

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

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

PhD-értekezés

Készítette:

Dénes Lilla

2023.

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Balka Gyula

Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

témavezető

.....

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 n. sz. példány.

.....

Dénes Lilla

Tartalomjegyzék

1	Ábrajegyzék	5
2	Rövidítések jegyzéke	7
3	Összefoglalás.....	10
4	Bevezetés és célkitűzések	12
5	Irodalmi áttekintés	13
5.1	A <i>Flaviviridae</i> család	13
5.2	A <i>Pestivirus</i> nemzetség.....	15
5.2.1	A pestivírusok genomszerkezete.....	17
5.2.2	Sertések pestivírusai	21
5.2.2.1	A klasszikus sertéspestis vírusa	21
5.2.2.2	Bungowannah-vírus.....	22
5.2.2.3	LINDA-vírus.....	23
5.2.2.4	Atipikus sertés-pestivírus	23
5.2.2.4.1	A fertőzés terjedése	24
5.2.2.4.2	Szervtropizmus	25
5.2.2.4.3	Diagnosztika.....	26
5.2.2.4.4	A vaddisznók szerepe az APPV járványtanában	27
5.2.2.4.5	Az APPV elleni védekezés	28
5.2.3	A reszketőkór	28
6	Anyagok és Módszerek	32
6.1	Vizsgált minták	32
6.1.1	Diagnosztikai és prevalencia vizsgálatok.....	32
6.1.2	Szervtropizmus-vizsgálatok.....	34
6.1.3	RNS-kivonás és PCR-vizsgálatok	34
6.1.3.1	RT-qPCR.....	35
6.1.3.2	RT-PCR.....	37
6.1.3.3	Agaróz gélelektroforézis	38
6.1.4	Sanger-szekvenálás és filogenetikai vizsgálatok	38

6.1.5	RNS-alapú <i>in situ</i> hibridizációs vizsgálatok	40
6.1.5.1	Minták deparaffinálása és feltárása	40
6.1.5.2	RNAscope	40
6.1.6	Immunhisztokémiai vizsgálatok	42
6.1.7	Statisztikai vizsgálatok	43
7	Eredmények.....	44
7.1	Az APPV magyarországi elterjedtsége	44
7.2	Filogenetikai vizsgálatok	48
7.3	Szervotropizmus és a vírus szövetbeli lokalizációja	52
7.3.1	Választás előtti malacok szöveteinek vizsgálata RT-qPCR módszerrel.....	52
7.3.2	Választás előtti malacok szöveteinek vizsgálata RNAscope-módszerrel	53
7.3.3	CT-vel született, de már tünetmentes, ivarérett kan szöveteinek vizsgálata RNAscope-módszerrel	58
8	Megvitatás.....	64
8.1	Prevalenciafelmérések és a hazai törzsek filogenetikai összehasonlítása.....	64
8.2	Szervotropizmus-vizsgálatok.....	66
9	Új tudományos eredmények.....	71
10	Irodalomjegyzék	72
11	A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	83
11.1	A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent közlemények	83
11.2	A doktori értekezés témájában tartott előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon	83
11.3	A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények, előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon.....	84
12	Köszönetnyilvánítás	88

1 Ábrajegyzék

1. ábra: Az atipikus sertés-pestivírus elterjedtsége a világon.....	12
2. ábra: Az <i>Flaviviridae</i> család tagjainak RNS-függő RNS-polimerázt (RdRP) kódoló konzervált szekvencia régiójának összehasonlítása Maximum Likelihood (ML) analízissel, az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ajánlása alapján.....	14
3. ábra A <i>Pestivirus</i> nemzetség tagjainak nem szerkezeti fehérje 5b (NS5b) kódoló szekvencia régiójának összehasonlítása Maximum Likelihood (ML) analízissel, az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ajánlása alapján.....	17
4. ábra: A pestivírusok alapvető szerkezeti jellemzői	19
5. ábra: A herélési folyadékminták gyűjtésének lépései.....	33
6. ábra Magyarországon vizsgált sertéstelepek, az APPV jelenlétét a piros színnel jelzett telepeken azonosítottuk.....	44
7. ábra A pozitív vérsavó-, rágókötel- és herélésifolyadék-minták aránya az APPV-pozitív telepeken.....	45
8. ábra Az APPV-pozitív vérsavópoolok százalékos megoszlása a vizsgált korcsoportok között	46
9. ábra A különböző korcsoportoktól származó pozitív savóminták Cq-értékeit összehasonlító Boxplot-ok	47
10. ábra A különböző APPV-pozitív minták Cq-értékeinek mintatípus szerinti összehasonlítása Boxplot-on ábrázolva	48
11. ábra A mintagyűjtés azon helyszínei, ahonnan részleges NS2–3 fehérjét kódoló szekvenciákat határoztunk meg.	49
12. ábra Az APPV GenBankból letöltött referencia és saját NS2–3 poliprotein-kódoló szekvenciák összehasonlítása alapján készített törzsfa	51
13. ábra Telepek színkódos jelölése vírusváltozatok szerint.....	52
14. ábra Az atipikus sertés pestivírus szervtropizmusa.....	53
15. ábra: Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNS in situ hibridizációs módszerrel (RNAscope) fertőzött, 3-napos malacok kisagyvelőjében (A) és nagyagyvelőjében (B).....	54
16. ábra: Negatív kontroll próbával (dapB, A) és pozitív kontroll próbával (Ss-PPIB, B) ellenőriztük az általunk alkalmazott RNAscope-módszer során az RNS integritását és a fixálás/feltárás sikerességét.....	55
17. ábra Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNAscope-módszerrel, reszketőkóros egy napos malacok heréjében	56
18. ábra: Reprezentatív képek újszülött malacok heréjéből készült sorozatmetszetek alfa simaizom aktin (α -SMA) (A), von Willebrand Factor (vWF) (B), c-kit (C) immunhisztokémiai és RNAscope ISH (D) jelölésével	57

19. ábra: Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNAscope-módszerrel fertőzött, 6-hónapos kan lépében (A) és ileumában (B).	59
20. ábra: Atipikus sertés-pestivírus (APPV) azonosítása RNS in situ hibridizációs módszerrel (RNAscope) fertőzött, 6-hónapos kan mellékveséjében (A) és hasnyálmirigyében (B).	60
21. ábra: Atipikus sertés-pestivírus (APPV) azonosítása RNS in situ hibridizációs módszerrel (RNAscope) fertőzött, 6-hónapos kan hereszövetében (A), Cowper-mirigyében (B) és prosztatájában (C).....	61
22. ábra: Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNAscope-módszerrel fertőzött, 6-hónapos kan kisagyvelejében (A) és gerincvelőjében (B).	62

2 Rövidítések jegyzéke

α-SMA	alfa-simaizom aktin
APPV	atypical porcine pestivirus
ASFV	african swine fever virus
BALB	Bagg albino egér
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BDV	border disease virus
BVDV-1	bovine viral diarrhoea virus-1
BVDV-2	bovine viral diarrhoea virus-2
<i>BtSk-PeV</i>	bat pestivirus
CSFV	classical swine fever virus
cp	citopatogén
CT	congenital tremor, reszketőkór
Cq	quantification cycle
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát
dapB	<i>Bacillus subtilis</i> dihidrodipikolinát reduktáz
DAB	diaminobenzidin-tetrahidroklorid
EB	elution buffer
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplazmatikus retikulum
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció
G	gamma eloszlás
GTR	General Time Reversible modell
GE	genome equivalent
H	helikáz
HCV	hepatitis C vírus
HP	hepatitis-pestivirus csoport
I	evolúciósan invariáns
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses

IFN-α	interferon-alfa
IHC	immunohistochemistry
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
IRF-3	Interferon Regulált Faktor-3
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
LINDA	lateral shaking inducing agent
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissue
MD	mucosal disease
ML	Maximum Likelihood
mRNS	messenger/hírvivő RNS
NCBI	National Library of Medicine
ncp	nem-citopatogén
NF90/NFAR	Nuclear factor 90
NS	nem szerkezeti
NTR	nem transzlált régió
NrPV	norvég patkány-pestivirus
NTP-áz	nukleotid-trifoszfátáz
OIE	Állategészségügyi Világszervezet
ORF	open reading frame
P	proteáz
PALS	periarteriolar lymphoid sheaths
PCR	polymerase chain reaction
PCV2	porcine circovirus 2
PK	porcine kidney cell line
poli(A)	polyadenil
PRR	pattern recognition receptor
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
RT-qPCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RdRP	RNS-függő RNS-polierázt kódoló gén
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav

RtAp-PeV	rodent pestivirus (gazda: <i>Apodemus peninsulae</i>)
RtNn-PeV	rodent pestivirus (gazda: <i>Niviventer nivivente</i>)
SPEV	embryonic porcine kidney epithelial inoculated line
SK	swine kidney cell line
Ss-PPIB	<i>Sus scrofa</i> peptidilprolil izomeráz B
TSV	Tunisian sheep-like pestivirus
UTR	untranslated region
UV	ultraviolet
VLP	virus-like particles
vWF	von Willebrand Factor

3 Összefoglalás

A klasszikus pestivírusok többnyire párosujjú patásokat fertőznek, közülük soroljuk a szarvasmarha vírusos hasmenését okozó vírusokat (bovine viral diarrhoea virus, BVDV-1 és BVDV-2), a bárányokat 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 korokra 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 sertéstelepekről 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-, herelési folyadék-, és rágókötelemintákat, 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. Rágókötelemintákat 10 és 20 hetes állatoktól gyűjtöttünk. A nagymintaszámú keresztmetszeti vizsgálatok során 66,67%-os magyarországi prevalenciát állapítottunk meg, azaz a vizsgált magyarországi sertéstelepek kétharmada fertőzött a vírussal. Az érintett telepeken a vérsavóminták 6,3–50%-ában, a herelési folyadékminták 20–100%-ában és a rágóköteleminták 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

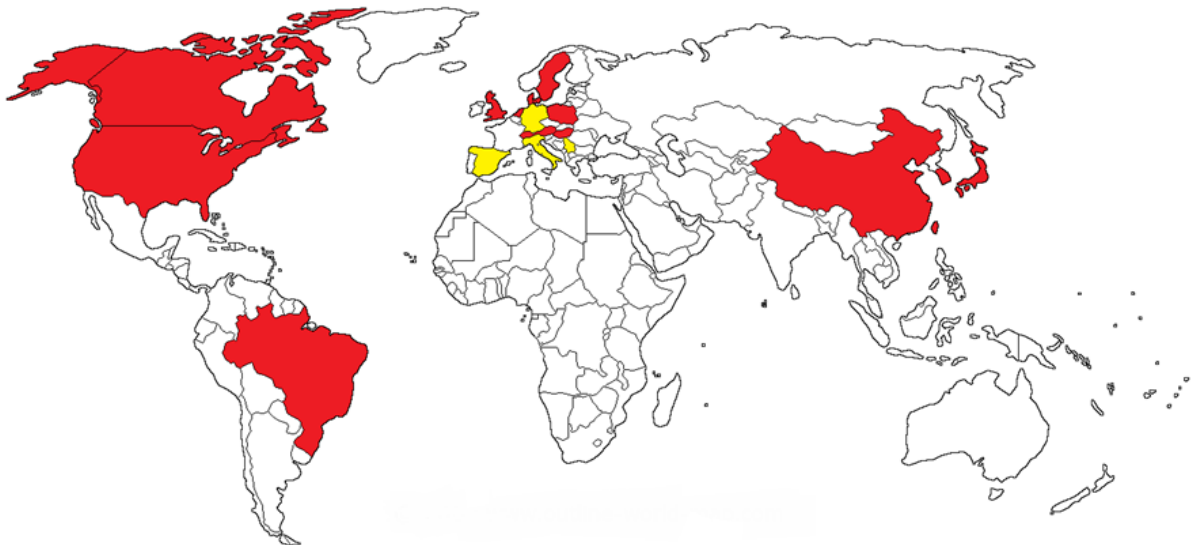
APPV-pozitív rágókötélminták 41%-a 10 hetes, 59%-a 20 hetes állatoktól származott. Két telep esetében csak a rágókötélmintákban azonosítottuk az APPV-t, továbbá 5 fertőzött telepen nem tudtuk kimutatni a vírust herélési folyadékmintákban. A herélési folyadékminták abban az esetben bizonyultak diagnosztikai 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 kapcsolatáról, 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-heré (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.

4 Bevezetés és célkitűzések

Az atipikus sertés-pestivírus (APPV, Pestivirus K) a *Flaviviridae* családba tartozó *Pestivirus* nemzetség újonnan felfedezett tagja, amelyet először 2015-ben azonosítottak az USA-ban, újgenerációs szekvenciameghatározásos módszerrel, a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) vírusával fertőzött állatok mintáiban (Hause et al., 2015). Azóta az APPV-t azonosították Németországban (Beer et al., 2016; Postel et al., 2016), Svédországban (Blomström et al., 2016), Hollandiában (de Groof et al., 2016), Ausztriában (Schwarz et al., 2017), Spanyolországban (Muñoz-González et al., 2017), Kínában (Yuan et al., 2017), Nagy-Britanniában és Olaszországban (Postel et al., 2017a), Brazíliában (Gatto et al., 2018c), Magyarországon (Dénes et al., 2018), Kanadában (Dessureault et al., 2018), Svájcban (Kaufmann et al., 2019), Japánban (Kasahara-kamiie et al., 2021) és nemrégiben Dániában (Pedersen et al., 2021) is. Az elmúlt években Németországban, Szerbiában és Spanyolországban vaddisznómintákból is kimutatták a vírust (Cagatay et al., 2018; Colom-Cadena et al., 2018) (1. ábra).



1. ábra: Az atipikus sertés-pestivírus elterjedtsége a világon

Piros színnel jelöltük azon országokat, ahol csak sertéslepeken azonosították a vírust, sárga színnel pedig ahol vaddisznó mintákból is. (Vaktérkép forrás: www.outline-world-map.com)

A közelmúltban igazolták, hogy APPV-t tartalmazó vérrel vagy szövetszuszpenzióval mesterségesen fertőzött vemhes kocák utódai az A-II-es típusú reszketőkór (congenital tremor, CT) klinikai tüneteit mutatták (Hause et al., 2015; Arruda et al., 2016; Postel et al.,

2016), amely egyes esetekben, járványszerű megjelenés nyomán akár 10–60%-os malacelhullást is okozhat (de Groof et al., 2016; Postel et al., 2017a).

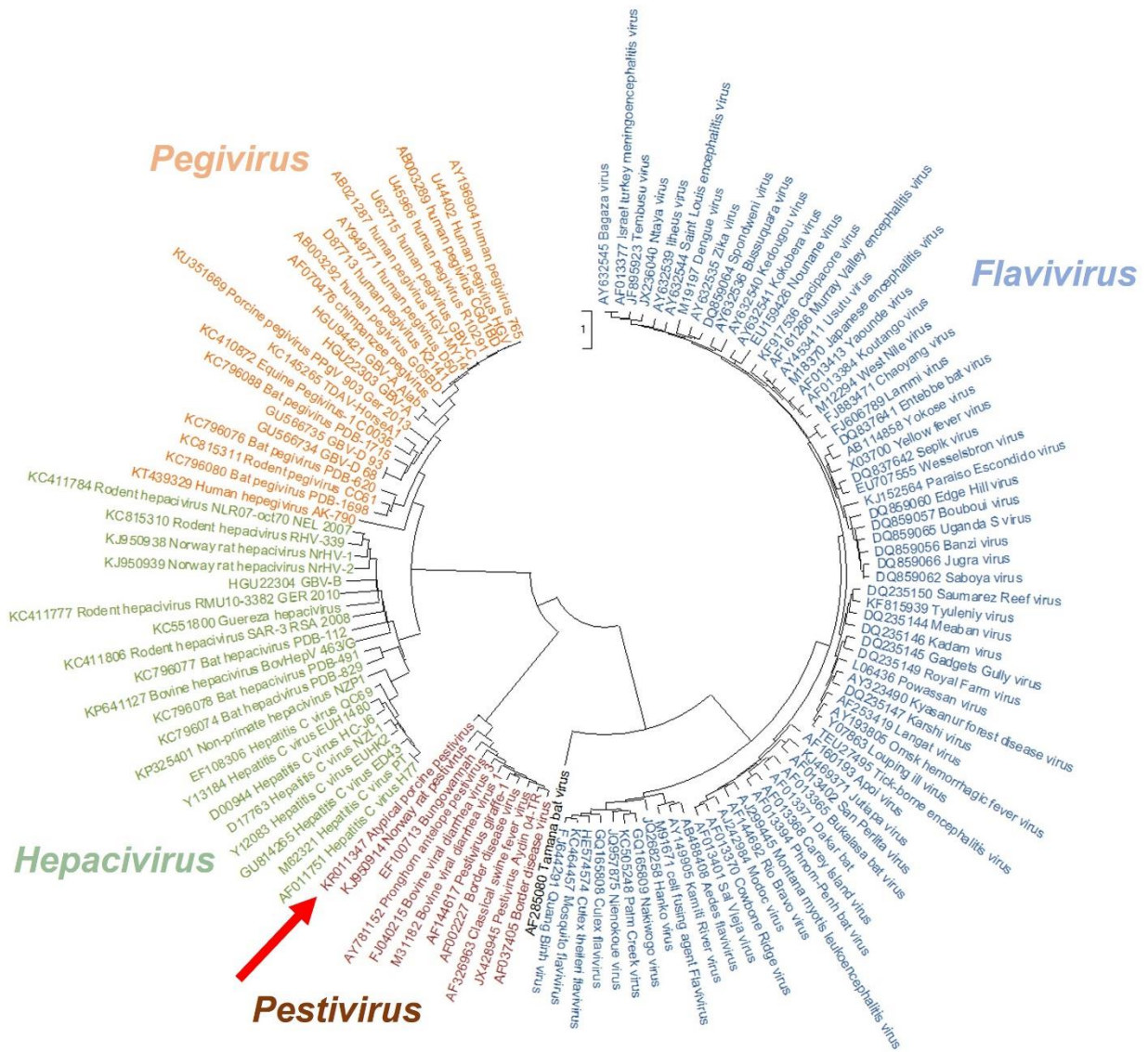
Ezen dolgozat keretében célul tűztük ki, hogy információt gyűjtsünk a Magyarországon kutatásunk előtt még nem azonosított vírus jelenlétével, elterjedtségével kapcsolatban, illetve, hogy felderítsük, milyen összefüggést mutat a már régóta, hazánkban is megfigyelt, újszülött malacokat érintő reszketőkór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

5 Irodalmi áttekintés

5.1 A *Flaviviridae* család

A *Flaviviridae* családot kisméretű, burokkal rendelkező vírusok alkotják, amelyek többnyire gazdaspecifikusak és főként emlősöket és madarakat fertőznek meg. A család négy nemzetségből áll: (I) a *Flavivirus* nemzetségbe többnyire ízeltlábúak által terjesztett kórokozók tartoznak, több képviselője jelentős humán vagy állati patogén (sárgalázvírus, Dengue-láz vírus, Nyugat-nílusi vírus); (II) a *Pestivirus* nemzetség tagjainak többsége leginkább sertések és kérődzők megbetegedéséért felelős, bár az utóbbi évtizedben leírtak több atipikus *Pestivirust*, amelyek vadon élő állatokhoz köthetőek. A fertőződés általában fertőzött váladékkal (légúti cseppek, vizelet vagy bélsár) vagy a placentán keresztül történik; (III) a *Hepacivirus* genus jellemző tagja a Hepatitis C vírus (HCV), amely jelentős humán kórokozó: az általa okozott fertőzés idült májgyulladás, ill. cirrhosis kialakulásához vezethet; (IV) a *Pegivirus* nemzetség tagjai számos emlősfaj esetében perzisztens fertőzést okoznak, azonban egyelőre nem hozták összefüggésbe őket ismert kórképekkel (2. ábra).

Habár a *Flaviviridae* család tagjai morfológiájukban, genomfelépítésükben és replikációs stratégiáikban hasonlítanak, a különböző nemzetségekhez tartozó vírusok eltérő biológiai tulajdonságokat mutatnak, továbbá nem jellemző rájuk szerológiai keresztreaktivitás (Simmonds et al., 2017).



2. ábra: Az *Flaviviridae* család tagjainak RNS-függő RNS-polimerázt (RdRP) kódoló konzervált szekvencia régiójának összehasonlítása Maximum Likelihood (ML) analízissel, az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ajánlása alapján

A bootstrap értékek az ábrán nincsenek feltüntetve. A méretek 1 várható változást jelez helyenként és áganként. A piros nyíl az atipikus sertés-pestivírust jelöli

A *Flaviviridae* családba tartozó vírusok virionja megközelítőleg 40–60 nm átmérőjű, kisméretű kapszidján kettő (*Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus*) vagy három (*Pestivirus*) membrán-asszociált glikoprotein található (Simmonds et al., 2017). Genomjuk 9–13 kb méretű, pozitív irányultságú, nem-szegmentált, egyszálú RNS, amely egy nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz 5'- és 3'-terminális nem kódoló régiókkal (NTR) határolva. A család összes tagja esetében hiányzik a 3'-terminális poli(A) farok. Nem-szerkezeti fehérjéik szerin-proteázt, RNS-helikázt és RNS-függő RNS-polimerázt (RdRP) kódolnak. A transláció a flavivírusok esetében az I-es típusú cap szerkezetet tartalmazó RNS-

genomról történik, míg a többi nemzetség esetében egy belső riboszomális belépési hely (Internal Ribosomal Entry Site, IRES) elemei mediálják a cap-független transzlációt. A genomreplikáció a citoplazmában történik, amelyet a virion összeépülése követ az endoplazmatikus retikulumból (ER) eredő membránvezikulumokban. Az érett virionok bimbózással jutnak át az ER lumenjén és a vezikulumtranszport-útvonalon jutnak ki a sejtől (Tautz et al., 2015; Simmonds et al., 2017).

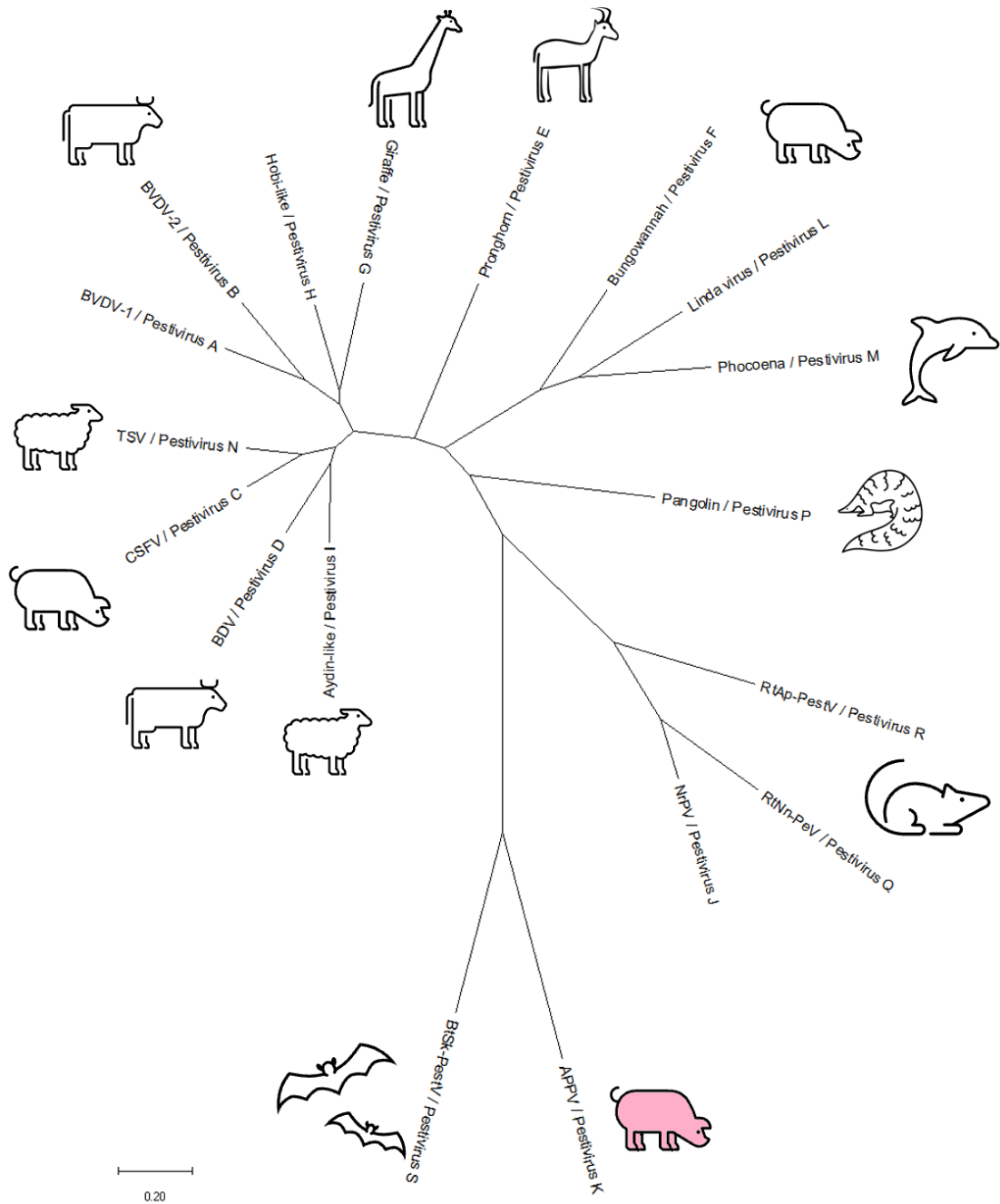
5.2 A *Pestivirus* nemzetség

Korábban a *Pestivirus* nemzetségbe négy fajt soroltak: a szarvasmarha vírusos hasmenését okozó vírus 1-es és 2-es típusát (bovine viral diarrhoea virus, BVDV-1, *Pestivirus A* és BVDV-2, *Pestivirus B*), a klasszikus sertéspestis vírusát (classical swine fever virus, CSFV, *Pestivirus C*), és a border disease vírust (border disease virus, BDV, *Pestivirus D*), amelyek jelentős gazdasági kárt okozhatnak szarvasmarha-, sertés-, és kiskérődző-állományokban (Dietzgen et al., 2017).

Az utóbbi két évtizedben további pestivírusokat is azonosítottak: ilyen a villás szarvú antilopot megbetegítő pestivírus (*Pestivirus E*) (Vilcek et al., 2005), az ausztrál sertések mintáiból kimutatott Bungowannah-vírus (*Pestivirus F*) (Kirkland et al., 2015a), zsiráf-pestivírusok (*Pestivirus G*) (Avalos-Ramirez et al., 2001), a szarvasmarhákat fertőző HOBI-like pestivírus (*Pestivirus H*), a kecskéket, bárányokat és szarvasmarhákat fertőző Aydin-like pestivírus (*Pestivirus I*) (Becher et al., 2012), a norvég patkány-pestivírus (Norway rat pestivirus, NrPV, *Pestivirus J*) (Firth et al., 2014), az atipikus sertés-pestivírus (Atypical porcine pestivirus, APPV, *Pestivirus K*) (Hause et al., 2015). 2021-ben további fajok felvételét javasolták a pestivírusok közé, ilyen az APPV-hez hasonló, de annál súlyosabb megbetegedést okozó LINDA-vírus (lateral shaking inducing agent, *Pestivirus L*) (Lamp et al., 2017), a barna delfint fertőző Phocoena pestivírus (PhoPeV *Pestivirus M*) (Jo et al., 2019), a vadkecskéből és muflonból kimutatott tunéziai sheep-like pestivírus (TSV, *Pestivirus N*) (Meyer et al., 2021), juhokat fertőző ovine/IT pestivírus (ovIT PeV, *Pestivirus O*) (Sozzi et al., 2019a), továbbá tobzoskából és rajta élősködő kullancsból izolált pangolin pestivírus (DYPV, *Pestivirus P*) (Gao et al., 2020). Végül az 1-2 évtizede már rágcsálókából (RtNn-PeV, *Pestivirus Q* és RtAp-PeV, *Pestivirus R*) (Becher et al., 1997; Wu et al., 2018) és a *Rhinolophus affinis* denevérekéből kimutatott pestivírust (BtSk-PeV, *Pestivirus S*) is a *Pestivirus* nemzetségbe sorolták (Wu et al., 2012; Smith et al., 2017; Postel et al., 2021).

