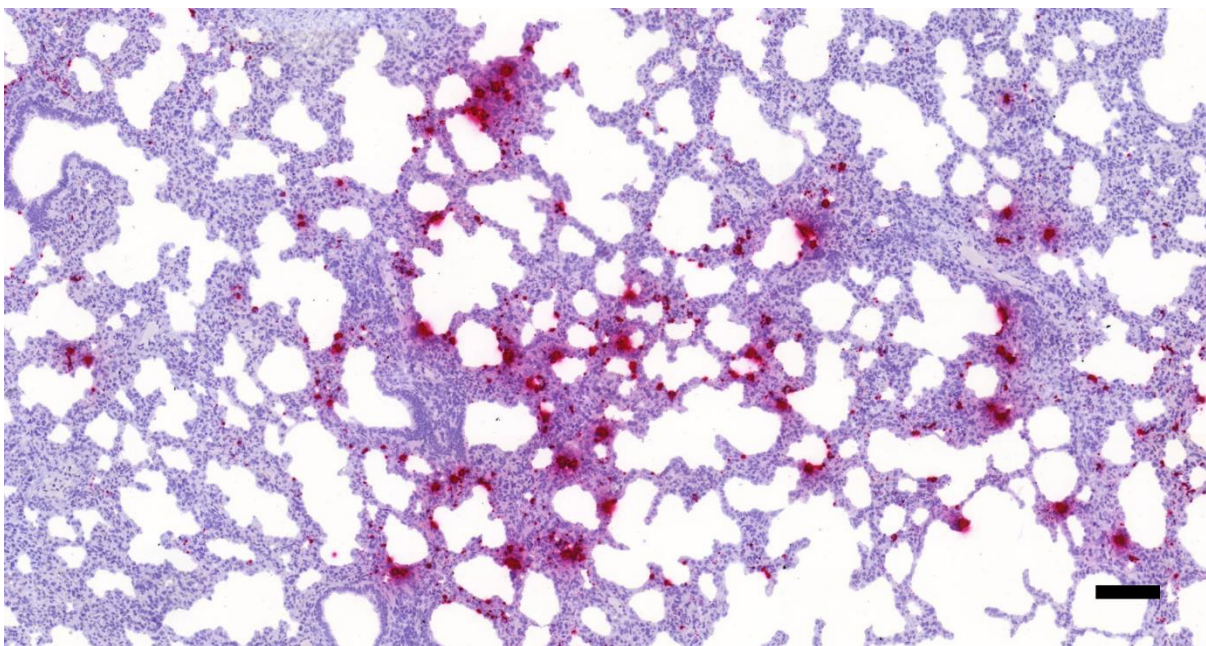


14. ábra: RNAscope segítségével jelölt pozitív PPIB (A) és negatív DapB kontroll (B) próbák eredményei sertés tüdőszövet-mintákban (20×; bar = 50 µm)

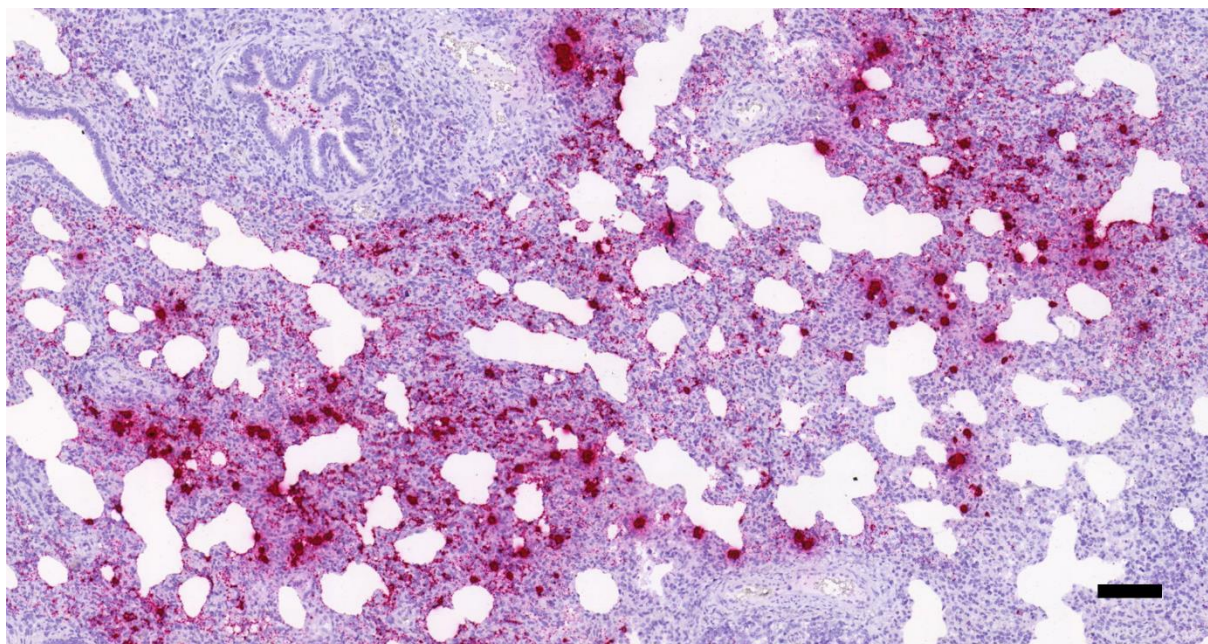
Amint azt a 15., 16. és 17. ábra bemutatja, a PRRSV genom jelenlétét multifokálisan eloszló, elkülönülő vagy összefolyó vörös pöttyökként azonosítottuk a fertőzött állatok tüdejében. A fertőzött (többnyire macrophag és alveolaris epithel morfológiájú) sejtek száma és eloszlása a metszeteken a legtöbb esetben egyenetlen volt. Jellemzően több pozitív sejtet észleltünk a súlyosabb gyulladásos elváltozásokat mutató területeken, különösen ott, ahol az intralobularis sövények szélesebbek voltak. A legtöbb pozitív sejtet többnyire ezekben az intralobularis/interalveolaris sövényekben figyeltük meg.



15. ábra: PRRSV-pozitív sertés tüdőszövetminta, amely kisszámú fertőzött sejtet tartalmaz (RNAscope ISH, 10×, bar = 100 µm)



16. ábra: PRRSV-pozitív sertés tüdőszövetminta, amely mérsékelt számú fertőzött sejtet tartalmaz (RNAscope ISH, 10×, bar = 100 µm)



17. ábra: PRRSV-pozitív sertés tüdőszövetminta, amely nagyszámú fertőzött sejtet tartalmaz (RNAscope ISH, 10×, bar = 100 μm)

7.2. Digitális képelemzés és manuális pontozás

7.2.1. Légúti PRRSV fertőzéses modell

Amint az várható volt, az negatív kontroll állatokból vett tüdőmintákban nem azonosítottunk pozitív sejteket. A fertőzött sertések tüdőmintáiban a fertőzött sejtek aránya jelentős egyedenkénti variabilitást mutatott 0,16% és 26,7% közötti értékekkel a kijelölt területeken, amint azt az 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat. A tüdőgyulladás súlyossági pontszámai, valamint a fertőzött sejtek százalékos aránya a genomkópiák 10-es alapú logaritmusához viszonyítva 1 gramm tüdőszövetre

Állat egyedi azonosító	Fertőzött sejtek (%)	log10 genom kópia/g	Med. lebeny súlyosság ^a	Összesített súlyosság ^b
19	0,00	0,00	0	0
9	0,00	0,00	0	0
7	0,00	0,00	0	0
4	0,00	0,00	0	0
2	0,00	0,00	0	0
23	0,16	10,09	17	68
22	0,19	10,95	20	143
14	0,20	8,79	10	72

25	0,41	9,80	12	67
21	0,72	9,71	17	101
20	1,04	10,41	16	77
17	1,04	8,18	12	56
5	1,86	10,65	26	180
6	1,88	10,68	19	157
12	2,73	11,46	20	135
3	2,93	10,98	17	101
18	3,86	10,73	23	139
13	3,97	10,66	12	65
1	4,24	11,25	17	107
15	4,29	10,91	21	115
11	5,60	11,00	11	110
24	5,79	10,70	25	144
8	8,25	10,93	19	110
10	9,02	10,99	20	136
16	26,70	11,68	21	137

^aBal mediális tüdőlebeny súlyossági és eloszlási pontszámai, ^ba tüdő összesített súlyossági és eloszlási pontszámai

7.2.2. Szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modell

A 2,37 mm²-es területeken számított gyulladásos sejtszám 92 és 5200 között változott (átlag = 1279,94, medián = 798,0, szórás = 1205,64, n = 141). Hasonlóan, a CD163+ macrophagok száma 38 és 910 között mozgott (átlag = 177,83, medián = 127, szórás = 156,39, n = 35). Az esetekre bontott gyulladásos sejtszámok a függelék táblázatában láthatók, a teljes gyulladásos sejtszám numerikus összefoglalását az 1-es vizsgáló endometritis fokozatain és a fertőzött csoportokon belül pedig a 3. és 4. táblázat mutatja.

3. táblázat. A teljes gyulladásos sejtszám numerikus összefoglalása az 1-es számú manuális endometritis fokozatai szerint

Grade/Fokozat	Átlag	Szórás	Minimum	Medián	Maximum
Grade0 (n = 10)	166,6	65,5	92	178	285
Grade1 (n = 67)	521,9	249,57	97	490,0	1167
Grade2 (n = 37)	1477,57	658,52	631	1289,0	3869
Grade3 (n = 23)	3096,13	730,6	2273	2842,0	5167
Grade4 (n = 4)	4489,25	928,8	3128	4814,5	5200

4. táblázat. A teljes gyulladásos sejtszám numerikus összefoglalása a kezelési csoportok szerint

Csoport	Átlag	Szórás	Minimum	Medián	Maximum
no_vacc/chall_L (n = 45)	1669,49	1505,69	154	950	5200
no_vacc/chall_H (n = 50)	1577	978,3	337	1184	3775
vacc/chall_L (n = 21)	827,95	832,29	151	529	3813
vacc/chall_H (n = 15)	496,07	644,35	97	260	2632

7.2.3. PCV-2-SD modell

Összesen 15 negatív eset, 12 +, 8 ++ és 12 +++ súlyosságúnak bírált eset kapott azonos pontszámot mindkét patológustól. Csak 1 esetet értékelt negatívnak az egyik vizsgáló, amit a másik pozitívnak. Az első vizsgáló egy esetet pozitívnak, a második ++ súlyosságúnak értékelt. Az első vizsgáló további két esetet ++, míg a második + fokozatúnak értékelt. Két eset +++ pontot kapott az első vizsgálótól és ++ pontot a másodiktól. A QuPath szoftverrel végzett digitális képelemzés egyszerre azonosította a fertőzött és a nem fertőzött sejteket. A fertőzött sejtek arányát (fertőzött sejt/összes sejt) szintén automatikusan kiszámította. A fertőzött sejtek

egyértelmű, intenzív citoplazmatikus festődést mutattak (13. ábra). A vizsgálatra kijelölt (annotált) területen a számuk 5 és 476 243 között, arányuk a teljes sejtszámhoz képest 0,0006 és 52,3027 között volt. Az esélyeket úgy számítottuk ki, hogy a fertőzött sejtek számát elosztottuk a nem fertőzött sejtek számával. A manuális pontozást, a digitálisan számszerűsített sejtszámot és -arányt, valamint a qPCR eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat. A PCV-2-SD esetek digitálisan számolt sejtei és arányai, manuális pontozási és qPCR értékei

Eset	Összes sejt	p sejt	n sejt	p/összes sejt	p/n sejt	Első vizsgáló	Második vizsgáló	Ct	Kópiaszám
Eset 1	1131862	5872	1125990	0,5188	0,005214966	++	+	12,90	1,97E+07
Eset 2	1038163	10646	1027517	1,0255	0,010360899	++	++	17,63	1,93E+06
Eset 3	462001	69047	392954	14,9452	0,175712679	+++	+++	8,09	2,11E+08
Eset 4	335383	5182	330201	1,5451	0,015693472	++	++	12,59	2,30E+07
Eset 5	872616	38474	834142	4,409	0,046124041	+++	+++	14,21	1,04E+07
Eset 6	1605046	85512	1519534	5,3277	0,056275148	+++	+++	12,35	2,59E+07
Eset 7	636292	41	636251	0,0064	6,444E-05	-	-	21,52	2,84E+05
Eset 8	1158228	2696	1155532	0,2328	0,002333124	+	++	15,16	6,50E+06
Eset 9	1864635	92	1864543	0,0049	4,93418E-05	-	-	27,48	1,51E+04
Eset 10	295284	9	295275	0,003	3,04801E-05	-	-	27,73	1,34E+04
Eset 11	1225710	106	1225604	0,0086	8,6488E-05	-	-	neg	
Eset 12	510791	28	510763	0,0055	5,48199E-05	-	-	29,51	5,58E+03
Eset 13	363315	151	363164	0,0416	0,00041579	-	-	30,10	4,17E+03
Eset 14	340084	177873	162211	52,3027	1,096553255	+++	+++	15,21	6,34E+06
Eset 15	2089229	24938	2064291	1,1936	0,012080661	++	++	15,29	6,09E+06
Eset 16	695751	240494	455257	34,5661	0,528259862	+++	+++	8,09	2,11E+08
Eset 17	1539364	226	1539138	0,0147	0,000146835	-	-	19,13	9,21E+05
Eset 18	1637279	1160	1636119	0,0708	0,000708995	-	-	30,30	3,78E+03
Eset 19	1213812	246	1213566	0,0203	0,000202708	+	+	20,78	4,09E+05
Eset 20	1171083	38	1171045	0,0032	3,24496E-05	-	-	26,90	2,01E+04
Eset 21	2242192	225	2241967	0,01	0,000100358	-	-	27,26	1,69E+04
Eset 22	1240409	50	1240359	0,004	4,03109E-05	-	-	21,18	3,36E+05
Eset 23	2908044	6820	2901224	0,2345	0,002350732	++	+	15,06	6,82E+06
Eset 24	1134019	42	1133977	0,0037	3,70378E-05	-	-	24,67	6,03E+04
Eset 25	1053896	185	1053711	0,0176	0,00017557	+	-	28,80	7,91E+03
Eset 26	776217	5	776212	0,0006	6,44154E-06	-	-	31,12	2,53E+03
Eset 27	1354293	64	1354229	0,0047	4,72594E-05	-	-	26,73	2,19E+04
Eset 28	797575	3692	793883	0,4629	0,004650559	+	+	11,96	3,14E+07
Eset 29	1789164	2158	1787006	0,1206	0,001207606	+	+	18,01	1,60E+06
Eset 30	1038112	165	1037947	0,0159	0,000158968	+	+	21,85	2,42E+05
Eset 31	1639206	9981	1629225	0,6089	0,006126226	++	++	14,17	1,06E+07
Eset 32	1165970	800	1165170	0,0686	0,000686595	+	+	15,26	6,18E+06
Eset 33	835599	55	835544	0,0066	6,58254E-05	+	+	25,31	4,40E+04
Eset 34	2209830	262	2209568	0,0119	0,000118575	+	+	19,12	9,26E+05
Eset 35	1534578	23311	1511267	1,519	0,015424806	+++	++	12,13	2,88E+07

Eset 36	1017342	678	1016664	0,0666	0,000666887	+	+	17,75	1,82E+06
Eset 37	1863784	116677	1747107	6,2602	0,066782973	+++	+++	13,96	1,17E+07
Eset 38	2134883	434	2134449	0,0203	0,000203331	+	+	16,12	4,05E+06
Eset 39	2139121	228	2138893	0,0107	0,000106597	-	-	neg	
Eset 40	1007959	364588	643371	36,1709	0,56668392	+++	+++	7,55	2,75E+08
Eset 41	3135360	476243	2659117	15,1894	0,179098174	+++	+++	7,12	3,39E+08
Eset 42	568485	45169	523316	7,9455	0,08631305	+++	++	15,35	5,92E+06
Eset 43	504803	192	504611	0,038	0,000380491	-	+	20,08	5,77E+05
Eset 44	557247	1044	556203	0,1873	0,001877013	+	+	23,33	1,17E+05
Eset 45	1191039	61859	1129180	5,1937	0,054782231	+++	+++	11,49	3,95E+07
Eset 46	1313687	5913	1307774	0,4501	0,004521423	+	+	neg	
Eset 47	1648454	13282	1635172	0,8057	0,008122693	++	++	14,21	1,04E+07
Eset 48	1090152	52467	1037685	4,8128	0,050561587	+++	+++	13,42	1,53E+07
Eset 49	994664	17962	976702	1,8058	0,018390461	++	++	10,65	5,97E+07
Eset 50	1022486	2068	1020418	0,2023	0,00202662	+	+	16,99	2,64E+06
Eset 51	1075558	59756	1015802	5,5558	0,058826425	+++	+++	16,43	3,48E+06
Eset 52	2459422	212651	2246771	8,6464	0,094647385	+++	+++	9,65	9,77E+07
Eset 53-A	1481790	17546	1464244	1,1841	0,011982976	++	++	13,69	1,34E+07
Eset 53-B	1446628	9003	1437625	0,6223	0,006262412	++	++	14,29	9,97E+06

p = pozitív/fertőzött, n = negatív/nem fertőzött, neg = a magas Ct értékek alapján qPCR-negatív

7.3. qPCR

7.3.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell

Nem volt PCR-pozitivitás a negatív kontroll állatok tüdőszövet-mintáiban. Az összes többi, AUT15-33-mal fertőzött állat tüdeje PCR-pozitív volt. A 2. táblázat a fertőzött állatokból vett minták log₁₀ genomkópiái/g szövet mutatja 8,18 és 11,68 közötti értékekkel.

7.3.2. Szaporodásbiológiai PRRSV-fertőzéses modell

A magzati szérumon és csecsemőmirigyen, valamint az endometrium és placenta szöveteken elvégzett qPCR-vizsgálatok eredményei a függelék táblázatában olvashatók.

