

## Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

# Atipikus sertés-pestivírus kimutatása, elterjedtségének feltérképezése és genetikai jellemzése Magyarországon

Dénes Lilla

Témavezető: Dr. Balka Gyula



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2023

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Témavezető:**

.....

Dr. Balka Gyula

Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

Dr. Biksi Imre

Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

témabizottság tagja

Dr. Bálint Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a(z) ..... számú  
példány.

.....

Dénes Lilla

## Tartalomjegyzék

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései.....	3
2. Összefoglalás .....	4
3. Új tudományos eredmények .....	6
4. Publikációk .....	7
A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények .....	7

# 1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A *Pestivirus* nemzetségbe sorolt atipikus sertés-pestivírust (APPV) először 2015-ben azonosították az USA-ban. Azóta egyértelműen bebizonyosodott, hogy a vírus világszerte elterjedt házisertés- és vaddisznóállományokban egyaránt. A közelmúltban igazolták, hogy APPV-t tartalmazó vérrel vagy szövetszuspenzióval mesterségesen fertőzött vemhes kocák utódai az A-II-es típusú reszketőkór (congenital tremor, CT) klinikai tüneteit mutatták, amely hazánkban is egy régóta ismert kórkép.

Az értekezés keretében célul tűztük ki, hogy információt gyűjtsünk a Magyarországon kutatásunk előtt még nem azonosított vírus jelenlétével, elterjedtségével kapcsolatban, illetve, hogy felderítsük, milyen összefüggést mutat a már régóta, hazánkban is megfigyelt, újszülött malacokat érintő reszketőkór előfordulásával. Célunk volt

(i) különböző magyarországi sertéstelepekről származó mintákban az APPV kimutatása,

(ii) a begyűjtött APPV-törzsek részleges genomszekvencia-meghatározása és filogenetikai vizsgálata, melyek segíthetnek eredetük, terjedésük és genomevolúciójuk megismerésében,

(iii) célzott, országos prevalencia-vizsgálatok elvégzése a fertőzés elterjedtségének felmérése céljából,

(iv) a fertőzött állományokban az egyes korcsoportok érintettségének, fertőzöttségi arányának, a vírusterjedés állományon belüli dinamikájának felderítése,

(v) RNS-alapú in situ hibridizációs módszer (RNAscope) alkalmazása a vírus szöveti elváltozásokban való kimutatására, különös tekintettel a hereszövetben és az agyvelőben érintett sejttípusok azonosítására.

## 2. Összefoglalás

A klasszikus pestivírusok többnyire párosujjú patásokat fertőznek, közéjük soroljuk a szarvasmarha vírusos hasmenését okozó vírusokat (bovine viral diarrhoea virus, BVDV-1 és BVDV-2), a bányákat és kecskéket megbetegítő border disease vírust (border disease virus, BDV) és egy jelentős setéspatogént, a klasszikus sertéspestis vírusát (classical swine fever virus, CSFV), amely hazánkban utoljára 2009-ben fordult elő vaddisznóban, a korlátozó intézkedéseket pedig 2013-ban oldották fel az érintett területeken. Az utóbbi évtizedben több új pestivírust is azonosítottak különféle állatfajokban, ezen fajok egyike az atipikus sertés pestivírus (atypical porcine pestivirus, APPV). Az APPV első azonosítása óta egyértelműen bebizonyosodott, hogy a vírus világszerte elterjedt házisertés- és vaddisznóállományokban egyaránt. A klasszikus sertéspestishez hasonlóan, méhen belüli fertőződéskor reszketőkórt (congenital tremor, CT) okozhat az újszülött malacokban. A CSFV-vel ellentétben, amely az ún. A-I-es típusú CT-t okozza, az A-II-es típusú CT-vel született, APPV-fertőzött malacok választási korukra legtöbbször klinikailag egészségesekké válnak. Feltételezhetően ennek oka a vírus kisagyveleji lokalizációjának eltérése a két vírus esetében, ugyanis az APPV kizárólag a belső granularis és molecularis réteget (köztük a Purkinje-sejteket) fertőzi, így a fertőzés nyomán elpusztuló idegsejteket az érintetlen, külső granularis réteg sejtjei pótolni képesek. A vírus hónapokig ürülhet a már tünetmentes állatok bélsarával, továbbá az ivarérett kanok spermájával is.