Az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) *Pestivirus* referenciagenom-adatbázisát és az újonnan leírt pestivírusok (*Pestivirus M–S*, Postel et al., 2021) genomját hasonlítottam össze Maximum Likelihood analízissel (ML). A 3. ábraán látható, hogy a csak Ausztráliában azonosított, sertéseket érintő Bungowannah-vírus és az

APPV-hez hasonlóan feltételezhetően reszketőkórt okozó LINDA-vírus a legközelebbi rokonságot a barna delfinekben felfedezett pestivírussal mutatják. Az APPV legközelebbi rokona a denevérekben azonosított *BtSk-PeV*, míg a rágcsálókban leírt pestivírusok külön, távoli csoportot alkotnak, amelyek legközelebbi rokona a tobzoskában azonosított pangolin pestivírus. Érdekesség, hogy a klasszikus sertéspestis vírusának legközelebbi rokona a *Pestivirus* nemzetségben a tunéziai sheep-like pestivírus és az Aydin-like pestivírus, azonban ezeket a vírusokat, a CSFV-vel ellentétben nem azonosították sertésekben (Meyer et al., 2021).



3. ábra A *Pestivirus* nemzetség tagjainak nem szerkezeti fehérje 5b (NS5b) kódoló szekvencia régiójának összehasonlítása Maximum Likelihood (ML) analízissel, az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ajánlása alapján.

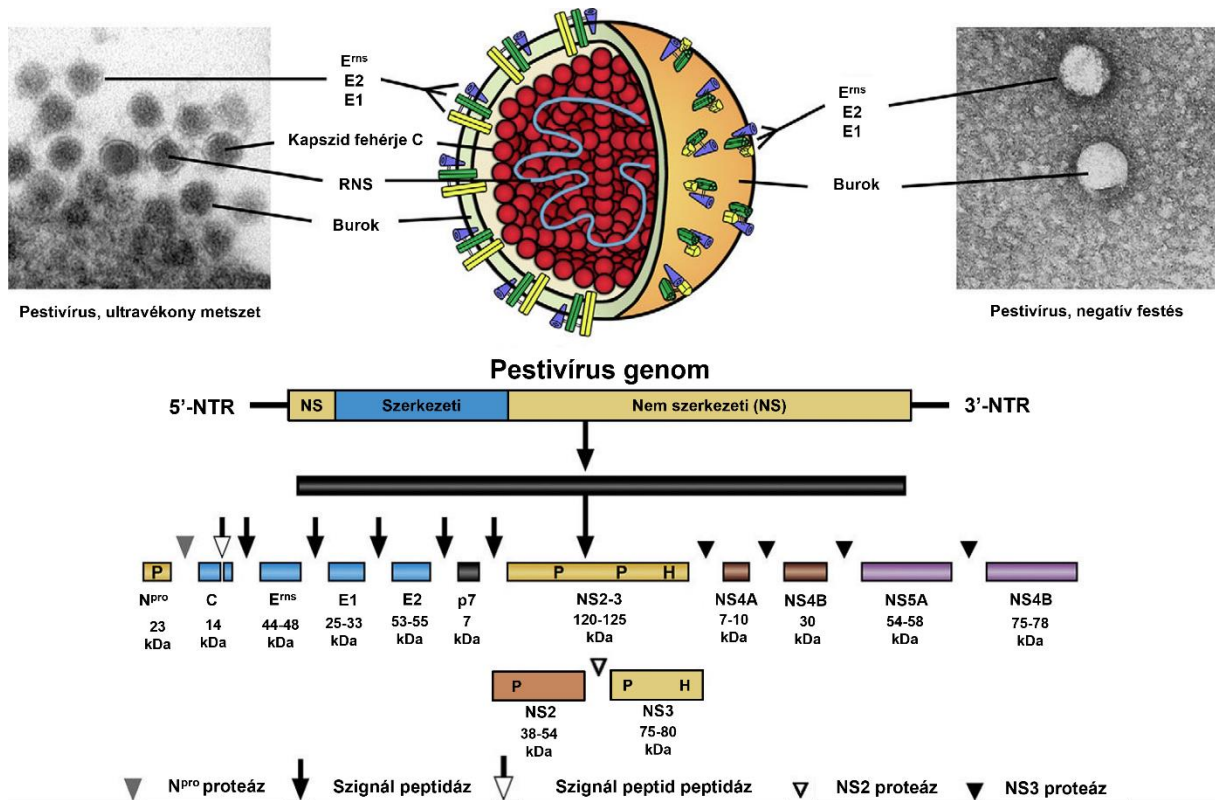
A bootstrap analízist 1000 ismétléssel végeztük, az értékek az ábrán nincsenek feltüntetve. A méretskála 0,2 várható változást jelez helyenként és áganként.

5.2.1 A pestivírusok genomszerkezete

A *Pestivirus* nemzetség tagjai genetikailag kifejezetten változékony, egyszálú pozitív irányultságú RNS-vírusok. Genomjuk ~12,3 kb méretű, amely csak egy, ~3900 aminosavból álló poliproteint kódoló nyitott leolvasási keret (open reading frame, ORF) tartalmaz.

Genomjuk felépítése nagy hasonlóságot mutat a szintén *Flaviviridae* családba sorolt, jelentős humán patogén Hepatitis C víruséval (HCV), közös jellemzőjük hogy a szerkezeti fehérjéken túl a nem-szerkezeti fehérjék is szerepet játszanak a virion morfogenezisében (Tautz et al., 2015).

A nemzetség tagjai 40–60 nm átmérőjű burkos vírusok. A virionban négy szerkezeti fehérje található: C kapszidfehérje (core protein) és E^{ms}, E1 és E2 buroklehérje (4. ábra). A pestivírusok két egyedi fehérjével is rendelkeznek, amelyeknek még a *Flaviviridae* családot alkotó, közeli rokonságban álló többi nemzetség tagjainak genomjában sincs megfelelője. Egyik az E^{ms}, egy ribonukleáz aktivitással rendelkező RNáz T2 doménnel rendelkező burokglikoprotein, a másik az N^{pro} N-terminális autoproteáz, az NS3 (nem szerkezeti fehérje) autentikus N-terminálisát generáló fehérje, amely fontos szerepet játszik a virion morfogenezisben (Klemens et al., 2015), továbbá ez felelős az APPV tekintetében egyedülálló N^{pro}/C hely önhasításáért (Pan et al., 2018). A BVDV nem-citopatogén törzsei esetében bebizonyították, hogy az említett fehérjéknek jelentős szerepük van a veleszületett, immuntoleranciával járó perzisztens fertőzés kialakításában is. Az N^{pro} lebontja a veleszületett immunválaszban fontos szerepet játszó IRF-3 transzkripciósfaktort, az E^{ms} pedig a sejtek közötti térbe kikerült virális RNS-t darabolja fel célzottan, felismerhetetlenné téve azokat az idegen molekuláris mintázatokat felismerésére hivatott, ún. PRR (pattern recognition receptor) receptorok számára. E két folyamat hatékonyan képes gátolni a veleszületett immunrendszer vírusellenes hatású I-es típusú interferonválaszát (Kiss and Dobos, 2021). Az APPV N^{pro} fehérjéje nem mutat szignifikáns hasonlóságot egy ismert fehérjével sem, és aminosavösszetétele mindössze 9–18%-ban egyezik meg más N^{pro} fehérjeszekvenciákkal. Az APPV E^{ms} fehérjéje 32,9–39%-ban egyezik meg más E^{ms} fehérjékkel (Hause et al., 2015).



4. ábra: A pestivírusok alapvető szerkezeti jellemzői

Az ábrán egy pestivírus részecske sematikus ábrája látható középen, bal oldalon a BVDV elektronmikroszkópos képe ultravékony metszetben, jobb oldalon a CSFV elektronmikroszkópos képe negatív festéssel található. Ezek alatt van ábrázolva a pestivírus genom sematikus felépítése, amely egyetlen nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, az általa kódolt fehérjecsoportok különböző színnel jelölve. P: proteáz, H: helikáz (forrás: Tautz et al., 2015)

A másik két burokfehérje felelős a vírus fertőzőképességéért: az E2 egy 53–55 kDa méretű receptorkötő fehérje, amely fő célpontja a neutralizáló ellenanyagoknak és kulcsfaktora a vírus sejtropizmusának, az E1 pedig egyelőre nem tisztázott szerepet játszik a vírus sejtbe jutásában (Tautz et al., 2015). Az APPV esetében mindkét fehérje kevesebb mint 31% egyezést mutat más pestivírusokéval, habár az E2 54%-ban megegyezik a BtSk-PeV-víruséval. A pestivírusok teljes genomjának filogenetikai vizsgálata alapján az APPV legközelebbi rokonai a kínai denevérekéből (*Rhinolophus affinis*, *Scotophilus kuhlii*) azonosított pestivírusok. Ezen három vírus E2 fehérjéi kb. 130 aminosavval rövidebbek a többi pestivíruséhoz képest, és filogenetikailag külön csoportot alkotnak (Hause et al., 2015; Riedel et al., 2021).

A nem-szerkezeti (non structural, NS) fehérjék fontos szerepet játszanak a virion kialakításában. Az NS2 cisztein-autoproteázként funkcionál, amely az NS2–3 hasításáért

felelős, míg az NS3 helikáz, NTP-áz aktivitással rendelkezik és kofaktorával, az NS4a-val szerin-proteázként is működik (Becher and Tautz, 2011; Klemens et al., 2015; Tautz et al., 2015).

Szövettenyészetben megfigyelt sejtkárosító hatásuk alapján a pestivírusokat nem-citopatogén (ncp) vagy citopatogén (cp) biotípusba sorolják. Perzisztensen BVDV-fertőzött állatok esetében a cp típusú vírus megjelenését gyakran RNS-rekombináció okozza, amely halálos kimenetelű nyálkahártya-betegséghez (mucosal disease, MD) vezet (Becher and Tautz, 2011). Ezen fenotípus kialakulása korrelál a szabad NS3 fehérje képződésével, amely az NS2–3 kódoló régió szekvenciájának eltéréséből adódik (Klemens et al., 2015). A hasítatlan NS2–3 fehérje lényeges eleme a virion morfogenezisének, ám pontos funkciója még nem meghatározott (Tautz et al., 2015). Több vizsgálat is alátámasztotta, hogy bizonyos DNS-fragmentek inzerciója az NS2 és NS3 gének közé megakadályozza a fertőző virion képződését (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Cp és ncp vírusok egyaránt képesek heveny fertőzést okozni, azonban perzisztens fertőzés kialakulása kizárólag az ncp vírusok esetében jellemző (Brownlie, 1991).

A pestivírusok aktív virális RNS-replikázát az NS3, NS4A, NS4B, NS5A, és NS5B fehérjék, továbbá egyéb ismeretlen gazdafaktorok alkotják (Tautz et al., 2015). Az APPV nem szerkezeti fehérjéi közül az NS2 60%, az NS3 74%, az NS4a 61%-ban egyezik az BtSk-PeV nem szerkezeti fehérjéivel. Más pestivírusokkal összehasonlítva az NS4a 29-33%, az NS4b és az NS5b 36-45%, míg az NS5a fehérje 12-17% egyezést mutat (Hause et al., 2015).

A transláció inicializálásáért és a vírus-RNS replikációjáért a pestivírusgenom 5'-NTR régiója felelős (Yu et al., 2000; Grassmann et al., 2005). A translációt az 5'-NTR régió kódolt IV-es típusú belső riboszomális belépési hely (internal ribosome entry site, IRES) mediálja, amely az IRES elemek hepatitis C vírus/pestivírus (HP) csoportjába tartozik (Tautz et al., 2015). A translációt követően a poliprotein ko- és poszttranszlációs hasítását szerkezeti és nem-szerkezeti fehérjékre a sejt és a vírus proteázai végzik. A transláció a 3'-NTR régiónál fejeződik be, ezután áll össze a replikációs komplex, amely elindítja a vírusreplikációt (Tautz et al., 2015; Simmonds et al., 2017). A 3'-NTR a pestivírusok esetében nem rendelkezik poli(A) farokkal, amely más vírusok esetében az RNS stabilitásáért felelős, továbbá az eukarióta szervezetekben az mRNS-ek translációját segíti (Smith et al., 2017). A *Pestivirus* nemzetség tagjainál ezt a szerepet a gazdasejt NF90/NAFR fehérjéi veszik át, amelyek kölcsönhatásba lépnek a 3'-NTR régióval és így koordinálják a translációt és az RNS-replikációt (Tautz et al., 2015). Az APPV 5'-NTR szekvenciája (~125 bp) megközelítőleg 250 bp-rel rövidebb a többi pestivírusénál (~370-498 bp), a 3'-NTR hosszában (~245 bp) azonban nincs eltérés (Hause et al., 2015).

5.2.2 Sertések pestivírusai

5.2.2.1 A klasszikus sertéspestis vírusa

A klasszikus sertéspestis (classical swine fever, CSF) gazdaságilag jelentős, bejelentési kötelezettség alá tartozó, nagy ragályozó képességű vírusos megbetegedés. A CSFV-fertőzés fő útvonala az oronasalis úton történő horizontális átvitel, fertőzött sertésekkel való közvetlen vagy közvetett érintkezés, illetve fertőzött takarmány (Moennig et al., 2003). Habár a vírus egyszerű fertőtlenítő szerekkel inaktiválható, nedves biológiai környezetben és bizonyos élelmiszerekben, mint pl., szalámi, sonka, friss sertéshús és belsőségek a CSFV akár hónapokig fertőzőképes maradhat (Edwards, 2000). Ezekon felül a fertőzés történhet fertőzött kanok spermájával végzett inszemináció útján is (de Smit et al., 1999; Floegel, 2000). A CSFV-fertőzött egyedek testi váladékaik útján a klinikai tünetek megjelenésétől a halál beálltáig folyamatosan ürítik a vírust (Postel et al., 2018). Más pestivírusokhoz hasonlóan a CSFV is képes áthatolni a placentán, a vemhesség bármelyik szakaszában. A magzatok károsodása attól függően eltérő mértékű lehet, hogy a koca a vemhesség mely szakaszában fertőződött meg. Az első trimeszterben lezajló fertőződés veteléshez, életképtelen vagy mumifikálódott magzatok elléséhez vagy halvaszületéshez vezethet (Kaden et al., 2005). A második trimeszterben (a vemhesség kb. 50 és 70 napja között) való fertőződés esetén az immuntolerancia jelensége figyelhető meg. Ebben az esetben klinikailag egészséges malacok születnek, azonban pár hónapon belül, a betegség későn kifejlődő formája miatt idő előtt elpusztulnak (Postel et al., 2018). A *Suidae* család tagjai, mint pl. az eurázsiai vaddisznó (*Sus scrofa*) a CSFV természetes rezervoárjai, így komoly veszélyt jelenthetnek a házi sertésállományra. A vírus endémiás olyan területeken, ahol sűrű a vaddisznóállomány, míg a kisebb, ritkább egyedsűrűségű populációk esetében általában elszigetelt eseteket figyeltek meg. Házi sertéseken és vaddisznókon kívül a vírusnak más rezervoárja nem ismert. Habár embereket nem, kísérletesen kerdőzöket és nyulakat sikerült a vírussal fertőzni (Moennig, 2015).

A CSF diagnózisa hagyományosan a klinikai tünetek, kórbonctani elváltozások vizsgálatával, továbbá antigén-és antitest-kimutatással történik (Zhou, 2019). Az Állategészségügyi Világszervezet (World Organisation for Animal Health, WOAHA, korábban OIE) kézikönyve alapján megbízható diagnosztikai módszerek számít a vírusizolálás, a fluoreszcens antitest teszt (FAT) vagy peroxidázfestés, az antigéncsapda Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), a reverz-transzkripció real-time vagy konvencionális polimeráz láncreakció (RT-qPCR), a vírusneutralizációs teszt (VNT), továbbá az ellenanyag-ELISA (OIE Terrestrial Manual, 2019).

A CSFV genomjának 5'-NTR és az E2 glikoprotein nukleotid-szekvenciája alapján a vírust három genotípusba és 11 altípusba soroljuk (1.1--1.4, 2.1-2.3, és 3.1-3.4) (Lowings et

al., 1996; Paton et al., 2000; Deng et al., 2005). A genotípusok globális megoszlása eltérő földrajzi mintázatot mutat, amely fontos a betegségek dinamikájának és járványtanának megértéséhez (Paton et al., 2000).

A betegség bejelentésköteles az Állategészségügyi Világszervezet felé, mivel jelentős gazdasági károkat okozhat a sertéstartásban (Wang et al., 2020). Az Európai Unió nagy része CSF-mentesnek számít (WOAH, 2016). Az utóbbi években Európában a 2.1 (Litvánia) és 2.3 (Lettország) genotípus előfordulása volt a legjellemzőbb. Az 1.1, 2.1, 2.2 és 2.3 altípus Ázsiában (Postel et al., 2019), míg a 3.1–3.4 altípusok több különálló földrajzi régióban sorolhatóak a releváns patogének közé (Blome et al., 2017; Zhou, 2019). 2019 májusában Argentína, Kanada, Chile, Francia-Guyana, Mexikó, Paraguay, az USA, Uruguay és Brazília néhány megyéje, Kolumbia bizonyos részei és Costa Rica szintén mentességet szerzett. A CSF Magyarországon először 1895-ben jelent meg, tömeges elhullást okozva a sertéstelepeken. Az 1960-as években indult mentesítési program hatására az 1970-es évek végére sikerült eradikálni a vírust (Mocsári and Molnár, 1994). Hazánkban a vaddisznókat érintő legutóbbi járvány 2007 januárjában kezdődött, mentes státuszunkat 2013 júliusában kaptuk vissza (NÉBIH, 2013).

5.2.2.2 Bungowannah-vírus

A Bungowannah-vírus (BuPV) genetikailag és antigenitását tekintve is különálló pestivírus, a *Pestivirus F* faj egyetlen azonosított tagja (Read et al., 2020a). A vírust összefüggésbe hozták 2003-ban 2–3 hetes malacok elhullásával és halvaszületéssel kísért járvánnyal egy ausztráliai sertéstelepen. Az elpusztult állatok esetében szívizomgyulladást és izomelhalást is megfigyeltek (porcine myocarditis syndrome, PMC; McOrist et al., 2004). A PMC kialakulása és a Bungowannah-vírus közötti kapcsolatot később vemhes kocákkal végzett fertőzéses kísérletekkel igazolták (Kirkland et al., 2007, 2015b; Finlaison et al., 2009, 2010, 2012; Finlaison and Kirkland, 2020). A vemhesség 35. napján fertőződött malacok a fertőzés perzisztens formáját (alulfejlett, alacsony éltképeségű), míg az 55. napon fertőződött állatok a fertőzés krónikus formáját (növekedési visszamaradottság, hónapokig elnyúló virémia) mutatták. A jellemző szívizomgyulladásos elváltozásokat a vemhesség 90. napján történő fertőzés esetében figyelték meg (Kirkland et al., 2007; Read et al., 2020b). Az érintett telep egységei között pár hét alatt szétterjedt a vírus, a fertőzés élőállat-kereskedelem útján járványt okozott egy másik közeli telepen is. Becslések szerint a járvány 13 hónapja alatt a teljes malacvesztés elérte az 50 000 egyedet. A vírus terjedése az említett két telepre korlátozódott, azóta nem észlelték más területen (Kirkland et al., 2015b). A Bungowannah-vírus eredete és természetes rezervoárja egyelőre ismeretlen. Eddigi kísérletes eredmények alapján a vírus *in vitro* körülmények között ember, denevér, és különböző haszonállatok sejtenyészetein is szaporítható (Richter et al., 2011; Kirkland et al., 2015a; Meyer et al., 2021).

5.2.2.3 LINDA-vírus

A LINDA- (lateral-shaking inducing neurodegenerative agent) vírust (*Pestivirus L*) néhány éve azonosították reszketőkórban szenvedő malacok vérsavó- és szövetmintáiból két ausztriai, egymással kereskedelmi/járványtani kapcsolatban lévő sertéstelepen. A vizsgált állatok központi idegrendszerében a reszketőkór fertőzések formáira jellemző hypomielinizációt figyeltek meg. A mintákban egy TaqMan-rendszeren alapuló qRT-PCR-módszerrel nem tudták kimutatni az atipikus sertés-pestivirus örökítőanyagát, továbbá a klasszikus pestivirusok jelenlétét sem azonosították (Lamp et al., 2017). Ausztriában ezt követően egy 5 éves, országos szerológiai felmérést követően mindössze az egyik korábban fertőzött telepen azonosították a vírust (Kiesler et al., 2021), majd egy harmadik ezektől független telepen klinikai tüneteket mutató állatokból (Kiesler et al., 2022).

Fertőzéses kísérleteket végeztek a LINDA-vírus és a reszketőkór közötti összefüggés feltárására. Választás utáni (13 hetes) sertéseket fertőztek sejtenyészeten (SK-6) szaporított LINDA-vírus szuszpenzióval, intranasalis és intramuscularis úton. A fertőzött állatok nem mutattak reszketőkorra jellemző tüneteket, viraemia alig volt kimutatható, azonban a fertőzés 14. napjától szerológiailag pozitívnak bizonyultak (Kiesler et al., 2019). A LINDA-vírus a Bungowannah-vírushoz hasonlóan könnyen szaporítható sertés- és szarvasmarha-eredetű sejtvonalakon, továbbá genetikailag a Bungowannah-vírussal áll legközelebbi rokonságban. Megfigyelések alapján a LINDA-vírusfertőzött sejtek E1 és E2 fehérjei keresztreakciót mutattak BVDV E2-specifikus antitestekkel, amely a jövőben problémát jelenthet más pestivirusok, kimondottan a CSFV-t érintő szerológiai vizsgálatok esetében (Lamp et al., 2017). Eddigi ismereteink alapján a LINDA-vírus, közeli rokonához, a Bungowannah-vírushoz hasonlóan, egy adott földrajzi területre korlátozódik (Kiesler et al., 2022). Eredete és természetes rezervoárja ismeretlen.

5.2.2.4 Atipikus sertés-pestivirus

Az APPV-t 2015-ben fedezte fel egy kutatócsoport az USA-ban, PRRSV-vel fertőzött minták metagenomikai vizsgálata során. Az újgenerációs szekvenciameghatározás során nyert readeket 2167 contigba *de novo* összeillesztve hat 68–98%-os egyezést mutatott pestivirusokkal. A szekvenáló könyvtárat újraszekvenálva egy 11267 bp méretű, 3635 aminosavból álló poliproteint kódoló contigot kaptak, amely 68–74% aminosavegyezést mutatott az BtSk-PeV részleges poliprotein-kódoló régiójával, míg a BVDV, BDV és CSFV teljes poliprotein-kódoló régiójával 37–40%-ban egyezett (Hause et al., 2015; Postel et al., 2016). Megkísérelték izolálni a vírust számos sejtvonalon is, azonban két passzálás után a sejtek már negatívak voltak RT-qPCR-rel vizsgálva. Citopatogén hatás egyik sejtvonalon sem volt megfigyelhető (Hause et al., 2015).

Az elmúlt pár évben több kutatócsoport is megkísérelte a vírus sejtenyészeten való felszaporítását. Beer és mtsai (2016) sikerrel izolálták a vírust sertésvese-sejteken (SPEV, 0008-as sejtvonala, Állatorvostudományi sejtgyűjtemény, Friedrich–Loeffler Intézet), azonban passzálásról nem volt adatuk. Egy bécsi kutatócsoport is izolálta a vírust szintén sertésvese-eredetű SK-6 és PK-15 sejtvonalaikon. A sejteket reszketőkórban szenvedő, kolosztrumfelvétel előtti, APPV-fertőzött malac vérsavómintájával fertőzték, megfigyeléseik alapján a vírus terjedése a sejtenyészeten így is gyenge hatékonyságú volt (Schwarz et al., 2017).

Arruda és kutatócsoportja (2016) PK-15, SK6 és elsődleges sertésvese-sejtenyészeten inokuláltak APPV-fertőzött malacokból származó savóval vagy szövet-homogenizátummal. Vírusreplikációt egyik sejtvonala esetében sem figyeltek meg. Napjainkig az NRPV-t és BtSk-PeV-t kivéve mindegyik pestivírust sikeresen izolálták különböző sejtvonalaikon. Az APPV-vel végzett erre vonatkozó sikertelen kísérletek alapján feltételezhető, hogy ez a jelenség az E2 fehérje eltérő szerkezetéből adódik (Hause et al., 2015; Arruda et al., 2016; Beer et al., 2016; de Groof et al., 2016)

5.2.2.4.1 A fertőzés terjedése

Egy CT-vel született malacokon végzett vizsgálat kimutatta, hogy a viraemia szintje öt hónapos korban lecsökken, azonban a vírus bélsárban való ürítése tovább folytatódik, amely hozzájárulhat ahhoz, hogy az APPV képes hosszú ideig fennmaradni az érintett állományokban, és időnként újabb klinikai tüneteket okozni. Fertőzött kocák nyálmirigyében, duodenumában, hasnyálmirigyében és vastagbelében jelentős mennyiségű APPV-genom található, amely szintén azt igazolja, hogy a vírus orofekális útvonalon is terjedhet (de Groof et al., 2016).

Egyelőre az APPV-fertőzéssel szemben kialakuló immunitásról nincs sok információ. Egy fertőzéses kísérlet során de Groof és kutatócsoportja megfigyelte, hogy az a koca, amely egyszer A-II-es CT-ben szenvedő almot ellett, az ezt követő almok esetében az újszülött állatok egyike sem mutatta reszketőkór tüneteit (de Groof et al., 2016), tehát az anyaállatban nagy valószínűséggel protektív immunitás alakult ki, amely megakadályozza a malacok transzplacentaris fertőződését. Szintén erre utal, hogy fertőzött állatok nyirokszerveiben a vírus magas szintjét figyelték meg, ezen felül APPV-fertőzött malacok vérsavómintáiban kimutatható volt az interferon- α (IFN- α) citokin is, tehát APPV-fertőzést követően a gazdaszervezet immunrendszere aktiválódik (Muñoz-González et al., 2017).

A CSFV, BVDV, BDV és Hobi-like pestivírus esetében is leírták korábban a fertőzés perzisztens formáját (Meyers et al., 2007; Decaro et al., 2013; Schweizer and Peterhans, 2014). Pestivírusok esetében az N^{pro} és E^{ns} fehérjék kulcszerepet játszanak az I-es típusú interferonválasz visszaszorításában, és így a perzisztens fertőzés kialakulásában (Tautz et al.,

2015), és tekintve hogy az APPV is rendelkezik ezen fehérjékkel, nem meglepő, hogy esetében is megfigyeltek CT klinikai tüneteit nem mutató, viraemiás állatokat (Arruda et al., 2016; de Groof et al., 2016; Postel et al., 2017b), amelyek tünetmentes hordozóként észrevétlenül terjeszthetik a vírust.