7.3.3. PCV-2-SD modell

A PCV-2-SD-ben szenvedő sertésekből származó FFPE-blokkok nyirokcsomó szöveteiből elvégzett qPCR-vizsgálatok három negatív esetet eredményeztek, a pozitív esetek Ct-értéke 7,12 és 31,12 között, a kópiaszám 2,53E+03 és 3,39E+08/mL között változott. A qPCR-vizsgálatok eredményei (Ct érték és kópiaszám) az 5. táblázatban olvashatók.

7.4. Statisztikai elemzések

7.4.1. Légúti PRRSV-fertőzéses modell

Három különböző béta regressziós modellt illesztettünk az RNAscope módszerrel jelölt PRRSV pozitív sejtek arányaira (1) mind a hét lebeny összesített szövettani súlyossági és eloszlási pontszámával, (2) a bal medialis lebeny szövettani súlyossági és eloszlási pontszámával és (3) a qPCR segítségével magyarázó változóként kimutatott genom kópiaszám log10 értékével a bal mediális lebenyben. Szignifikáns összefüggést találtunk a fertőzött sejtek aránya és a qPCR-rel meghatározott genom kópiaszám log10-a között ugyanabban a tüdőlebenyben (pszeudo $R^2 = 0,3894$, $p = 0,004$). Nem tártunk fel statisztikailag szignifikáns összefüggést sem az összesített szövettani súlyosság (pszeudo $R^2 = 0,1664$, $p = 0,1806$), sem pedig az RNAscope eljárással jelölt bal medialis lebeny esetében (pszeudo $R^2 = 0,1354$, $p = 0,1455$).

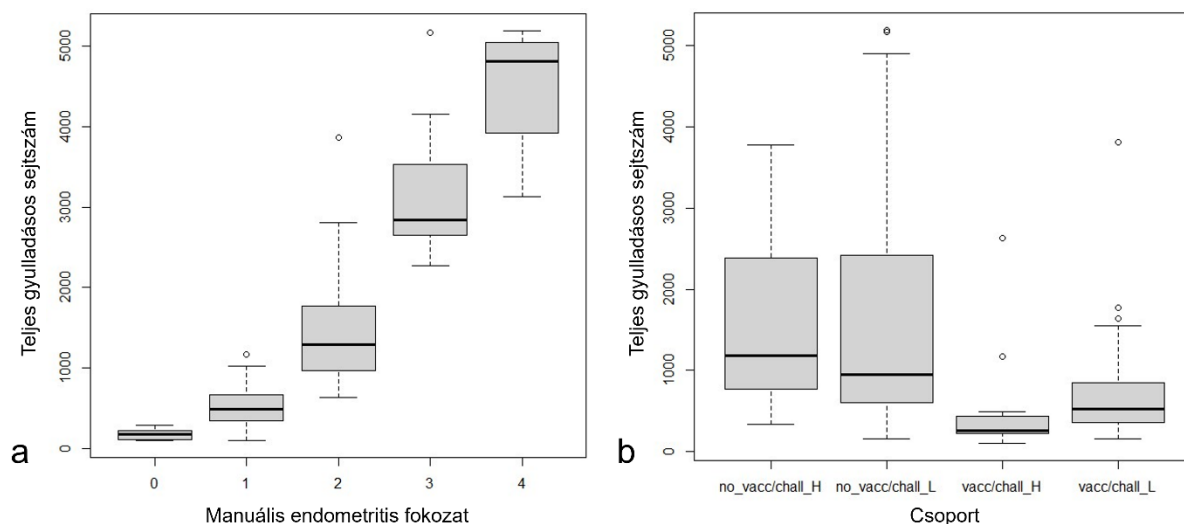
7.4.2. Szaporodásbiológiai PRRSV-fertőzéses modell

7.4.2.1. A manuális pontozások összehasonlítása

A vasculitis súlyossága esetén a két vizsgáló összes megfigyelésének 79,4%-ában azonos döntés született, a Fleiss-kappa értéke 0,68 ($p < 0,0001$). Nagyobb egyetértés volt a vizsgálók között az endometritis esetében, ahol az azonos döntés gyakorisága 90,0%, a Fleiss-kappa értéke 0,85 ($p < 0,0001$). Az eredmények jelentős egyezést mutatnak a két vizsgáló által megadott pontszámok között.

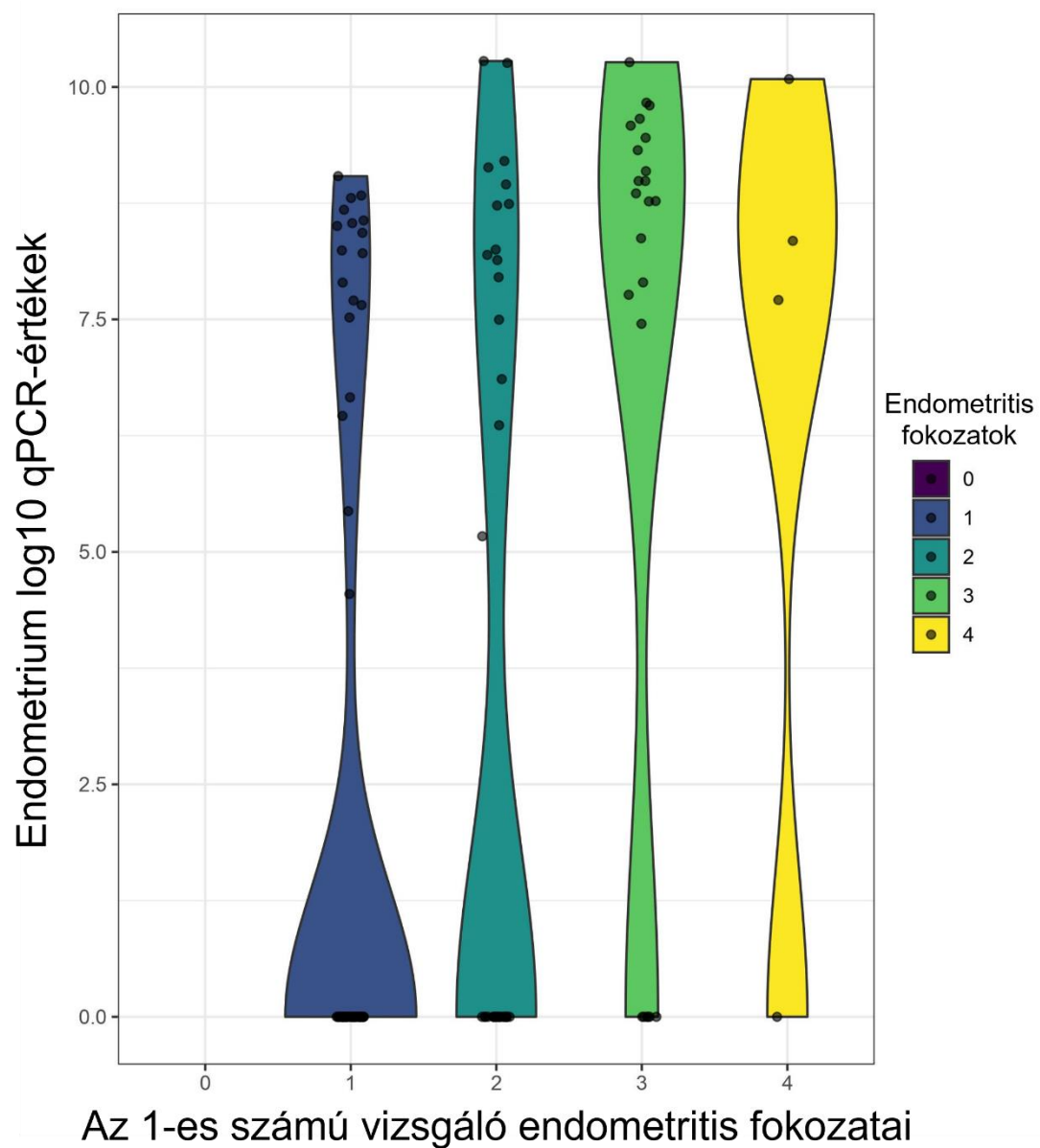
7.4.2.2. A sejtszámok és a qPCR-eredmények eloszlása

A teljes gyulladásos sejtszám eloszlása szignifikánsan különbözött az 1-es számú vizsgáló manuális endometritis-fokozatai között ($p < 0,0001$), bár jelentős átfedéseket észleltünk (18a. ábra). A különbség a csoportok között is szignifikáns volt ($p < 0,0001$), kivéve a két nem vakcinázott között (18b. ábra). A CD163+ sejtszám eloszlása nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget az 1-es vizsgáló manuális endometritis-fokozatai között vagy a különböző csoportok között. Az endometrium és a placenta qPCR GE-értékeinek eloszlása szignifikánsan különbözött az 1-es vizsgáló manuális endometritis-fokozatai között ($p = 0,0001$ és $0,039$) (19. és 20. ábra).



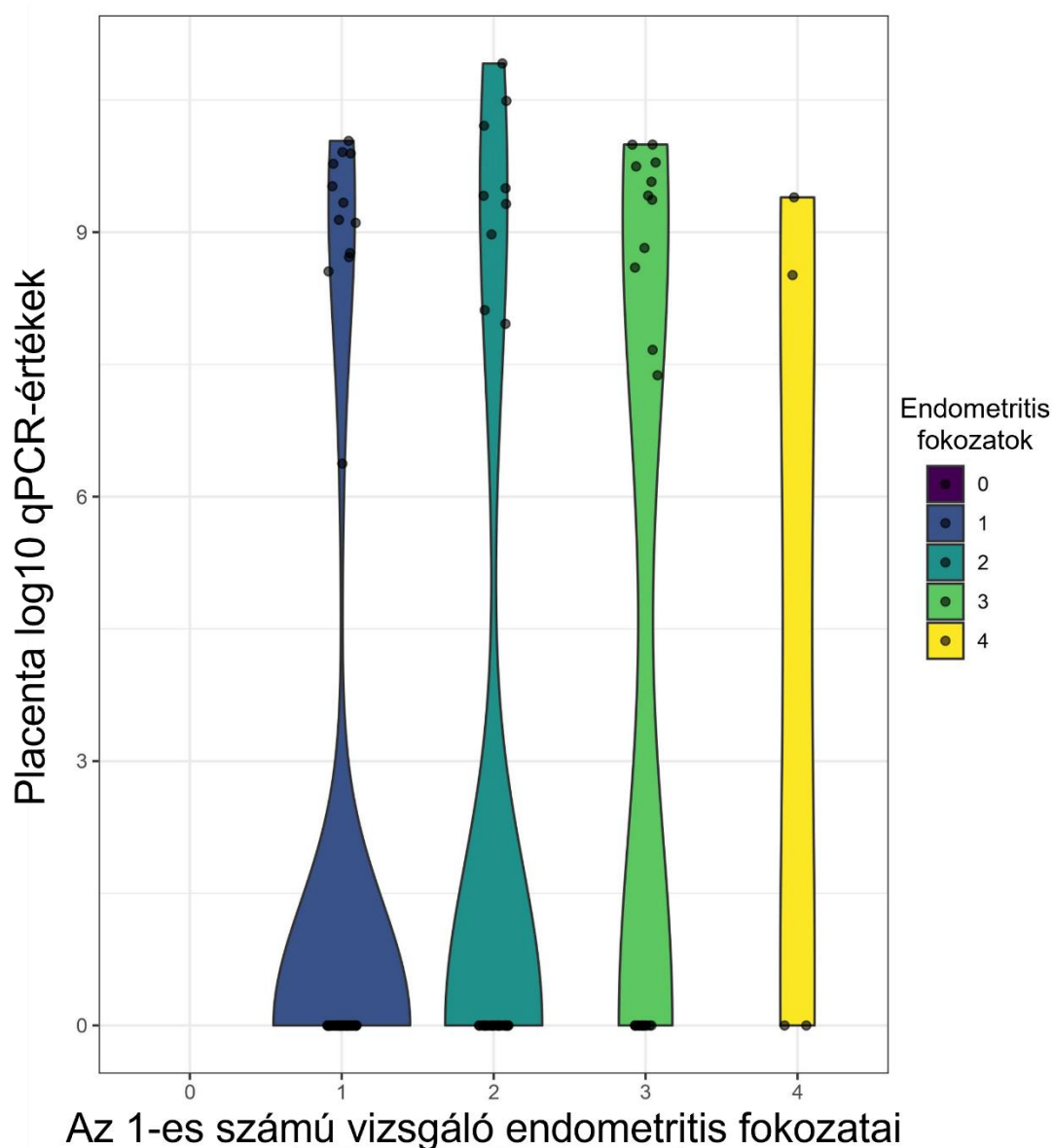
18. ábra: A teljes gyulladásos sejtszám boxplotjai a szaporodásbiológiai PRRSV fertőzéses modellünkben

Az 1-es vizsgáló sejtszám alapján elkülönülő manuális endometritis fokozatai láthatók (a), továbbá a sejtszámok markánsan eltérő eloszlást mutatnak a vakcinázott és a nem vakcinázott csoportok között (b). A sávok feletti körök egyedi esetek, lényegesen magasabb sejtszámmal



19. ábra: Hegedűgrafikonok a qPCR-eredmények eloszlásáról.

Az endometrium log10 qPCR-értékek eloszlási különbségei láthatók az 1-es vizsgáló által értékelt különböző endometritis-fokozatok között



20. ábra: Hegedűgrafikonok a qPCR eredmények eloszlásáról.

A placenta log10 qPCR-értékek eloszlási különbségei láthatók az 1-es vizsgáló által értékelt különböző endometritis fokozatok között

7.4.2.3. A sejtszámok és a manuális pontszámok közötti összefüggés

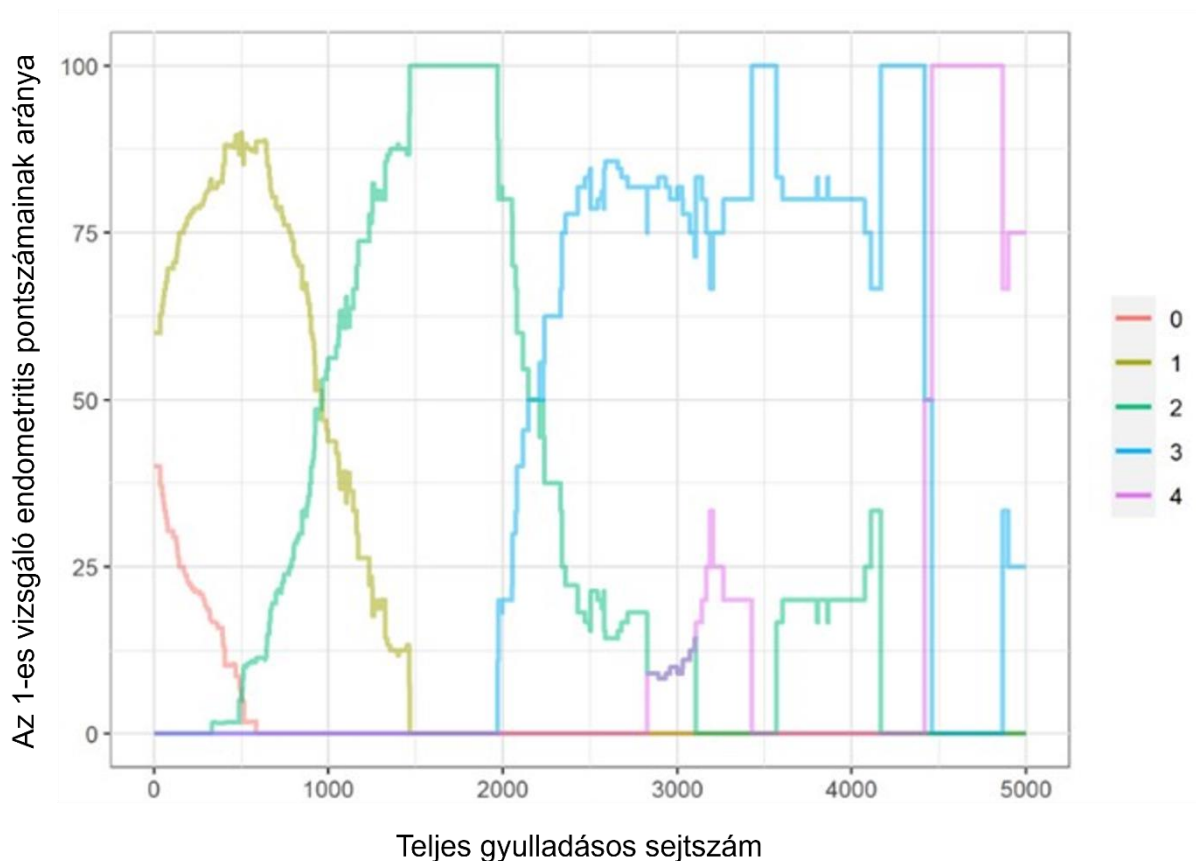
A Kendall-korrelációk azt mutatták, hogy vizsgálótól függetlenül a magasabb vasculitis-pontszám magasabb endometritis-pontszámmal jár, és magasabb teljes gyulladásos sejtszám is várható magas vasculitis- vagy endometritis-pontszám esetén ($\tau = 0,68\text{--}0,78$, $p < 0,0001$). Nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a CD163+ sejtek száma és a teljes gyulladásos sejtszám vagy a manuális pontszámok között.

7.4.2.4. Az endometritis fokozatok sejtszámainak küszöbértékei

A szimulációk szerint az első küszöbérték (0–1. fokozat) az esetek 95%-ában 95,5 és 161 közé, a második (1–2) 817,5 és 1012 közé, a harmadik (2–3) 2275 és 2752 közé, a negyedik (3–4) 3985 és 5038 közé esett. A találati arány az esetek 95%-ában 66% és 87,2% között mozgott (6. táblázat). A javasolt küszöbértékek 105,0 (0–1), 948,5 (1–2), 2398,0 (2–3) és 5038,5 (3–4) voltak, ebben az esetben 78,72%-ban volt egyezés a manuális pontozással. A 300-as sáv szélesség optimálisnak bizonyult a teljes gyulladásos sejtszám küszöbértékeinek demonstrálására (21. ábra).