2016-ban elsőként azonosítottuk a vírust hazai sertésletelepekről származó, reszketőkórból szenvedő sertések szövetmintáiból. A vírust 2005, 2007 és 2010-ből származó, reszketőkóros sertések archivált szövetmintáiból is azonosítottuk, tehát a vírus legalább 18 éve jelen van a hazai tenyészállományban. 2018–2022 között 26 magyarországi, és egy szlovákiai telepről gyűjtöttünk vérsavó-, herélési folyadék-, és rágókötélmintákat, amelyeket APPV kimutatására optimalizált RT-qPCR-módszerrel ellenőriztünk. Összesen 18 telepen mutattuk ki a vírus jelenlétét. Vérsavóminták esetén, telepenként átlagosan 100 vérsavómintát gyűjtöttünk 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 hetes állatoktól, továbbá süldőktől, kétszer és négyszer fiatal kocáktól, amelyeket 5-ös poolokban vizsgáltunk. Rágókötélmintákat 10 és 20 hetes állatoktól gyűjtöttünk. A nagymintaszámú keresztmetszeti vizsgálatok során 66,67%-os magyarországi prevalenciát állapítottunk meg, azaz a vizsgált magyarországi sertésletelepek kétharmada fertőzött a vírussal. Az érintett telepeken a vérsavóminták 6,3–50%-ában, a herélési folyadékminták 20–100%-

ában és a rágókötélminták 10–100%-ában mutattuk ki a vírust. A kocák, a 2 és a 4 hetes malacok mind negatívak voltak, a 12 hetesek, valamint a kocasüldők alacsony fertőzöttségi arányt mutattak (4–6%), a 6, 8, 14 és 18 hetesek (14–16%) és a 10 hetesek (27%) mutatták a legnagyobb pozitívítási arányt a vérsavómintáikban. Az APPV-pozitív rágókötélminták 41%-a 10 hetes, 59%-a 20 hetes állatoktól származott. Két telep esetében csak a rágókötélmintákban azonosítottuk az APPV-t, továbbá 5 fertőzött telepen nem tudtuk kimutatni a vírust herélési folyadék-mintákban. A herélési folyadék-minták abban az esetben bizonyultak diagnosztikai szempontból megbízhatónak, amikor egy telepről 5-nél többet vizsgáltunk.

Filogenetikai vizsgálataink alapján a meghatározott részleges APPV szekvenciák jellemzően európai szekvenciákkal alkotnak közös filogenetikai csoportot, de voltak olyan törzsek, amelyek egy Koreai Köztársaságban leírt mintával sorolhatóak egy monofiletikus csoportba. Eredményeink alapján a Magyarországon azonosított törzsek nem alkotnak telepenként külön-külön csoportokat, azonban előfordult, hogy egymástól átlagosan 100–300 km távolságra lévő telepeken hasonló/azonos törzseket is azonosítottunk. Habár jelenleg nincs információnk ezen telepek közötti kereskedelmi kapcsolatról, elképzelhető, hogy ezek a törzsek országon belüli kereskedelem útján jutottak el az egyes telepekre, esetleg közös forrásból származó kocasüldőket, vagy akár spermát használnak. Eredményeink arra utalnak, hogy az APPV genetikai diverzitásának fő mozgatórugója a törzsek helyi, divergens evolúciója, valamint a fertőzött, tünetmentes állatok és/vagy szaporítóanyag kereskedelme.