Másik lehetséges fertőzési útvonal lehet a fertőzött sperma, akár állományon belül vagy állományok között is. Ezt klasszikus sertéspestis esetében már bebizonyították (de Smit et al., 1999). Az APPV-t több esetben azonosították tenyészkánok spermájában (de Groof et al., 2016; Schwarz et al., 2017; Gatto et al., 2018a; Houston et al., 2022), továbbá egy vizsgálat során egy telepen klinikai tüneteket mutató malacokból azonosított APPV törzs 98,9%-ban megegyezett egy korábban a telepre érkezett spermadózisból kimutatott törzssel (Houston et al., 2022). Habár ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy sperma útján is bekövetkezhet fertőzés, mivel fertőzött ondóval végzett inszeminációs kísérleteket napjainkig még nem végeztek, ezen minták fertőzőképességének megállapítására további vizsgálatokra van szükség.

5.2.2.4.2 Szervtropizmus

Postel és kutatócsoportja vizsgálta elsőként qRT-PCR és fluoreszcens *in situ* hibridizációs módszerrel (FISH) az APPV szervtropizmusát. Mindkét módszerrel azonosították a vírust a gyomorban, a vastagbélben, az orrmirigyekben, a kétféjű karizomban és az ahhoz köthető gerincvelői idegekben, a vese és a lép szöveteiben. A tüdő és az agytörzs esetében a vírus alacsony kópiaszámban volt megtalálható, míg a thymus esetében FISH-módszerrel nem találtak fertőzött sejteket. Ezeken felül a központi idegrendszerben erős jelintenzitást figyeltek meg, többnyire a kisagyvelő belső granularis sejtrétegében, a trigeminalis és gerincvelői dúcokban, valamint az *arcus palatoglossus* mirigyhámsejtjeiben, a duodenum Brunner-mirigyeiben és lymphoid szervek follicularis csíráközpontjaiban (centrum germinativum) (Postel et al., 2016). Feltételezték, hogy a reszketőkórra jellemző klinikai tüneteket a központi idegrendszer előbb felsorolt sejtjeinek APPV-fertőzése okozza.

Korábbi tanulmányok igazolták (de Groof et al., 2016; Schwarz et al., 2017; Gatto et al., 2018a), hogy az APPV megtalálható ivarérett kanok spermájában, amely arra utal, hogy a fertőzött kanok és spermájuk, a *Flaviviridae* család több más tagjához hasonlóan szerepet játszhat a vírus átvitelében. Egy közelmúltbeli tanulmányban Buckley és mtsai (2021) a vírus-RNS széles körű, szisztémás eloszlását figyelték meg, beleértve az endothelsejteket, a fibroblastokat és a simaizomsejteket is, míg a herében erős pozitívítást figyeltek meg a tunica albugineaában és mérsékelt jelölődést a kanyarulat csatornák lumenében.

5.2.2.4.3 Diagnosztika

Három tanulmányban RT-qPCR-rel a legnagyobb APPV-genomkópiaszámot teljes vérben, tracheobronchialis és mesenterialis nyirokcsomókban, lépben, orrtamponban (Arruda et al., 2016), mandulában, csecsemőmirigyben (Muñoz-González et al., 2017), a szájpadlás mirigyeiben, a mandibularis nyirokcsomókban és a gyomorban mérték (Postel et al., 2016).

A RT-qPCR az egyik leggyakrabban használt diagnosztikai eszköz vírusok kimutatására, bár – mint minden más módszer esetében – itt is elengedhetetlen a fajlagosság (specifititás) és az érzékenység (szenzitivitás) megfelelő kombinációja. Kettő kutatócsoport is kimutatta, hogy a pestivírus-genom 5' nem fordítandó régióján (untranslated region, UTR) tapadó primerek reaktívak lehetnek mind az APPV-vel, mind a különböző CSFV-genotípusokkal szemben (Postel et al., 2017b; Kaufmann et al., 2019), tehát specifikusan az APPV kimutatásra nem alkalmazhatók teljes biztonsággal. Muñoz-González és mtsai (2017) eredményei azt mutatták, hogy a vírus a vizsgált, CT-vel érintett malacok 42,3%-ának vérsavójában nem volt kimutatható, amely azt jelentheti, hogy (i) a vírus nem volt jelen a vérsavóban a mintavétel időpontjában, vagy (ii) egy másik, azonosítatlan vírus okozta a CT-t (pl. LINDA-vírus), vagy (iii) az APPV-törzsek nagy variabilitását tekintve az alkalmazott TaqMan-próbán alapuló RT-qPCR-vizsgálat nem volt kellő érzékenységű.

A pestivírusok genetikailag és antigén szerkezetüket tekintve is közeli rokonságban állnak egymással, ezért az adott vírusfaj azonosítására a különböző ellenanyagok alkalmazása nem mindig megbízható. Egy tanulmány kimutatta, hogy az Állategészségügyi Világszervezet által leírt ELISA-eljárással (WOAH 2008) BDV-vel fertőzött sertéseket tévesen CSFV-fertőzöttként diagnosztizálhatnak (Rosell et al., 2014). Kísérleti immunológiai módszereket fejlesztettek ki az APPV E^{ms} fehérjével szemben képződő ellenanyagok kimutatására, amelyek nem mutattak keresztreaktivitást más pestivírusokkal. Egyik esetben APPV E^{ms} peptideket 6× hisztidinfúziós fehérjékként expresszáltattak *Escherichia coli* baktériumban, amelyeket egy APPV-ellenanyagokat kimutató ELISA-teszt kifejlesztéséhez használtak fel (Hause et al., 2015), hasonlóan a CSFV esetében korábban kifejlesztett módszerhez (Lin et al., 2005). Postel és kutatócsoportja a Németországban azonosított S5/9-es APPV törzs *Leishmania tarentolae* eukarióta protozoonban expresszáltatott E^{ms} glikoproteinjét alkalmazta indirekt ELISA-tesztjének előállításához (Postel et al., 2017b). Utóbbi módszert alkalmazva egy másik vizsgálatban a szeronegatív malacok 10%-a volt PCR-pozitív (Postel et al., 2017a), amely azt bizonyítja, hogy az átfogó diagnosztikának direkt és indirekt (szerológiai) módszereket is tartalmaznia kell. Egy kutatócsoport a CSFV és BVDV szero-diagnosztikájában rutinszerűen használt NS3 blokkoló ELISA-val analóg, APPV-vel keresztreakciót mutató antitesteket alkalmazott. Az antitestek előállítása során BALB/c egereket egyidejűleg immunizáltak CSFV-vel és BVDV-vel, a heterogén antitestek közül pedig

kettő anti-NS3-helikáz fehérje adott reakciót APPV-vel fertőzött állatok vérsavómintáival szemben (Schwarz et al., 2017). Napjainkig kereskedelmi forgalomban nincs elérhető, megbízható ELISA-teszt az APPV kimutatására; az előbb felsorolt kísérleti rendszerek diagnosztikai szempontból fontos mutatóinak (érzékenység és specificitás) vizsgálata és értékelése nem történt meg kísérleti körülmények között fertőzött, tehát ismert fertőzési státuszú egyedek mintáival. Arruda és munkatársai 22 olyan állatot vizsgáltak, amelyekről megvonták a kolosztruot. Ezek közül 6-ot szintetikus sejt-kultúra-mediummal (minimal essential medium, MEM), 16-ot pedig APPV-vel inokuláltak, az állatok orrtampon-, vérsavó-, és rágókötelemintáit pedig a fertőzéstől számított 70 napig ellenőrizték RT-qPCR- és ELISA-módszerrel. Az ELISA-módszer esetében anti-E^{ms}, -NS3, és -E2 ellenanyagokat alkalmaztak. A vizsgálat során az E^{ms} alapú ELISA-teszt, továbbá a rágókötelem- és vérsavóminták bizonyultak a legmegbízhatóbbnak APPV kimutatásra (Arruda et al., 2022)

5.2.2.4.4 A vaddisznók szerepe az APPV járványtanában

Több tanulmányban igazolták, hogy a vaddisznó (*Sus scrofa*) fontos vírusrezervoár a klasszikus sertéspestis esetében, és az utóbbi években az APPV-t több kutatócsoport is azonosította vaddisznóeredetű mintákban (Cagatay et al., 2018; Colom-Cadena et al., 2018; Sozzi et al., 2019b).

Colom-Cadena és mtsai (2018) által készített tanulmányban 437 északkelet-spanyolországi vaddisznó vadászat során begyűjtött savómintáját vizsgálták RT-qPCR módszerrel, amelyek közül mindössze egy APPV-pozitív egyedet találtak (12–18 hónapos kan). A szekvenenciaanalízis alapján ez az APPV-törzs 100%-ban azonos egy házisertésből származó, 2003-ban meghatározott spanyolországi szekvenciával. A fertőzött vaddisznó nagy- és kisagyvelejében nem figyeltek meg az APPV-fertőzés nyomán kialakuló CT-re jellemző elváltozásokat, továbbá az állat nem mutatott látható idegrendszeri tüneteket. Ezzel ellentétben, Németországban 456 vaddisznó vérsavómintájának 19%-a bizonyult APPV-pozitívnak RT-qPCR-rel, és 52%-a szeropozitívnak ELISA-módszerrel. APPV-specifikus ellenanyagokat olyan vadászterületeken is kimutattak, ahol nem azonosítottak PCR-pozitív állatot, amely arra utal, hogy a vírus valószínűleg jelen van ezeken a területeken is. Szerbiából származó mintákból PCR-módszerrel nem tudták azonosítani a vírust, azonban a vérsavóminták szeropozitívnak bizonyultak APPV-re (Cagatay et al., 2018). Sozzi és mtsai 430, vadászat során elejtett vaddisznó vérmintáját vizsgálták Észak-Olaszországban APPV jelenlétére. Szerológiai vizsgálatokkal nem, APPV-specifikus RT-qPCR-módszerrel azonban három pozitív mintát is azonosítottak, két különböző tartományból. Az azonosított három törzs két távoli klaszterbe sorolható, korábban leírt, németországi és spanyolországi mintával mutatta a legnagyobb genetikai hasonlóságot (Sozzi et al., 2019b).

5.2.2.4.5 Az APPV elleni védekezés

Jelenleg nincs a piacon elérhető APPV-vakcina, az elmúlt években azonban több kutatócsoport is kísérletezett oltóanyag előállításával. 2016-ban szabadalmaztattak egy inaktivált vakcinát, amely képes megelőzni malacok esetében a reszketőkór klinikai tüneteit. Ehhez egy olyan pestivírus törzset alkalmaztak, amely legalább 95%-ban azonos egy korábban az USA-ban izolált atipikus sertés-pestivírussal (KU194229, Arruda et al., 2016). A szabadalmat beadó kutatócsoport (Patterson et al., 2018) ajánlása szerint kocasüldők és vemhes kocák vakcinázásával megakadályozható a méhen belüli fertőződés, így az utódok fertőződése és a reszketőkór kialakulása is. Azonban mivel napjainkig nem sikerült APPV-törzseket *in vitro* fenntartani különböző sejtvonalakon, egy inaktivált vakcina nagyipari termelésére egyelőre nem adták a feltételek.

A közelmúltban két közlemény is megjelent, amelyben eltérő vakcinafejlesztési stratégiákat alkalmaztak. Egyik esetben vírusszerű részecskék (virus-like particles, VLP) használatát vizsgálták, és bebizonyosodott, hogy *E. coli* baktériumban expresszált, majd természetesen összekapcsolódó (self-assemble) E2 és E^{rns} fehérjék által képezett struktúrák erős ellenanyagválaszt váltanak ki és csökkentik ráfertőzést követően a vírus mennyiséget BALB/c egerek szöveteiben a vakcinázatlan kontrollcsoportéhoz képest (Liu et al., 2021). Ezzel ellentétben Ren és kutatócsoportja (2021) Fc-mediált E2-dimer alegységvakcinát fejlesztett ki. Kísérletük során APPV E2, E2Fc, és E2ΔFc fúziós fehérjék és ISA 201VG és 1313VG adjuvánsok kombinációjának hatását vizsgálták. Eredményeik alapján az Fc-fragmensekkel fuzionált APPV E2 alegységvakcina ISA 201VG adjuvánsal emulzionálva erős humorális és sejtes immunválaszt váltott ki fiatal malacokban, tehát ez a konstrukció is ígéretes vakcinajelölt lehet az APPV elleni védekezésben (Ren et al., 2021).

A vírus által okozott károk mérséklésére megoldást jelenthet még megfelelő süldő-aklimatizációs eljárások bevezetése, például a kocasüldők fiatal kori fertőződése. Az így kialakuló adaptív immunitás képes lehet megelőzni a magzatok méhen belüli fertőződését (Postel et al., 2016). A már klinikai tüneteket mutató malacokat melegen kell tartani, gondoskodni kell a megfelelő mennyiségű és minőségű kolosztrum beviteléről, hogy a malacok az anyai ellenanyagok és lymphocyták mellett elegendő folyadékhoz és tápanyaghoz jussanak.

5.2.3 A reszketőkór

A méhen belüli pestivírus-fertőzés gyakran káros hatással van a fejlődő embrióra, idegrendszeri károsodást, esetenként kisagyi hypoplasiát vagy akár magzatelhullást okozhat.

Az idegsejtek és a myelinhüvely károsodása révén bekövetkező működési zavar reszketőkórhoz, másnéven *myoclonia congenita*-hoz vezethet, amelyre az újszülött malacok izomremegése jellemző és gyakran együtt jelentkezik a hátsó lábak szétcsúszásával (Done et al., 1986). A remegést kiválthatja stressz és a hideg is, azonban a tünetek alvó állapotban akár meg is szűnhetnek (Patterson et al., 1976). Annak ellenére, hogy a remegés önmagában ritkán okoz közvetlenül elhullást, a súlyosan érintett egyedek idővel el is pusztulhatnak az elégtelen kolosztrum- és táplálékfelvétel miatt (de Groof et al., 2016).

A sertések reszketőkóráját először 1922-ben figyelték meg (Kinsley, 1922). A CT esetében megkülönböztetünk kórszövettani vizsgálattal felismerhető agyi és gerincvelői morfológiai elváltozásokat mutató (A-I–A-V típus) és nem mutató (B típus) csoportokat. A CT oktani szempontból a következőképpen osztható fel: A-I klasszikus sertéspestis vírusával való transzplacentális fertőződés (Vannier et al., 1981); A-II korábban ismeretlen eredetű vírusos fertőzés, A-III és A-IV recesszíven öröklődő genetikai rendellenesség (lapály és saddleback fajták) (Done, 1968); A-V mérgezés (metrifonát, triklórfon) (Bölske et al., 1978).

Habár a reszketőkórt már több mint 30 évvel ezelőtt sikeresen indukálták malacokban, vemhes kocák CT-ben szenvedő malacokból származó agyszuszpenzióval történő beoltásával (Done et al., 1986; Vandekerckhove, 1989) a fertőző ágenszt csak az elmúlt évtizedben azonosították. Egyes feltételezések szerint a 2-es típusú sertés-circovírus (PCV2) és különböző astrovírusok állnak a betegség hátterében, azonban erre irányuló tanulmányok nem támasztották alá ezeket (Gustafson and Kaintz, 1974; Stevenson et al., 2001; Blomström et al., 2014).

Minden A típusú CT velejárója az agy- és a gerincvelői idegpályák demyelinizációja, továbbá fertőző formáira (A-I, A-II) jellemző még a szürke- és fehérállomány térfogatának csökkenése (Done, 1968; Bölske et al., 1978). A kisagyvelő külső granularis sejtrétegének elsődleges fertőződése a neuronok pusztulását okozza, amely kisagyi hypoplasiahoz vezet (Zachary, 2012). A klasszikus sertéspestissel ellentétben az APPV-fertőzött reszketőkóros malacok választási korukra klinikailag egészségesekké válhatnak. Feltételezhetően ennek oka a vírus lokalizációjának eltérése a két vírus esetében. Míg a CSFV esetében a teljes kisagyvelő érintett, az APPV csak a kisagyvelő belső granularis és molecularis rétegének sejtjeit fertőzi, így az elhalt idegsejteket pótolhatják az egészséges, csak újszülöttekben megfigyelhető külső granularis rétegből odavándorló sejtek (Postel et al., 2016).

Az A-II típusú CT esetében elektronmikroszkópos módszerrel megfigyelték, hogy a gerincvelő hypomyelinizációján túl a kisagyvelő fehérállományában myelindegradáció is végbement. Ezek az elváltozások némileg eltérnek a CSFV-fertőzött malacok és a BVDV-fertőzött borjak esetében megfigyeltékkel (Bradley et al., 1983; Porter et al., 2010).

Immunhisztokémiai vizsgálatok alapján az oligodendrocyták száma a gerincvelőben nem változott, azonban az oligodendrocyta transzkripció faktor 2 (Olig 2) expressziója megnövekedett (Schwarz et al., 2017). Ezek alapján feltételezhető, hogy az APPV-fertőzés káros hatással lehet a myelinhüvely fejlődésére.

Az elmúlt években fertőzéses kísérleteket végeztek az A-II-es típusú CT és az APPV-fertőzés kapcsolatának bizonyításához, és annak igazolására, hogy a vírus megfelel a Koch-féle posztulátumoknak. APPV-pozitív vérsavómintákkal de Groof és mtsai 3 vemhes kocasüldőt fertőztek intramuscularis úton a vemhesség 28. napján. A beavatkozás után 10 nappal mindhárom koca vérsavómintája PCR-pozitívnak bizonyult APPV-re, habár az egyik állat esetében a vérben csak kis mennyiségű vírusgenom volt kimutatható. Mindhárman a vemhesség 114–115. napján fiáltak, addigra vérsavó- és bélsármintáik is PCR-negatívak voltak. A hárból két alomban voltak CT-ben szenvedő malacok, 11/13 és 13/15 arányban, továbbá rendellenesen nagy számú malac született lábszétcsúszással. Nem találtak összefüggést a vérben kimutatott vírusgenom kópiaszáma és a tünetek súlyossága között. Érdekes módon a vírus két tünetmentes malacból is kimutatható volt. Az alacsony szintű viraemiát mutató kocasüldőtől született malacok mindegyike APPV-negatív és klinikailag egészséges volt (de Groof et al., 2016).

Arruda és mtsai (2016) vizsgálatuk során három kocasüldőt a vemhességük 45. napján, további hármát a 62. napon APPV-tartalmú szuszpenzióval, míg a kontrollcsoportokat ($n = 2$) placeboval inokuláltak a 45. és a 62. napon egyaránt. Ez utóbbi csoportban sem a kocák, sem a malacok nem mutatták a reszketőkór tüneteit és APPV-re PCR-negatívak voltak. Az APPV-vel fertőzött kocák újszülött malacainak jelentős része reszketőkórban szenvedett és mindegyikük esetében PCR-rel igazolták az APPV jelenlétét. A reszketőkór és a lábszétcsúszás előfordulása az APPV-vel fertőzött almok esetében rendre 57–100% és 0–40% között változott.

Egy másik pestivírus, a BVDV-2 lehetséges szerepét is vizsgálták a CT esetében. Vemhességük 45. napján négy vemhes kocasüldőt oronasalisan, másik négy állat esetében pedig szintén a vemhesség 45. napján a magzatokat méhen belül fertőzték BVDV-2-vel. Noha az intrauterin fertőzött malacok magas ellenanyagszintekkel születtek, egyik újszülött sem mutatta CT tüneteit és kórszövettani eltéréseket sem találtak a központi idegrendszerben a kontrollcsoporthoz képest. Ezek alapján nem találtak összefüggést a sertések BVDV-2-fertőzése és a reszketőkór között (Mechler et al., 2018).

Vietnámban egy afrikai sertéspestissel fertőzött telepen PCR-pozitív, de tünetmentes kocák súlyos szaporodás-biológiai zavarokat mutattak, és az élve született malacaik reszketőkór tüneteit mutatták. A mandibularis és az inguinalis nyirokcsomókban, valamint a

vesék kéregállományában vérzéseket, az agyvelőben pedig súlyos, vírusos gyulladásra jellemző kórszövettani elváltozásokat figyeltek meg. A CT-vel érintett malacok agyvelejében és agy-gerincvelői folyadékjában az afrikai sertéspestis vírusát azonosították RT-qPCR módszerrel. A PRRSV-, a PPV-, a CSFV-, és az Aujeszky-betegség vírusa által okozott fertőzést PCR-módszerrel kizárták. Az APPV jelenlétét nem vizsgálták, így nem egyértelműen bizonyítható az okozati összefüggés az ASFV-fertőzés és az állományban megfigyelt CT megjelenése között. Nem zárható ki az APPV-vel való együttes fertőzés gyanúja sem, noha ez utóbbi esetben agyvelőgyulladás nem jellemző még a klinikai tüneteket mutató állatok esetében sem (Nguyen et al., 2022).

6 Anyagok és Módszerek

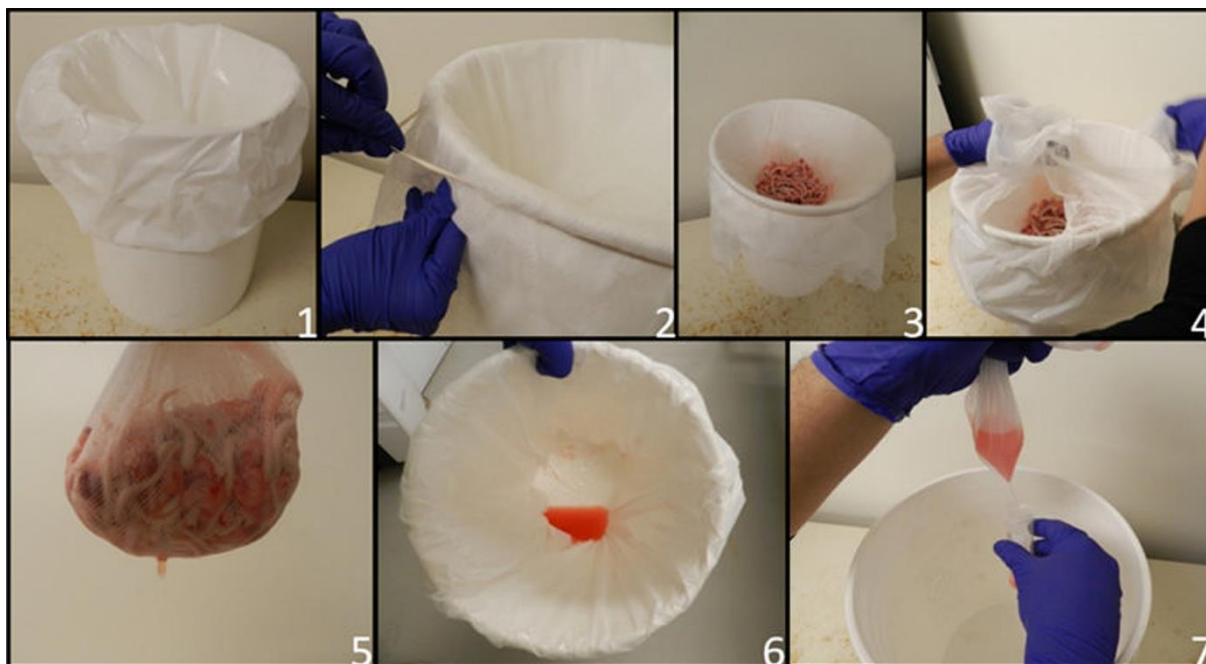
6.1 Vizsgált minták

6.1.1 Diagnosztikai és prevalencia vizsgálatok

Az APPV magyarországi elterjedtségének felmérése, valamint klinikai esetek kórjelzése kapcsán összesen 31 sertéstelepen vizsgáltuk a vírus jelenlétét, amelynek során a mintagyűjtés a hatályos magyar állatjóléti előírásoknak megfelelően zajlott (Etikai engedély száma: PE/EA/544-5 /2018).

Vizsgálataink során a 2018. és 2022. közötti időszakban 23 hazai és egy szlovákiai telepről összesen 2650 vérsavómintát ellenőriztünk, korcsoportonként képezett 5-ös poolokban. Ezek közül 23 telepről 100 (60–160) db, korcsoportonként 10 állattól származó mintát gyűjtöttünk. Az alábbi korcsoportok mintáit vizsgáltuk: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 hetes állatok, továbbá süldők, kétszer-és négyszer fialt kocák. Egy telep esetében korábban PRRS-monitoring céljából gyűjtött 265 vérsavóminta kapcsán a korcsoportokról nem volt adatunk.

Ezen telepek közül 22 esetében herelési folyadékmintát (processing fluid) is, további három telep esetében pedig kizárólag herelési folyadékmintát vizsgáltunk. A herelési folyadék minta 10–15 alom 3–5 napos kan malacainak kasztrálása után összegyűjtött heremintákból felfogott savós jellegű folyadék. A mintagyűjtés során egy tiszta műanyag vödörré eldobható műanyag zacskót és szövetpelenkát erősítettünk gumiszalaggal, erre helyeztük a herelési mintákat (szövet és folyadék), majd a szövetpelenkát a szűrés végén fennmaradt szövetekkel együtt eltávolítottuk, majd a műanyag zacskóban felfogott folyadékot 15 ml térfogatú műanyag centrifuga csövekbe engedték (5. ábra) (Lopez et al., 2018)



5. ábra: A herelési folyadékminták gyűjtésének lépései

(1) tiszta műanyag zacskót helyeztünk egy műanyag vödörbe, (2) a zacskóra tiszta szövetpelenkát helyeztünk, majd ezeket gumiszalaggal rögzítettük a vödör szájához, (3) a gézre borítottuk a heréléskor felfogott szövet és folyadékmintát, (4-5) a szűrési folyamat végén eltávolítottuk a szövetpelenkában fennmaradt szilárd részeket, (6) a műanyag zacskóban már csak a herelési folyadék található, (7) a herelési folyadékot tartalmazó zacskót leemeltük a vödörről, a tetejét összehúztuk, az alján pedig egy lyukat ejtve egy 15 mL-es centrifuga csőbe engedtük a mintát (forrás: Lopez et al., 2018)

Szintén 22 telepről, telepenként 4–10 falkából összesen 198 db rágókötélmintát (oral fluid) gyűjtöttünk, a battérián/utónevelőn 10 hetes, a hizlaldán pedig 20 hetes állatoktól. A mintagyűjtés során az adott állatcsoport fölé lógattunk egy erre a célra kialakított pamutkötelet 15–20 perc időtartamig, amelyet ez idő alatt minden egyednek lehetősége volt megrágni. Ezt követően a köteleket egy műanyag zacskóba helyeztük, folyadéktartalmát kipréseltük és egy 15 ml-es, zárható gyűjtőcsőbe öntve szállítottuk a laboratóriumi vizsgálat helyére.

Öt további telepről különféle szövetmintákat gyűjtöttünk (agy, kisagy, agytörzs, mandula, vesék, tracheobronchialis és retropharyngealis nyirokcsomók, lép, thymus, colon) CT tüneteit mutató malacok teteméből. A vizsgálandó szövettípusokat az alapján választottuk ki, hogy irodalmi adatok szerint melyekben mutatható ki legnagyobb eséllyel a vírus (de Groof et al., 2016; Postel et al., 2016).

A begyűjtött savó-, herélési folyadék-, rágókötel-, és szövetmintákat további vizsgálatokig -80°C -on tároltuk.