6. táblázat. Küszöbértékek, p -értékek szélsőséges értékekkel és konfidencia-intervallumok 1000 szimuláció alapján. A szimulációkat az érzékenység értékelésére használtuk. Az esetek kétharmadát véletlenszerűen választottuk ki a küszöbértékek meghatározásához, majd a találati arányt a tendenciabeli különbségek fennmaradó 1/3-án teszteltük. Az első küszöbérték azt a sejtszámot jelöli, amely felett 1, alatta 0 besorolást kapnánk, tehát a négy küszöbérték meghatározza a négy endometritis fokozatot

	Első küszöb	Második küszöb	Harmadik küszöb	Negyedik küszöb	Találati arány	p -érték
Minimum	95,5	776,5	2156	3404	0,5745	0,0001
Maximum	221	1156,5	2803,5	5038,5	0,9362	1
CI 2,5%	95,5	817,5	2275	3985	0,6596	0,0215
CI 97,5%	161	1012	2752	5038,5	0,8723	1

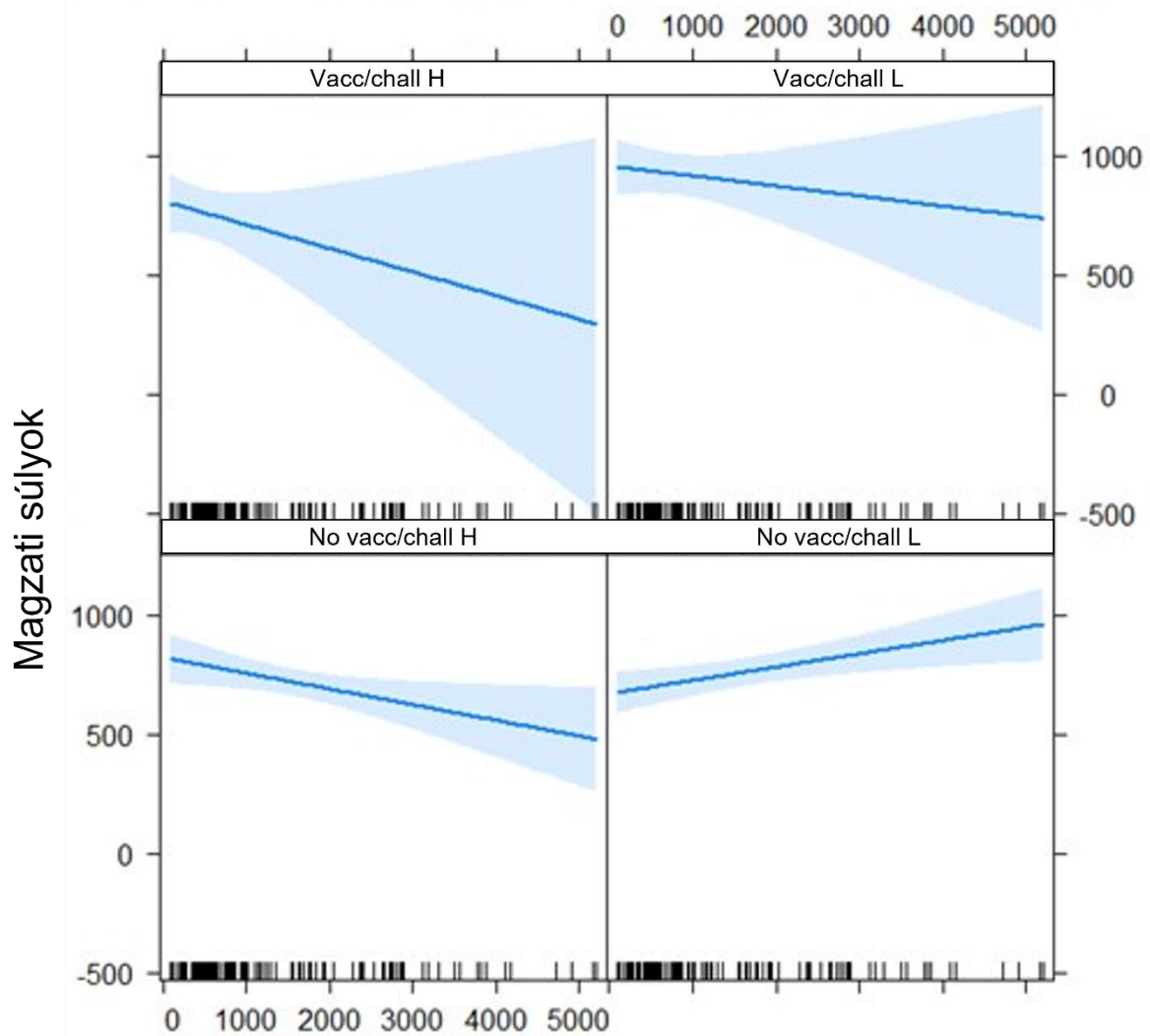


21. ábra: Az 1-es vizsgáló manuális endometritis-pontszámainak aránya az összes esethez viszonyítva a teljes gyulladásos sejtszám ± 300 intervallumában.

A gyulladásos sejtszám növekedésével a manuális endometritis pontszámok is emelkednek, de jelentős átfedés van a különböző súlyossági fokozatok között

7.4.2.5. A sejtszám és a magzati súly, valamint qPCR-eredmények közötti összefüggések

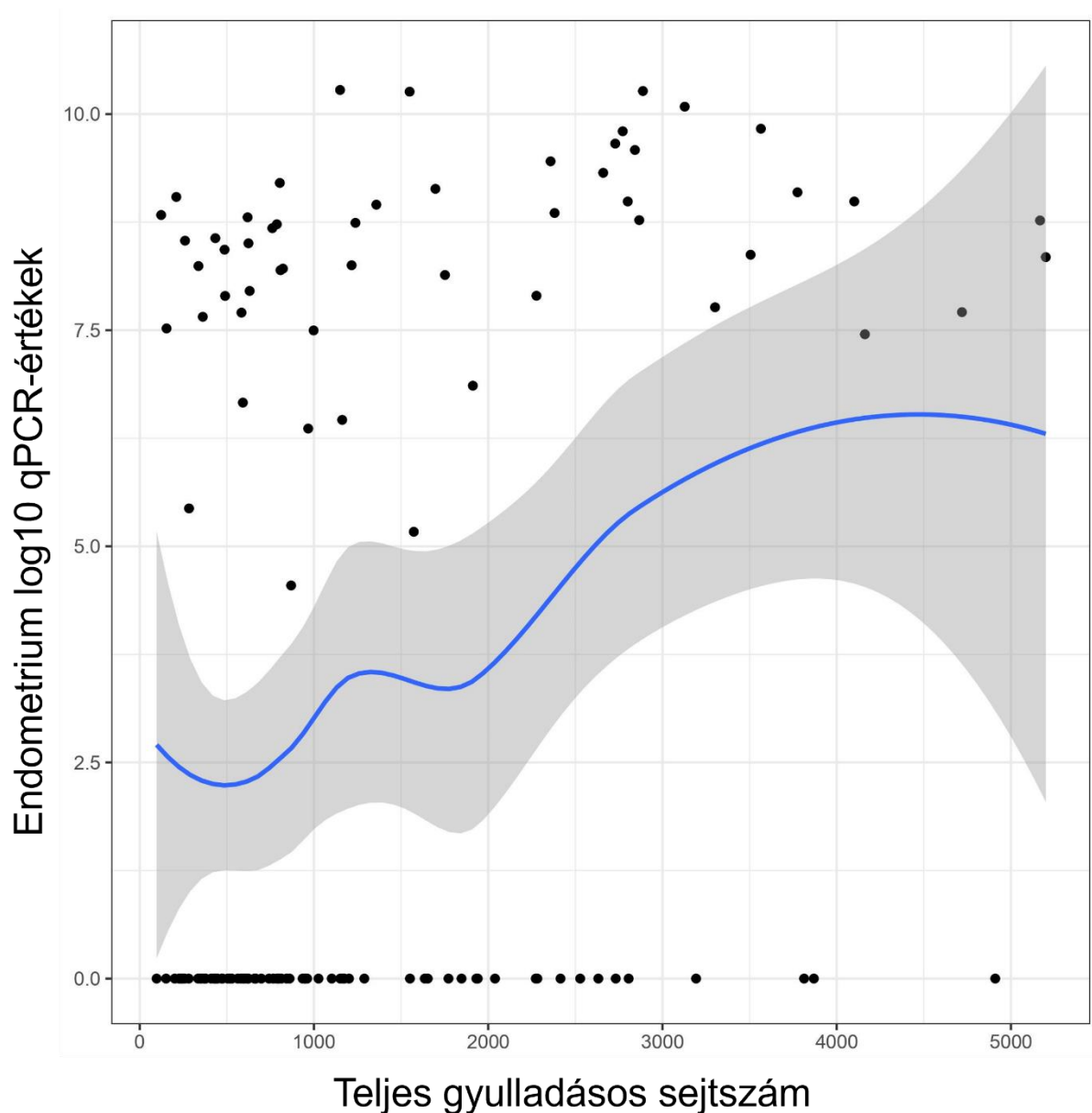
Szignifikáns korrelációt a magzati súly és a teljes gyulladásos sejtszám között csak a nem vakcinázott csoportokban észleltünk (22. ábra). A no_vacc/chall_L csoportban szignifikáns mérsékelten pozitív (Pearson-féle korrelációs együttható = 0,34, $p = 0,0213$, 95% CI: 0,05 és 0,58), míg a no_vacc/chall_H csoportban szignifikáns mérsékelt negatív korreláció volt megfigyelhető (Pearson-féle korrelációs együttható = -0,35, $p = 0,0151$, 95% CI: -0,57 és -0,07). Szignifikáns pozitív korrelációt állapítottunk meg a teljes gyulladásos sejtszám és az endometrium PRRSV GE-értékei között (Pearson-féle korrelációs együttható = 0,32, $p = 0,0002$, 95%-os CI: 0,16 és 0,47) (23. ábra).



Teljes gyulladásos sejtszámok

22. ábra: Összefüggések a magzati súly és a teljes gyulladásos sejtszám között.

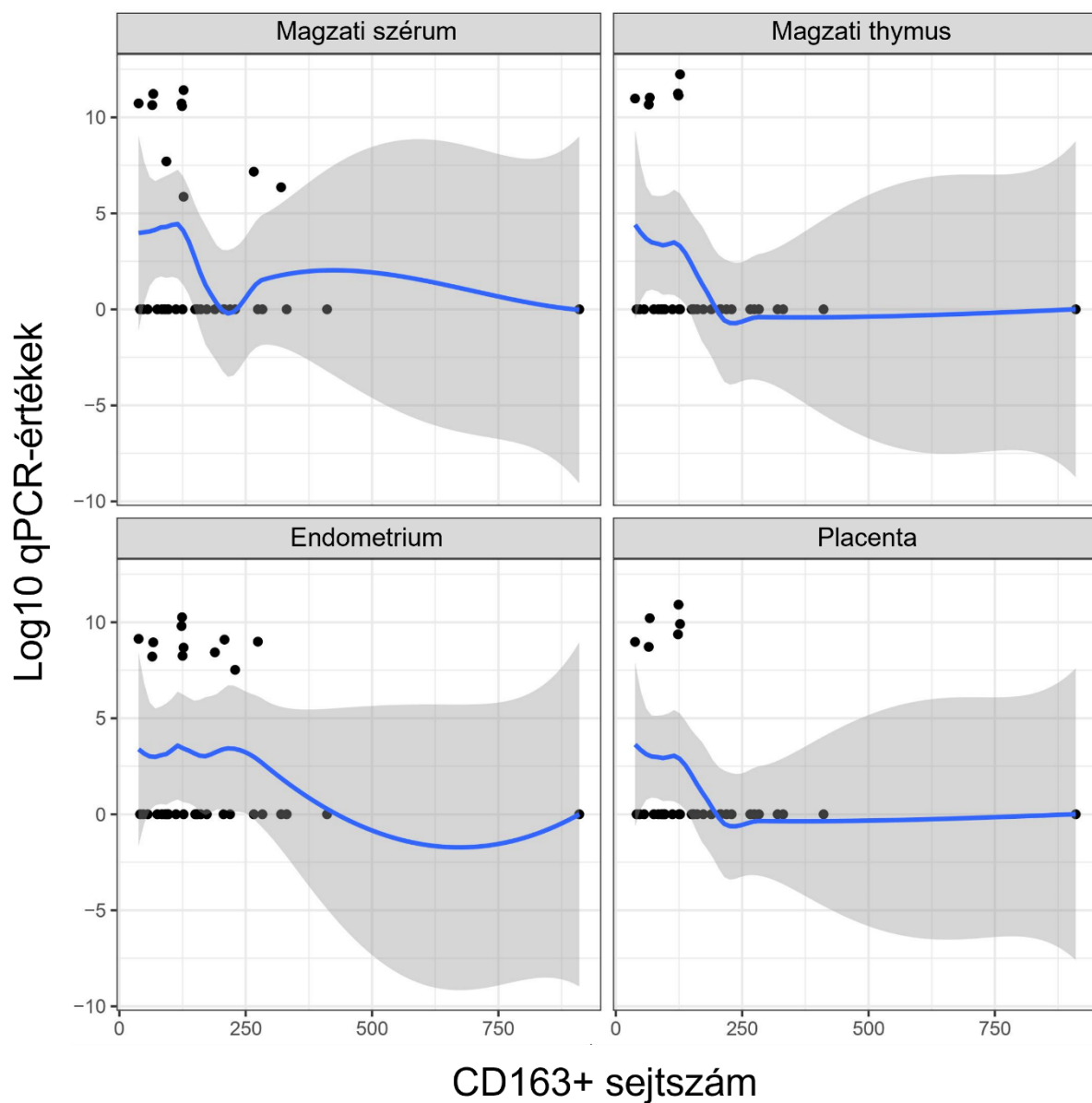
A konfidenciasávok szélessége alapján szignifikáns korreláció a magzati súly és a gyulladásos sejtek száma között csak a nem oltott csoportokban mutatkozik meg



23. ábra: Scatterplot a teljes gyulladásos sejtszám és az endometrium PRRSV GE-értékei közötti összefüggésről.

Szignifikáns pozitív korrelációt állapítottunk meg

Nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a CD163+ sejtszám és a magzati súly között, azonban statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt azonosítottunk a CD163+ sejtek száma és a magzati szérum, a magzati csecsemőmirigy, az endometrium és a placenta PRRSV GE-értékei között a no_vacc/chall_H csoportban (Pearson-féle korrelációs együttható = -0,56, -0,72, -0,61, -0,71, $p = 0,0469, 0,0060, 0,0271, 0,0070$, 95% CI: -0,85, -0,91, -0,87, -0,91 és -0,01, -0,27, -0,09, -0,25 gu) (24. ábra).



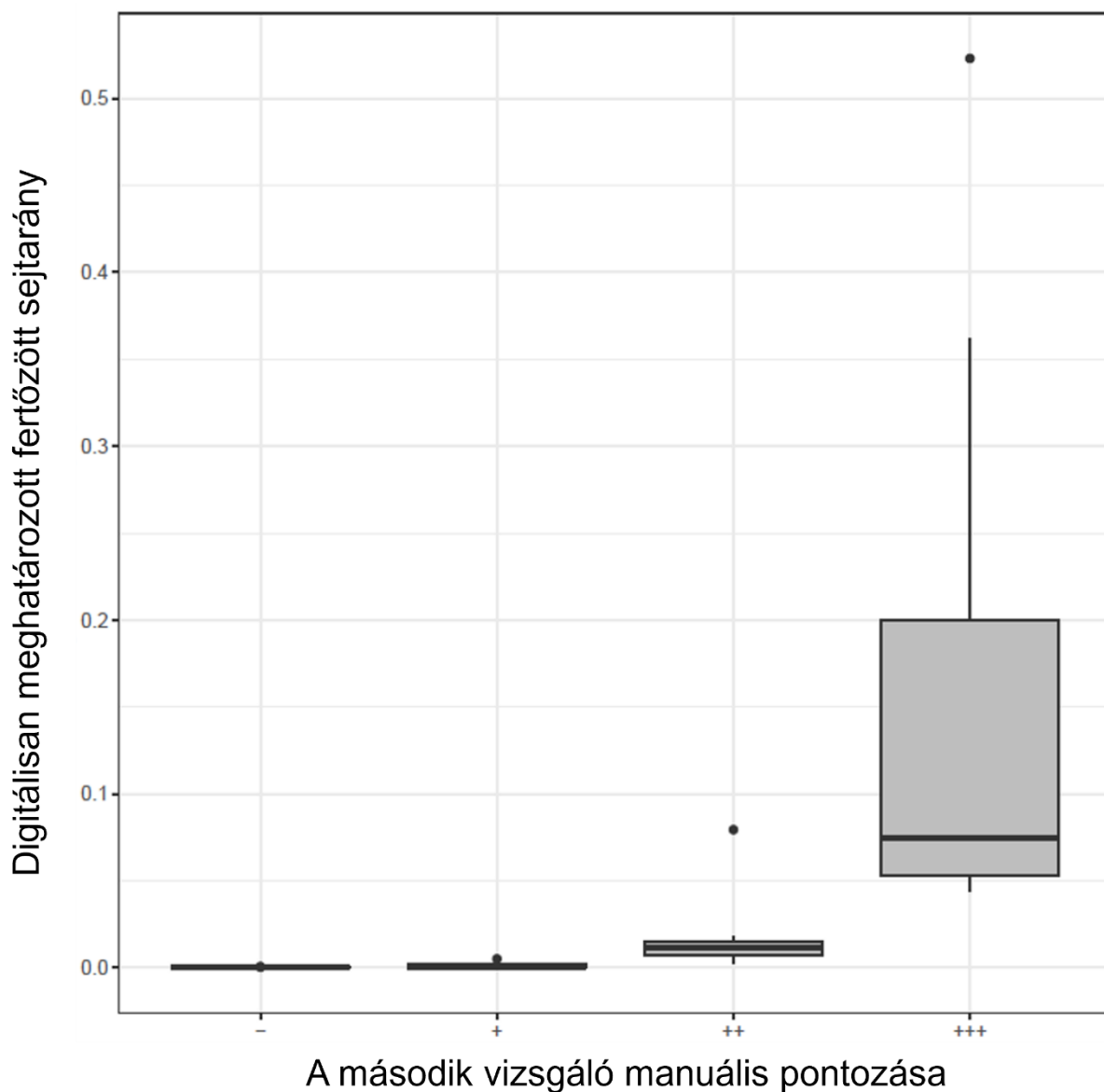
24. ábra: Scatterplot a CD163+ sejtszám és a magzati szérum, a magzati csecsemőmirigy, a méhnyálkahártya és a placentaminták log10 qPCR-értékei közötti összefüggésről.