Fertőzött, 1–3 napos, továbbá egy CT-vel született, majd tünetmentessé váló, ivarérett kan heréjének *in situ* hibridizációs vizsgálata során az interstitialis Leydig-sejteket, a peritubularis myoid sejteket és közepes méretű artériák falának simaizomsejtjeit azonosítottuk a vírus célsejtjeiként. Megfigyeltük továbbá, hogy míg a fiatal malacok esetében az APPV nem volt azonosítható a vér-here (Sertoli-) gáton túl, a kan heréjében azonban ezen a területen is találtunk pozitív sejteket, amely a bulbourethralis mirigy és a prosztatata fertőzöttségével együtt megmagyarázza a fertőzött sperma ürítését. Ezen állatok kis- és nagyagyvelejében is vizsgáltuk a vírus jelenlétét *in situ* hibridizációs módszerrel. Az APPV genetikai állományát megtaláltuk a reszketőkóros malacok kisagyvelejének belső granularis és molecularis rétegében, valamint a Purkinje-sejtekben. Ezen felül mérsékelt festődést figyeltünk meg a nagyagyvelő neuronjaihoz kötötten.

### 3. Új tudományos eredmények

1. Elsőként azonosítottuk az atipikus sertés-pestivírust magyarországi és szlovákiai sertéstelepekről származó friss, illetve archivált mintákból.
2. Elsőként végeztünk nagy mintaszámú, reprezentatív, keresztmetszeti prevalenciavizsgálatokat hazai sertésállományokban, megállapítottuk, hogy egy telep APPV-fertőzöttségének igazolásához a herelési folyadékminták, a 10 hetes sertések vérsavómintái és 20 hetes állatok rágókötélmintái a legalkalmasabbak.
3. Elsőként határoztuk meg Magyarországon és Szlovákiában azonosított törzsek részleges NS2–3 fehérjekódoló régióját, összehasonlító filogenetikai vizsgálatok céljából. Megállapítottuk, hogy a hazai törzsek nagy diverzitást mutatnak, azonban többnyire Európában azonosított vírusokkal alkotnak filogenetikai csoportot.
4. Elsőként dolgoztunk ki RNS-alapú *in situ* hibridizációs módszert (RNAscope) a vírus szövetbeli lokalizációjának vizsgálatára.
5. Elsőként azonosítottuk az érintett sejttípusokat RNAscope- és IHC-módszerekkel napos malacok és egy CT-vel született, perzisztens APPV-fertőzésben szenvedő kan hereszövetében és járulékos nemi mirigyeiben. Megállapítottuk, hogy a fiatal állatokéval ellentétben, az ivarérett kan esetében a vér-here gáton túli sejtek (Sertoli-sejt, csírasejtek) is érintettek, a fertőzés nem korlátozódik kizárólag az interstitialis Leydig-sejtekre, a kanyarulat csatornák körüli peritubularis myoid sejtekre és a közepes méretű artériák falában elhelyezkedő simaizom-sejtekre.

## 4. Publikációk

### A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

- Dénes, L., Balka, G., 2022. Az atipikus sertés-pestivírus és az általa okozott reszketőkór Irodalmi összefoglaló. Magy. Állatorvosok Lapja 144, 591–602. doi:0.56385/magyallov.2022.10.591-602, IF: 0,236
- Dénes, L., Ruedas-Torres, I., Szilasi, A., Balka, G., 2021. Detection and localization of atypical porcine pestivirus in the testicles of naturally infected, congenital tremor affected piglets. Transbound. Emerg. Dis. 1–9. doi:10.1111/tbed.14355, IF: 4,521
- Dénes, L., Biksi, I., Albert, M., Szeredi, L., Knapp, D.G., Szilasi, A., Bálint, Á., Balka, G., 2018. Detection and phylogenetic characterization of atypical porcine pestivirus strains in Hungary. Transbound. Emerg. Dis. 65, 2039–2042. doi:10.1111/tbed.12981, IF: 3,554