Ezekon felül a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Intézetének gyűjteményéből 2005-ből, 2008-ból és 2010-ből származó, CT-ben szenvedő újszülött malacok formalinban fixált, paraffinba ágyazott (formalin fixed, paraffin embedded, FFPE), archivált szövetmintáit is vizsgáltuk.

6.1.2 Szervtropizmus-vizsgálatok

Két sertéstelepről, 1–3 napos élő malacot (3–3 állat mindkét telepről, a CT-fertőzött állatok alomtársak voltak, míg az egészségeseket másik alomból választottuk ki) a hatályos magyar állatjóléti előírások szerint humánusan elaltattuk (Etikai engedély száma: PE/EA/544-5 /2018). Minden gazdaságból 2–2 kiválasztott állat szenvedett reszketőkórbán (A2-3, A5-6), a harmadik, klinikailag egészséges malac (A1, A4) szolgált kontrollként. Az állatokból gyűjtött szövetminták (kisagyvelő, agytörzs, nagyagyvelő, mandula, vese, tracheobronchialis nyirokcsomó, lép, csecsemőmirigy, vastagbél, mesenterialis nyirokcsomó, here) egyik felét PCR-vizsgálatra használtuk fel, másik felét 10%-os semleges pufferolt formalinban fixáltuk 24 órán keresztül, majd víztelenítés után paraffinba ágyaztuk.

A Bécsi Állatorvostudományi Egyetemről egy 6 hónapos, CT-vel született, később tünetmentessé vált és ivarériségig követett kan FFPE-blokkokba ágyazott szövetmintáit (vastagbél, lép, ileum, máj, here, tüdő, mellékvese, bulbourethralis mirigy, prosztatata, hasnyálmirigy, kis- és nagyagyvelő) vizsgáltuk. Az állat 6 hónapos korában még jelentős mennyiségben ürítette az APPV-t az ondójában ($2,1 \times 10^9$ GE/mL) és a nyálában ($2,9 \times 10^9$ GE/mL) egyaránt, míg a vérsavóban a vírus két nagyságrenddel alacsonyabb szintjét mérték ($2,0 \times 10^7$ GE/mL). APPV NS3 helikáz specifikus antitestek az állat születésétől kezdve 8 hetes koráig voltak kimutathatóak (Schwarz et al., 2017), tehát a mintavétel időpontjában az állat már szeronegatív volt.

6.1.3 RNS-kivonás és PCR-vizsgálatok

A heréket tartalmazó gyűjtőzacskókból a folyadékfrakciót a korábban leírtak szerint gyűjtöttük össze (Lopez et al., 2018), míg a boncolás során gyűjtött szervmintákat Tissuelyzer II (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével homogenizáltuk és 3000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 3 percig. A vírus-RNS-t vérsavóból, herélési folyadékból és a szövethomogenizátumok felülúszójából Indispin/Cador Pathogen Mini Kit-tel (Qiagen) vontuk ki, QIAcube (Qiagen) automatikus nukleinsavizoláló robot segítségével, a gyártó utasításai szerint.

Az FFPE-szövetmintákból AIIPrep DNS/RNS FFPE Kit-tel (Qiagen) vontuk ki az RNS-t, a gyártó előírásai szerint. A blokkok felszínéről a legfelső, oxidálódott részt eltávolítottuk, majd blokkonként 2 db 10 µm vastag metszetet készítettünk rotációs mikrotómmal. A szeleteket steril gyűjtőcsőbe tettünk és 1 ml xilolban 15 mp-ig azonnal vortexeltük, majd centrifugáltuk (2 perc, 12000 fordulat/perc). A felülúszót óvatosan lepipettáztuk a pellet felzavarása nélkül, majd a xilol maradványainak eltávolításhoz 1 ml abszolút etanolt mértünk rá, ismét vortexeltük, centrifugáltuk, és lepipettáztuk a felülúszót. A pelletet tartalmazó gyűjtőcsövet nyitott fedővel 37 °C-ra előmelegített termosztátba helyeztük és 10 percig inkubáltuk, vagy amíg már nem érződött az etanol szaga. Ezután 150 µl proteináz K puffert és 10 µl proteináz K oldatot mértünk a mintákra, majd 15 mp vortexelés után 15 percig inkubáltuk 56 °C-on. Ezután a hatékony precipitáció érdekében a mintánkat 3 percig jégre helyeztük, majd 15 percig 16 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. Ettől a lépéstől kezdve a kit használati utasításának a teljes RNS kivonásra optimalizált protokollját követtük. A centrifugálás után a felülúszót óvatosan lepipettáztuk, majd egy új, steril gyűjtőcsőbe mértük és 80 °C-on inkubáltuk 15 percig. Ezután a nukleinsav tisztítása szilikon membrános oszlopon (RNeasy MinElute) történt.

A vérsavó-, herélési folyadék-, szövet-, és FFPE-mintákból kivont nukleinsavat minden esetben 60 µl elúciós pufferben (EB) (Qiagen) vettük fel, és közvetlenül ezután RT-qPCR-vizsgálatnak vetettük alá vagy –80 °C-on tároltuk a vizsgálatokig.

6.1.3.1 RT-qPCR

A sertéstelepekről érkező vérsavó-, rágókötel- és herélési folyadékminták vizsgálatához RT-qPCR-t alkalmaztunk. Korábban az 5' UTR régióra tervezett RT-qPCR rendszerekkel kísérleteztünk, azonban ezek nem voltak alkalmasak az összes hazai, korábban hagyományos, end-point RT-PCR-vizsgálattal megtalált vírustörzs kimutatására. Legalkalmasabbnak egy multiplex, TaqMan-próbás rendszer bizonyult (Yuan et al., 2021), amely az NS3 és NS5b régiókra tervezett, fluoreszcensen jelölt rendszerek (1. táblázat) együttes alkalmazásával az általunk eddig Magyarországon talált összes variáns kimutatására alkalmasnak bizonyult.

1. táblázat: A PCR vizsgálatokhoz alkalmazott primerek és fluoreszcens jelölésű próbák

Primer/próba	Szekvencia (5'–3')	Target régió	Felhasználás	Hivatkozás
APPV_5587-fw	CAGAGRAAAGGKCGAGTGGG	NS3	Diagnosztika	(Postel et al., 2016)
APPV_5703-rev	ACCATAYTCTTGGGCCTGSAG	NS3	Diagnosztika	(Postel et al., 2016)
APPV_5087-fw	GAAAGTGTCTGCCGCTTCATG	NS3	Szekvenálás	(Postel et al., 2016)
APPV_4186-fw	GTGCGGCCTCCCAACTGTAG	NS2	Szekvenálás	(Postel et al., 2016)
APPV_4273-fw	TGGGGACCTCACCAGTGATG	NS2	Szekvenálás	(Postel et al., 2016)
APPV_5169-rev	ACGTCACCCTCTTCCGCTC	NS3	Szekvenálás	(Postel et al., 2016)
NS3-F2 Q	GTGGTCATAGAYACYATGCAG	NS3	Diagnosztika	(Yuan et al., 2021)
NS3-R2 Q	TTCCTCTGGCCCTGTTCTTC	NS3	Diagnosztika	(Yuan et al., 2021)
NS3-P2 Q	FAM-TAGTGAATTTCTCVGCAAAGATGCC-BHQ1	NS3	Diagnosztika	(Yuan et al., 2021)
NS5B-F Q	TCGTCACTTAYAAGAAACCACG	NS5b	Diagnosztika	(Yuan et al., 2021)
NS5B-R Q	TTTACCCACTTGATACATTATTTGGT	NS5b	Diagnosztika	(Yuan et al., 2021)
NS5B-P Q	FAM-ATACAGTACCCTGAGGCAGTCAC-BHQ1	NS5b	Diagnosztika	(Yuan et al., 2021)

A vizsgálatokhoz One Step RT-PCR Kit-et (Qiagen) alkalmaztunk (2. táblázat) a következő hőmérsékleti profillal: a reverz transzkripció 50 °C-on 40 percig, a reverz transzkriptáz enzim inaktíválása, ill. a Taq-polimeráz hőaktivációja 95 °C-on 15 percig majd 45 cikluson keresztül 95 °C-on denaturáció 15 másodpercig, primerek kapcsolódása és elongáció 58 °C-on 30 másodpercig. A fluoreszcenciaadatok gyűjtése a ciklusok utolsó lépésénél, a FAM (6-carboxyfluorescein) festéknek megfelelő 510±5 nm emissziós hullámhosszon, a zöld csatornán történt, Rotor Gene Q (Qiagen) készülékben.

2. táblázat: A RT-qPCR reakció összetétele 25 µl reakcióelegyre számolva

Reagens	Mennyiség (µl)
RNáz-mentes víz	7,9
5x QIAGEN OneStep RT-PCR puffer	5
dNTP Mix (10mM)	1
NS3-F2 Q (10 µM)	1
NS3-R2 Q (10 µM)	1
NS3-P2 Q (10 µM)	0,5
NS5B-F Q (10 µM)	1
NS5B-R Q (10 µM)	1
NS5B-P Q (10 µM)	0,5
RNáz inhibitor (Ribolock, 40U/µl, Fermentas)	0,1
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1
Templát	5

6.1.3.2 RT-PCR

A reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) vizsgálatokhoz One Step RT-PCR Kit-et (Qiagen) használtunk (3. táblázat). A részleges szekvencia meghatározáshoz az RT-PCR-t az NS2–NS3 fehérjék kódoló régióját célzó primerekkel (1. táblázat) (Postel et al., 2016). A reakció az alábbi hőprofilon zajlott: a reverz transzkripció 50 °C-on 30 percig, a reverz transzkriptáz enzim inaktiválása, ill. a Taq-polimeráz hőaktivációja 95 °C-on 15 percig, majd 40 cikluson keresztül 95 °C-on denaturáció 30 másodpercig, primerek kapcsolódása 58 °C-on 30 másodpercig, elongáció 72 °C-on 30 másodpercig. Az RT-qPCR vizsgálatot Genesys 96T PCR készülékkel (Xi'an Tianlong Science and Technology, Xi'an City, China) végeztük.

3. táblázat: Az RT-PCR-reakció összetétele 10 µl reakcióelegyre számolva

Reagens	Mennyiség (µl)
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	2
dNTP Mix (10mM)	0,4
Forward primer (40 µM)	0,2
Reverse primer (40 µM)	0,2
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0,4
RNáz inhibitor (Ribolock, 40U/µl, Fermentas)	0,1
RNáz-mentes víz	5,7
Templát	1

6.1.3.3 Agaróz gélelektroforézis

A PCR-termékek vizualizálására 1,2%-os agaróz gélét használtunk. A géleket 1 × TAE-pufferben, 120 V feszültségen, a ME15-7-10-15 and Mini-300 (Major Science, Saratoga, CA, U.S.A.) horizontális elektroforézis-készülékkel futtattuk. Az amplikonok futását a PCR-termékhez hozzáadott mintapufferrel (6 × TriTrack DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, amely brómfenolkék, xilén-cianol FF és orange G festékek keveréke) követtük. Az elválasztott fragmensek vizualizálásához SYBR Safe DNS-festéket (Thermo Fisher Scientific) kevertünk a gélhez, amelyben kék/UV fény megvilágítással gerjeszthető a kettős spirál bázisai közé interkalálódó festékanyag. A PCR-termékek méretét 50 bp DNA Ladder (O'GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg. A géldokumentációt a Gel documentation system Basic rendszerrel (VWR, Leicestershire, Anglia) végeztük.

6.1.4 Sanger-szekvenálás és filogenetikai vizsgálatok

A szekvenáló primerekkel (1. táblázat) futtatott PCR-termékek esetében az agaróz gélelektroforézis után a megfelelő hosszúságú amplikonokat (NS2 ~800 bp, NS3 ~600 bp) steril szikével kivágtuk, majd Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk, a gyártó útmutatása alapján. A kivágott géldarabokat gyűjtőcsőbe helyeztük majd 800 µl QG puffert pipettáztunk rá és 10 percig, vagy amíg a gél teljesen feloldódott, 50 °C-on inkubáltuk. A mintánkat ezután szilika-membrános oszlopon tisztítottuk, majd 40 µl elúciós pufferben (EB) vettük fel.

Az FFPE-mintákból kivont RNS feltehetőleg a hosszú tárolás során bekövetkező fragmentáció miatt alkalmatlan volt hosszabb amplikonok felsokszorozására, így ezek esetében a szekvencia meghatározást az NS3-fehérjekódoló régióra tervezett diagnosztikai primerekkel (APPV_5587-fw, APPV_5703-rev) végeztük.

A kétirányú, Sanger-szekvenálási PCR-reakciót a megfelelő szekvenáló primerekkel (1. táblázat), fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi-nukleotidos láncterminációs módszerrel, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük. A szekvencialeolvasás kapilláris-elektroforézis módszerrel (ABI PRISM 3100 automata) történt a Magyar Természettudományi Múzeum DNS Laboratóriumában, bér munka keretében. A nyers elektroforetogramokat Chromas 2.6.6 (Technelysium Pyt Ltd., Brisbane, Ausztrália) szoftverrel jelenítettük meg, ellenőriztük a leolvasás megbízhatóságát és a kétirányú szekvenálási eredményeket összehasonlítottuk egymással és egy, a GenBank-ból letöltött referencia törzsszel (KY652092), az esetleges hibákat és eltéréseket javítottuk.

Az így kapott szekvenciákat elsőként BLAST (NCBI) internetes szoftverrel azonosítottuk, majd a GenBank-ban található hasonló, reprezentatív NS2–NS3 fehérjekódoló szekvenciákat gyűjtöttünk, amelyek illesztése mafft 7 online szoftver E-INS-i beállításával történt (Kato and Toh, 2008). A Maximum Likelihood (ML) analízist és törzsfarekonstrukciót MEGA X szoftverrel végeztük (Kumar et al., 2018), a megfelelő modellt a szoftver MODELS beállításával (Nei and Kumar, 2000) választottuk ki, az ML bootstrap-értékeket 1000 ismétlés alapján határoztuk meg. A filogenetikai fát MEGA X szoftverrel vizualizáltuk és szerkesztettük.

A *Flaviviridae* család filogenetikai elemzéséhez az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ajánlását követtük, a négy nemzetségre jellemző fajok -függő RNS-polimerázt (RdRP) kódoló konzervált szekvencia régióját Maximum Likelihood (ML) analízissel hasonlítottuk össze. Az analízis MEGA X szoftverrel (Kumar et al., 2018) történt, a GTR+G+I szubsztitúciós modellt a szoftver MODELS beállításával (Nei and Kumar, 2000) választottuk ki. A bootstrap-analízist 1000 ismétléssel végeztük (2. ábra)

A *Pestivirus* nemzetség tagjainak filogenetikai elemzéséhez az ICTV által javasolt nem szerkezeti fehérje 5b (NS5b) kódoló szekvencia régióját hasonlítottuk össze Maximum Likelihood (ML) analízissel. Az analízis MEGA X szoftverrel (Kumar et al., 2018) történt, a GTR+G+I szubsztitúciós modellt a szoftver MODELS beállításával (Nei and Kumar, 2000) választottuk ki. Mindegyik fajból egy reprezentatív szekvenciát használtunk az analízishez: *Pestivirus A* (BVDV-1) (AB078950), *Pestivirus B* (BVDV-2) (AB567658), *Pestivirus C* (CSFV) (AF407339), *Pestivirus D* (BDV) (AB897785), *Pestivirus E* (Pronghorn) (AY781152), *Pestivirus*

F (Bungowannah) (EF100713), *Pestivirus G* (Giraffe) (AF144617), *Pestivirus H* (Hobi-like) (AB871953), *Pestivirus I* (Aydin-like) (JX428945), *Pestivirus J* (NrPV) (NC025677), *Pestivirus K* (APPV) (KR011347), *Pestivirus L* (LINDA) (KY436034), *Pestivirus M* (PhoPeV) (MK910227), *Pestivirus N* (TSV) (MZ664274), *Pestivirus O* (ovIT PeV) (MK618726), *Pestivirus P* (DYPV) (MK636874), *Pestivirus Q* (RtNn-PeV) (KY370101), *Pestivirus R* (RtAp-PeV) (KY370100), *Pestivirus S* (BtSk-PeV) (MH282908)(3. ábra)

6.1.5 RNS-alapú *in situ* hibridizációs vizsgálatok

1–3 napos malacok kis- és nagyagyvelő-, valamint hereszövetét, továbbá egy 6 hónapos kan szövetmintáit vizsgáltuk egy speciális, RNS-alapú *in situ* hibridizációs módszerrel (RNAscope), az APPV-genom szöveti lokalizációjának megjelenítése céljából. A művelet során az FFPE-mintákból 4 µm vastagságú metszeteket pozitív töltésű üveglapra (SuperFrost, Thermo Scientific) rögzítettük.

6.1.5.1 Minták deparaffinálása és feltárása

A feltárás során a formaldehid által képezett keresztkötések felbomlanak, a nukleinsavak hozzáférhetővé válnak. A metszeteket termosztátban egy órán át, 60 °C-on inkubáltuk, majd elszívófülke alatt 2 × 5 percig xilolban, 2 × 2 percig 96%-os etanolban víztelenítettük, majd 5 percig szobahőmérsékleten száradni hagytuk. A hibridizációs termosztátot (HybEZ™ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) 40 °C-ra előmelegítettük, a hozzá tartozó hibridizációs kamrába a használat előtt 30 perccel vízzel átitatott párasító lapot helyeztünk, majd a kamrát a már felfűtött termosztátba helyeztük. Eközben előkészítettünk 700 ml 1× Target Retrieval oldatot egy főzőpohárban, majd fóliával lefedve forraltuk. A deparaffinált metszetekre 5–8 csepp RNAscope® hidrogén-peroxid-oldatot cseppentettünk, majd 10 perc szobahőmérsékleten való inkubációt követően desztillált vízzel kétszer mostuk. A tárgylemezeket a már forrásban lévő 1× Target Retrieval oldatba merítettük és 15 percig alufóliával lefedve forraltuk, majd kétszer desztillált vízben, egyszer 96%-os etanolban mostuk, majd szobahőmérsékleten, levegőn száradni hagytuk. Ezután Immedge™ hidrofób jelölő tollal 2–4 alkalommal körberajzoltuk a szövetmintákat, majd 10 percig, szobahőmérsékleten száradni hagytuk. A továbbiakban kb. 5 csepp RNAscope® Proteáz Plus oldatot cseppentettünk a metszetekre úgy, hogy a szervmintákat teljesen lefedje. Ezután a metszeteket a 40 °C-ra előmelegített hibridizációs termosztátban (HybEZ™ Oven, Advanced Cell Diagnostics) inkubáltuk 30 percig, majd desztillált vízzel kétszer mostuk.

6.1.5.2 RNAscope

A vírusgenom kimutatására az APPV NS2–3 fehérjéit kódoló régiókra komplementer, általunk tervezetett, 20 pár dupla Z, többszörös jelerősítő rendszerrel, ill. alkalikus-

foszfatázzal jelölt oligonukleotid próbákat (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA, katalógusszám: 503381) alkalmaztunk, így a vírussal fertőzött sejtek piros színnel jelölődtek. Az RNS sértetlenségét és a reakció specificitását belső kontroll próbákkal ellenőriztük: pozitív kontrollként a minden sertéssejtben expresszálandó Ss-PPiB (*Sus scrofa* peptidilprolil izomeráz B, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA, katalógusszám: 428591), negatív kontrollként pedig a bakteriális dapB (*Bacillus subtilis* dihidrodipikolinát reduktáz, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA, katalógusszám: 310043) RNS-re tervezett próbákat alkalmaztuk.

A feltárás után a metszetekre 4–5 csepp, a célszekvenciákra specifikus próbák keverékét csepegtettünk, amellyel 40 °C-on 2 órán keresztül inkubáltuk a hibridizációs termosztátban, majd előzőleg elkészített mosó pufferban (Advanced Cell Diagnostics, katalógusszám: 310091) 2 × 2 percen keresztül mostuk. A felesleges folyadék leitatása után amplifikáló (Amp 1–6) reagenseket mértünk a lemezre, a lépések között 2 × 2 percen keresztül mosópufferbe állítottuk a metszeteket (4. táblázat).

4. táblázat RNAscope módszer során alkalmazott amplifikációs lépések

Reagens	Inkubációs idő (perc)	Inkubációs hőmérséklet (°C)
Amp 1	30	40
Amp 2	15	40
Amp 3	30	40
Amp 4	15	40
Amp 5	30	20
Amp 6	15	20

Az utolsó amplifikáló lépést követően a metszetekre Fast RED-B és Fast RED-A reagensek 1:60 arányú keverékéből 120–120 µl-t pipettáztunk, majd 10 percig inkubáltuk a mintákat hibridizációs kamrában, szobahőmérsékleten, majd desztillált vízzel mostuk. Ezt követően a metszeteket 2 percre 50%-os hematoxin-oidatba (Gill No. 1, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Németország) merítettük, desztillált vízzel mostuk, majd 10 másodpercig 0,02%-os ammónia oldatban kékítettük, melyet követően ismét desztillált vízben mostuk. A felesleges folyadék leitatását követően a mintákat 60 °C-on 15 percig szárítottuk, majd a tárgylemezeket xilolba merítettük, BioCare EcoMount (Advanced Cell Diagnostics, katalógusszám: 320409)

médiummal és fedőlemezzel fedtük. A tárgylemezeket levegőn száradni hagytuk, 5 perc elteltével fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

6.1.6 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az APPV-fertőzött állatok heréjében az RNS *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal párhuzamosan immunhisztokémiai (IHC) módszerekkel kíséreltük meg azonosítani az érintett sejttípusokat.

Az együttes IHC- és RNAscope-vizsgálatokhoz a hat, újszülött, általunk elaltatott malac heréjéből készült FFPE-blokkokból 3–4 µm vékony sorozatmetszeteket készítettünk. A tárgylemezeket xilolban (2 × 10 perc) és 96%-os etil-alkoholban (2 × 5 perc) deparaffináltuk. Desztillált vizes mosást követően egy speciális feltáró oldatban (pH = 9, Target Retrieval Solution, DAKO) forraltuk a mintákat mikrohullámú sütőben (800 W), vWF esetében 25 percig, c-Kit és α-SMA esetében pedig 10 percig, majd a mintákat peroxidázblokkoló reagenssel (EnVision FLEX, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 5 percig inkubáltuk. A metszeteket a megfelelő elsődleges antitestekkel (5. táblázat) 30 percig inkubáltuk, szobahőmérsékleten. Az antigénhez kötött elsődleges antitesteket standard avidin-biotin immunperoxidáz komplex (ABC) alkalmazásával mutattuk ki (EnVision FLEX HRP kit, Agilent), amelyhez 3,3 -diaminobenzidin-tetrahidrokloridot (DAB szubsztrát-kromogén, DAKO) használtunk kromogén szubsztrátként. Desztillált vizes mosást követően a metszeteket 30 másodpercig hematoxilinnel (GILL II, Merck, Darmstadt, Németország) festettük. A tárgylemezeket 96% és abszolút etil-alkoholba (2 × 5 perc), majd xilolba (2 × 5 perc) merítettük. Ezt követően a mintákat DPX nem-vizes médiummal és fedőlemezzel fedtük (Sigma Aldrich, Darmstadt, Németország).

5. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során alkalmazott antitestek és jellemzőik

Antitest	Célsejtek	Típus	Hígítás	Gyártó
anti-von Willebrand Factor (vWF)	endothelsejtek	poliklonális nyúl anti-human	1 : 500	DAKO, Glostrup, Dánia
anti-c-Kit	Leydig- és csírasejtek	poliklonális nyúl anti-human	1 : 200	DAKO, Glostrup, Dánia
anti-alfa simaizom aktin (α -SMA)	kontraktilis simaizomelemek különféle sejttípusokban	monoklonális egér anti-human klón1A4	1 : 100	DAKO, Glostrup, Dánia

Az RNAscope- és IHC-vizsgálatok során a fedést követően a tárgylemezeket levegőn száradni hagytuk, 5 perc elteltével fénymikroszkóppal vizsgáltuk, 12 óra elteltével pedig metszetszkennert (Pannoramic Midi Slide Scanner, 3D Histech, Magyarország) segítségével digitalizáltuk. Az összetartozó RNAscope- és IHC-sorozatmetszeteket a CaseViewer/SlideViewer szoftver (3DHistech) MultiView Toolbox csomagjával illesztettük és elemeztük.

6.1.7 Statisztikai vizsgálatok

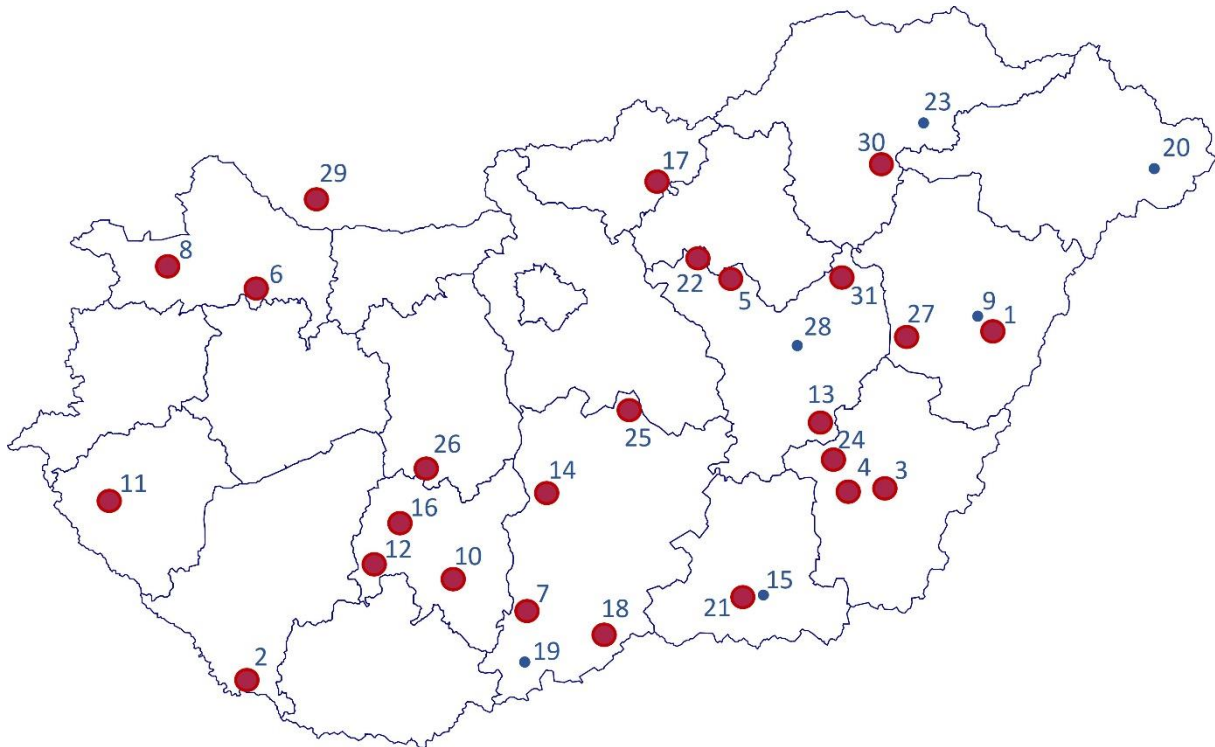
A vérsavó-, rágókötel-, és herélési folyadékminták RT-qPCR-vizsgálata során kapott eredményeket táblázatos formában rögzítettük, majd GraphPad Prism 9 szoftverrel (9.4.1.681 verzió, GraphPad Software, Boston, USA) statisztikailag elemeztük, hogy van-e szignifikáns különbség az egyes korcsoportok között. Első lépésként mindegyik adatsor esetében megvizsgáltuk, hogy normális eloszlás jellemző-e az adathalmazunkra. Amennyiben ez teljesült, egyutas ANOVA-analízist, majd Tukey-féle post hoc tesztet végeztünk 95%-os konfidenciaszinten. Amennyiben adataink nem mutattak normális eloszlást, nemparaméteres Kruskal–Wallis-próbát, majd Dunn-féle post hoc tesztet végeztünk, szintén 95%-os konfidenciaszinten.