Statistikailag szignifikáns negatív korrelációt azonosítottunk a CD163+ sejtek száma és a PRRSV GE-értékek között ebben a (no_vacc/chall_H) csoportban

7.4.3. PCV-2-SD-modell

A manuális pontozásnál az esetek 47/54-ében (87,04%) azonos pontszámot adtak a független patológusok, ami erős megegyezést jelent a két vizsgáló között (súlyozott $\kappa = 0,898$, Fleiss-kappa, $p < 0,0001$). Nagyobb tapasztalata és szakértelme miatt csak a második vizsgáló pontszámait használtuk fel a további elemzésekhez.

A logisztikus regresszió szerint a második megfigyelő által negatívnak ítélt esetekben kevés volt a fertőzött sejt, majd a +, ++ és +++ pontszámoknak megfelelően az arány nőtt (25. ábra és 7. táblázat).



25. ábra: Boxplot a digitálisan azonosított, PCV-2-vel fertőzött sejtek aránya és a második vizsgáló manuális pontszámai közötti összefüggésről.

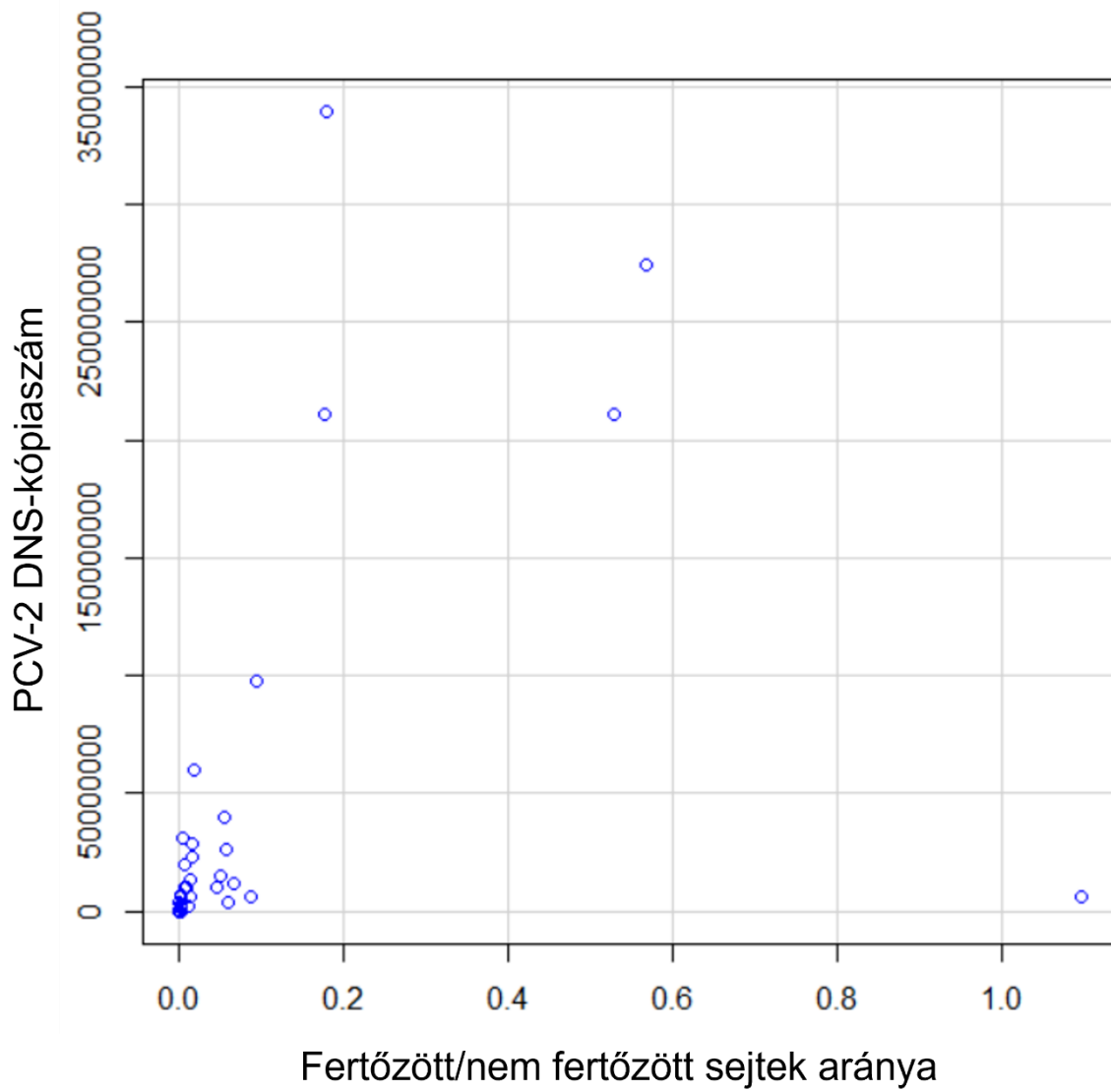
Látható, hogy a fertőzött sejtek aránya a második megfigyelő manuális pontszámaival együtt nő

7. táblázat. A logisztikus regressziós modell eredményei. A MV +, MV ++ és MV +++ becsült esélyhányadosai azt a tényezőt jelzik, amellyel a fertőzött és nem fertőzött sejtek esélye növekszik ezeknél a pontszámoknál, a „–” értékhez képest.

	Becsült modellparaméterek	A becslések standard hibája	Esélyhányados	Az esélyhányados 95%-os konfidencia intervalluma	p-érték
(Metszéspont)	–8,887	0,019			<0,001
MV +	2,418	0,020	11,221	10,784–11,675	<0,001
MV ++	4,549	0,019	94,57	91,011–98,268	<0,001
MV +++	6,930	0,019	1022,553	984,322–1062,269	<0,001

MV = második vizsgáló

Szignifikáns pozitív korrelációt észleltünk a fertőzött/nem fertőzött sejtek aránya és a qPCR-rel meghatározott PCV-2 DNS-kópiaszám között az azonos FFPE-blokkokban ($\rho = 0,8461$, Spearman-korreláció, $p < 0,0001$) (26. ábra).



26. ábra: Szórásdiagram a digitálisan azonosított, PCV-2-vel fertőzött/nem fertőzött sejtek aránya és a PCV-2 DNS-kópiaszámok közötti összefüggésről.

Látható, hogy a sejtarány a kópiaszámmal együtt nő

8. Megvitatás

8.1. Légúti PRRSV-fertőzőes model

A PRRSV közvetlen laboratóriumi diagnózisa elsősorban RT-PCR-en alapul és a vírusantigén IHC-vel vagy a vírusgenom ISH-val való kimutatása szövettani metszeteken általában nem része a rutin diagnosztikának. Ezek a humán- és állatgyógyászatban széles körben alkalmazott módszerek lehetővé teszik a kórszövettani elváltozások vizsgálatát, valamint az adott kórokozó mennyiségének, eloszlásának, sejtropizmusának megfigyelését a szöveteken belül. Ezek a tulajdonságok hasznosak lehetnek a PRRSV kóroki szerepének felmérésére sertés légúti betegségkomplex természetes eseteiben, de a módszereket gyakrabban alkalmazzák kísérleti körülmények között is, ahol a PRRSV az egyetlen kórokozó (Han et al., 2012; Sánchez-Carvajal et al., 2021).

Számos hibalehetőség és nehézség merülhet fel az IHC-vel végzett szövettani víruskimutatással kapcsolatban. Ezekben a vizsgálatokban az eredmények pontosságát nagymértékben meghatározzák olyan tényezők, mint a használt fixáló anyag koncentrációja és pH-ja, a boncolás és a fixálás (autólízis) között eltelt idő, valamint a rögzítési folyamat időtartama, amelyek a legfontosabb minőséget befolyásoló faktorok a rutin diagnosztikára küldött minták esetében. Sajnálatos módon a mintavétel és a szövetfeldolgozás minőségellenőrzési eljárásai az állatorvosi rutin diagnosztikai patológia területén ritkán valósulnak meg, nem úgy, mint a humán patológia esetében (Van Alstine et al., 2002). Ezen okok miatt, valamint a különböző PRRSV törzsek nagy genetikai és antigénvariabilitása miatt a vírusantigén IHC-vel történő kimutatása analitikai és diagnosztikai szempontból kevésbé érzékeny, mint a vírusnukleinsavak kimutatására szolgáló módszerek (Zimmerman et al., 2019).

Különbféle RNS-alapú *in situ* hibridizációs vizsgálatokat fejlesztettek ki a PRRSV kimutatására, beleértve a fluoreszcens (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), kromogén (chromogenic *in situ* hybridization CISH) és biotinil-tyramid alapú (tyramid *in situ* hybridization TISH) módszereket (Han et al., 2012; Trang et al., 2015).

Az AUT15-33 PRRSV-1-törzs ORF7 genomrégióját célzó, újonnan kifejlesztett RNAscope ISH sikeresen láthatóvá tette a vírust mesterségesen fertőzött állatok tüdejében. Ebben az esetben a megfelelő fixáló (10% NBF) használata és az optimális időtartamú rögzítés biztosította a szövet sértetlenségét. Az RNAscope alkalmazásáról a PRRSV kimutatására eddig csak a PRRSV-2-törzsek esetében számoltak be (Cui et al., 2018; Song et al., 2019). Úgy tűnt, hogy a vírusgenom jelenléte és eloszlása a szövetben átfedésben van a tüdőgyulladás súlyosságával, azaz több vírus volt jelen azokon a területeken, ahol az

interstitialis gyulladás súlyosabb volt, bár nem tártunk fel statisztikailag szignifikáns összefüggést az ISH-pozitív sejtek aránya és a bal mediális tüdőlebenyben megfigyelt gyulladás, sem a tüdőlebenyek összesített súlyossága között. Az elváltozások különböző súlyossága és eloszlása az egyes sertések között csökkenthette az összehasonlítás erejét, ami arra utal, hogy a statisztikailag szignifikáns összefüggés eléréséhez nagyobb számú vizsgált tüdőmetszetre lehet szükség.

Az ISH kvantitatív mérésekre való alkalmazhatóságának vizsgálatához elsőként automatikus, szoftveralapú sejtszámlálást alkalmaztunk tárgylemezeken, amelyeket metszetszkennelrel digitalizáltunk. A digitális képelemzéssel végzett sejtszámlálást széles körben alkalmazzák a humán patológiában, különösen a Ki67-index, a különböző biomarkerek és a tumorinfiltráló lymphocyták értékelésére, amely eljárás a manuális számlálással összehasonlíthatónak, vagy bizonyos esetekben még pontosabbnak és reprodukálhatóbbnak bizonyult (Stålhammar et al., 2018; Ács et al., 2021; Sun et al., 2021).

Szignifikáns összefüggést találtunk a fertőzött sejtek aránya és az RT-qPCR-rel meghatározott genomkópiaszám log10-a között ugyanabban a tüdőlebenyben. Az egyes esetekben megfigyelt változatos sejtarányok és egyidejű nagy kópiaszám magyarázata a léziók/ISH jelsűrűség heterogén eloszlása, valamint az ISH-jel kvantifikációjának kétdimenziós jellege az RT-qPCR-hez képest, amely utóbbi a szövetdarab egészét vizsgálja.

Az eredmények azt bizonyítják, hogy a PRRSV RNAscope ISH-val történő kimutatása és az azt követő digitális képelemzés hatékony eszköz lehet a vírusterhelés felmérésére szövettani metszeten, ahol a szöveti szerkezet is látható. Patológiai szempontból ez az információ értékeesebb, mint egy PCR-eredmény, mivel a vírus jelenléte közvetlenül látható és kiértékelhető az elváltozásokban.

Az RNAscope jelenlegi ára és jelentős munkaigénye, valamint a digitális képelemzés egyidejű technológiai feltételei még nem teszik lehetővé a módszer rutin diagnosztikában való alkalmazását, de eredményeink bebizonyították, hogy hatékony eszköz lehet különböző fertőzőes vizsgálatok értékelésében, valamint vakcinafejlesztési vizsgálatokban, ahol a tüdőgyulladás enyhítése és a pozitív sejtek százalékának csökkenése fontos végpont lehet a hatékonyság meghatározásában. A módszer hatékonyan alkalmazható újonnan felfedezett kórokozók esetében is, ahol még nem áll rendelkezésre IHC-re alkalmazható ellenanyag (Alex et al., 2018; Horváth et al., 2020; Dénes et al., 2022).

Jövőbeni célunk a módszer validálása különböző, PRRSV-pozitív FFPE-mintákon. Mivel a próbákat úgy tervezték, hogy a vírus genomjának egyik legkonzervatívabb régiójához (ORF7) kötődjenek, valamint a módszerről ismert, hogy rendkívül érzékeny, nagy esély van arra, hogy más PRRSV-törzsek kimutatására is alkalmas. A háztartási gén mRNS-éhez

kapcsolódó pozitív kontroll próba és a negatív kontroll alkalmazása segíthet a szövet integritásának felmérésében olyan FFPE blokkok esetében, amelyeknél a rögzítési idő ismeretlen, mivel ez a fixáló minőségével (10% NBF) együtt kritikus eleme a sikeres RNAscope reakciónak.

RNAscope ISH-eljárás segítségével sikeresen azonosítottuk a PRRSV-1-et AUT15-33-törzzsel mesterségesen fertőzött sertések tüdejében. A WSI-ken DIA segítségével számított pozitív sejtarány és a qPCR-rel meghatározott genomkópiaszámok log10-ének statisztikai elemzése ugyanazon tüdőlebenyekben szignifikáns összefüggést mutatott ki a változók között. Eredményeink bizonyítják, hogy az RNAscope ISH DIA-vel kombinálva értékes szemikvantitatív adatokkal szolgálhat a tüdő *in situ* PRRSV fertőzésére vonatkozóan.

8.2. Szaporodásbiológiai PRRSV-fertőzéses modell

Szaporodásbiológiai vizsgálatunk célja az volt, hogy a DIA-t endometriális WSI-ken alkalmazzuk, hogy felmérjük annak alkalmazhatóságát a szemikvantitatív, szubjektívebb és kevésbé reprodukálható pontozási módszerek helyettesítésére. Az összes gyulladásos sejtszámot és a CD163+ sejtszámot is számszerűsítettük és meghatároztuk a statisztikai összefüggéseiket a kísérletünk során mért különböző változókkal. Az esetkiválasztás torzítása miatt nem tudtunk valós összefüggéseket feltárni, digitális módszertanunk azonban hasznos lehet a hasonló változókat és statisztikai elemzéseket használó, robusztusabb jövőbeli vizsgálatokhoz.

Reprodukciós kísérletünkben először összehasonlítottuk a két vizsgáló manuális gyulladásos pontszámait. A manuális pontozási értékek között nagyfokú egyezést találtunk, ami rámutat ennek a hagyományos, szemikvantitatív módszernek az alkalmazhatóságára, potenciális szubjektivitása ellenére. Mivel a súlyossági fokozatok pontozása nem mutatott szignifikáns különbséget, a további statisztikai elemzésekhez csak az 1-es vizsgáló pontszámait használtuk fel nagyobb tapasztalata miatt.

Szignifikáns különbségeket találtunk a teljes gyulladásos sejtszám eloszlásában az 1-es vizsgáló manuális endometritis-fokozatai között, ami azt bizonyítja, hogy a digitális képelemzés segítségével objektíven lehet jellemezni, sőt kategorizálni is a méhnyálkahártya gyulladását. Hangsúlyozni kell, hogy a fokozatok között jelentős átfedések és szórások voltak, valószínűleg azért, mert az összehasonlított módszerek lényegesen eltérőek, és nincs standardizált pontozási rendszer a sertés méhnyálkahártya gyulladásának kategorizálására.

A teljes gyulladásos sejtszám eloszlása szignifikánsan különbözött a csoportok között is, kivéve a két nem vakcinázott csoportot. Bár vizsgálatunk célja nem az elváltozások súlyosságának összehasonlítása volt a törzsek között, a nem vakcinázott állatok

méhnyálkahártyájában hasonló gyulladásos sejtszám lehet, függetlenül a vírustörzstől és a magzatmegtartástól. A jövőben alaposabb vizsgálatokra lesz szükség a vírustörzsek és a gyulladásos sejtszám közötti valós összefüggések feltárásához.

Az egyes endometritis súlyossági fokozatok teljes sejtszám küszöbértékei különböző sávszélességgörbékkel demonstrálhatók, vagy szimulációkkal határozhatók meg. Az a kísérletünk, hogy a sejtszám alapján osztályozzuk és meghatározzuk az abszolút skálákat, csak tájékoztató jellegű, de nagy számú metszet felhasználásával valószínűleg ki tudnánk fejleszteni egy objektívebb digitális pontozási módszert, amely automatikusan hozzárendeli az endometritis-metszeteket a megfelelő súlyossági fokozathoz. Az endometritis manuális osztályozása potenciálisan mindig nagyobb hibaarányal bírhat, mint a DIA, mivel nincs szabványos, validált pontozási módszer.