7 Eredmények

7.1 Az APPV magyarországi elterjedtsége

Az APPV jelenlétét összesen 30 magyarországi telepen ellenőriztük: két telepről reszketőkóros állatokból archivált szövetmintákat (FFPE-blokkok), hat telep esetében klinikai tüneteket mutató állatokból származó friss szövetmintákat; 27 telepen vérsavó-, herelési folyadék-, és/vagy rágókötelemintákat vizsgáltunk RT-qPCR-módszerrel.

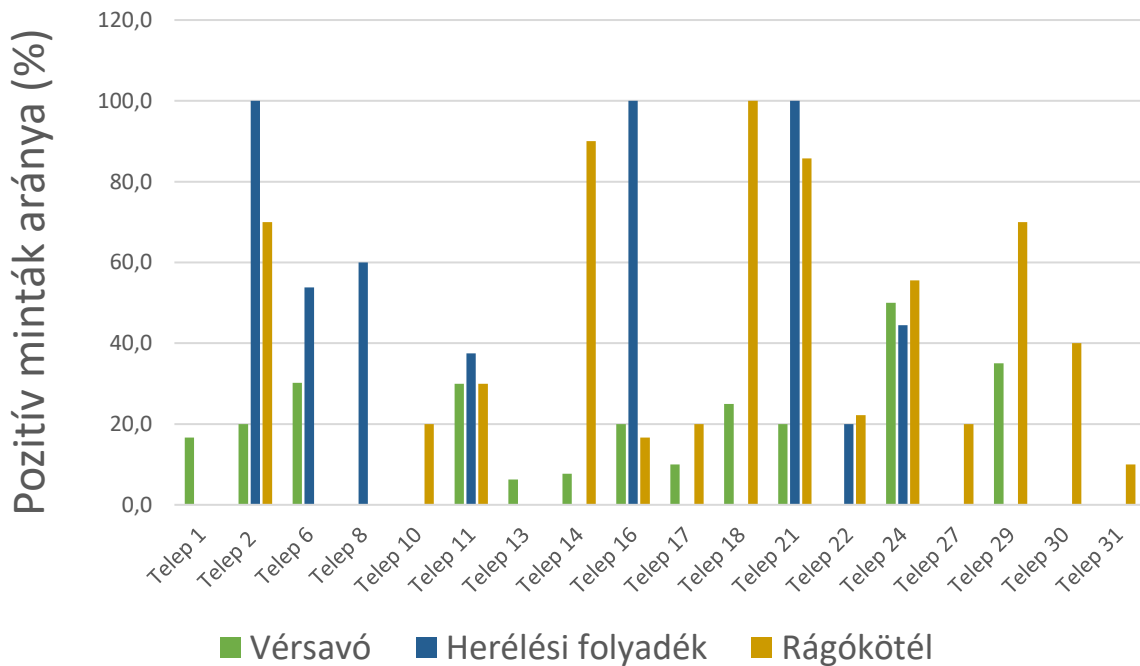
Az APPV-t összesen 24 hazai és egy szlovákiai telepen azonosítottuk (6. ábra), a prevalenciafelmérés során vizsgált 27 telep közül pedig 18 bizonyult fertőzöttnek, ami 66,67%-os prevalenciának felel meg. Vizsgálataink során valamennyi, CT-re jellemző klinikai tünetet mutató állat szövetmintájából kimutattuk a vírust, amelyek közül a 2005, 2007 és 2010-ből származó, archivált FFPE-minták a legkorábbi magyarországi dokumentált esetek közé tartoznak.



6. ábra Magyarországon vizsgált sertéstelepek, az APPV jelenlétét a piros színnel jelzett telepeken azonosítottuk

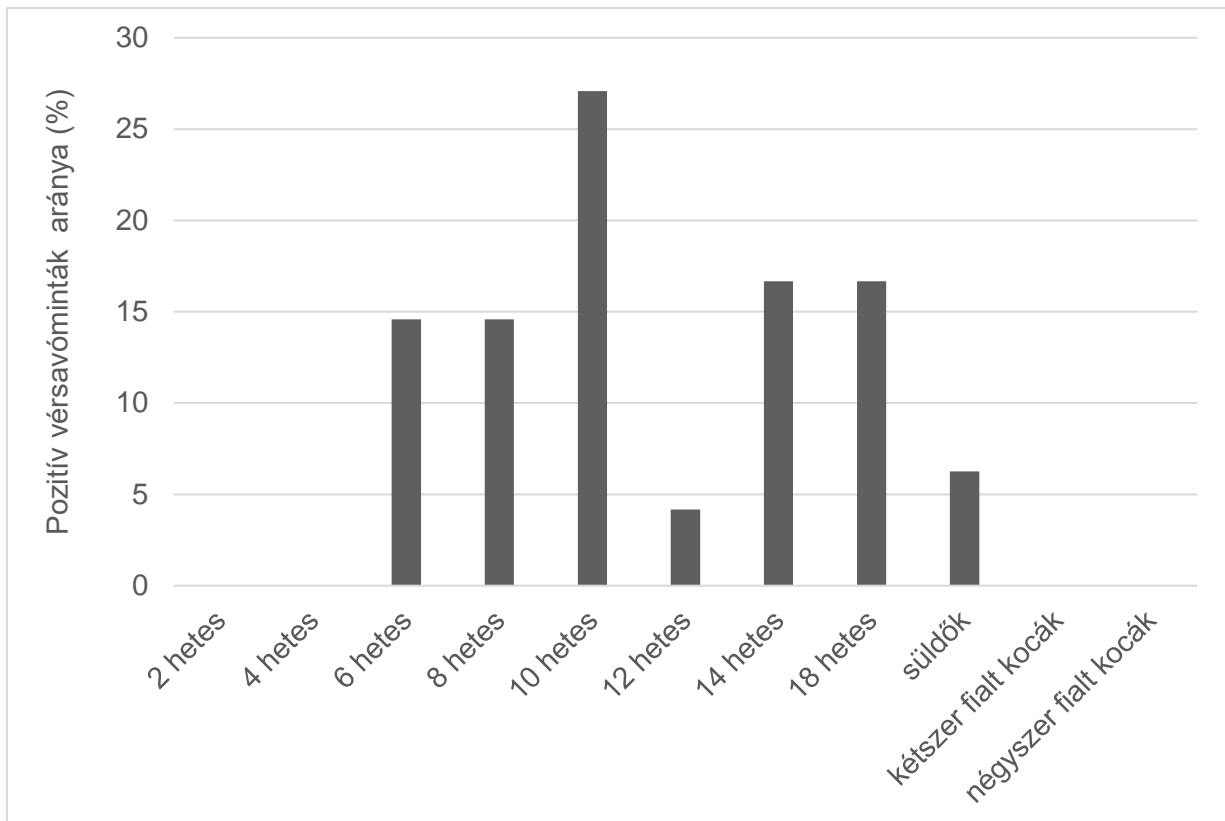
A pozitív telepek esetében átlagosan a vérsavóminták 21%-ában, a herelési folyadékminták 57%-ában és a rágóköteleminták 72%-ában volt kimutatható az APPV-genom. A vérsavóminták esetében a minimum és maximum érték 6,3% és 50%, a herelési folyadékok esetében 20% és 100%, a rágóköteleminták esetében pedig 10% és 100% volt. Négy olyan

telepet találtunk, ahol kizárólag a rágókötel-, négyet ahol csak a vérsavó- és rágókötel- és egyet ahol csak a herélési folyadék- és rágókötelmintákból tudtuk kimutatni az APPV jelenlétét. Négy telepen mindhárom mintafajtában azonosítani tudtuk a vírust. Két telepről csak herélési folyadék-, egy telepről pedig csak vérsavómintákat kaptunk, ezek közül két telep bizonyult fertőzöttnek. Azon fertőzött telepeken, ahonnan 5-nél több herélési folyadékmintát vizsgáltunk, ebből a mintatípusból is minden esetben ki tudtuk mutatni a vírust (7. ábra).



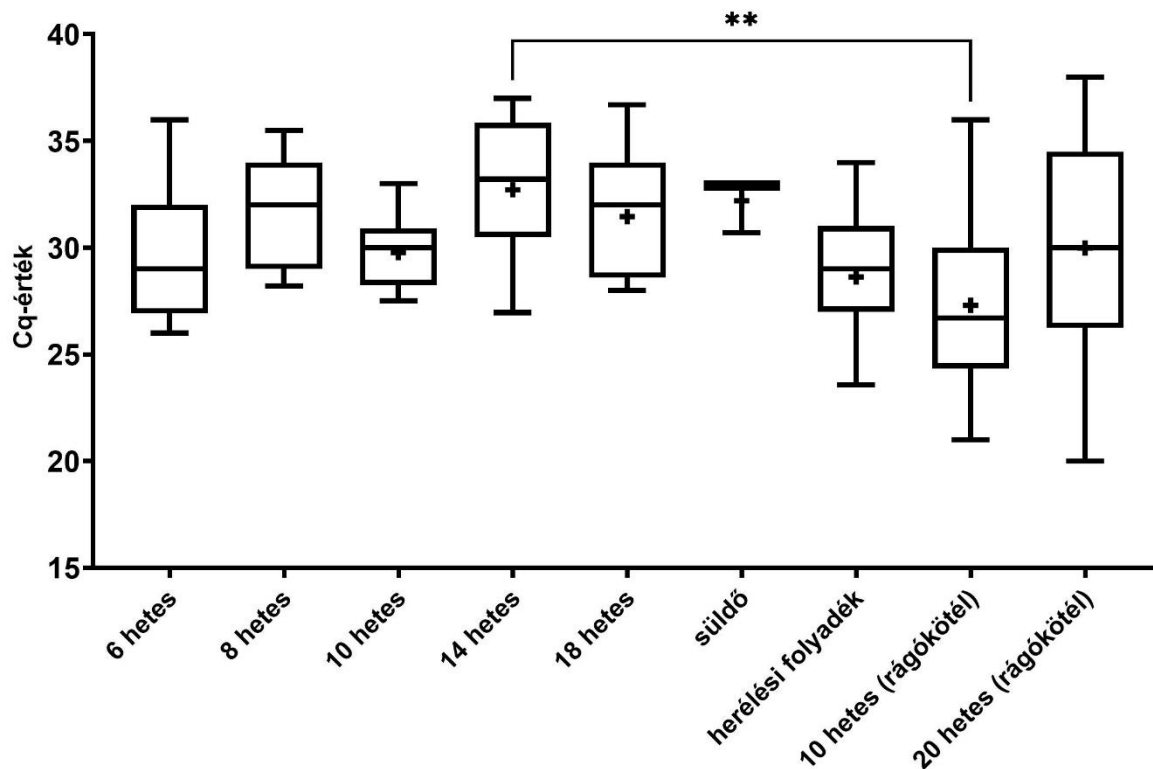
7. ábra A pozitív vérsavó-, rágókötel- és herélésifolyadék-minták aránya az APPV-pozitív telepeken

Az APPV-pozitív telepeken felmértük a fertőzöttség korcsoportonkénti megoszlását (8. ábra). Az összes pozitív vérsavópoolhoz mérten a pozitív minták kb. 27%-a 10 hetes, kb. 17–17%-a 14 és 18 hetes, kb. 15–15%-a 6 és 8 hetes, kb. 4%-a 12 hetes állatoktól származott. A kocasüldőkből gyűjtött vérsavópoolok mindössze kb. 6%-ában, mindösszesen két telep esetében azonosítottuk a vírust, a többször fiatal kocák és a 6 hetesnél fiatalabb állatok mintái minden esetben negatívak voltak.



8. ábra Az APPV-pozitív vérsavópoolok százalékos megoszlása a vizsgált korcsoportok között

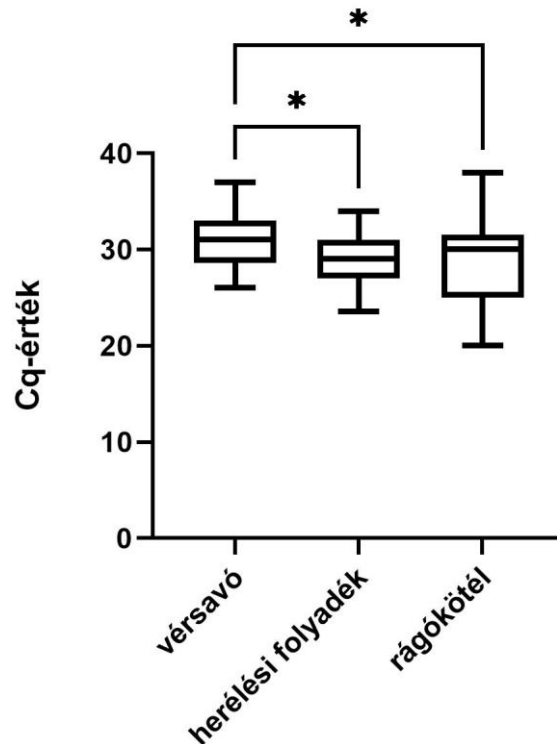
Korcsoportok szerint a minták C_q-értékei normális eloszlást mutattak, a csoportok közötti eltéréseket így egyutas ANOVA módszerrel elemeztük. Csoportokon belül szignifikáns eltérést figyeltünk meg az értékek között, azonban a csoportokat összehasonlítva csak a 14 hetes állatoktól vett vérsavóminták és a 10 hetes állatok rágókötélmintái között állapítottunk meg szignifikáns eltérést ($p < 0,0072$) a C_q-értékekben (9. ábra).



9. ábra A különböző korcsoportoktól származó pozitív savóminták Cq-értékeit összehasonlító Boxplot-ok

A bajusz az értékek minimumát és a maximumát jelzi, a „+” jelek pedig a mintasorátlagot. A doboz vízszintes vonalai az felső kvartilist, a mediánt és az alsó kvartilist mutatják. A Cq-értékek statisztikai összehasonlítása egyutas ANOVA-tesztel történt. A dobozok feletti csillagok a statisztikailag szignifikáns eltérést jelölik. (**: $p < 0,01$)

A mintatípusok Cq-értékeit szintén egyutas ANOVA-módszerrel hasonlítottuk össze. A vérsavó-herélési folyadékminták ($p < 0,0287$) és a vérsavó-rágókötélminták között találtunk szignifikáns eltérést ($p < 0,0137$), ezek alapján a vérsavómintákban magasabb Cq-értéket állapítottunk meg (10. ábra).

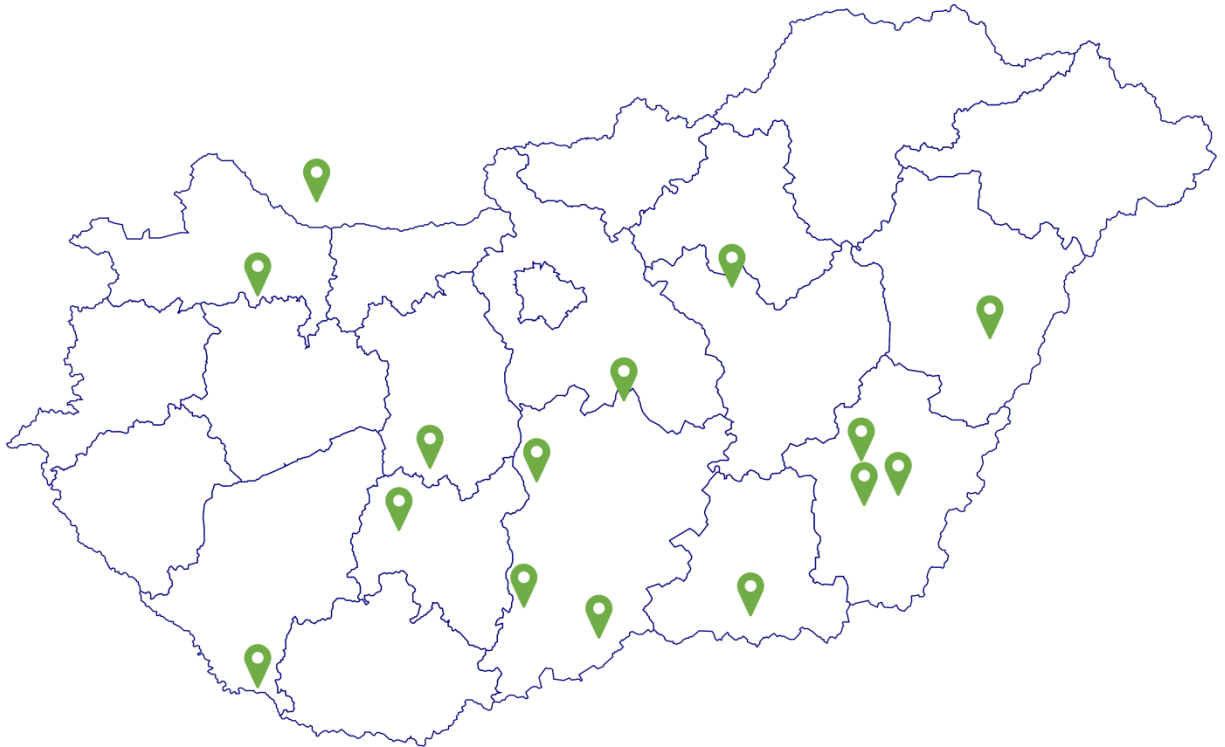


10. ábra A különböző APPV-pozitív minták Cq-értékeinek mintatípus szerinti összehasonlítása Boxplot-on ábrázolva

A bajusz az értékek minimumát és a maximumát jelzi. A doboz vízszintes vonalai az felső kvartilist, a mediánt és az alsó kvartilist mutatják. A Cq-értékek statisztikai összehasonlítása egyutas ANOVA-tesztel történt. A dobozok feletti csillagok a statisztikailag szignifikáns eltérést jelölik. (*: $p < 0,05$)

7.2 Filogenetikai vizsgálatok

A prevalenciafelmérés során gyűjtött vérsavó-, a reszketőkórban szenvedő állatok szerv-, és az archivált szövetminták vizsgálata során 15 telepen 22, az NS2–3 fehérjéket kódoló régiók részleges szekvenciáját sikerült meghatározni, ezeket a telepeket a 1111. ábraán jelöltük. Két telepen, habár sikerült kimutatni a vírus jelenlétét, feltételezhetően az alacsony vírusszám vagy a vírus-RNS nagymértékű fragmentációja miatt nem tudtunk szekvencia meghatározást végezni.



11. ábra A mintagyűjtés azon helyszínei, ahonnan részleges NS2–3 fehérjét kódoló szekvenciákat határoztunk meg.

Filogenetikai vizsgálataink alapján a különböző APPV-törzsek országonként nagy változékonyságot mutatnak (12. ábra). Esetenként az adott országból származó törzsek önálló, monofiletikus csoportokat alkotnak (lásd kínai szekvenciák). A 2002 és 2015 között vizsgált, különböző telepekről származó spanyolországi szekvenciák egy része kisebb, monofiletikus csoportot alkot, tehát ezeken a telepeken ugyanaz a vírustörzs leszármazottjai fertőztek több, mint egy évtizeden keresztül. Ezen csoporttal közelebbi rokonságot mutat egy ausztriai, továbbá egy hazai sertéstelepen 2016-ban és 2017-ben is azonosított szekvencia is. Az egyetlen ismert, spanyolországi (Katalónia) vaddisznóból származó APPV-törzs nagy hasonlóságot mutat egy 12 évvel későbbi, spanyolországi sertéstelepen izolált mintával. A legtöbb, németországi vaddisznóból gyűjtött törzs, függetlenül a gyűjtés időpontjától (2015–2017), külön filogenetikai csoportot alkot, bár három 2015-ből és 2016-ból származó szekvencia nagyobb hasonlóságot mutatott bizonyos Olaszországban, Hollandiában és az Egyesült Királyságban azonosított törzsekkel (2015-ből és 2016-ból is), továbbá egy 2015-ben azonosított németországi sertéstelepről gyűjtött mintával.

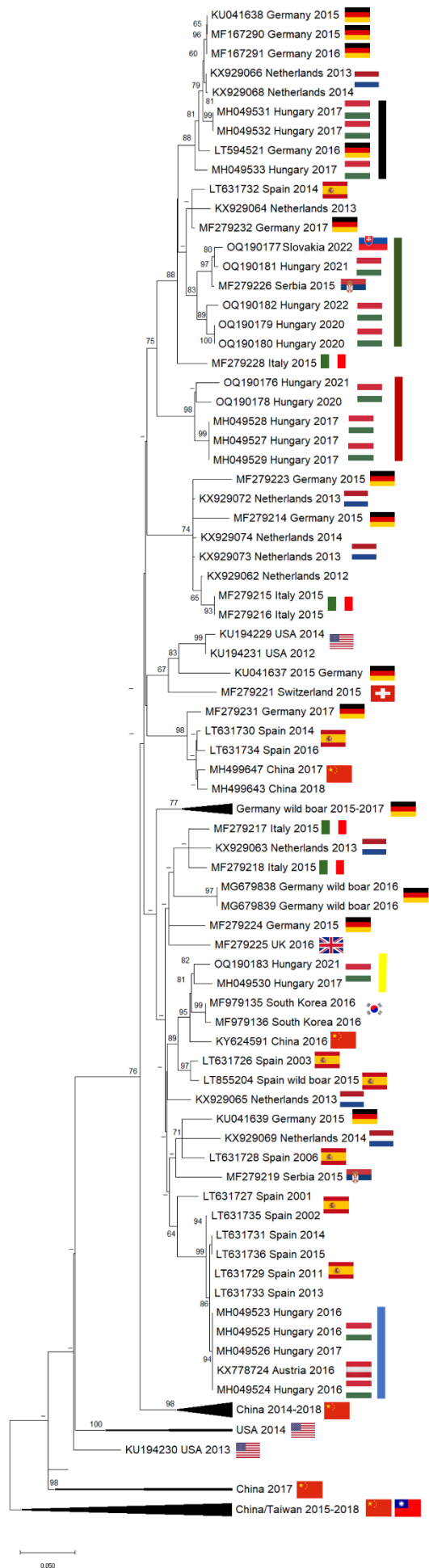
A Magyarországon azonosított törzsek nem alkotnak telepenként külön-külön csoportot (12. és 13. ábra). Két, egymástól 130 km-re fekvő magyarországi telepről származó minta egy filogenetikai csoportot alkot egymással, valamint németországi és hollandiai szekvenciákkal; a Felvidékről és az egyik Alföldről származó minta egy 2015-ben Szerbiában azonosított törzssel alkot egy kisebb csoportot. Ezekkel tartozik egy tágabb filogenetikai csoportba három

másik, dél-magyarországi telepről származó törzs, amelyek esetében két különböző, egymástól kb. 100 km távolságra lévő telepről származó reszketőkóros malacok mintáiból azonosított vírus szekvenciája teljes mértékben megegyezik egymással. Egy 2017-ben, reszketőkóros malac szerveiből azonosított APPV-törzs monofiletikus csoportot alkotó, 3–4 évvel később azonosított, egymástól 300 km távolságra megtalálható sertéstelepen azonosított törzssel. Érdekes módon szinténkettő, egymástól távol eső hazai sertéstelepen azonosított szekvencia mutat jelentős hasonlóságot (98,2%) egymással, továbbá egy Koreai Köztársaságban leírt mintával is.

A legnagyobb genetikai távolság a kínai törzsek között figyelhető meg (18,1%-os eltérés), ez más országokban átlagosan 9–12,3%. A hazai törzsek esetében 1,1–11,2% genetikai távolságot figyeltünk meg, az átlagos genetikai távolság pedig 7,6%. A hazai szekvenciák gyűjtési helye, akcessziós számai és a mintagyűjtés időpontjait a 6. táblázat tartalmazza.

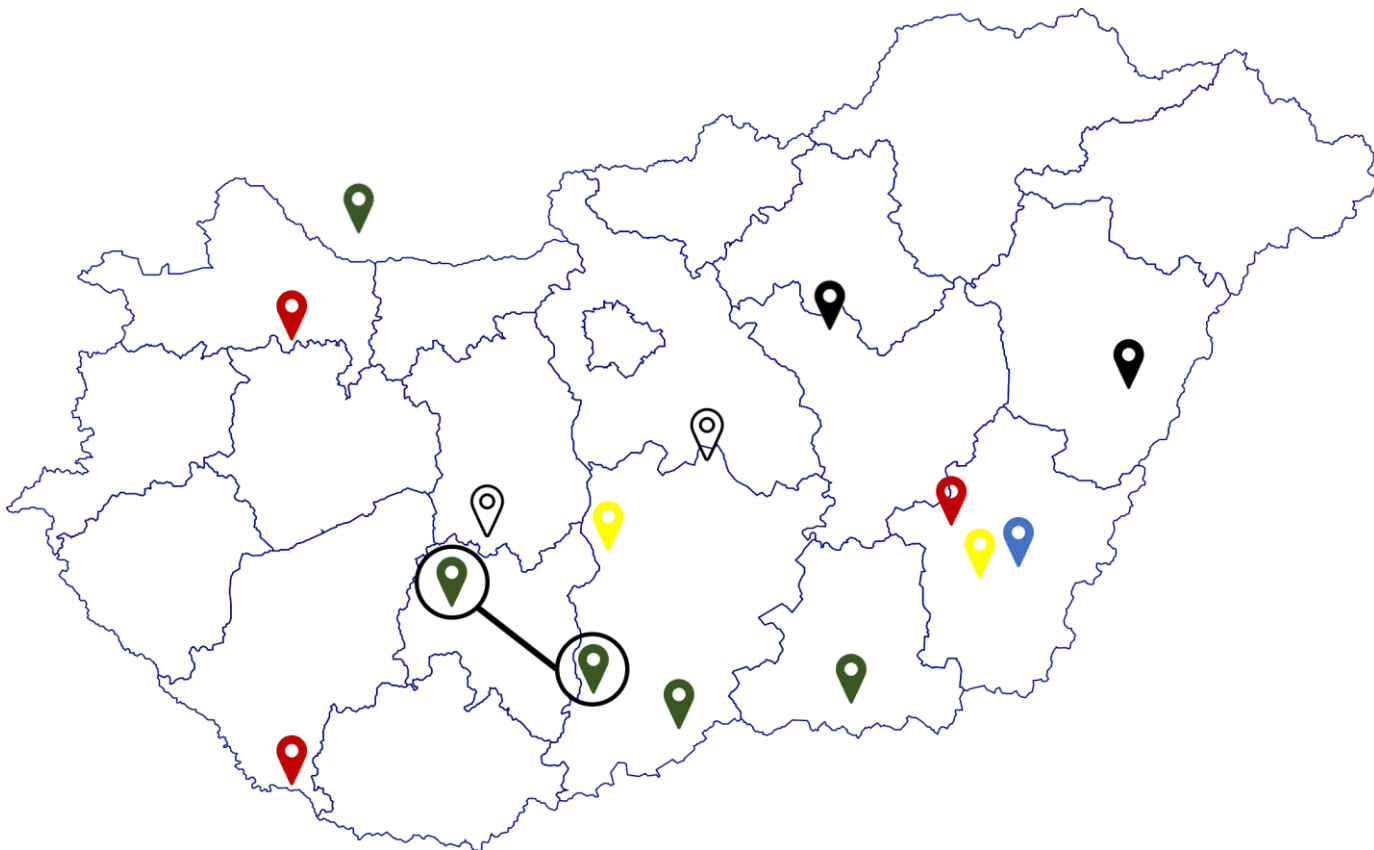
6. táblázat A hazai szekvenciák akcessziós száma / gyűjtés éve / telep sorszáma.

Akcessziós szám	Mintagyűjtés éve	Telep sorszáma
MH049531	2017	1
MH049532	2017	1
MH049527	2017	2
MH049528	2017	2
MH049529	2017	2
MH049523	2016	3
MH049524	2016	3
MH049525	2016	3
MH049526	2017	3
MH049530	2017	4
MH049533	2017	5
OQ190178	2020	6
OQ190180	2020	7
OQ190183	2021	14
OQ190179	2020	16
OQ190182	2022	18
OQ190181	2021	21
OQ190176	2021	24
OQ190177	2022	29



12. ábra Az APPV GenBankból letöltött referencia és saját NS2–3 polipeptid kódoló szekvenciák összehasonlítása alapján készített törzsfá

Az összehasonlítást Maximum Likelihood-eljárással végeztük, az így kapott bootstrap-értékeket (≥ 70) százalékokként jelenítettük meg az ágak felett. A méretskála 0,01 várható változást jelez helyenként és áganként. A filogenetikai fán megjelenő törzsek kódolása: génbanki akcessziós szám_gyűjtés országa_gyűjtés dátuma A függőleges színes oszlopok a következő (13. ábra) ábra színeivel megegyezően mutatják a magyarországi minták származási helyét.



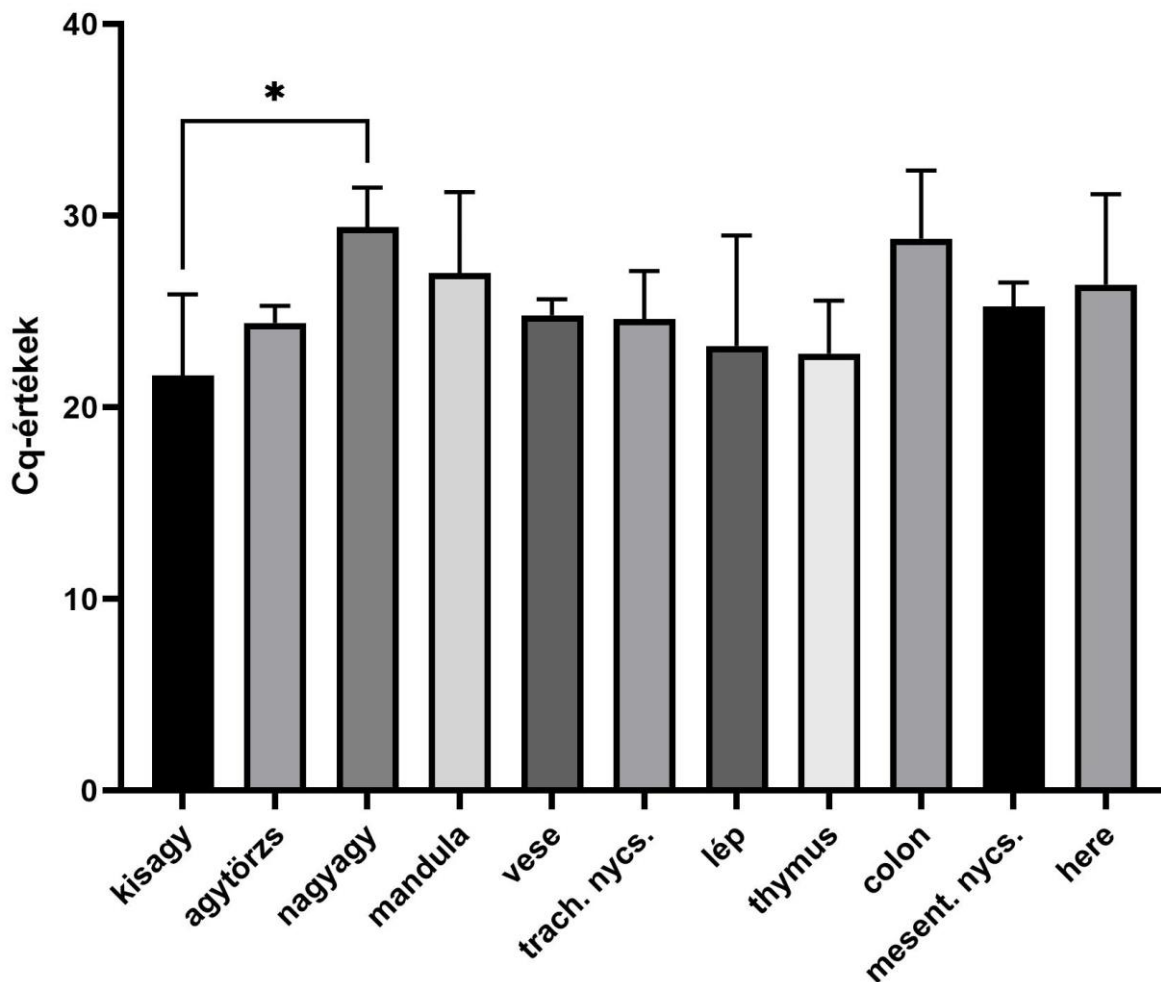
13. ábra Telepek színkódos jelölése vírusváltozatok szerint

Az azonos színnel jelölt telepeken hasonló vírusváltozatokat azonosítottunk. A két bekarikázott és vonallal összekötött telepen ugyanazt a vírusváltozatot azonosítottuk

7.3 Szervtropizmus és a vírus szövetbeli lokalizációja

7.3.1 Választás előtti malacok szöveteinek vizsgálata RT-qPCR módszerrel

RT-qPCR-módszerrel mindegyik CT-ben szenvedő állatból (A2–3, A5–6) gyűjtött szövetminta (kisagyvelő, agytörzs, nagyagyvelő, mandula, vese, tracheobronchialis nyirokcsomó, lép, csecsemőmirigy, vastagbél, mesenterialis nyirokcsomó, here) pozitívnak bizonyult APPV-re (kivével az A5-ös állat mesenterialis nyirokcsomója). A vírust ezen túl kimutattuk még a klinikai tüneteket nem mutató egyik állat (A1) kisagyvelejéből (quantification cycle, Cq = 30,14) és mandulájából (Cq = 26,53) is. A nagyagyvelőt és kisagyvelőt kivéve nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző szervek között a víruskópiák mennyiségét (átlagos Cq) illetően (14. ábra)

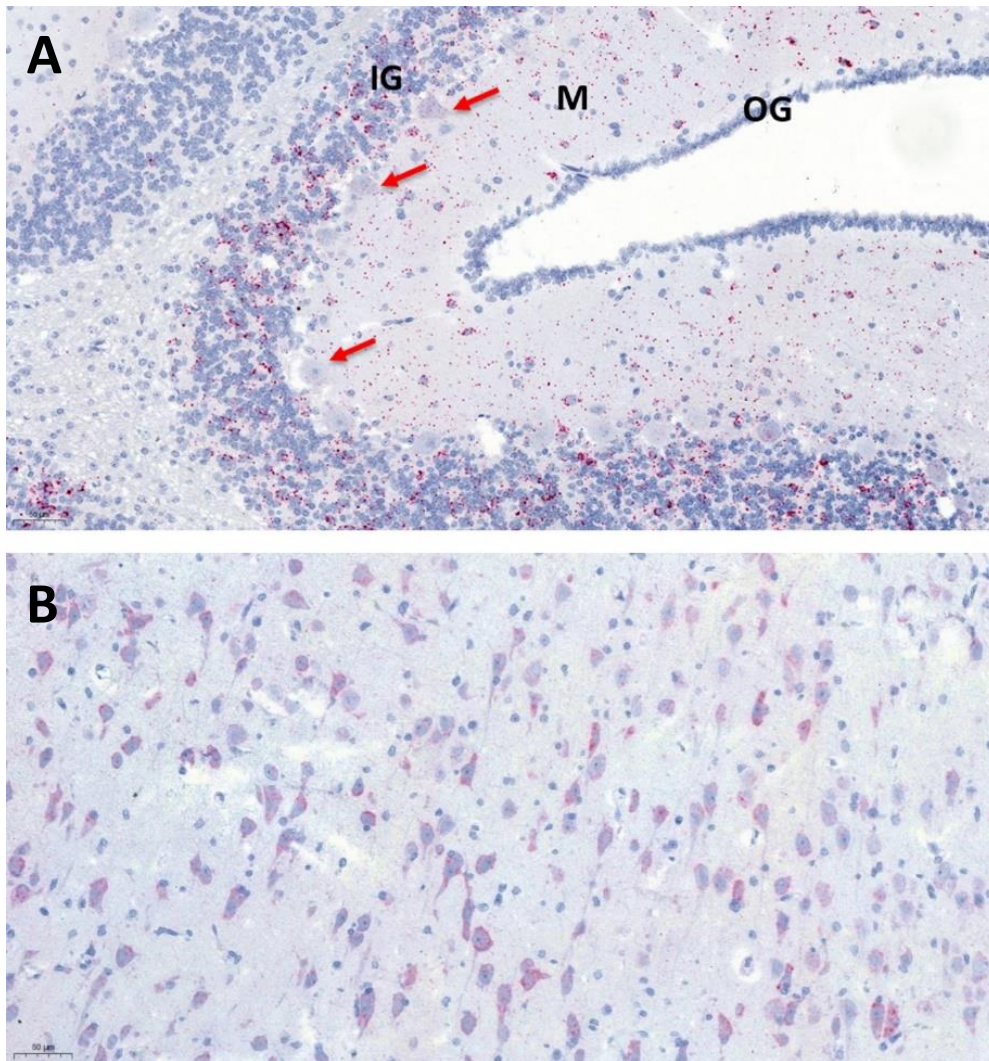


14. ábra Az atipikus sertés pestivírus szervtropizmusa

A négy CT-vel született malac szerveinek kvantitatív real-time PCR (RT-qPCR) módszer során mért átlagos Cq értékeit ábrázoltuk. Az értékeket nemparaméteres Kruskal–Wallis-tesztel hasonlítottuk össze, hibásávként a szórásértékeket ábrázoltuk. Az oszlopok feletti csillag a statisztikailag szignifikáns eltérést jelöli (*: $p < 0,05$)

7.3.2 Választás előtti malacok szöveteinek vizsgálata RNAscope-módszerrel

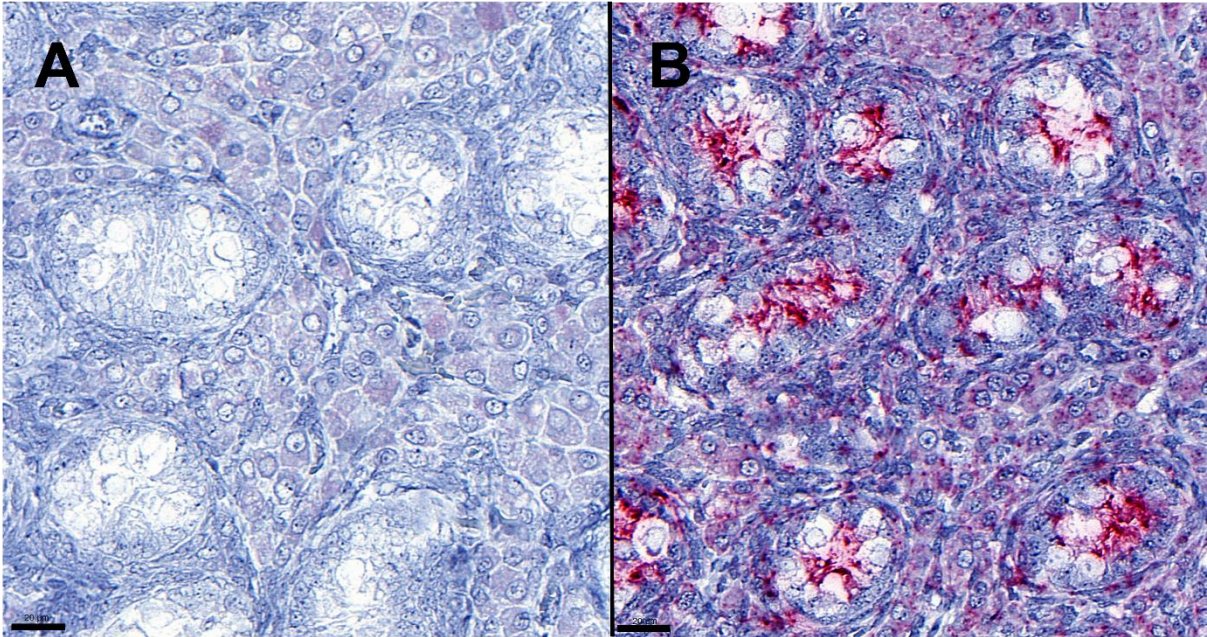
CT-vel érintett, ill. egyazon telepről származó 1–3 napos kontroll malacok kis- és nagyagyvelejét vizsgáltuk RNAscope-módszerrel az APPV-genom szöveti lokalizációjának megjelenítése céljából. Az APPV genetikai állományát megtaláltuk a reszketőkóros malacok kisagyvelejének belső granularis és molecularis rétegében, valamint a Purkinje-sejtekben (15. ábra A). Mérsékelt festődést figyeltünk meg ezen túl a nagyagyvelő neuronjaihoz kötötten (15. ábra B).



15. ábra: Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNS *in situ* hibridizációs módszerrel (RNAscope) fertőzött, 3-napos malacok kisagyvelőjében (A) és nagyagyvelőjében (B)

A piros pontok fertőzött sejteket jelölnek. Belső granularis réteg (inner granular cell layer, IG), molecularis réteg (molecular layer, M), külső granularis réteg (outer granular cell layer, OG), a Purkinje-sejteket piros nyíllal jelöltük. ISH, 400×, Bar = 50 µm

Sorozatmetszeteken RNAscope- és IHC-módszerrel vizsgáltuk az érintett sejtípusokat a CT-tüneteket mutató, újszülött malacok hereszövetében. Az RNS integritása és a fixálás/feltárás hatékonysága megfelelt az elvárásoknak: a pozitív kontroll próbával hibridizált minták esetében intenzív, piros jelet észleltünk mindegyik sejtben (16. ábra, B), míg a negatív kontroll próbával hibridizált minták esetében ilyen jelenséget nem figyeltünk meg (16. ábra, A).



16. ábra: Negatív kontroll próbával (dapB, A) és pozitív kontroll próbával (Ss-PPIB, B) ellenőriztük az általunk alkalmazott RNAscope-módszer során az RNS integritását és a fixálás/feltárás sikerességét

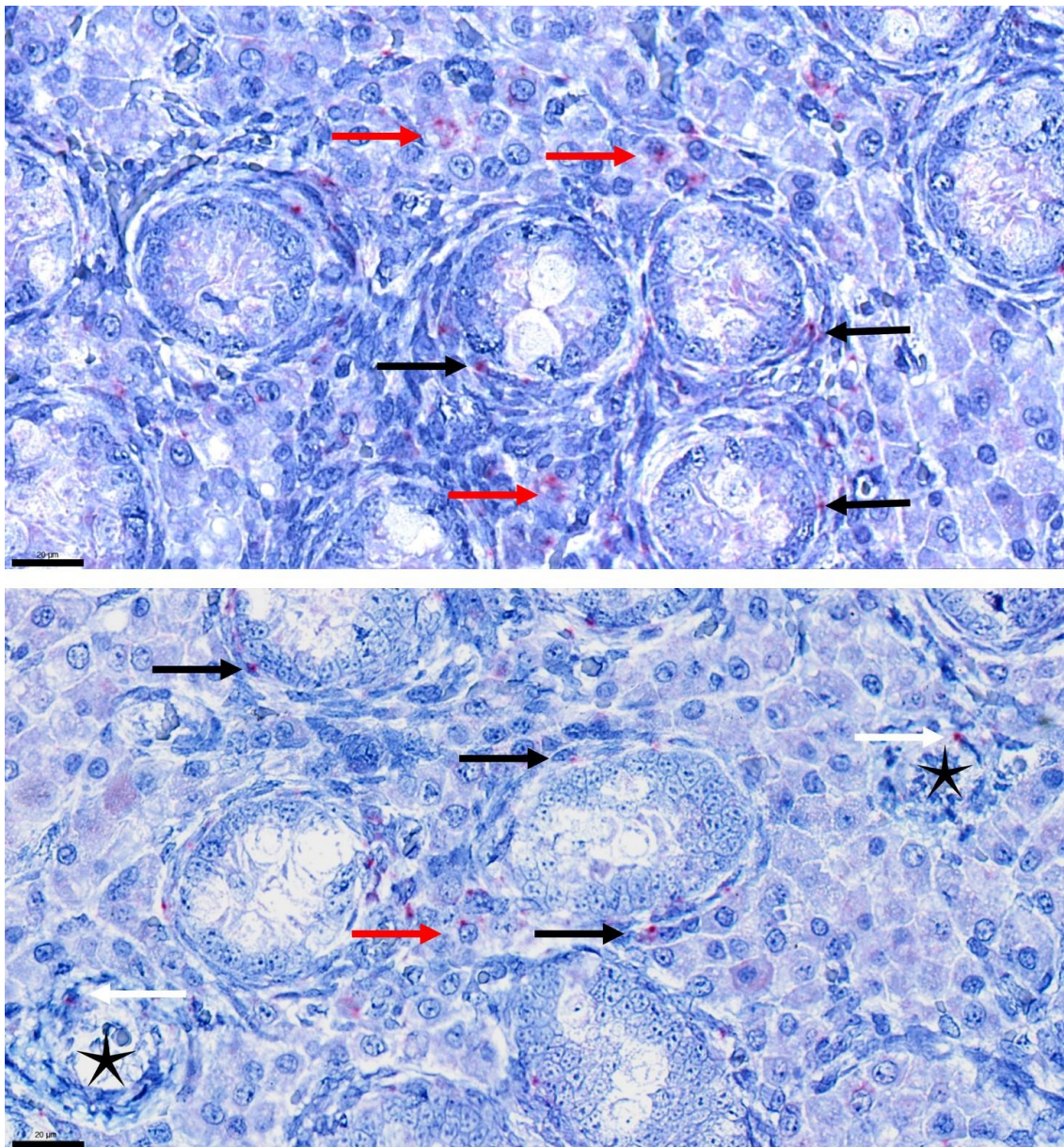
A pozitív jelet piros pontok jelzik. ISH, 600×, Bar = 20 µm

Az APPV-fertőzött sejteket mind a négy CT-vel érintett újszülött malac (A2–3, A5–6) hereszövetében azonosítottuk RNAscope és RT-qPCR módszerrel, az egészséges állatok negatívnak bizonyultak (7. táblázat).

7. táblázat: Az atipikus sertés-pestivírus azonosítása 1–3 napos malacok hereszövetében kvantitatív real-time PCR (RT-qPCR) és RNAscope módszerrel

Állat kódja	CT	RT-qPCR (Cq)	RNAscope
A1	–	–	–
A2	+	22,94	+
A3	+	23,72	+
A4	–	–	–
A5	+	34,15	+
A6	+	27,09	+

A pozitív sejteket a here három különálló részében figyeltük meg: az interstitialis régióban, a primitív, nem-funkcionális kanyarulatot körülölelő orsó alakú sejtekben, továbbá a közepes méretű (nem-kapilláris) artériák falában (17. ábra).

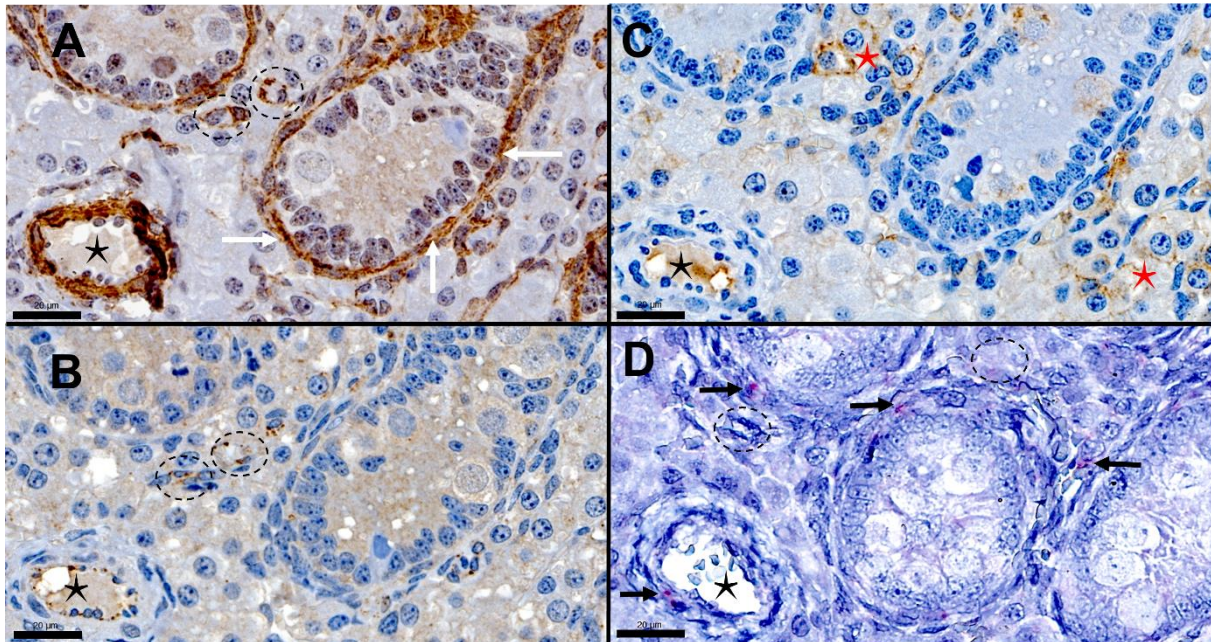


17. ábra Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNAscope-módszerrel, reszketőkóros egy napos malacok heréjében

A piros pontok a fertőzött sejteket jelölik. Fekete nyíl: fertőzött peritubularis myoid sejtek, piros nyilak: fertőzött Leydig-sejtek, fehér nyilak: fertőzött endothelsejtek a fekete csillaggal jelölt közepes méretű artériák falában. ISH, 600×, Bar = 20 µm

A különböző sejtípusok azonosítására többféle immunhisztokémiai festést alkalmaztunk a sorozatmetszeteken. A vérerek endothelsejtjeit anti-vWF antitesttel (18. ábra

B), az interstitialis Leydig-sejteket és a csírasejteket anti-c-kit antitesttel (18. ábra C), a kanyarulatos csatornákat körülvevő simiomsejteket anti- α -SMA antitesttel (18. ábra A) azonosítottuk, a 18. ábra D szegmensében pedig ugyanazon vizsgált terület RNAscope-módszerrel jelölt képe látható.



18. ábra: Reprezentatív képek újszülött malacok heréjéből készült sorozatmetszetek alfa simaizom aktin (α -SMA) (A), von Willebrand Factor (vWF) (B), c-kit (C) immunhisztokémiai és RNAscope ISH (D) jelölésével

A bal alsó sarokban látható fekete csillag mindegyik képen ugyanazt az artériát jelöli, a szaggatott vonalú körök a (B) és (D) képen az interstitialis régióban található kapillárisokat jelölik. A fehér nyilak az α -SMA-pozitív peritubularis myoid sejtekre mutatnak az (A) képen, a piros csillagok a (C) képen a c-kit-pozitív interstitialis Leydig-sejteket jelölik, a fekete nyilak pedig az atipikus sertés-pestivírus (APPV) genomját jelölő piros pöttyökre mutatnak (D).

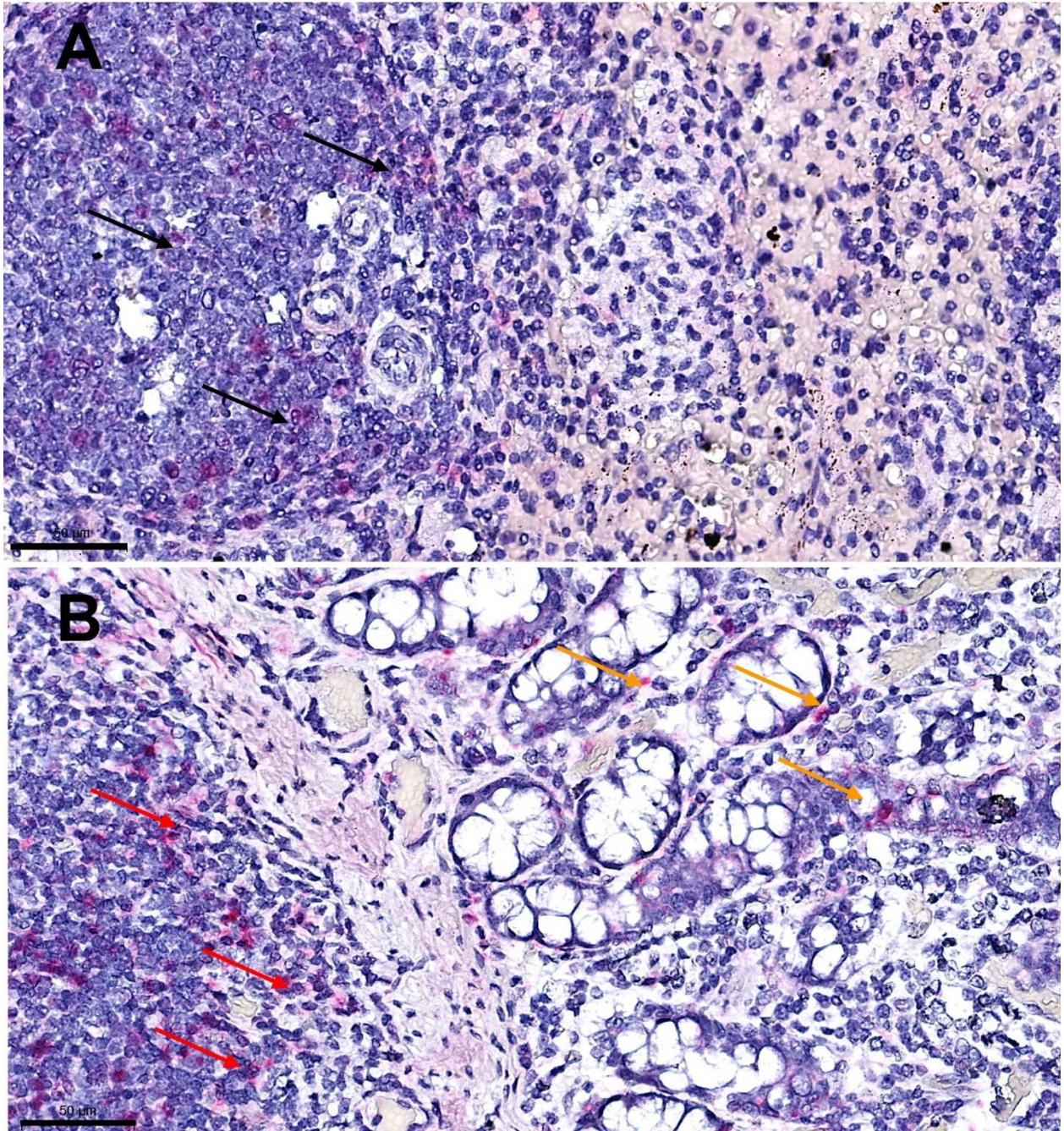
300 \times , Bar = 50 μ m

Egyes területeken a vWF-pozitív sejtek eloszlása hasonló volt az anti- α -SMA antitesttel jelöltekéhez a vérerek kettős pozitivitása miatt. Ezzel szemben a herecsatornácskák körüli, peritubularis sejtek esetében csak az α -SMA-festéssel figyeltünk meg intenzív jelet a citoplazmában, amelyből arra következtettünk, hogy azok olyan simaizomelemeket tartalmazó sejtek, amelyek nem a vérerek falát alkotják. Ezek a here ún. peritubularis myoid sejtei. A hereszövetekből készült sorozatmetszetek RNAscope- és IHC-vizsgálatai alapján az APPV-genom leginkább az interstitialis Leydig-sejtekben, a kanyarulatos csatornák körüli peritubularis myoid sejtekben és a közepes méretű artériák falában lokalizálódik (17. ábra). A

vírus genomját nem azonosítottuk a csírasejtekben és a Sertoli-sejtekben, továbbá a négy CT-ben szenvedő állat (A2–3, A5–6) esetében a vírus herén belüli eloszlása között RNAscope-módszerrel nem figyeltünk meg különbséget.