Szignifikáns korrelációt csak a nem vakcinázott csoportokban találtunk a magzati súly és a teljes gyulladásos sejtszám között. Érdekes módon a korrelációs együttható hasonló értéket mutatott, de pozitív volt a no_vacc/chall_L csoportnál és negatív a no_vacc/chall_H csoportnál. A vizsgálatban felhasznált metszetek többsége ezekből a nem oltott csoportokból származott, így elképzelhető, hogy hasonló szignifikáns összefüggéseket kaphattunk volna a beoltott csoportokban, ha több gyulladásos mintánk lett volna belőlük. A vakcinázás nagy valószínűséggel az endometriumra is védő hatást gyakorolt.

A méhnyálkahártya teljes gyulladásos sejtszáma és a PRRSV RT-qPCR GE-értékek közötti pozitív korreláció arra utal, hogy a nagyobb vírusterhelés a fetomaternalis határfelületen erősebb gyulladásos választ vált ki. Ez utóbbira utalt az endometrium és placenta PRRSV GE-értékek szignifikánsan eltérő eloszlása is az 1-es vizsgáló manuális endometritis-fokozatai között.

A CD163+ sejtek száma és a magzati szérumban a magzati csecsemőmirigy, az endometrium és a placenta PRRSV GE-értékei közötti statisztikailag szignifikáns negatív korreláció a no_vacc/chall_H csoportban ellentétben áll Novakovic és mtsainak eredményeivel (Novakovic et al., 2016b). Publikációjukban a magzati csecsemőmirigy PRRSV-2-vírusterheltsége pozitív összefüggést mutatott az endometrium CD163+ sejtszámával (Novakovic et al., 2016b). Amint azt korábban kiemeltük, az esetkiválasztás torzítása miatt nem tudtunk valódi statisztikai összefüggéseket feltárni. Ezeknek a sejteknek a szerepe azonban összetettebb is lehet, és a sejt-quantifikációval kiegészített CD163 IHC nem biztos, hogy elegendő a PRRSV által okozott szaporodásbiológiai rendellenességek finom mechanizmusainak, valamint a PRRSV-1- és PRRSV-2-fertőzés patogenezise közötti különbségek elemzéséhez.

Szaporodásbiológiai tanulmányunknak voltak bizonyos korlátai. Többnyire elváltozásokkal terhelt eseteket választottunk ki, amelyek nem feltétlenül reprezentatívak a csoportra. A különböző csoportokból nyert tárgylemezek száma nagyon változatos volt, mivel a különböző csoportokban más volt a gyulladásos elváltozások gyakorisága. Viszonylag kis számú mintával kellett dolgoznunk, különösen a nagyobb manuális fokozatok és az IHC-val jelölt metszetek esetében. A „random trees classifier” osztályozók időnként hibákat követtek el, amikor súlyos gyulladásos elváltozásoknál az egymáshoz nagyon közel helyeződő gyulladásos sejteket mirigyhámsejteknek (glands) értékelték. Ezekben az esetekben manuális korrekciót alkalmaztunk. A lymphocyták és a plazmasejtek osztályozása volt a legmegbízhatóbb, a granulocytákat esetenként műtermékként (artefact) értékelték, a különböző morfológiájú macrophagokat pedig olykor más csoportokba sorolták.

Adatainkat összegezve megállapítható, hogy a digitális képelemzést sikeresen alkalmaztuk PRRSV-1-gyel kísérletileg fertőzött vemhes kocasüldők endometrium metszeteiben a gyulladásos infiltráció számszerűsítésére.

A nyílt forráskódú QuPath szoftver kiváló platformnak bizonyult az algoritmusok betanítására és átdolgozására. Képes volt felismerni és osztályozni a különböző sejteket, de a tárgylemezek változatos minősége és színárnyalata miatt gyakran volt szükség a manuális korrekcióra. Tudomásunk szerint ez az első olyan tanulmány, amely DIA-t használt a sertés endometrium PRRSV-indukálta gyulladásos elváltozásainak vizsgálatára.

Összefoglalva, a szemikvantitatív pontozás mellett vagy helyett a DIA hatékony módszer lehet a szövétvizsgálatra hasonló kutatási eljárásokban, ahol az endometrium gyulladását objektíven kell értékelni. Ilyenek lehetnek többek között a vakcinafejlesztési kísérletek, ahol a léziócsökkentés mértékét kívánjuk számszerűsíteni, de módszertanával új ismereteket szerezhetünk a PRRSV-1 reprodukciós patológiájáról is.

8.3. PCV-2-SD-modell

Vizsgálatunk célja a PCV-2-vel fertőzött sejtek számszerűsítése volt immunhisztokémiai jelölést követően, továbbá a számszerű eredmények összehasonlítása a szemikvantitatív, becslésen alapuló manuális módszerrel, valamint az azonos FFPE-blokkokból kinyert PCV-2 DNS-kópiaszámmal. A fő célkitűzés a digitális QuPath módszertan alkalmazhatóságának és hatékonyságának felmérése volt a PCV-2 IHC-jelek számszerűsítésében.

A digitálisan meghatározott IHC-jelek kvantifikációjának és a manuális elbírálásnak az összhangja számos tanulmány központi témája volt, mivel a digitális patológia lehetőséget adott arra, hogy a nehezen megismételhető, időigényes manuális pontozási rendszereket pontosabbá, objektívebbé és időhatékonyabbá tegyék. Az IHC-festődés digitális értékelése

hatékony az objektív elemzéshez, és különösen hasznos a klinikailag releváns biomarkerek azonosítására és validálására (Klauschen et al., 2015; Ács et al., 2019, Moratin et al., 2021). Néhány kiemelt kutatási téma a Ki67 proliferációs marker és az ösztrogénreceptor (ER), progeszteron-receptor (PR) és humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (erbB2/HER2) IHC-festődések értékelése, mivel a Ki67 valószínűleg a daganatpatológia legszélesebb körben használt immunhisztokémiai markere, a többi IHC pedig szerves részét képezi az humán emlőrákok fenotípezálásának és prognosztizálásának. Egy szabványosított, digitális Ki67-pontozási rendszer nagymértékben reprodukálható Ki67-kiértékeléshez vezethet, ez pedig javíthatja a vizsgálók közötti (interobserver) variabilitást. Ez elengedhetetlen a Ki67 prognosztikai és prediktív emlőrák biomarkerként való alkalmazásához (Klauschen et al., 2015; Ács et al., 2019). Az optimalizált és validált digitális képelemzés alkalmazását a Ki67 mennyiségi meghatározására a klinikai gyakorlatban a hasnyálmirigy neuroendokrin daganatainak alapos felülvizsgálata és metaanalízise is támogatta (Luchini et al., 2022). A Stålhammar és mtsai által használt digitális patológiai rendszer a legtöbb szempontból hatékonyabb volt, mint a Ki67, ER, PR és HER2 IHC biomarkerek manuális pontozása (Stålhammar et al., 2016). Yousif és mtsai összehasonlították a kvantitatív képelemzést az ER, PR és HER2 IHC manuális pontozásával, és szignifikáns javulást észleltek a pontozás szabványosításában és kiváló konkordanciát (Yousif et al., 2022). Az IHC-vel jelölt szöveti microarray (TMA) QuPath által végzett pontozása hatékony és reprodukálható, valamint Loughrey és mtsai szerint pontosabb, mint a manuális értékelés (Loughrey et al., 2018). A QuPath szoftvert egy nemrégiben megjelent tanulmányban is használták, amely a szervenkénti immunreaktív terület és a madárinfluenza vírus antigénjének manuális szemikvantitatív pontszáma közötti megfelelő korrelációról tájékoztat (Landmann et al., 2024).

Annak ellenére, hogy a tapasztalt patológusok által végzett kórszövettani pontozást tekintik referenciamódszernek a digitális patológia analitikai teljesítményének validálására, ezek a módszerek kiegészítik egymást, és kölcsönösen kiküszöbölik gyengeségeiket. A digitális patológia segíti a patológusokat a szövetelemzés során jelentkező torzításaik leküzdésében, és olyan végpontok létrehozásában, amelyeket egy humán vizsgáló nem érhet el (Aeffner et al., 2017).

Vizsgálatunkban erős egyezést találtunk két, a patológia területén jelentősen eltérő tapasztalattal rendelkező megfigyelő manuális pontozása között. Ezek az eredmények jelzik ennek a hagyományos, szemikvantitatív módszernek a hatékonyságát, annak potenciális szubjektivitása ellenére. Csak egy, nem lektorált vizsgálat mutatta be a PCV-2 IHC-n végzett körvizsgálat eredményeit, amely bizonyos eltéréseket mutatott ki a különböző patológusok által végzett pontozásban (Segalés et al., 2010). Következésképpen a digitális alapú rendszereknek segíteniük kell homogénebb és objektívebb IHC-pontszámok kialakításában,

amelyek kulcsfontosságúak bizonyos betegségek diagnosztizálásában, mint például a PCV-2-SD esetében. A pontos értékelés különbséget tehet akár a beteg és a szubklinikai/lábadozó sertések között is (Olvera et al., 2004).

Negatív bírálat esetén a fertőzött sejtek aránya sokkal alacsonyabb volt, mint a nem fertőzött sejtek aránya. Ezenkívül statisztikailag szignifikáns esélyhányadosok figyelhetők meg a pozitív kategóriákban (+, ++, +++) a negatív bírálathoz képest. Ezen eredmények alapján a fertőzött sejszámok összevethetők a vizsgáló pontozásával.

A szignifikáns pozitív korreláció és a magas p-érték alapján megállapítható, hogy nagyobb vírusterheléssel nagyobb számú digitálisan számszerűsített, IHC-jelölt PCV-2-vel fertőzött sejt társult. Eredményünk is bizonyítja a digitális QuPath módszertan eredményességét megfelelő immunhisztokémiai eljárással és tárgylemezminőséggel kombinálva.

A vírus kópiaszáma és a fertőzött sejtek mennyisége közötti szignifikáns erős pozitív korreláció bizonyítja a qPCR hatékonyságát FFPE-mintákon. Az FFPE-blokkokon történő rutinszerű diagnosztikai alkalmazása azonban önmagában saját tanulmányunk alapján nem javasolható, és lehetséges diagnosztikai hasznossága további vizsgálatokat igényel.

Bár nem tekintettük vizsgálatunk szignifikáns megfigyelésének, a korábban elvégzett IHC-vizsgálatok manuális pontozása kisebb eltéréseket mutatott a vizsgálatunkban nemrégiben elvégzett festések pontszámaihoz képest. Ez a megállapítás rávilágít arra, hogy nemcsak a megfigyelők közötti variabilitást, hanem a festési eljárások vagy akár a festési időpontok közötti változékonyságot is figyelembe kell venni (Segalés et al., 2010).

Tanulmányunknak voltak bizonyos korlátai. Viszonylag kis számú mintával dolgoztunk, de az eredmények alapján a rendszer megbízhatónak mondható. Jóllehet jól működött egy olyan betegségnél, amelyben általában jelentős az antigén mennyisége, megbízhatósága kisebb antigénterhelésnél és erősebb háttérfestésnél nem ismert. A QuPath szoftver azonban rugalmassága miatt használható különböző expressziós szintekkel rendelkező IHC-markereket értékelő vizsgálatokban (Bankhead et al., 2017). A festődési variabilitás minimalizálása a megfelelően működő digitális képelemzés egyik alapfeltétele még akkor is, ha rendelkezésre állnak algoritmusok a csökkentésére (Zuraw és Aeffner, 2022).

Összefoglalva, a QuPath digitális képelemzés felhasználható a PCV-2 IHC-jelek pontos számszerűsítésére természetes sertéscircovírus-betegségben szenvedő sertések nyirokcsomóiban. A jelenleg alkalmazott manuális módszer hatékonysága ellenére egy új, digitális patológiai rendszer potenciálisan javíthatja a betegség diagnosztizálását, ahol elengedhetetlen a vírus vizualizálása a beteg szövetekben, a digitális kvantifikáció pedig objektívebbé és reprodukálhatóbbá teszi az esetértékelést.

9. Új tudományos eredmények

1. Először azonosítottuk a PRRSV-1-et RNAscope módszerrel sertés tüdőszövetmintákban és először alkalmaztunk digitális képelemzést az így láthatóvá tett nukleinsav mennyiségi meghatározására. Az RNAscope ISH DIA-vel kombinálva értékes szemikvantitatív adatokkal szolgálhat a tüdő *in situ* PRRSV fertőzésére vonatkozóan.

2. Először alkalmaztunk digitális képelemzést a sertés endometrium gyulladásos sejtszámának számszerűsítésére és hasonlítottuk össze a módszert manuális pontozási eljárással. A DIA hatékony módszer lehet a szövetvizsgálatra hasonló kutatási eljárásokban, ahol az endometrium gyulladását objektíven kell értékelni. Ilyenek lehetnek többek között a vakcinafejlesztési kísérletek, ahol a léziócsökkentés mértékét kívánjuk számszerűsíteni, de módszertanával új ismereteket szerezhethetünk a PRRSV-1 reprodukciós patológiájáról is.

3. Először fejlesztettünk ki és alkalmaztunk digitális patológiai rendszert a PCV-2-SD egyedi diagnosztikájára. A jelenleg alkalmazott manuális módszer hatékonysága ellenére egy új, digitális patológiai rendszer potenciálisan javíthatja a betegség diagnosztizálását, ahol elengedhetetlen a vírus vizualizálása a beteg szövetekben, a digitális kvantifikáció pedig objektívebbé és reprodukálhatóbbá teszi az esetértékelést.

10. Irodalomjegyzék

1. Ács, B., Pelekanou, V., Bai, Y., Martinez-Morilla, S., Toki, M., Leung, S.C.Y., Nielsen, T.O., Rimm, D.L., 2019. Ki67 reproducibility using digital image analysis: an inter-platform and inter-operator study. *Lab. Invest.* 99, 107–117. doi: 10.1038/s41374-018-0123-7
2. Ács, B., Rantalainen, M., Hartman, J., 2020. Artificial intelligence as the next step towards precision pathology. *J. Intern. Med.* 288, 62–81. doi: 10.1111/joim.13030
3. Ács, B., Salgado, R., Hartman, J., 2021. What do we still need to learn on digitally assessed biomarkers? *EBioMedicine.* 70, 103520. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103520
4. Aeffner, F., Adissu, H.A., Boyle, M.C., Cardiff, R.D., Hagendorn, E., Hoenerhoff, M.J., Klopffleisch, R., Newbigging, S., Schaudien, D., Turner, O., Wilson, K., 2018. Digital Microscopy, Image Analysis, and Virtual Slide Repository. *ILAR J.* 59, 66–79. doi: 10.1093/ilar/ily007
5. Aeffner, F., Wilson, K., Martin, N.T., Black, J.C., Hendriks, C.L.L., Bolon, B., Rudmann, D.G., Gianani, R., Koegler, S.R., Krueger, J., Young, G.D., 2017. The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 141, 1267–1275. doi: 10.5858/arpa.2016-0386-RA
6. Alex, C.E., Kubiski, S.V., Li, L., Sadeghi, M., Wack, R.F., McCarthy, M.A., Pesavento, J.B., Delwart, E., Pesavento, P.A., 2018. Amdoparvovirus Infection in Red Pandas (*Ailurus fulgens*). *Vet. Pathol.* 55, 552–561. doi: 10.1177/0300985818758470
7. Arruda, A.G., Tousignant, S., Sanhueza, J., Vilalta, C., Poljak, Z., Torremorell, M., Alonso, C., Corzo, C.A., 2019. Aerosol Detection and Transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): What Is the Evidence, and What Are the Knowledge Gaps? *Viruses.* 11, 712. doi: 10.3390/v11080712
8. Bai, B., Yang, X., Li, Y., Zhang, Y., Pillar, N., Ozcan, 2023. A Deep learning-enabled virtual histological staining of biological samples. *Light. Sci. Appl.* 12, 57. doi: 10.1038/s41377-023-01104-7.
9. Balka, G., Ladinig, A., Ritzmann, M., Saalmüller, A., Gerner, W., Käser, T., Jakab, C., Rusvai, M., Weißenböck, H., 2013. Immunohistochemical characterization of type II pneumocyte proliferation after challenge with type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Comp. Pathol.* 149, 322–330. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.12.006
10. Balka, G., Podgórska, K., Brar, M.S., Bálint, Á., Cadar, D., Celer, V., Dénes, L., Dirbakova, Z., Jedryczko, A., Márton, L., Novosel, D., Petrović, T., Sirakov, I., Szalay, D., Toplak, I., Leung, F.C., Stadejek, T., 2018. Genetic diversity of PRRSV 1 in Central Eastern Europe in 1994-2014: origin and evolution of the virus in the region. *Sci. Rep.* 8, 7811. doi: 10.1038/s41598-018-26036-w
11. Balka, G., Wang, X., Olasz, F., Bálint, Á., Kiss, I., Bányai, K., Rusvai, M., Stadejek, T., Marthaler, D., Murtaugh, M.P., Zádori, Z., 2015. Full genome sequence analysis of a wild, non-MLV-related type 2 Hungarian PRRSV variant isolated in Europe. *Virus Res.* 200, 1–8. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.014
12. Bankhead, P., Fernández, J.A., McArt, D.G., Boyle, D.P., Li, G., Loughrey, M.B., Irwin, G.W., Harkin, D.P., James, J.A., McQuaid, S., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2018. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes

- pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Lab. Invest.* 98, 15–26. doi: 10.1038/labinvest.2017.131
13. Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7, 16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5
 14. Behrman, D.B., Lubin, D.J., Magliocca, K., Shi, Q., Viswanathan, K., 2023. Exploration of Digital Image Analysis for Ki67 Quantification in the Grading of Medullary Thyroid Carcinoma: A Pilot Study with 85 Cases. *Head Neck Pathol.* 17, 638–646. doi: 10.1007/s12105-023-01564-8
 15. Bertram, C.A., Aubreville, M., Gurtner, C., Bartel, A., Corner, S.M., Dettwiler, M., Kershaw, O., Noland, E.L., Schmidt, A., Sledge, D.G., Smedley, R.C., Thaiwong, T., Kiupel, M., Maier, A., Klopffleisch, R., 2020. Computerized Calculation of Mitotic Count Distribution in Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Sections: Mitotic Count Is Area Dependent. *Vet. Pathol.* 57, 214–226. doi: 10.1177/0300985819890686
 16. Bertram, C.A., Gurtner, C., Dettwiler, M., Kershaw, O., Dietert, K., Pieper, L., Pischon, H., Gruber, A.D., Klopffleisch, R., 2018. Validation of Digital Microscopy Compared With Light Microscopy for the Diagnosis of Canine Cutaneous Tumors. *Vet. Pathol.* 55, 490–500. doi: 10.1177/0300985818755254
 17. Bertram, C.A., Klopffleisch, R., 2017. The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. *Vet. Pathol.* 54, 756–766. doi: 10.1177/0300985817709888
 18. Bruce, C., Prassas, I., Mokhtar, M., Clarke, B., Youssef, E., Wang, C., Yousef, G.M., 2024. Transforming diagnostics: The implementation of digital pathology in clinical laboratories. *Histopathology*. doi: 10.1111/his.15178. Epub ahead of print.
 19. Brunborg, I.M., Moldal, T., Jonassen, C.M., 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based realtime PCR. *J. Virol. Methods.* 122, 171–178. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.08.014.
 20. Burkard, C., Opriessnig, T., Mileham, A.J., Stadejek, T., Ait-Ali, T., Lillico, S.G., Whitelaw, C.B.A., Archibald, A.L., 2018. Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. *J. Virol.* 92, e00415–18. doi: 10.1128/JVI.00415-18
 21. Canelli, E., Catella, A., Borghetti, P., Ferrari, L., Ogno, G., De Angelis, E., Corradi, A., Passeri, B., Bertani, V., Sandri, G., Bonilauri, P., Leung, F.C., Guazzetti, S., Martelli, P., 2017. Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs. *Vet. Microbiol.* 210, 124–133. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.09.002
 22. Chen, S., Li, X., Zhang, L., Zheng, J., Yang, L., Niu, G., Zhang, H., Ren, Y., Qian, J., Sun, C., Ren, L., 2023. Phylogenetic and Structural Analysis of Porcine Circovirus Type 2 from 2016 to 2021 in Jilin Province, China. *Microorganisms.* 11, 983. doi: 10.3390/microorganisms11040983
 23. Clark, E. G., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 28, 499–501.

24. Clunie, D.A., 2021. DICOM Format and Protocol Standardization-A Core Requirement for Digital Pathology Success. *Toxicol. Pathol.* 49, 738–749. doi: 10.1177/0192623320965893
25. Cui, M.M., Li, J.N., Wang, G., He, X.J., Weng, C.J., 2018. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA using RNAscope in situ hybridization. *Chin. J. Prev. Vet. Med.* 40, 596–600.
26. Dénes, L., Horváth, D.G., Duran, O., Rathkjen, P.H., Kraft, C., Ács, B., Szász, A.M., Rümenapf, T., Papp, M., Ladinig, A., Balka, G., 2021. In Situ Hybridization of PRRSV-1 Combined with Digital Image Analysis in Lung Tissues of Pigs Challenged with PRRSV-1. *Vet. Sci.* 8, 235. doi: 10.3390/vetsci8100235
27. Dénes, L., Ruedas-Torres, I., Szilasi, A., Balka, G., 2022. Detection and localization of atypical porcine pestivirus in the testicles of naturally infected, congenital tremor affected piglets. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, e621–e629. doi: 10.1111/tbed.14355
28. Dettwiler, M., Mauldin, E.A., Jastrebski, S., Gillette, D., Stefanovski, D., Durham, A.C., 2023. Prognostic clinical and histopathological features of canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma. *Vet. Pathol.* 60, 162–171. doi: 10.1177/03009858221140818
29. Donovan, T.A., Moore, F.M., Bertram, C.A., Luong, R., Bolfa, P., Klopfleisch, R., Tvedten, H., Salas, E.N., Whitley, D.B., Aubreville, M., Meuten, D.J., 2021. Mitotic Figures-Normal, Atypical, and Imposters: A Guide to Identification. *Vet. Pathol.* 58, 243–257. doi: 10.1177/0300985820980049
30. Duerlinger, S., Knecht, C., Sawyer, S., Balka, G., Zaruba, M., Ruemenapf, T., Kraft, C., Rathkjen, P.H., Ladinig, A., 2022. Efficacy of a Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) Vaccine against Experimental Infection with PRRSV AUT15-33 in Weaned Piglets. *Vaccines (Basel)*. 10, 934. doi: 10.3390/vaccines10060934
31. Egli, C., Thür, B., Liu, L., Hofmann, M.A., 2001. Quantitative TaqMan RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods.* 98, 63–75. doi: 10.1016/s0166-0934(01)00358-5
32. Ellis, J., 2014. Porcine circovirus: a historical perspective. *Vet. Pathol.* 51, 315–327. doi: 10.1177/0300985814521245
33. Fehér, E., Jakab, F., Bányai, K., 2023. Mechanisms of circovirus immunosuppression and pathogenesis with a focus on porcine circovirus 2: a review. *Vet. Q.* 43, 1–18. doi: 10.1080/01652176.2023.2234430
34. Finney, C.A., Jones, N.M., Morris, M.J., 2021. A scalable, fully automated approach for regional quantification of immunohistochemical staining of astrocytes in the rat brain. *J. Neurosci. Methods.* 348, 108994. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108994
35. Fónyad, L., Gerely, L., Cserneky, M., Molnár, B., Matolcsy, A., 2010. Shifting gears higher--digital slides in graduate education--4 years experience at Semmelweis University. *Diagn. Pathol.* 5, 73. doi: 10.1186/1746-1596-5-73.
36. Fónyad, L., Krenács, T., Nagy, P., Zalathnai, A., Csomor, J., Sápi, Z., Pápay, J., Schönleber, J., Diczházi, C., Molnár, B., 2012. Validation of diagnostic accuracy using digital slides in routine histopathology. *Diagn. Pathol.* 7, 35. doi:10.1186/1746-1596-7-35
37. Franzo, G., Segalés, J., 2020. Porcine Circovirus 2 Genotypes, Immunity and Vaccines: Multiple Genotypes but One Single Serotype. *Pathogens.* 9, 1049. doi: 10.3390/pathogens9121049

38. Gagnon, C.A., Lalonde, C., Provost, C., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus whole-genome sequencing efficacy with field clinical samples using a poly(A)-tail viral genome purification method. *J. Vet. Diagn. Invest.* 33, 216–226. doi: 10.1177/1040638720952411
39. Gatumu, M.K., MacMillan, F.M., Langton, P.D., Headley, P.M., Harris, J.R., 2014. Evaluation of usage of virtual microscopy for the study of histology in the medical, dental, and veterinary undergraduate programs of a UK University. *Anat. Sci. Educ.* 7, 389–398. doi: 10.1002/ase.1425
40. Go, H., 2022. Digital Pathology and Artificial Intelligence Applications in Pathology. *Brain Tumor Res. Treat.* 10, 76–82. doi: 10.14791/btrt.2021.0032
41. Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 187, 23–32. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.01.018
42. Guo, J., Hou, L., Zhou, J., Wang, D., Cui, Y., Feng, X., Liu, J., 2022. Porcine Circovirus Type 2 Vaccines: Commercial Application and Research Advances. *Viruses*. 14, 2005. doi: 10.3390/v14092005
43. Halami, M.Y., Freick, M., Shehata, A.A., Müller, H., Vahlenkamp, T.W., 2014. Susceptibility of calves to porcine circovirus-2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* 173, 125–131. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.06.022
44. Hamilton, P.W., Bankhead, P., Wang, Y., Hutchinson, R., Kieran, D., McArt, D.G., James, J., Salto-Tellez, M., 2014. Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods*. 70, 59–73. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.06.015
45. Han, K., Seo, H.W., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Kang, S.H., Kim, S.H., Lee, B.H., Kwon, B., Chae, C., 2012. Evaluation of monoclonal antibody-based immunohistochemistry for the detection of European and North American Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and a comparison with in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 719–724. doi: 10.1177/1040638712446507
46. Hanna, M.G., Ardon, O., 2023. Digital pathology systems enabling quality patient care. *Genes Chromosomes Cancer*. 62, 685–697. doi: 10.1002/gcc.23192.
47. Hanna, M.G., Reuter, V.E., Samboy, J., England, C., Corsale, L., Fine, S.W., Agaram, N.P., Stamelos, E., Yagi, Y., Hameed, M., Klimstra, D.S., Sirintrapun, S.J., 2019. Implementation of Digital Pathology Offers Clinical and Operational Increase in Efficiency and Cost Savings. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 143, 1545–1555. doi: 10.5858/arpa.2018-0514-OA
48. Harding, J.C.S., Ladinig, A., Novakovic, P., Detmer, S.E., Wilkinson, J.M., Yang, T., Lunney, J.K., Plastow, G.S., 2017. Novel insights into host responses and reproductive pathophysiology of porcine reproductive and respiratory syndrome caused by PRRSV-2. *Vet. Microbiol.* 209, 114–123. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.02.019
49. Harding, J.C., Baker, C., Rhodes, C., McIntosh, K.A., Bonneau, M., 2009. Ring tests to evaluate the performance of Porcine circovirus-2 (PCV-2) polymerase chain reaction (PCR) assays used in North American diagnostic laboratories. *Can. J. Vet. Res.* 73, 7–14.
50. Harding, J.C., Baker, C.D., Tumber, A., McIntosh, K.A., Parker, S.E., Middleton, D.M., Hill, J.E., Ellis, J.A., Krakowka, S., 2008. Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with

- lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 274–282. doi: 10.1177/104063870802000303
51. He, S., Li, L., Chen, H., Hu, X., Wang, W., Zhang, H., Wei, R., Zhang, X., Chen, Y., Liu, X., 2022. PRRSV Infection Induces Gasdermin D-Driven Pyroptosis of Porcine Alveolar Macrophages through NLRP3 Inflammasome Activation. *J. Virol.* 96, e0212721. doi: 10.1128/jvi.02127-21
 52. Hellen, D.J., Karpen, S.J., 2023. LiverQuant: An Improved Method for Quantitative Analysis of Liver Pathology. *Bio. Protoc.* 13, e4776. doi: 10.21769/BioProtoc.4776
 53. Horváth, D.G., Abonyi-Tóth, Z., Papp, M., Szász, A.M., Rümenapf, T., Knecht, C., Kreutzmann, H., Ladinig, A., Balka, G., 2023. Quantitative Analysis of Inflammatory Uterine Lesions of Pregnant Gilts with Digital Image Analysis Following Experimental PRRSV-1 Infection. *Animals (Basel)*. 13, 830. doi: 10.3390/ani13050830
 54. Horváth, D.G., Sós, E., Dénes, L., Dán, Á., Biksi, I., Balka, G., 2020. Az elefántok endotheliotropikus herpeszvírusa. *Irodalmi összefoglaló. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA.* 142, 303–312.
 55. Hosseini, M.S., Bejnordi, B.E., Trinh, V.Q., Chan, L., Hasan, D., Li, X., Yang, S., Kim, T., Zhang, H., Wu, T., Chinniah, K., Maghsoudlou, S., Zhang, R., Zhu, J., Khaki, S., Buin, A., Chaji, F., Salehi, A., Nguyen, B.N., Samaras, D., Plataniotis, K.N., 2024. Computational pathology: A survey review and the way forward. *J. Pathol. Inform.* 15, 100357. doi: 10.1016/j.jpi.2023.100357
 56. Hu, Z., Tian, X., Lai, R., Ji, C., Li, X., 2023. Airborne transmission of common swine viruses. *Porcine Health Manag.* 9, 50. doi: 10.1186/s40813-023-00346-6
 57. Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segalés, J., Baumgaertner, W., 2009. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet. Microbiol.* 138, 27–33. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.02.005
 58. Maxie, M.G., 2016. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Sixth Ed, Vol 2, Elsevier. Amsterdam.
 59. Karniychuk, U.U., De Spiegelaere, W., Nauwynck, H.J., 2013. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection is associated with an increased number of Sn-positive and CD8-positive cells in the maternal-fetal interface. *Virus Res.* 176, 285–291. doi: 10.1016/j.virusres.2013.05.005
 60. Klauschen, F., Wienert, S., Schmitt, W.D., Loibl, S., Gerber, B., Blohmer, J.U., Huober, J., Rüdiger, T., Erbstößer, E., Mehta, K., Lederer, B., Dietel, M., Denkert, C., von Minckwitz, G., 2015. Standardized Ki67 Diagnostics Using Automated Scoring--Clinical Validation in the GeparTrio Breast Cancer Study. *Clin. Cancer Res.* 21, 3651–3657. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1283
 61. Kogan, L.R., Dowers, K.L., Cerda, J.R., Schoenfeld-Tacher, R., Stewart, S., 2014. Virtual microscopy: a useful tool for meeting evolving challenges in the veterinary medical curriculum. *J. Sci. Educ. Technol.* 2014, 23, 756–762. doi: 10.1007/s10956-014-9508-6
 62. Kreutzmann, H., Dürlinger, S., Knecht, C., Koch, M., Cabana, M., Torrent, G., Balasch, M., Taylor, L.P., Balka, G., Gerner, W., Ladinig, A., 2021. Efficacy of a Modified Live Virus Vaccine against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) Administered to 1-Day-Old Piglets in Front of Heterologous PRRSV-1 Challenge. *Pathogens.* 10, 1342. doi: 10.3390/pathogens10101342

63. Kreutzmann, H., Stadler, J., Knecht, C., Sassu, E.L., Ruczizka, U., Zablotski, Y., Vatzia, E., Balka, G., Zaruba, M., Chen, H.W., Riedel, C., Rümenapf, T., Ladinig, A., 2022. Phenotypic Characterization of a Virulent PRRSV-1 Isolate in a Reproductive Model With and Without Prior Heterologous Modified Live PRRSV-1 Vaccination. *Front. Vet. Sci.* 9, 820233. doi: 10.3389/fvets.2022.820233
64. Ladinig, A., Ashley, C., Detmer, S.E., Wilkinson, J.M., Lunney, J.K., Plastow, G., Harding, J.C., 2015. Maternal and fetal predictors of fetal viral load and death in third trimester, type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected pregnant gilts. *Vet. Res.* 46, 107. doi: 10.1186/s13567-015-0251-7
65. Ladinig, A., Wilkinson, J., Ashley, C., Detmer, S.E., Lunney, J.K., Plastow, G., Harding, J.C., 2014. Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One.* 9, e96104. doi: 10.1371/journal.pone.0096104
66. Landmann, M., Scheibner, D., Gischke, M., Abdelwhab, E.M., Ulrich, R., 2024. Automated quantification of avian influenza virus antigen in different organs. *Sci. Rep.* 14, 8766. doi: 10.1038/s41598-024-59239-5
67. Lopez, W., Angulo, J., Zimmerman, J., 2018. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *Journal of Swine Health and Production.* 26, 146–150. doi: 10.54846/jshap/1055
68. Lorincz, M., Cságola, A., Biksi, I., Szeredi, L., Dán, A., Tuboly, T., 2010. Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Vet. Hung.* 58, 265–268. doi: 10.1556/AVet.58.2010.2.12
69. Loughrey, M.B., Bankhead, P., Coleman, H.G., Hagan, R.S., Craig, S., McCorry, A.M.B., Gray, R.T., McQuaid, S., Dunne, P.D., Hamilton, P.W., James, J.A., Salto-Tellez, M., 2018. Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis. *Histopathology.* 73, 327–338. doi: 10.1111/his.13516
70. Louis, D.N., Gerber, G.K., Baron, J.M., Bry, L., Dighe, A.S., Getz, G., Higgins, J.M., Kuo, F.C., Lane, W.J., Michaelson, J.S., Le, L.P., Mermel, C.H., Gilbertson, J.R., Golden, J.A., 2014. Computational pathology: an emerging definition. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138, 1133–1138. doi: 10.5858/arpa.2014-0034-ED
71. Luchini, C., Pantanowitz, L., Adsay, V., Asa, S.L., Antonini, P., Girolami, I., Veronese, N., Nottegar, A., Cingarlini, S., Landoni, L., Brosens, L.A., Verschuur, A.V., Mattiolo, P., Pea, A., Mafficini, A., Milella, M., Niazi, M.K., Gurcan, M.N., Eccher, A., Cree, I.A., Scarpa, A., 2022. Ki-67 assessment of pancreatic neuroendocrine neoplasms: Systematic review and meta-analysis of manual vs. digital pathology scoring. *Mod. Pathol.* 35, 712–720. doi: 10.1038/s41379-022-01055-1
72. Lunney, J.K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G.J., 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 129–154. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111025
73. Madabhushi, A., Lee, G., 2016. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Med Image Anal.* 33, 170–175. doi: 10.1016/j.media.2016.06.037