7.3.3 CT-vel született, de már tünetmentes, ivarérett kan szöveteinek vizsgálata RNAscope-módszerrel

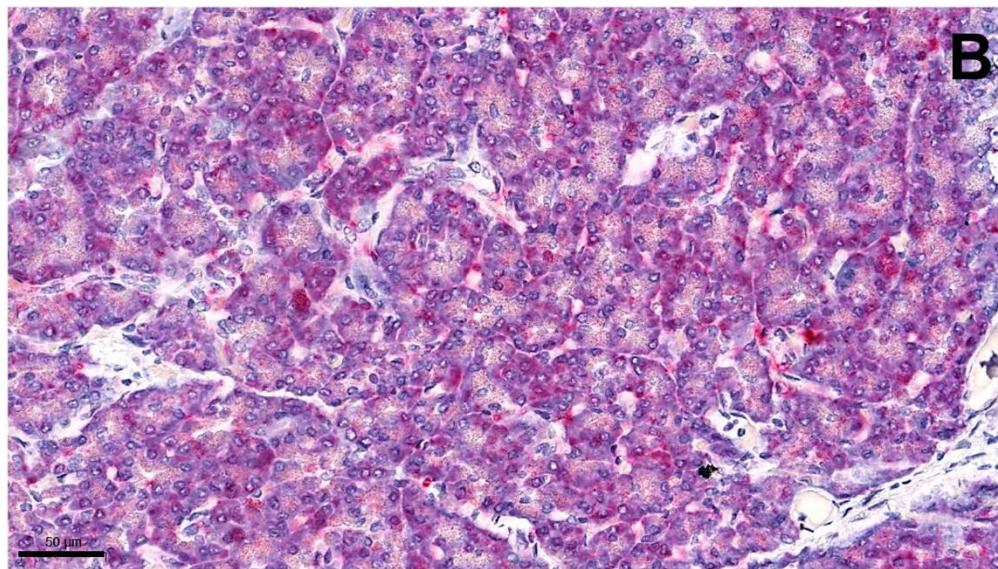
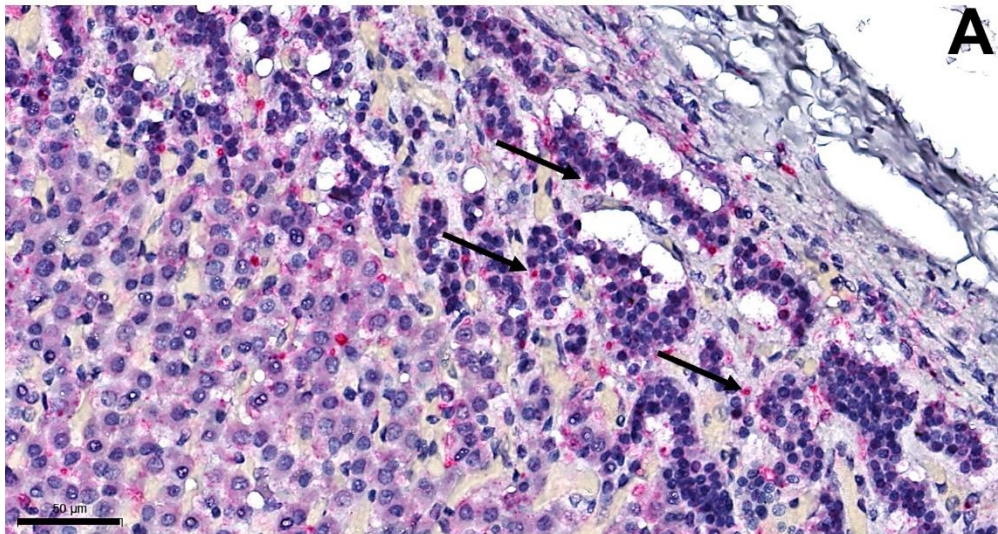
A Bécsi Állatorvostudományi Egyetem egy 2017-es vizsgálatából származó kan szerveit is megvizsgáltuk az említett RNAscope-módszerrel. Pozitív sejteket azonosítottunk a lép periarteriolaris lymphoid hüvelyében (19. ábra A), az ileum MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) régiójában és a kripták differenciálatlan sejtjeiben (19. ábra B).



19. ábra: Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNAscope-módszerrel fertőzött, 6-hónapos kan lépében (A) és ileumában (B).

A pozitív reakciót piros pontok jelölik. Fekete nyíl: periarteriolaris lymphoid hüvely (PALS), piros nyíl: MALT, sárga nyíl: Lieberkühn-kripták. ISH, 600× (A), 750× (B), Bar = 50 µm

Pozitív jelet találtunk a mellékvese-kéregállomány külső rétegében (zona arcuata, 20. ábra A), ill. az exocrin hasnyálmirigy acinaris sejtjeiben (20. ábra B).

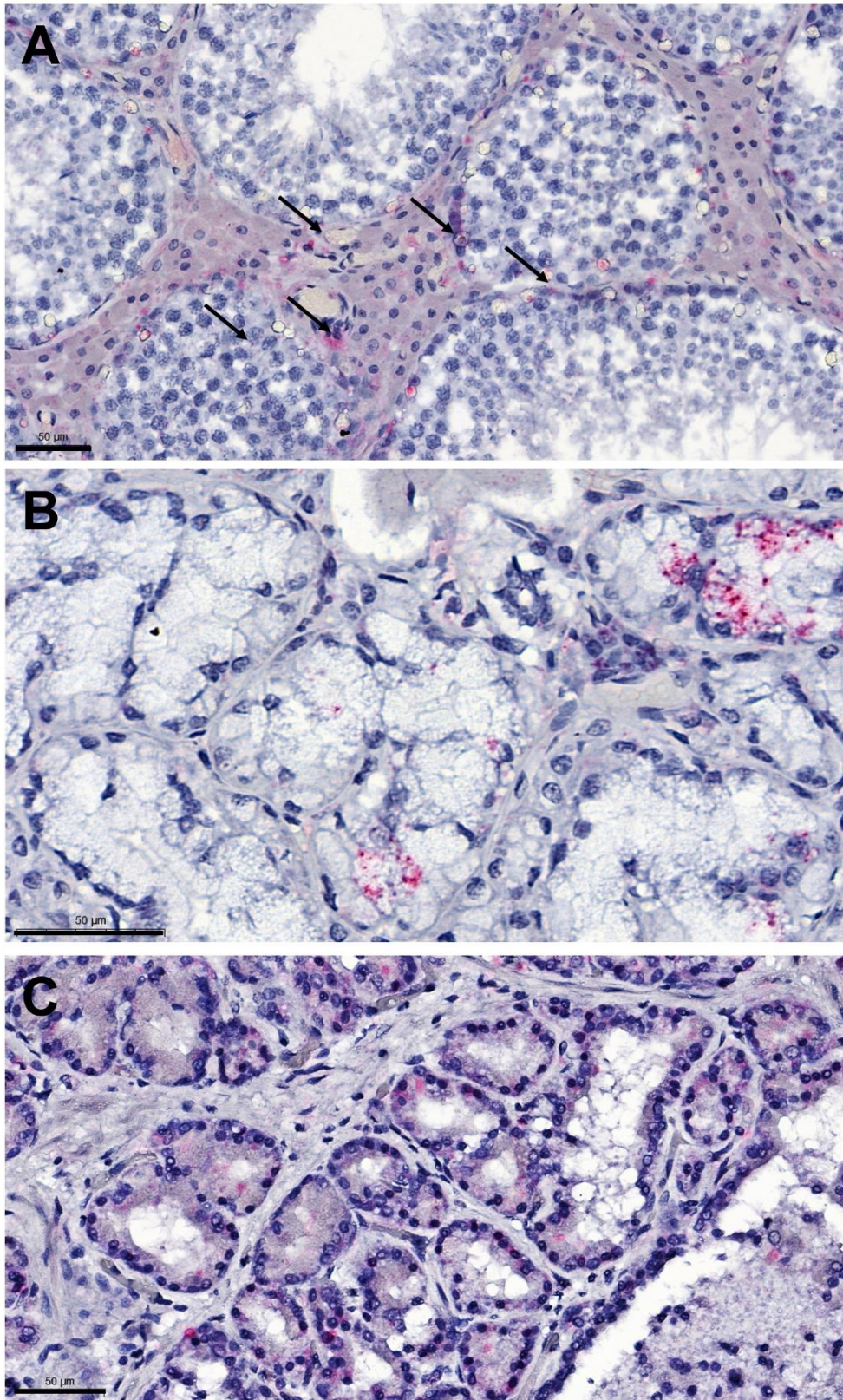


20. ábra: Atipikus sertés-pestivírus (APPV) azonosítása RNS *in situ* hibridizációs módszerrel (RNAscope) fertőzött, 6-hónapos kan mellékveséjében (A) és hasnyálmirigyében (B).

A pozitív reakciót piros pontok jelölik. Fekete nyíl: pozitív sejtek a Zona arcuata régióban.

ISH, 700× (A), 600× (B), Bar = 50 µm

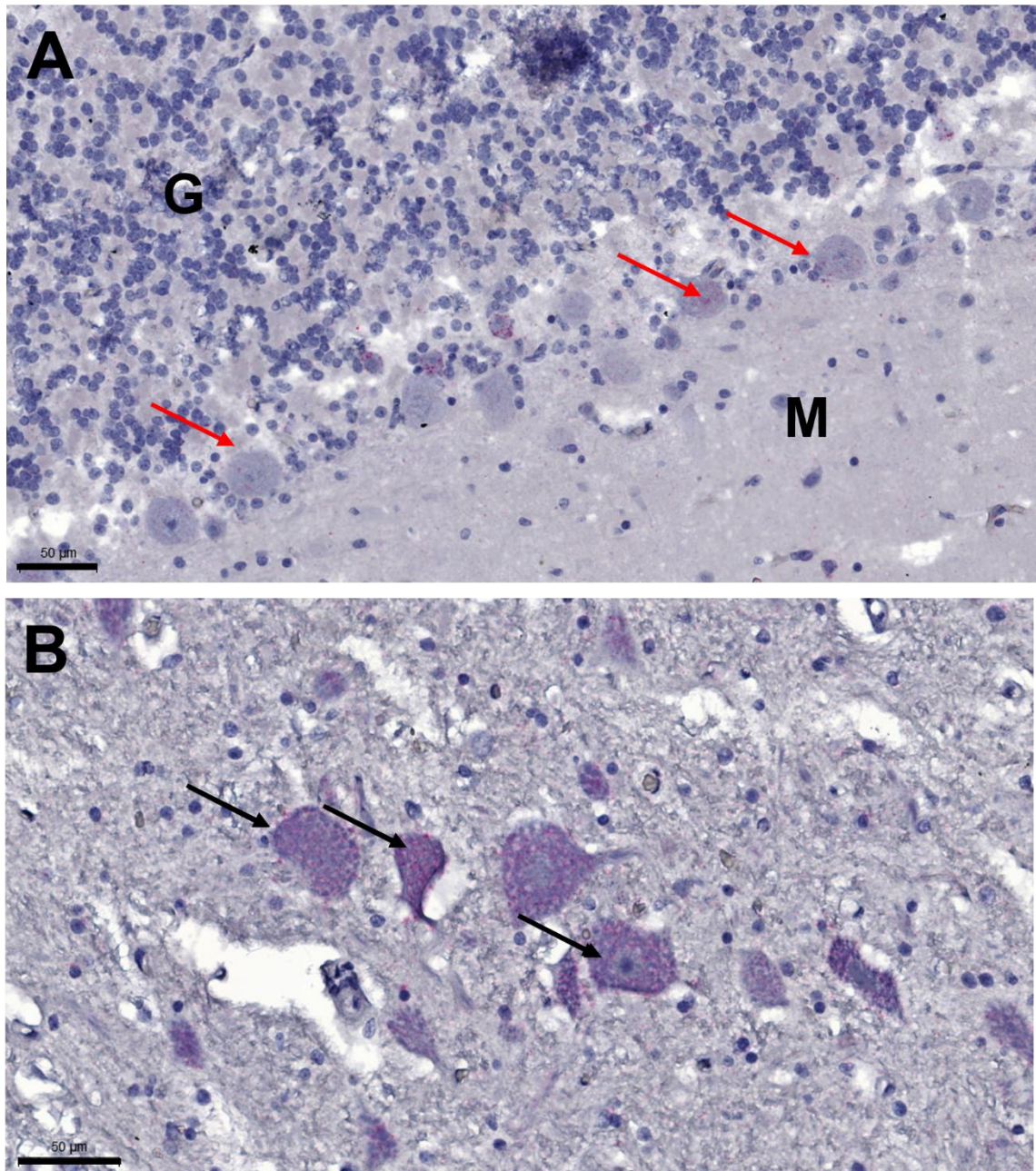
Erős jelintenzitást figyeltünk meg a szaporító szervek vizsgálatakor (21. ábra) is. A hereszövet esetében az interstitialis régióban elhelyezkedő Leydig-sejtek, peritubularis myoid sejtek, továbbá vér-here gáton túli csírasejtek esetében is azonosítottunk APPV-pozitív jelet (21. ábra A). Ezekon felül markáns festődést figyeltünk meg a Cowper-mirigy (glandula bulbourethralis) sejtjeiben (21. ábra B) és a prosztatá apocrin sejtjeiben (21. ábra C).



21. ábra: Atipikus sertés-pestivírus (APPV) azonosítása RNS *in situ* hibridizációs módszerrel (RNAscope) fertőzött, 6-hónapos kan hereszövetében (A), Cowper-mirigyében (B) és prosztatájában (C)

A pozitív reakciót piros pontok jelölik. Fekete nyíl: pozitív sejtek. ISH, 400× (A), 750× (B)
600× (C), Bar = 50 µm

Enyhe festődést figyeltünk meg az állat kisagyvelejében, a granularis-, és molecularis sejtrétegben, továbbá a Purkinje-sejtekben (22. ábra A). Ezen felül a gerincvelő szürkeállományában (22. ábra B) is találtunk APPV-érintett neuronokat, míg a nagyagyvelő és agytörzs negatívnak bizonyult.



22. ábra: Atipikus sertés-pestivírus azonosítása RNAscope-módszerrel fertőzött, 6-hónapos kan kisagyvelejében (A) és gerincvelőjében (B).

A pozitív reakciót piros pontok jelölik. Piros nyíl: Purkinje-sejtek, fekete nyíl: fertőzött idegsejtek. A granularis-sejtréteget G-vel, a molecularis-sejtréteget M-mel jelöltük. ISH, 600× (A), 750× (B), Bar = 50 µm

Az RNAscope-módszerrel vizsgált, FFPE-blokkokban archivált szövetmintákból RNS-kinyerést is végeztünk, majd RT-qPCR módszerrel is ellenőriztük a vírus jelenlétét (8. táblázat). A mellékvesekéreg és a gerincvelő esetében a vírusgenom igen kis mennyiségét figyeltük meg RNAscope és RT-qPCR módszerrel is.

8. táblázat: Az atipikus sertés-pestivírus azonosítása 6 hónapos kan archivált szövetmintáiban RT-qPCR- és RNAscope-módszerrel

Szervek	RT-qPCR (Cq)	RNAscope
lép	33	+
ileum	32	+
mellékvese	38/–	+
hasnyálmirigy	34	+
here	29	+
Cowper-mirigy	33	+
prosztata	34	+
kisagyvelő	35	+
gerincvelő	40/–	+
nagyagyvelő	–	–

8 Megvitatás

8.1 Prevalenciafelmérések és a hazai törzsek filogenetikai összehasonlítása

A sertések reszketőkórja régóta ismert kórkép, amely az érintett telepeken esetenként akár jelentős malacveszteséghez is vezethet (de Groof et al., 2016; Postel et al., 2017a). Néhány évvel ezelőttig a klasszikus sertéspestis vírusán kívül nem azonosítottak más fertőző ágenszt, amely felelős lehet a reszketőkórra jellemző tünetek megjelenéséért. Egy PRRSV-monitoring vizsgálat kapcsán újgenerációs szekvencia meghatározásos módszerrel 2015-ben azonosították az atipikus sertés-pestivírust, amelynek kóroki kapcsolatát a CT-vel ezt követően több fertőzéses kísérletben is bizonyították (Hause et al., 2015; Arruda et al., 2016; Postel et al., 2016). A reszketőkór jól ismert újszülöttkori kórkép hazánkban is, de mivel az APPV jelenlétét kutatásunk előtt még nem mutatták ki Magyarországon, célul tűztük ki a vírus azonosítását, prevalenciájának felmérését a hazai sertésállományokban, továbbá a korcsoportok érintettségének felmérését és a különböző mintatípusok diagnosztikai szempontból való megbízhatóságának összehasonlítását.

PhD-kutatásaim kezdetén csoportunk elsőként azonosította a vírust hazánkban reszketőkóros malacokból származó vérsavó- és szervmintákban, valamint a NÉBIH archívumából származó, CT-érintett malacokból gyűjtött FFPE-szervpoolokban, amelyek közül a legkorábbi 2005-ből származott. Kutatásunkban valamennyi, reszketőkór tüneteit mutató sertéstől vett minta APPV-pozitívnak bizonyult, amely az APPV és CT-tünetek közötti okozati összefüggést erősíti. Az általunk vizsgált, összesen 31 sertéstartó telepről származó mintát vizsgálva 24-ben mutattuk ki a vírus jelenlétét. A klinikailag egészséges állományok prevalenciafelmérése során pedig 66,67%-os előfordulást állapítottunk meg, amely alapján kijelenthető, hogy a vírus széles körben előfordul hazánkban. Egy spanyolországi retrospektív vizsgálatban APPV-t találtak 1997-ből származó sertésszérum mintákban (Muñoz-González et al., 2017), amely ezidáig a vírus kimutatásának legkorábbi időpontja. Hazánkban 2005 volt a legkorábbi pozitív minta begyűjtésének ideje, az általa okozott CT pedig már régóta ismert tünetegyüttes hazánkban és világszerte, így megállapítható, hogy a vírus már régóta jelen van a sertésállományokban, tüneteket azonban csak sporadikus előfordulással okoz. Az említett tanulmányban vizsgált, 1997–2016 közötti időszakból származó 642 savóminta 13,9%-a volt pozitív, ill. saját eredményeinkkel ellentétben, a CT-vel érintett állatok mintáinak csak 57,7%-a volt PCR-pozitív APPV-re. Habár a szerzők egyértelmű összefüggést találtak az APPV jelenléte és a CT között, voltak olyan tünetmentes egyedek is, amelyek APPV-fertőzöttnek bizonyultak (Muñoz-González et al., 2017). Sajnos arról nincs információ, hogy a felmérés során hány telepről gyűjtöttek vérsavómintákat.

Az általunk ellenőrzött 510 db vérsavópool kb. 21%-a bizonyult APPV-pozitívnak, ez 7%-kal haladja meg a spanyolországi prevalenciaértéket, azonban ennek oka lehet az általuk vizsgált kisebb mintaszám. A telepek nagy hányadában a vérsavó-, rágóköttél-, és herélésifolyadék-mintákból csak két-két mintatípusban tudtuk kimutatni a vírust, mindösszesen 5 telep volt, ahol mindhárom mintatípus érintett volt. Abban az esetben, ahol vérsavóból igen, herélési folyadékból pedig nem sikerült azonosítani a vírust, 5 vagy kevesebb herélésifolyadék-mintát kaptunk, azokon a telepeken pedig, ahol mindkét mintatípusból kimutattuk a vírust, 5-nél több herélési folyadékmintát tudtunk megvizsgálni. Ennek alapján diagnosztikai célra telepenként 5 vagy több herélésifolyadék-minta begyűjtése javasolható, ilyen formában ez a mintaféle kifejezetten alkalmasnak tűnik egy adott sertéstelep APPV-fertőzöttségének megállapítására (Dénes et al., 2021), csak úgy, mint PRRSV esetében (Lopez et al., 2018). A herélési folyadékot elsősorban újszülött állatok PRRSV-szűrésére alkalmazzák, mivel a vírus jelenléte ebben a korcsoportban aktív fertőzésre, vírucirkulációra utal a tenyészállományban (Lopez et al., 2018). A naposkori állatok herélésifolyadék-minták alapján bizonyított fertőzöttsége ellenére a pozitív telepeken sem figyelték meg CT előfordulását a mintavétel időpontjában annak ellenére, hogy az eredmények széles körű méhen belüli fertőződésre utalnak. Ezek a tünetmentes állatok feltételezhetően méhen belüli fejlődésüknek már későbbi szakaszában fertőződtek, amikor idegrendszeri fertőződésük sem okoz reszketőkóros tüneteket. Erre utalnak saját eredményeink is, amikor egy klinikailag egészséges újszülött malac agyvelejéből és thymusából sikerült kimutatnunk a vírust (lásd később). Eredményeinkkel összhangban korábbi tanulmányok is igazolták, hogy elegyminták vizsgálata alkalmas lehet prevalenciafelmérésre, ill. egy telep fertőzöttségének megállapítására (Sipos et al., 2021).

Eredményeink alapján telepi diagnosztikai célra a legmegbízhatóbb minták a 10 hetes állatok vérsavómintái (27% pozitív) és a 20 hetes állatok rágóköttélmintái (59% pozitív) bizonyultak. APPV-monitoring céljából célszerű lehet herélésifolyadék-mintákat és a rágóköttélmintákat vizsgálni, mivel ezek nem járnak külön diagnosztikai célból végzett invazív beavatkozással, továbbá nagyobb egyedszámot kisebb energiabefektetéssel tudunk ellenőrizni (Sipos et al., 2021).

A fertőzött telepekről 22 részleges NS2–3 fehérjekódoló szekvenciát határoztunk meg, ezeket hasonlítottuk egymáshoz és a GenBank-ban található hasonló APPV-szekvenciákhoz filogenetikai elemzés során. A hazai törzsek esetében megfigyeltük, hogy a szűkebb monofiletikus csoportba tartozó vírusváltozatok nem feltétlenül korlátozódnak egy telepre, azonban teljes szekvenciaegyezést csak két telep esetében találtunk. Abban az esetben, amikor egy telepen több mintát is megszekvenáltunk, minden alkalommal teljesen megegyező szekvenciákat azonosítottunk a vizsgált 1635 nukleotid hosszúságú szakaszon. A vizsgált

hazai telepek közötti élőállat-kereskedelmi vagy egyéb járványtani kapcsolatról jelenleg nincs információnk, de nem zárható ki, hogy az azonos/hasonló változatok országon belüli állatmozgatás és/vagy azonos spermaforrás útján jutottak el az egyes telepekre (ez utóbbi fertőzőközvetítő szerepére a spermával történő vírusürítés ellenére nincs tudományos bizonyíték, lásd később).

Egy kutatócsoport vizsgálata alapján a spanyolországi izolátumok többsége genetikailag igen változatos, és különböző európai és kínai törzsekkel együtt több különféle filogenetikai csoportba sorolható (Muñoz-González et al., 2017). A hazai és a Szlovákiából származó törzsek esetében hasonló megfigyeléseket tettünk, tehát eddigi ismereteink alapján a vírus nem csoportosítható földrajzi eredete szerint. Az egyetlen ismert, spanyolországi (Katalónia) vaddisznóból származó APPV-törzs nagy hasonlóságot mutat egy 12 évvel későbbi, spanyolországi sertéstelepen izolált mintával. Spanyolországra jellemző az ibériai sertés (Iberico) extenzív tartása, amely telepek esetében a járványvédelem, azon belül is a vaddisznóállományoktól való elkülönítés nehéz feladat. Habár az extenzív sertéstartás főleg a déli régiókra jellemző, a Katalónia szomszédságában lévő Kasztília La Mancha régióban is folyik Iberico sertéstartás (Horrillo et al., 2022). Ezek alapján nem zárható ki a vaddisznók és a házisertés-állomány közötti járványtani kapcsolat.

A legnagyobb genetikai távolság a kínai törzsek esetében figyelhető meg (18,1%-os eltérés), ez a hazai törzsek esetében 1,1–11,2% volt, más országok esetében pedig átlagosan 9–12,3%. Eredményeink arra utalnak, hogy az APPV genetikai diverzitásának fő mozgatórugója a törzsek helyi, divergens evolúciója, valamint a fertőzött, tünetmentes állatok kereskedelme. A fertőzött sperma lehetséges szerepét az APPV terjedésében még nem vizsgálták, de feltételezhetően ez is szerepet játszik.

8.2 Szervtropizmus-vizsgálatok

Az APPV-fertőzés során érintett szövetek és sejtek felderítése érdekében természetes módon fertőződött újszülött malacok szerveit vizsgáltuk, különös tekintettel a herékre és az agyvelőre. 2–2 reszketőkórban szenvedő és 1–1 tünetmentes, kontroll állatot kaptunk nagyüzemi sertéstelepekről, amelyek szervmintáiban RT-qPCR módszerrel ellenőriztük a vírus jelenlétét. Azonosítottuk a vírust a CT-érintett állatok összes vizsgált szervmintájában, amelyek vírusterheltsége között csak a nagyagyvelő- és kisagyvelőminták között találtunk szignifikáns különbséget. A két újszülött kontroll állat közül az egyik (A4) negatívnak bizonyult APPV jelenlétére, azonban az A1-es állat mandulájában és kisagyvelejében azonosítottuk a vírust, utóbbi feltételezhetően a gesztáció egy későbbi időpontjában fertőződött (feltehetőleg a 68. nap után), így a CT-re jellemző kórkép és szisztémás fertőzés már nem alakult ki (Arruda et al., 2016; de Groof et al., 2016).