74. Malgarin, C.M., Nosach, R., Novakovic, P., Suleman, M., Ladinig, A., Detmer, S.E., MacPhee, D.J., Harding, J.C.S., 2019. Classification of fetal resilience to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) based on temporal viral load in late gestation maternal tissues and fetuses. *Virus Res.* 260, 151–162. doi: 10.1016/j.virusres.2018.12.002
75. Martín-Valls, G.E., Cortey, M., Allepuz, A., Illas, F., Tello, M., Mateu, E., 2022. Description of a New Clade within Subtype 1 of Betaarterivirus suid 1 Causing Severe Outbreaks in Spain. *Microbiol. Resour. Announc.* 11, e0030422. doi: 10.1128/mra.00304-22
76. Mendelsohn, M.L., Kolman, W.A., Perry, B., Prewitt, J.M., 1965. Computer analysis of cell images. *Postgrad. Med.* 38, 567–573. doi: 10.1080/00325481.1965.11695692.
77. Meng, X.J., 2013. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 43–64. doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103720
78. Montalto, M.C., McKay, R.R., Filkins, R.J., 2011. Autofocus methods of whole slide imaging systems and the introduction of a second-generation independent dual sensor scanning method. *J. Pathol. Inform.* 2, 44. doi: 10.4103/2153-3539.86282
79. Moratin, J., Mock, A., Obradovic, S., Metzger, K., Flechtenmacher, C., Zaoui, K., Fröhling, S., Jäger, D., Krauss, J., Hoffmann, J., Freier, K., Horn, D., Hess, J., Freudlsperger, C., 2021. Digital Pathology Scoring of Immunohistochemical Staining Reliably Identifies Prognostic Markers and Anatomical Associations in a Large Cohort of Oral Cancers. *Front. Oncol.* 11, 712944. doi: 10.3389/fonc.2021.712944
80. Morriss, N.J., Conley, G.M., Ospina, S.M., Meehan Iii, W.P., Qiu, J., Mannix, R., 2020. Automated Quantification of Immunohistochemical Staining of Large Animal Brain Tissue Using QuPath Software. *Neuroscience.* 429, 235–244. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.01.006
81. Mysona, B.A., Segar, S., Hernandez, C., Kim, C., Zhao, J., Mysona, D., Bollinger, K.E., 2020. QuPath Automated Analysis of Optic Nerve Degeneration in Brown Norway Rats. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 9, 22. doi: 10.1167/tvst.9.3.22
82. Nagy, S.Á., Csabai, I., Varga, T., Póth-Szebenyi, B., Gábor, G., Solymosi, N., 2023. Mesterséges neurális hálózatok az állatiternék-előállításban. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA.* 145, 309–319.
83. Neel, J.A., Grindem, C.B., Bristol, D.G., 2007. Introduction and evaluation of virtual microscopy in teaching veterinary cytopathology. *J. Vet. Med. Educ.* 34, 437–444. doi: 10.3138/jvme.34.4.437
84. Niazi, M.K.K., Parwani, A.V., Gurcan, M.N., 2019. Digital pathology and artificial intelligence. *Lancet Oncol.* 20, e253–e261. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30154-8
85. Ning, X., Liu, R., Wang, N., Xiao, X., Wu, S., Wang, Y., Yi, C., He, Y., Li, D., Chen, H., 2023. Development of a deep learning-based model to diagnose mixed-type gastric cancer accurately. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 162, 106452. doi: 10.1016/j.biocel.2023.106452
86. Novakovic, P., Detmer, S.E., Suleman, M., Malgarin, C.M., MacPhee, D.J., Harding, J.C.S., 2018. Histologic Changes Associated With Placental Separation in Gilts Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Pathol.* 55, 521–530. doi: 10.1177/0300985818765067

87. Novakovic, P., Harding, J.C., Al-Dissi, A.N., Ladinig, A., Detmer, S.E., 2016. Pathologic Evaluation of Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection at the Maternal-Fetal Interface of Late Gestation Pregnant Gilts. *PLoS One*. 11, e0151198. doi: 10.1371/journal.pone.0151198
88. Novakovic, P., Harding, J.C., Ladinig, A., Al-Dissi, A.N., MacPhee, D.J., Detmer, S.E., 2016. Relationships of CD163 and CD169 positive cell numbers in the endometrium and fetal placenta with type 2 PRRSV RNA concentration in fetal thymus. *Vet. Res.* 47, 76. doi: 10.1186/s13567-016-0364-7
89. Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Domingo, M., 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J. Virol. Methods* 117, 75–80. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.12.007
90. Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591–615. doi: 10.1177/104063870701900601
91. Opriessnig, T., Prickett, J.R., Madson, D.M., Shen, H.G., Juhan, N.M., Pogranichniy, R.R., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Vet. Res.* 41, 31. doi: 10.1051/vetres/2010003
92. Ouyang, Y., Nauwynck, H.J., 2023. PCV2 Uptake by Porcine Monocytes Is Strain-Dependent and Is Associated with Amino Acid Characteristics on the Capsid Surface. *Microbiol. Spectr.* 11, e0380522. doi: 10.1128/spectrum.03805-22
93. Pallua, J.D., Brunner, A., Zelger, B., Schirmer, M., Haybaeck, J., 2020. The future of pathology is digital. *Pathol. Res. Pract.* 216, 153040. doi: 10.1016/j.prp.2020.153040
94. Plana, J., Vayreda, M., Vilarrasa, J., Bastons, M., Rosell, R., Martinez, M., San Gabriel, A., Pujols, J., Badiola, J.L., Ramos, J.A., et al., 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet. Microbiol.* 33, 203–211. doi: 10.1016/0378-1135(92)90048-x
95. Plass, M., Kargl, M., Kiehl, T.R., Regitnig, P., Geißler, C., Evans, T., Zerbe, N., Carvalho, R., Holzinger, A., Müller, H., 2023. Explainability and causability in digital pathology. *J. Pathol. Clin. Res.* 9, 251–260. doi: 10.1002/cjp.2.322
96. Porter, R.J., Din, S., Bankhead, P., Oniscu, A., Arends, M.J., 2023. QuPath Algorithm Accurately Identifies MLH1-Deficient Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers in a Tissue Microarray. *Diagnostics (Basel)*. 13, 1890. doi: 10.3390/diagnostics13111890
97. Prelaj, A., Miskovic, V., Zanitti, M., Trovo, F., Genova, C., Viscardi, G., Rebuzzi, S.E., Mazzeo, L., Provenzano, L., Kosta, S., Favali, M., Spagnoletti, A., Castelo-Branco, L., Dolezal, J., Pearson, A.T., Lo Russo, G., Proto, C., Ganzinelli, M., Giani, C., Ambrosini, E., Turajlic, S., Au, L., Koopman, M., Delaloge, S., Kather, J.N., de Braud, F., Garassino, M.C., Pentheroudakis, G., Spencer, C., Pedrocchi, A.L.G., 2024. Artificial intelligence for predictive biomarker discovery in immuno-oncology: a systematic review. *Ann. Oncol.* 35, 29–65. doi: 10.1016/j.annonc.2023.10.125

98. Resendes, A.R., Segalés, J., 2015. Characterization of vascular lesions in pigs affected by porcine circovirus type 2-systemic disease. *Vet. Pathol.* 52, 497–504. doi: 10.1177/0300985814540542
99. Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 78–89. doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.002
100. Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Balasch, M., Rodríguez-Arriola, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120, 59–78. doi: 10.1053/jcpa.1998.0258
101. Rossow, K.D., 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35, 1–20. doi: 10.1177/030098589803500101
102. Ruedas-Torres, I., Sánchez-Carvajal, J.M., Salguero, F.J., Pallarés, F.J., Carrasco, L., Mateu, E., Gómez-Laguna, J., Rodríguez-Gómez, I.M., 2024. The scene of lung pathology during PRRSV-1 infection. *Front. Vet. Sci.* 11, 1330990. doi: 10.3389/fvets.2024.1330990
103. Russell, G.G., Palmieri, C., Darby, J., Morris, G.P., Fountain-Jones, N.M., Pye, R.J., Flies, A.S., 2023. Automated Analysis of PD1 and PDL1 Expression in Lymph Nodes and the Microenvironment of Transmissible Tumors in Tasmanian Devils. *Immunol. Invest.* 52, 661–680. doi: 10.1080/08820139.2023.2217845
104. Sagrera, M., Garza-Moreno, L., Sibila, M., Oliver-Ferrando, S., Cárcelos, S., Casanovas, C., Prieto, P., García-Flores, A., Espigares, D., Segalés, J., 2024. Frequency of PCV-2 viremia in nursery piglets from a Spanish swine integration system in 2020 and 2022 considering PRRSV infection status. *Porcine Health Manag.* 10, 4. doi: 10.1186/s40813-024-00354-0
105. Sánchez-Carvajal, J.M., Ruedas-Torres, I., Carrasco, L., Pallarés, F.J., Mateu, E., Rodríguez-Gómez, I.M., Gómez-Laguna, J., 2021. Activation of regulated cell death in the lung of piglets infected with virulent PRRSV-1 Lena strain occurs earlier and mediated by cleaved Caspase-8. *Vet. Res.* 52, 12. doi: 10.1186/s13567-020-00882-x
106. Sarkis, R., Burri, O., Royer-Chardon, C., Schyrr, F., Blum, S., Costanza, M., Cherix, S., Piazzon, N., Barcena, C., Bisig, B., Nardi, V., Sarro, R., Ambrosini, G., Weigert, M., Spertini, O., Blum, S., Deplancke, B., Seitz, A., de Leval, L., Naveiras, O., 2023. MarrowQuant 2.0: A Digital Pathology Workflow Assisting Bone Marrow Evaluation in Experimental and Clinical Hematology. *Mod. Pathol.* 36, 100088. doi: 10.1016/j.modpat.2022.100088
107. Schulze, M., Revilla-Fernández, S., Schmoll, F., Grossfeld, R., Griessler, A., 2013. Effects on boar semen quality after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a case report. *Acta Vet. Scand.* 55, 16. doi: 10.1186/1751-0147-55-16
108. Segalés, J., Belák, K., Bille-Hansen, V., et al., 2010. International immunohistochemistry ring trial for the detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) antigen on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. pp:316.
109. Segalés, J., Domingo, M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Q.* 24, 109–124. doi: 10.1080/01652176.2002.9695132

110. Segalés, J., Sibila, M., 2022. Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Vet. Sci.* 9, 110. doi: 10.3390/vetsci9030110
111. Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10–19. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007
112. Seung, B.J., Cho, S.H., Kim, S.H., Lim, H.Y., Sur, J.H., 2020. Quantitative analysis of HER2 mRNA expression by RNA in situ hybridization in canine mammary gland tumors: Comparison with immunohistochemistry analysis. *PLoS One.* 15, e0229031. doi: 10.1371/journal.pone.0229031
113. Sinn, L.J., Klingler, E., Lamp, B., Brunthaler, R., Weissenböck, H., Rümenapf, T., Ladinig, A., 2016. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria. *Porcine Health Manag.* 2, 28. doi: 10.1186/s40813-016-0044-z
114. Song, J., Gao, P., Kong, C., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., Han, J., Yang, H., 2019. The nsp2 Hypervariable Region of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain JXwn06 Is Associated with Viral Cellular Tropism to Primary Porcine Alveolar Macrophages. *J. Virol.* 93, e01436–19. doi: 10.1128/JVI.01436-19
115. Stålhammar, G., Fuentes, Martinez, N., Lippert, M., Tobin, N.P., Mølholm, I., Kis, L., Rosin, G., Rantalainen, M., Pedersen, L., Bergh, J., Grunkin, M., Hartman, J., 2016. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod. Pathol.* 29, 318–329. doi: 10.1038/modpathol.2016.34
116. Stålhammar, G., Robertson, S., Wedlund, L., Lippert, M., Rantalainen, M., Bergh, J., Hartman, J., 2018. Digital image analysis of Ki67 in hot spots is superior to both manual Ki67 and mitotic counts in breast cancer. *Histopathology.* 72, 974–989. doi: 10.1111/his.13452
117. Stas, M.R., Kreutzmann, H., Stadler, J., Sassu, E.L., Mair, K.H., Koch, M., Knecht, C., Stadler, M., Dolezal, M., Balka, G., Zaruba, M., Mötz, M., Saalmüller, A., Rümenapf, T., Gerner, W., Ladinig, A., 2022. Influence of PRRSV-1 vaccination and infection on mononuclear immune cells at the maternal-fetal interface. *Front. Immunol.* 13, 1055048. doi: 10.3389/fimmu.2022.1055048
118. Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2008. Porcine Circovirus Type 2 Displays Pluripotency in Cell Targeting. *Virology.* 378, 311–322. doi: 10.1016/j.virol.2008.06.009
119. Szabó, I., Nemes, I., Bognár, L., Terjék, Z., Molnár, T., Abonyi, T., Bálint, Á., Horváth, D.G., Balka, G., 2023. Eradication of PRRS from Hungarian Pig Herds between 2014 and 2022. *Animals (Basel).* 13, 3747. doi: 10.3390/ani13243747
120. Szeredi, L., Szentirmai, C., 2008. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet. Hung.* 56, 101–109. doi: 10.1556/AVet.56.2008.1.10
121. Szilasi, A., Dénes, L., Jakab, C., Erdélyi, I., Resende, T., Vannucci, F., Csomor, J., Mándoki, M., Balka G., 2020. In situ hybridization of feline leukemia virus in a primary neural B-cell lymphoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32, 454–457. doi: 10.1177/1040638720915449
122. Thorstenson, S., Molin, J., Lundström, C., 2014. Implementation of large-scale routine diagnostics using whole slide imaging in Sweden: Digital pathology experiences 2006-2013. *J. Pathol. Inform.* 5, 14. doi: 10.4103/2153-3539.129452

123. Toussaint, J.F., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., De Clercq, K., 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods.* 140, 115–123. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.007
124. Trang, N.T., Hirai, T., Ngan, P.H., Lan, N.T., Fuke, N., Toyama, K., Yamamoto, T., Yamaguchi, R., 2015. Enhanced detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fixed tissues by in situ hybridization following tyramide signal amplification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 326–331. doi: 10.1177/1040638715579260
125. Turner, O.C., Aeffner, F., Bangari, D.S., High, W., Knight, B., Forest, T., Cossic, B., Himmel, L.E., Rudmann, D.G., Bawa, B., Muthuswamy, A., Aina, O.H., Edmondson, E.F., Saravanan, C., Brown, D.L., Sing, T., Sebastian, M.M., 2020. Society of Toxicologic Pathology Digital Pathology and Image Analysis Special Interest Group Article*: Opinion on the Application of Artificial Intelligence and Machine Learning to Digital Toxicologic Pathology. *Toxicol. Pathol.* 48, 277–294. doi: 10.1177/0192623319881401
126. Van Alstine, W.G., Popielarczyk, M., Albregts, S.R., 2002. Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 504–507. doi: 10.1177/104063870201400611
127. Wang, G., Yu, Y., He, X., Wang, M., Cai, X., Zimmerman, J.J., 2019. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of bone marrow: Lesions and pathogenesis. *Virus Res.* 265, 20–29. doi: 10.1016/j.virusres.2019.02.019
128. Webster, J.D., Dunstan, R.W., 2014. Whole-slide imaging and automated image analysis: considerations and opportunities in the practice of pathology. *Vet. Pathol.* 51, 211–223. doi: 10.1177/0300985813503570
129. Weinstein, R.S., 1986. Prospects for telepathology. *Hum. Pathol.* 17, 433–434. doi: 10.1016/s0046-8177(86)80028-4
130. Whitworth, K.M., Rowland, R.R., Ewen, C.L., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Samuel, M.S., Lightner, J.E., McLaren, D.G., Mileham, A.J., Wells, K.D., Prather, R.S., 2016. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.* 34, 20–22. doi: 10.1038/nbt.3434
131. Wu, J., Luo, T., Zeng, J., Gou, F., 2024. Continuous Refinement-based Digital Pathology Image Assistance Scheme in Medical Decision-Making Systems. *IEEE J. Biomed. Health. Inform.* doi: 10.1109/JBHI.2024.3351287. Epub ahead of print.
132. Yousif, M., Huang, Y., Sciallis, A., Kleer, C.G., Pang, J., Smola, B., Naik, K., McClintock, D.S., Zhao, L., Kunju, L.P., Balis, U.G.J., Pantanowitz, L., 2022. Quantitative Image Analysis as an Adjunct to Manual Scoring of ER, PgR, and HER2 in Invasive Breast Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 157, 899–907. doi: 10.1093/ajcp/aqab206
133. Yu, C., Cao, M., Wei, Y., Liu, J., Zhang, H., Liu, C., Feng, L., Huang, L., 2023. Evaluation of cross-immunity among major porcine circovirus type 2 genotypes by infection with PCV2b and PCV2d circulating strains. *Vet. Microbiol.* 283, 109796. doi: 10.1016/j.vetmic.2023.109796
134. Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Zhang, J., editors. 2019. *Diseases of Swine*, 11th Ed. Wiley Blackwell. Hoboken.

135. Zuraw, A., Aeffner, F., 2022. Whole-slide imaging, tissue image analysis, and artificial intelligence in veterinary pathology: An updated introduction and review. *Vet. Pathol.* 59, 6–25. doi: 10.1177/03009858211040484

11. A doktori kutatás eredményeinek közzélései

11.1. A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktorra bíró tudományos folyóiratban megjelent közlemények

- Horváth DG, Abonyi-Tóth Z, Papp M, Szász AM, Rümenapf T, Knecht C, Kreutzmann H, Ladinig A, Balka G. Quantitative Analysis of Inflammatory Uterine Lesions of Pregnant Gilts with Digital Image Analysis Following Experimental PRRSV-1 Infection. *Animals (Basel)*. 2023 Feb 24;13(5):830. doi: 10.3390/ani13050830. PMID: 36899686; PMCID: PMC10000175.
- Dénes L, Horváth DG, Duran O, Ratkhjen PH, Kraft C, Ács B, Szász AM, Rümenapf T, Papp M, Ladinig A, Balka G (2021): In Situ Hybridization of PRRSV-1 Combined with Digital Image Analysis in Lung Tissues of Pigs Challenged with PRRSV-1. *Veterinary Science*. 8:235.
- Horváth DG, Dénes L, Igriczi B, Papp M, Hidalgo-Martínez V, Segalés J, Balka G. Digital quantification of porcine circovirus 2 (PCV-2)-infected cells in lymph nodes of pigs with natural PCV-2 systemic disease shows strong association with manual scoring and quantitative PCR. *Vet Pathol*. 2025 Apr 21:3009858251331121. doi: 10.1177/03009858251331121. Epub ahead of print. PMID: 40257232.
- Horváth DG, Balka G (2025): Digitális metszetelemzés az állatorvosi patológiában. *Magyar Allatorvosok Lapja*, közzésre elfogadva.

11.2. A doktori értekezés témájában tartott előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon

- Vemhes kocasüldők gyulladásos méheltváltozásainak kvantitatív elemzése digitális képelemző szoftverrel kísérleti PRRSV-fertőzést követően. Akadémiai beszámoló 2022.
- 13th European Symposium of Porcine Health Management, 2022, Budapest. E-poster: Quantitative analysis of inflammatory uterine lesions of pregnant gilts with digital image analysis software following experimental PRRSV-infection.
- Digitális metszetelemzés és sejtszámlálás a PCV-2-SD (PMWS) diagnosztikájában. Magyar Sertésegészségügyi Társaság (MASETA): 30. Köves Napok, 2024.

11.3. A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények, előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon

A. Publikációk

- Madai M, Hanna D, Hetényi R, Földes F, Lanszki Z, Zana B, Somogyi B, Papp H, Kuczmog A, Faragó-Sipos O, Nemes C, Palya V, Horváth DG, Balka G, Bányai K, Jia X, Balogh P, Kemenesi G, Bajnóczi P. Evaluating the Protective Role of Intranasally Administered Avian-derived IgY against SARS-CoV-2 in Syrian Hamster Models. *Preprints* 2024, 2024100832. <https://doi.org/10.20944/preprints202410.0832.v1>
- Mátis G, Sebők C, Horváth DG, Márton RA, Mackei M, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrady Z, Varga I, Tráj P. Miniature chicken ileal explant culture to investigate the inflammatory response

induced by pathogen associated molecular patterns (January 5, 2024). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4685306> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4685306>

- Vörösházi J, Mackei M, Sebők C, Tráj P, Márton RA, Horváth DG, Huber K, Neogrady Z, Mátis G. Investigation of the effects of T-2 toxin in chicken-derived three-dimensional hepatic cell cultures. *Sci Rep.* 2024 Jan 12;14(1):1195. doi: 10.1038/s41598-024-51689-1. PMID: 38216675; PMCID: PMC10786837.
- Szabó I, Nemes I, Bognár L, Terjék Z, Molnár T, Abonyi T, Bálint Á, Horváth DG, Balka G. Eradication of PRRS from Hungarian Pig Herds between 2014 and 2022. *Animals (Basel).* 2023 Dec 5;13(24):3747. doi: 10.3390/ani13243747. PMID: 38136786; PMCID: PMC10740787.
- Szilasi A, Horváth DG, Balka G (2022): A macskák fertőző hashártyagyulladás, Irodalmi összefoglaló. *Magyar Allatorvosok Lapja.* 144:527-542.
- Horváth DG, Sós E, Dénes L, Dán Á, Biksi I, Balka G (2020): Az elefántok endotheliotropikus herpeszvírusa, Irodalmi összefoglaló. *Magyar Allatorvosok Lapja.* 142:303-312.
- Horváth DG, Tóth G, Lencse Z, Balka G (2021): Multirezisztens *Enterococcus faecium* okozta gerincvelőburok-gyulladás kutyában. *Magyar Allatorvosok Lapja.* 143:451-464.
- Dobra PF, Szilasi A, Vajdovich P, Erdélyi I, Horváth DG (2023): A háziállatok haemophagocytás histiocytás sarcomája Irodalmi összefoglaló és esetbemutatók. *Magyar Allatorvosok Lapja.* 145:725-734.

B. Előadások

- Az elefántok endotheliotropikus herpeszvírusának (EEHV) hazai megjelenése és kimutatása *in situ* hibridizációval. Akadémiai beszámoló 2021.
- 14th European Symposium of Porcine Health Management, 2023, Thessaloniki. E-poster: The applicability of different sample types for the detection of atypical porcine pestivirus.

12. Függelék

A reprodukciós modell eseteihez tartozó gyulladásoos sejtszámok, manuális pontozási és log10 qPCR-értékek.

Eset	Teljes sejtszám	Vas. súly V1	End. súly. V1	Vas. súly. V2	End. súly. V2	Csoport	Súly (g)	PCR szérum log10	PCR thymus log10	PCR endometrium log10	PCR placenta log10	CD163+ sejtek
js10I1	529	1	1	1	1	vacc/chall_L	773	0	0	0	0	
js10I4	622	2	1	1	1	vacc/chall_L	582	0	0	0	0	
js10I5	444	1	1	0	1	vacc/chall_L	848	0	0	0	0	
js10r1	843	1	1	1	1	vacc/chall_L	985	0	0	0	0	411
js10r2	581	1	1	1	1	vacc/chall_L	792	0	0	0	0	
js10r3	437	0	1	1	1	vacc/chall_L	847	0	0	0	0	
js10r6	798	0	1	1	1	vacc/chall_L	964	0	0	0	0	
js11I3	353	0	1	0	1	vacc/chall_L	901	0	0	0	0	
js12I2	347	1	1	0	1	vacc/chall_L	838	0	0	0	0	
js12I7	369	0	1	0	1	vacc/chall_L	1099	0	0	0	0	
js12I10	257	0	1	0	1	vacc/chall_L	1481	0	0	0	0	56
js12r2	151	0	1	0	1	vacc/chall_L	1182	0	0	0	0	
js12r4	233	0	1	1	1	vacc/chall_L	1013	0	0	0	0	
js12r5	471	0	1	0	1	vacc/chall_L	993	0	0	0	0	90
js12r10	242	0	1	1	1	vacc/chall_L	571	0	0	0	0	96
js13I3	429	1	1	1	1	vacc/chall_H	562	0	0	0	0	
js14I1	226	0	1	0	1	vacc/chall_H	1005	0	0	0	0	
js14I3	232	0	1	0	1	vacc/chall_H	648	0	0	0	0	161
js14I8	430	1	1	1	1	vacc/chall_H	544	0	0	0	0	
js14I9	281	1	1	1	1	vacc/chall_H	526	0	0	0	0	
js14r1	201	1	1	0	1	vacc/chall_H	921	0	0	0	0	
js14r3	246	1	1	1	1	vacc/chall_H	939	0	0	0	0	
js14r8	410	1	1	1	1	vacc/chall_H	806	0	0	0	0	
js15I3	97	0	1	0	1	vacc/chall_H	740	0	0	0	0	331
js15r4	260	0	1	0	1	vacc/chall_H	799	10,54749857	11,028738	8,535463161	8,556217274	
js15r5	210	1	1	1	1	vacc/chall_H	907	11,26734746	10,79531957	9,041180843	9,776820617	
js15r6	123	1	1	1	1	vacc/chall_H	765	11,19356389	11,05034198	8,83244499	9,140900629	
js16r2	490	1	1	1	1	vacc/chall_H	934	0	0	7,896366297	0	
js17I1	1026	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	774	0	0	0	0	
js17I4	517	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	907	0	0	0	0	283
js17I5	154	1	1	0	1	no_vacc/chall_L	755	0	0	7,520503791	0	229
js17I6	742	1	1	0	1	no_vacc/chall_L	850	0	0	0	8,763798058	
js19I3	505	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	526	0	0	0	0	
js19I5	592	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	660	0	0	6,662414872	0	
js19I7	860	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	549	0	0	0	0	
js19I10	950	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	406	0	0	0	0	
js19I11	283	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	820	10,38279101	11,59364709	5,438444505	9,894521311	

js19r6	869	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	510	0	0	4,547118009	0	
js20l1	621	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	932	0	0	0	0	47
js20l2	599	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	923	0	0	0	0	97
js20l4	335	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	682	0	0	0	0	
js20l5	608	0	1	0	1	no_vacc/chall_L	988	0	0	0	0	
js20l8	487	0	1	1	1	no_vacc/chall_L	353	0	0	8,431595326	0	189
js20l9	445	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	360	0	0	0	0	75
js20r1	935	1	1	2	2	no_vacc/chall_L	986	0	0	0	0	
js20r2	664	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	509	0	0	0	0	
js20r3	593	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	742	0	0	0	0	84
js20r4	623	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	506	0	0	0	0	
js20r8	563	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	343	0	0	0	0	
js20r9	375	1	1	1	1	no_vacc/chall_L	1150	0	0	0	0	
js21l1	362	0	1	1	1	no_vacc/chall_H	878	0	0	7,655069634	0	
js21l3	337	0	1	0	1	no_vacc/chall_H	562	0	0	8,242106472	0	
js23l3	665	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	548	5,997706307	0	0	NA	
js23l5	624	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	596	11,02262784	11,06702601	8,505247499	10,0359639	
js23r2	378	2	1	1	1	no_vacc/chall_H	747	7,70300211	0	0	0	93
js23r3	659	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	689	0	0	0	0	
js23r8	584	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	867	10,4003711	11,15614482	7,703128779	9,336062916	
js23r9	822	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	778	10,63669221	10,66461613	8,211903135	8,716907228	65
js23r11	761	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	858	11,41516477	12,23893912	8,680001172	9,908927645	127
js24l1	434	0	1	1	1	no_vacc/chall_H	839	11,14498846	10,14651216	8,564492875	9,107273125	
js24l2	619	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	976	11,46079489	10,59602048	8,805825437	9,522235409	
js24l6	796	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	870	0	0	0	6,374085661	
js24r3	766	1	1	1	2	no_vacc/chall_H	693	0	0	0	0	206
js24r4	1162	1	1	2	2	no_vacc/chall_H	NA	0	0	6,462504121	0	
js24r5	698	1	1	1	2	no_vacc/chall_H	795	0	0	0	0	
js24r6	475	1	1	1	1	no_vacc/chall_H	584	0	0	0	0	
js24r7	1167	2	1	1	2	no_vacc/chall_H	807	0	0	0	0	
js10l2	1551	2	2	2	2	vacc/chall_L	868	0	0	0	0	
js10l3	1151	2	2	2	2	vacc/chall_L	1066	0	0	0	0	
js10r5	1636	2	2	1	2	vacc/chall_L	945	0	0	0	0	
js10r7	1772	2	2	2	2	vacc/chall_L	939	0	0	0	0	
js10r8	787	1	2	1	2	vacc/chall_L	857	0	0	0	0	
js16r7	1174	1	2	2	2	vacc/chall_H	748	0	0	0	0	173
js18r1	961	1	2	1	2	no_vacc/chall_L	1209	0	0	0	0	
js18r2	1912	1	2	1	2	no_vacc/chall_L	1083	9,863176335	11,09202598	6,858174356	7,961029245	
js19l1	3869	2	2	2	2	no_vacc/chall_L	929	0	0	0	0	
js19l2	1653	2	2	2	2	no_vacc/chall_L	756	0	0	0	0	153
js19l6	998	2	2	1	2	no_vacc/chall_L	829	0	0	7,497237274	0	
js19l8	1932	1	2	2	2	no_vacc/chall_L	340	0	0	0	0	
js19l9	631	1	2	1	2	no_vacc/chall_L	508	0	0	7,954129213	0	

js19r1	1216	1	2	2	2	no_vacc/chall_L	937	0	0	8,251034148	0	125
js19r2	1573	2	2	2	2	no_vacc/chall_L	822	0	0	5,168216997	0	
js19r3	1289	1	2	1	2	no_vacc/chall_L	786	0	0	0	0	
js19r4	2806	2	2	2	2	no_vacc/chall_L	550	5,863671494	0	0	0	127
js19r5	1940	2	2	2	2	no_vacc/chall_L	683	0	0	0	0	41
js19r7	787	1	2	1	2	no_vacc/chall_L	391	0	0	8,725362886	0	
js21l2	2039	1	2	1	2	no_vacc/chall_H	517	6,357134809	0	0	0	320
js21l5	1847	1	2	1	2	no_vacc/chall_H	480	0	0	0	0	
js21r1	1358	1	2	1	2	no_vacc/chall_H	670	11,22084067	11,028738	8,951937819	10,20858792	67
js21r5	813	1	2	1	2	no_vacc/chall_H	557	0	0	0	0	
js21r7	2528	2	2	2	2	no_vacc/chall_H	811	0	0	0	0	
js22l1	1549	2	2	2	2	no_vacc/chall_H	836	10,58338016	11,13455453	10,2591046	10,91538067	124
js22r9	1697	2	2	2	2	no_vacc/chall_H	731	10,72594633	10,97668328	9,134747531	8,975893382	38
js22r10	1150	2	2	2	2	no_vacc/chall_H	519	11,3685695	11,279138	10,27841764	10,49050089	
js23l1	967	1	2	1	2	no_vacc/chall_H	1190	0	0	6,362109251	0	
js23l4	804	1	2	1	2	no_vacc/chall_H	939	10,66067579	10,52064877	9,203500104	9,499066571	
js23r1	2282	2	2	2	2	no_vacc/chall_H	900	5,78970055	0	0	0	
js23r4	1238	1	2	2	2	no_vacc/chall_H	555	10,3205526	10,14197247	8,741778063	9,320850328	
js23r5	808	1	2	2	2	no_vacc/chall_H	768	10,82647407	10,55598633	8,194032652	9,413926245	
js24l3	1752	2	2	2	2	no_vacc/chall_H	859	9,868651784	9,689230576	8,138451144	8,116054177	
js24l4	1201	2	2	2	2	no_vacc/chall_H	705	7,167969395	0	0	0	266
js24l5	1102	1	2	2	2	no_vacc/chall_H	949	0	0	0	0	
js24r1	947	1	2	2	2	no_vacc/chall_H	948	0	0	0	0	219
js24r2	950	0	2	1	1	no_vacc/chall_H	644	0	0	0	0	150
js10l6	3813	2	3	2	3	vacc/chall_L	777	0	0	0	0	910
js16l7	2632	2	3	2	3	vacc/chall_H	541	0	0	0	0	112
js17l2	4162	2	3	2	3	no_vacc/chall_L	1267	0	0	7,452945445	0	
js17l3	2732	2	3	2	3	no_vacc/chall_L	546	0	0	0	0	154
js17l7	5167	2	3	2	3	no_vacc/chall_L	964	0	0	8,769162732	0	
js17r3	3506	2	3	2	4	no_vacc/chall_L	1039	0	0	8,372882404	0	
js17r4	3302	2	3	2	3	no_vacc/chall_L	1027	0	0	7,765284648	0	
js17r6	2415	2	3	2	3	no_vacc/chall_L	858	0	0	0	0	
js17r7	4101	2	3	2	3	no_vacc/chall_L	982	0	0	8,989025661	0	274
js21l4	3193	2	3	2	2	no_vacc/chall_H	603	0	0	0	8,821961201	
js21l8	3775	2	3	2	3	no_vacc/chall_H	680	0	0	9,094961164	0	208
js21r4	2842	2	3	2	3	no_vacc/chall_H	483	0	0	9,58457763	0	
js21r6	2867	2	3	2	3	no_vacc/chall_H	386	0	0	8,773119152	0	
js22l3	2888	2	3	2	2	no_vacc/chall_H	273	11,10836203	11,05610159	10,2664415	9,993936112	
js22l5	2772	2	3	2	3	no_vacc/chall_H	832	10,71650833	11,23732173	9,80132256	9,369283832	123
js22l6	2358	2	3	2	2	no_vacc/chall_H	642	10,81450813	10,89719606	9,453456228	8,600143959	
js22l7	2729	3	3	2	3	no_vacc/chall_H	539	10,88525094	10,7178615	9,658311557	9,415431394	
js22r3	2660	2	3	2	3	no_vacc/chall_H	548	6,234661518	11,32855382	9,320383043	9,995291429	
js22r5	2801	2	3	2	2	no_vacc/chall_H	371	9,972302951	10,88297767	8,98880919	9,791958605	

js22r6	2381	2	3	2	2	no_vacc/chall_H	671	10,21446003	10,95770655	8,8556962	9,572197198	
js22r7	3565	2	3	2	3	no_vacc/chall_H	526	9,246867722	8,044439497	9,830508992	7,376831328	
js23l2	2273	1	3	2	2	no_vacc/chall_H	910	0	0	0	7,665424868	
js23r7	2277	2	3	2	3	no_vacc/chall_H	1050	10,57793535	10,2324918	7,898533964	9,747514675	
js17r1	5200	2	4	2	4	no_vacc/chall_L	818	10,58504315	9,735251782	8,345214202	8,514300929	
js17r2	4719	2	4	2	4	no_vacc/chall_L	881	0	0	7,708792141	0	
js17r5	4910	2	4	2	4	no_vacc/chall_L	759	0	0	0	0	
js22r11	3128	2	4	2	3	no_vacc/chall_H	795	11,14134471	10,22824385	10,08517362	9,395789459	
js1r5	213	0	0	0	0	no_vacc/no_chall						
js2l6	168	0	0	0	0	no_vacc/no_chall						
js5r9	94	0	0	0	0	vacc/no_chall						
js6l6	106	0	0	0	0	vacc/no_chall						
js9r3	104	0	0	0	0	vacc/chall_L						
js11l1	92	0	0	0	0	vacc/chall_L						
js13r1	285	0	0	0	0	vacc/chall_H						
js14l4	216	0	0	0	0	vacc/chall_H						
js20l3	200	0	0	0	0	no_vacc/chall_L						
js20l6	188	0	0	0	0	no_vacc/chall_L						

End. Súly. = endometritis súlyosság, Vas. Súly. = vasculitis súlyosság, V1 = 1-es vizsgáló, V2 = 2-es vizsgáló

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik közvetlenül vagy akár közvetve segítettek a PhD-munkám létrejöttében. A legnagyobb köszönet a témavezetőmet, dr. Balka Gyulát illeti, akihez bármilyen kérdés esetén fordulhattam. Köszönöm jelölttársamnak Igriczi Barbarának és dr. Dénes Lillának, akik a publikációk írásában és a PCR-vizsgálatok elvégzésében pótolhatatlan segítséget nyújtottak, továbbá köszönöm Pop Renátának a szövettani metszetek festéseinek elvégzését. Külön köszönet illeti a házi védésem és a nyilvános védésem opponenseit, Dr. Rusvai Miklós Professzor Urat, dr. Máthé Domokost és dr. Albert Mihályt, akik idejüket és energiájukat nem kímélve igyekeztek jobbra tenni a disszertációm és a prezentációm. Hálával tartozom ezen felül az összes szerzőtársamnak és a Patológiai Tanszék többi munkatársának, valamint szeretném megköszönni feleségemnek Lenkének, édesanyámnak és a barátaimnak, akik mindig támogattak.