Ezen CT-vel érintett 1–3 napos malacok kis- és nagyagyvelejét vizsgáltuk RNS-alapú *in situ* hibridizációs módszerrel (RNAscope) az APPV-genom szöveti lokalizációjának megjelenítése céljából. A vírusgenom kimutatására az APPV NS2–3 fehérjéit kódoló régiókra komplementer, 20 pár dupla Z, többszörös jelerősítő rendszerrel, ill. alkalikus-foszfátázzal jelölt oligonukleotid próbákat alkalmaztunk, így a vírusfertőzött sejtek piros színnel jelölődtek. Ugyanezzel a módszerrel vizsgáltuk egy reszketőkórral született, majd tünetmentessé váló, 6 hónapos, vírusürítő kan szerveit is. Az APPV genetikai állományát megtaláltuk a reszketőkóros malacok kisagyvelejének belső granularis és molecularis rétegében, továbbá a Purkinje-sejtekben, azonban CSFV-fertőzés esetében megfigyeltekkkel ellentétben a külső granularis réteg nem bizonyult érintettnek. Eredményeink többnyire egybevágóak korábban végzett hasonló vizsgálat eredményeivel, azzal a különbséggel, hogy abban az esetben a Purkinje-sejtek nem mutattak pozitívítást FISH-módszerrel (Postel et al., 2016). Az általunk vizsgált újszülött malacok nagyagyvelejében intenzív pozitív jelet azonosítottunk, míg az ivarérett kan esetében nem figyeltünk meg ilyet. Buckley és mtsai (2021) fertőzőseles kísérletben hozzánk hasonlóan RNAscope-módszerrel vizsgálták malacok és ivarérett kanok szöveteit, velünk ellentétben nem figyeltek meg intenzív festődést a nagyagyvelő sejtjeiben egyik csoport esetében sem. A perzisztens fertőzésben szenvedő ivarérett kan esetében enyhébb festődést figyeltünk meg az állat kisagyvelejében, a granularis, és molecularis sejtrétegben, továbbá a Purkinje-sejtekben. Buckley és kutatócsoportja ellentétes tendenciát figyelt meg a jelintenzitás tekintetében: a fiatal állatok esetében gyenge, az idősebb állatok esetében intenzívebb jelet azonosítottak, továbbá a malacok esetében elszórtan gyenge jelintenzitást azonosítottak a kisagyvelő külső granularis sejtjeiben is. Malacok esetében a fertőzött kisagyvelői területeknél a vírus multifocalis eloszlását figyelték meg, ez összhangban van saját eredményeinkkel (Buckley et al. 2021). Az általunk vizsgált ivarérett kan esetében a gerincvelő szürkeállományában is találtunk APPV-pozitív neuronokat, azonban az agytörzs nem bizonyult érintettnek.

A prevalenciavizsgálatok során a herélésifolyadék-minták nagyarányú pozitívítása, ill. egyéb pestivírusok bizonyított heretropizmusa (Voges et al., 1998a; Choi and Chae, 2002; Read et al., 2020b; Storino et al., 2020) okán célul tűztük ki annak kiderítését, hogy az APPV okoz-e fertőzést a hereszövet sejtjeiben, vagy az említett elegyminta pozitívítása inkább a vérsavó pozitívítását (viraemia) tükrözi-e, ahogy azt a PRRSV esetében igazolták (Lopez et al., 2018). Kutatásunk során sikerrel azonosítottuk az APPV-genomot RNAscope-módszerrel újszülött malacok hereszövetének interstitialis Leydig-sejtjeiben, a közepes méretű artériák simaizomsejtjeiben, továbbá a kanyarulat csatornák körüli orsó alakú mesenchymalis sejtjeiben. Utóbbiak sorozatmetszeteken, immunhisztokémiai vizsgálattal intenzív, citoplazmatikus α -SMA-pozitívítást mutattak, míg a vWF-jelöléssel negatívak voltak, ami arra

utal, hogy ezek a sejtek vérerektől független, simaizomelemeket tartalmazó, ún. peritubularis myoid sejtekként azonosíthatóak. Érdekes módon nem azonosítottunk pozitív jelet a kapillárisok endothelsejtjeiben, habár ezen sejtípus fertőzöttségét más szervekben korábban már leírták (Postel et al., 2016; Liu et al., 2019; Buckley et al., 2021). A peritubularis myoid sejtek a kanyarulat csatornákat körülvevő simaizomsejtek. Ezen sejtek felelősek a csatornák szerkezeti épségéért, szerepet játszanak a spermatogenezis szabályozásában, továbbá izomrostjaikkal részt vesznek a kanyarulat csatornák összehúzódásában, így segítik a spermatozoa lumenbe jutását (Maekawa et al., 1996). Az intertubularis térben elhelyezkedő Leydig-sejtek felelősek a tesztoszteron termeléséért, amely fontos a spermatogenesis és a hím másodlagos nemi jelegek fenntartásához (Mital et al., 2011). A szakirodalomban egyelőre csak néhány olyan tanulmány lelhető fel, amely pestivírus-fertőzés esetén a herében érintett sejtípusokat vizsgálja (Voges et al. 1998; Choi and Chae 2002; Read et al. 2020; Storino et al. 2020). Az APPV-vel filogenetikailag közelebbi rokon pestivírust, a BVDV-t korábban azonosították egy ivarérett bika hereszövetében, amely spermájában perzisztensen ürítette a vírust majdnem egy éven keresztül. A vírusfertőzés csak a herékre korlátozódott, ezért feltételezhető, hogy a bika csak a pubertást követően fertőződött meg, mivel a Sertoli-sejtek által létrehozott vér-here gát, amely megvédhette a vírust a bika immunválaszától, csak pubertás után lesz működőképes (Voges et al., 1998b). Egy közelmúltbeli tanulmányban perzisztens BVDV-fertőzésben szenvedő bikákat vizsgáltak, amelyek hosszabb időszakon keresztül ürítették a vírust spermájuk útján és a fertőzés az ivarszervekre korlátozódott. Megfigyelték, hogy a vírus többnyire a kanyarulat csatornában lokalizálódott. Az érintett tubulusokban elhelyezkedő, különféle fázisban lévő ivarsejtek, úgy mint spermatocyták és a kerek vagy megnyúlt spermátidák festődését tapasztalták a hereszövet károsodása mellett (Read et al., 2020b). A kanyarulat csatornák érintettségét a BVDV-fertőzésen túl egy humánpatogén flavivírus, a Zika-vírus esetében is megfigyelték, amely esetében bizonyított, hogy spermán keresztül is továbbadható a fertőzés (Siemann et al., 2017). Egy BVDV-vel végzett vizsgálat során nem tapasztaltak vírusürítést a reprodukciós útvonalon, azonban ez esetben a megfigyelés időszaka rövidebb volt (Storino et al., 2020). Az APPV-vel közeli rokonságban álló klasszikus sertéspestis vírusát nem mutatták ki a here Sertoli-, Leydig- és endothelsejtjeiben, a vírus többnyire a monocytákat/macrophagokat fertőzte (Choi and Chae, 2002). Egy közelmúltbeli tanulmányban Buckley és mtsai (2021) a vírus-RNS széles körű és szisztémás eloszlását figyelték meg, beleértve az endothelsejteket, a fibroblastokat és a simaizomsejteket is, míg a herében erős pozitívítást figyeltek meg a tunica albugineában és mérsékelt jelölődést a kanyarulat csatornák lumenében. Az általunk azonosított sejtek esetleges APPV-fertőzöttségéről ebben a tanulmányban nem számoltak be. Egy korábbi tanulmányban, a Phocoena-pestivírus és más pestivírusok esetében, más szervekben a vérerek, fibroblastok és a mesenchymalis sejtek érintettségét figyelték meg, amely

összhangban van kutatócsoportunk eredményeivel (Jo et al., 2019). A vérerek simaizomsejtjeinek érintettségét korábban megfigyelték már CSFV- és BVDV-fertőzés esetében is (Liebler-Tenorio et al., 1997; Narita et al., 2000).

Jelen ismereteink szerint a vírust még nem azonosították a vér-here gáton (Sertoli-sejt gát) túli területeken, ezért célunk volt APPV-fertőzött, ivarérett kanok hereszövetét is vizsgálni. Schwarz és mtsai (2017) CT-vel született, majd abból felgyógyult sertéseket követtek 6 hónapon keresztül és RT-qPCR módszerrel az APPV-genom magas szintjét mutatták ki egy ivarérett kan nyálában és spermájában, míg savójában két nagyságrenddel kisebb kópiaszámot azonosítottak. Az állat a vizsgálat időpontjában szeronegatív volt, ez alapján nem zárható ki a BVDV esetében megfigyelt (Voges et al., 1998a) perzisztens fertőzés és immuntolerancia gyanúja sem, bár erre vonatkozóan még nem jelentek meg további, bizonyító értékű vizsgálatok, továbbá az állat szeropozitív volt születésekor, ami szintén valószínűtlenné teszi, hogy immuntoleráns lett volna (Schwarz et al., 2017). Ennek az állatnak FFPE-blokkokban archivált szerveit vizsgáltuk APPV jelenlétére a már bemutatott *in situ* hibridizációs módszerrel, kiemelt figyelmet fordítva az állat hereszövetére és járulékos nemi mirigyeire. Az APPV sejtropizmusában esetlegesen bekövetkező, életkorral összefüggő változások elemzése kiemelten fontos, ugyanis kifejlett kanokban a vírus ondóval történő ürítését már bebizonyították (Gatto, Arruda et al., 2018). Habár az ondó fertőzőképességéről még nincs információ, egy fertőzött telepen 98,9% nukleotidegyezést találtak egy klinikai tüneteket mutató malac vérsavómintájából és egy telepre érkezett sperma dóziszból azonosított vírustörzs között (Houston et al., 2022). A fiatal állatokkal ellentétben az ivarérett kan hereszövetében nem csak az interstitialis régió sejtjeiben azonosítottuk a vírust, hanem a vér- here gáton túli Sertoli-sejtjeiben és csírasejtjeiben is. Ezen felül a spermaképződésben/ürítésben szintén szerepet játszó prosztata apocrin sejtjeiben és a Cowper-mirigy sejtjeiben is kimutattuk a vírust, ez magyarázatot adhat arra, korábban hogyan találták meg a vírust ivarérett kanok spermájában (Gatto et al., 2018b). Eredményeink fontos különbséget tártak fel a herét alkotó sejtípusok fertőzöttsége között újszülött és ivarérett állatok esetében, illetve igazoltuk a járulékos nemi mirigyek fertőzöttségét is egy a vírust spermájával (és nyálával) ürítő, feltételezhetően perzisztensen fertőzött, immuntoleráns állat esetében. Ennek hátterében két ok is feltételezhető: (i) az állat ivari érése során olyan változások következnek be a here sejtjeit illetően, amelyek nyomán fogékonyá válnak az APPV-fertőzésre; (ii) a hosszan, hónapokig is eltartó perzisztens fertőzés alatt a vírus – valamilyen eddig nem azonosított mechanizmus révén – képessé válik átjutni a Sertoli-sejt gáton, amely az immunrendszerrel védettebb területnek számít (Voges et al., 1998a).

Eddigi vizsgálataink alapján az APPV magyarországi elterjedtsége jelentős és amennyiben naiv kocaállomány fertőződik, az újszülött malacokban esetlegesen megjelenő

CT nyomán malacelhullás is bekövetkezhet. Megfelelő süldőakklimatizációs eljárások bevezetésével, továbbá a már klinikai tüneteket mutató malacokról való körültekintő gondoskodással a vírus által okozott károk mérsékelhetők. Eredményeink alapján mindenképpen javasolható a tenyészkantelek szűrése a vírus jelenléte szempontjából, amit további kutatásaink során tervezünk, illetve el is kezdtünk, valamint semmiképpen nem ajánlott reszketőkórosan született, majd abból kigyógyult kanok továbbtartása tenyésztési célokból. Filogenetikai elemzésünk során azonosítottuk a magyarországi vírusválozatokat, amely alapján az APPV genetikai diverzitásának fő mozgatórugója feltételezhetően a törzsek helyi, divergens evolúciója, valamint a fertőzött, tünetmentes állatok kereskedelme.

9 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 herélési folyadékminták, a 10 hetes sertések vérsavómintái és 20 hetes állatok rágókötelemintái 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.

10 Irodalomjegyzék

- Agapov, E. V, Murray, C.L., Frolov, I., Qu, L., Myers, T.M., Rice, C.M., 2004. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 78, 2414–25. doi:10.1128/JVI.78.5.2414
- Arruda, B.L., Arruda, P.H., Magstadt, D.R., Schwartz, K.J., Dohlman, T., Schleining, J.A., Patterson, A.R., Visek, C.A., Victoria, J.G., 2016. Identification of a Divergent Lineage Porcine Pestivirus in Nursing Piglets with Congenital Tremors and Reproduction of Disease following Experimental Inoculation. *PLoS One* 11, e0150104. doi:10.1371/journal.pone.0150104
- Arruda, B.L., Falkenberg, S., Mora-Díaz, J.-C., Matias Ferreyra, F.S., Magtoto, R., Giménez-Lirola, L., 2022. Development and Evaluation of Antigen-Specific Dual Matrix Pestivirus K ELISAs Using Longitudinal Known Infectious Status Samples. *J. Clin. Microbiol.* 0, e00697-22. doi:10.1128/jcm.00697-22
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J., Becher, P., 2001. Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species. *Virology* 286, 456–465. doi:10.1006/viro.2001.1001
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., König, M., Thiel, H.-J.J., König, M., Thiel, H.-J.J., 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 6), 1357–66. doi:10.1099/0022-1317-78-6-1357
- Becher, P., Schmeiser, S., Oguzoglu, T.C., Postel, A., 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Pestivirus from Sheep. *J. Virol.* 86, 11412–11412. doi:10.1128/jvi.01994-12
- Becher, P., Tautz, N., 2011. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol.* 8, 216–224. doi:10.4161/rna.8.2.14514
- Beer, M., Wernike, K., Dräger, C., Höper, D., Pohlmann, A., Bergemann, C., Schröder, C., Klinkhammer, S., Blome, S., Hoffmann, B., 2016. High Prevalence of Highly Variable Atypical Porcine Pestiviruses Found in Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, e22–e26. doi:10.1111/tbed.12532
- Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J., Beer, M., 2017. Classical swine fever—an updated review. *Viruses* 9, 1–24. doi:10.3390/v9040086
- Blomström, A.L., Fossum, C., Wallgren, P., Berg, M., 2016. Viral metagenomic analysis displays the Co-infection situation in healthy and PMWS affected pigs. *PLoS One* 11, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0166863
- Blomström, A.L., Ley, C., Jacobson, M., 2014. Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type All in piglets? *Acta Vet. Scand.* 56, 82. doi:10.1186/s13028-014-0082-y
- Bölske, G., Kronevi, T., Lindgren, N.O., 1978. Congenital tremor in pigs in Sweden. A case report. *Nord. Vet. Med.* 30, 534–7.

- Bradley, R., Done, J.T., Hebert, C.N., Overby, E., Askaa, J., Basse, A., Bloch, B., 1983. Congenital tremor type AI: Light and electron microscopical observations on the spinal cords of affected piglets. *J. Comp. Pathol.* 93, 43–59. doi:10.1016/0021-9975(83)90042-7
- Brownlie, J., 1991. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 79–96.
- Buckley, A.C., Falkenberg, S.M., Palmer, M. V., Arruda, P.H., Magstadt, D.R., Schwartz, K.J., Gatto, I.R., Neill, J.D., Arruda, B.L., 2021. Distribution and persistence of atypical porcine pestivirus in experimentally inoculated pigs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 33, 952–955. doi:10.1177/10406387211022683
- Cagatay, G.N., Antos, A., Meyer, D., Maistrelli, C., Keuling, O., Becher, P., Postel, A., 2018. Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 1087–1093. doi:10.1111/tbed.12854
- Choi, C., Chae, C., 2002. Localization of classical swine fever virus in male gonads during subclinical infection. *J. Gen. Virol.* 83, 2717–2721. doi:10.1099/0022-1317-83-11-2717
- Colom-Cadena, A., Ganges, L., Muñoz-González, S., Castillo-Contreras, R., Bohórquez, J.A., Rosell, R., Segalés, J., Marco, I., Cabezon, O., 2018. Atypical porcine pestivirus in wild boar (*Sus scrofa*), Spain. *Vet. Rec.* vetrec-2017-104824. doi:10.1136/vr.104824
- de Groof, A., Deijis, M., Guelen, L., van Grinsven, L., van Os-Galdos, L., Vogels, W., Derks, C., Cruijssen, T., Geurts, V., Vrijenhoek, M., Suijskens, J., van Doorn, P., van Leengoed, L., Schrier, C., Hoek, L., 2016. Atypical porcine pestivirus: a possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. *Viruses* 8, 271. doi:10.3390/v8100271
- de Smit, A.J., Bouma, A., Terpstra, C., van Oirschot, J.T., 1999. Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. *Vet. Microbiol.* 67, 239–49. doi:10.1016/s0378-1135(99)00045-0
- Decaro, N., Losurdo, M., Lucente, M.S., Sciarretta, R., Mari, V., Larocca, V., Elia, G., Cavaliere, N., Martella, V., Fasanella, A., Buonavoglia, C., 2013. Persistent Infection Caused by Hobi-Like Pestivirus. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1241–1243. doi:10.1128/JCM.03134-12
- 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
- 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
- Deng, M.-C., Huang, C.-C., Huang, T.-S., Chang, C.-Y., Lin, Y.-J., Chien, M.-S., Jong, M.-H., 2005. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolated from Taiwan. *Vet. Microbiol.* 106, 187–193. doi:10.1016/j.vetmic.2004.12.014

- Dessureault, F., M. C., C. P., CA., G., 2018. First report of atypical porcine pestivirus in piglets with congenital tremor in Canada. *Can Vet J.* 59, 429–432.
- Dietzgen, R.G., Ghedin, E., Jiāng, D., Kuhn, J.H., Song, T., Vasilakis, N., Wang, D., 2017. ICTV virus taxonomy profile: Nyamiviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 2914–2915. doi:10.1099/jgv.0.000973
- Done, J.T., 1968. Congenital nervous diseases of pigs: a review. *Lab Anim* 2, 207–217. doi:10.1258/002367768781082861
- Done, J.T., Woolley, J., Upcott, D.H., Hebert, C.N., 1986. Porcine congenital tremor type All: Spinal cord morphometry. *Br. Vet. J.* 142, 145–150. doi:10.1016/0007-1935(86)90090-4
- Edwards, S., 2000. Survival and inactivation of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 73, 175–181. doi:10.1016/S0378-1135(00)00143-7
- Finlaison, D.S., Cook, R.W., Srivastava, M., Frost, M.J., King, K.R., Kirkland, P.D., 2010. Experimental infections of the porcine foetus with Bungowannah virus, a novel pestivirus. *Vet. Microbiol.* 144, 32–40. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.023
- Finlaison, D.S., King, K.R., Frost, M.J., Kirkland, P.D., 2009. Field and laboratory evidence that Bungowannah virus, a recently recognised pestivirus, is the causative agent of the porcine myocarditis syndrome (PMC). *Vet. Microbiol.* 136, 259–265. doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.026
- Finlaison, D.S., King, K.R., Gabor, M., Kirkland, P.D., 2012. An experimental study of Bungowannah virus infection in weaner aged pigs. *Vet. Microbiol.* 160, 245–250. doi:10.1016/j.vetmic.2012.05.001
- Finlaison, D.S., Kirkland, P.D., 2020. The Outcome of Porcine Foetal Infection with Bungowannah Virus Is Dependent on the Stage of Gestation at Which Infection Occurs. Part 2: Clinical Signs and Gross Pathology. *Viruses* 12, 873. doi:10.3390/v12080873
- Firth, C., Bhat, M., Firth, M.A., Williams, S.H., Frye, M.J., Simmonds, P., Conte, J.M., Ng, J., Garcia, J., Bhuvu, N.P., Lee, B., Che, X., Quan, P.L., Ian Lipkin, W., 2014. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *rattus norvegicus* in New York city. *MBio* 5, 1–16. doi:10.1128/mBio.01933-14
- Floegel, G., 2000. Detection of Classical Swine Fever virus in semen of infected boars. *Vet. Microbiol.* 77, 109–116. doi:10.1016/S0378-1135(00)00267-4
- Gao, W.-H., Lin, X.-D., Chen, Y.-M., Xie, C.-G., Tan, Z.-Z., Zhou, J.-J., Chen, S., Holmes, E.C., Zhang, Y.-Z., 2020. Newly identified viral genomes in pangolins with fatal disease. *Virus Evol.* 6, 1–10. doi:10.1093/ve/veaa020
- Gatto, I.R.H., Arruda, P.H., Visek, C.A., Victoria, J.G., Patterson, A.R., Krull, A.C., Schwartz, K.J., de Oliveira, L.G., Arruda, B.L., 2018a. Detection of atypical porcine pestivirus in semen from commercial boar studs in the United States. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, e339–e343. doi:10.1111/tbed.12759

- Gatto, I.R.H., Arruda, P.H., Visek, C.A., Victoria, J.G., Patterson, A.R., Krull, A.C., Schwartz, K.J., de Oliveira, L.G., Arruda, B.L., 2018b. Detection of atypical porcine pestivirus in semen from commercial boar studs in the United States. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, e339–e343. doi:10.1111/tbed.12759
- Gatto, I.R.H., Harmon, K., Bradner, L., Silva, P., Linhares, D.C.L., Arruda, P.H., de Oliveira, L.G., Arruda, B.L., 2018c. Detection of atypical porcine pestivirus in Brazil in the central nervous system of suckling piglets with congenital tremor. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 375–380. doi:10.1111/tbed.12824
- Grassmann, C.W., Yu, H., Isken, O., Behrens, S.E., 2005. Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhoea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: Implications for the viral life cycle. *Virology* 333, 349–366. doi:10.1016/j.virol.2005.01.007
- Gustafson, D.P., Kaintz, C.L., 1974. Experimental transmission of congenital tremors in swine. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.* 338–45.
- Hause, B.M., Collin, E.A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R.A., Gauger, P.C., Clement, T., Fang, Y., Anderson, G., 2015. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J. Gen. Virol.* 96, 2994–2998. doi:10.1099/jgv.0.000251
- Horrillo, A., Obregón, P., Escribano, M., Gaspar, P., 2022. A biosecurity survey on Iberian pig farms in Spain: Farmers' attitudes towards the implementation of measures and investment. *Res. Vet. Sci.* 145, 82–90. doi:10.1016/j.rvsc.2022.02.017
- Houston, G.E., Jones, C.K., Woodworth, J.C., Palinski, R., Paulk, C.B., Petznick, T., Gebhardt, J.T., 2022. Detection and investigation of atypical porcine pestivirus in a swine production system. *Front. Vet. Sci.* 9. doi:10.3389/fvets.2022.998344
- Jo, W.K., van Elk, C., van de Bildt, M., van Run, P., Petry, M., Jesse, S.T., Jung, K., Ludlow, M., Kuiken, T., Osterhaus, A., 2019. An evolutionary divergent pestivirus lacking the N pro gene systemically infects a whale species. *Emerg. Microbes Infect.* 8, 1383–1392. doi:10.1080/22221751.2019.1664940
- Kaden, V., Steyer, H., Schnabel, J., Bruer, W., 2005. Classical Swine Fever (CSF) in Wild Boar: the Role of the Transplacental Infection in the Perpetuation of CSF. *J. Vet. Med. Ser. B* 52, 161–164. doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00838.x
- Kasahara-kamiie, M., Kagawa, M., Shiokawa, M., Sunaga, F., Aihara, N., Shiga, T., Kamiie, J., Aoki, H., 2021. Detection and genetic analysis of a novel atypical porcine pestivirus from piglets with congenital tremor in Japan 1–10.
- Katoh, K., Toh, H., 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics* 9, 212. doi:10.1186/1471-2105-9-212
- Kaufmann, C., Stalder, H., Sidler, X., Renzullo, S., Gurtner, C., Grahofer, A., Schweizer, M., 2019. Long-Term Circulation of Atypical Porcine Pestivirus (APPV) within Switzerland.

- Kiesler, A., Plankensteiner, J., Schwarz, L., Riedel, C., Seitz, K., Mötz, M., Ladinig, A., Lamp, B., Rümenapf, T., 2021. Prevalence of Linda Virus Neutralizing Antibodies in the Austrian Pig Population. *Viruses* 13, 1001. doi:10.3390/v13061001
- Kiesler, A., Schwarz, L., Riedel, C., Högler, S., Brunthaler, R., Dimmel, K., Auer, A., Zaruba, M., Mötz, M., Seitz, K., Ladinig, A., Lamp, B., Rümenapf, T., 2022. New Emergence of the Novel Pestivirus Linda Virus in a Pig Farm in Carinthia, Austria. *Viruses* 14, 326. doi:10.3390/v14020326
- Kiesler, A., Seitz, K., Schwarz, L., Buczolic, K., Petznek, H., Sassu, E., Dürlinger, S., Högler, S., Klang, A., Riedel, C., Chen, H.W., Mötz, M., Kirkland, P., Weissenböck, H., Ladinig, A., Rümenapf, T., Lamp, B., 2019. Clinical and serological evaluation of LINDA virus infections in post-weaning piglets. *Viruses* 11, 1–13. doi:10.3390/v11110975
- Kinsley, A., 1922. Dancing pigs? *Vet. Med.* 17, 123.
- Kirkland, P.D., Frost, M.J., Finlaison, D.S., King, K.R., Ridpath, J.F., Gu, X., 2007. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Res.* 129, 26–34. doi:10.1016/j.virusres.2007.05.002
- Kirkland, P.D., Frost, M.J., King, K.R., Finlaison, D.S., Hornitzky, C.L., Gu, X., Richter, M., Reimann, I., Dauber, M., Schirrmeier, H., Beer, M., Ridpath, J.F., 2015a. Genetic and antigenic characterization of Bungowannah virus, a novel pestivirus. *Vet. Microbiol.* 178, 252–259. doi:10.1016/j.vetmic.2015.05.014
- Kirkland, P.D., Read, A.J., Frost, M.J., Finlaison, D.S., 2015b. Bungowannah virus – a probable new species of pestivirus – what have we found in the last 10 years? *Anim. Heal. Res. Rev.* 16, 60–63. doi:10.1017/S1466252315000031
- Kiss, I., Dobos, A., 2021. Újabb ismeretek a szarvasmarhák vírusos hasmenésének kórokozójáról II. Irodalmi összefoglaló. *Magy. állatorvosok lapja.*
- Klemens, O., Dubrau, D., Tautz, N., 2015. Characterization of the Determinants of NS2-3-Independent Virion Morphogenesis of Pestiviruses. *J. Virol.* 89, 11668–11680. doi:10.1128/JVI.01646-15
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Lamp, B., Schwarz, L., Högler, S., Riedel, C., Sinn, L., Rebel-Bauder, B., Weissenböck, H., Ladinig, A., Rümenapf, T., 2017. Novel Pestivirus Species in Pigs, Austria, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1176–1179. doi:10.3201/eid2307.170163
- Liebler-Tenorio, E.M., Greiser-Wilke, I., Pohlenz, J.F., 1997. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch. Virol.* 142, 1613–1634. doi:10.1007/s007050050184

- Lin, M., Trottier, E., Pasick, J., 2005. Antibody Responses of Pigs to Defined E rns Fragments after Infection with Classical Swine Fever Virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 12, 180–186. doi:10.1128/CDLI.12.1.180-186.2005
- Liu, J., Li, Z., Ren, X., Li, H., Lu, R., Zhang, Y., Ning, Z., 2019. Viral load and histological distribution of atypical porcine pestivirus in different tissues of naturally infected piglets. *Arch. Virol.* 164, 2519–2523. doi:10.1007/s00705-019-04345-3
- Liu, J., Zhang, P., Chen, Y., Zhong, W., Li, B., Pi, M., Ning, Z., 2021. Vaccination with virus-like particles of atypical porcine pestivirus inhibits virus replication in tissues of BALB/c mice. *Arch. Virol.* 166, 2733–2741. doi:10.1007/s00705-021-05185-w
- Lopez, W., Angulo, J., Zimmerman, J., 2018. Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *J. Swine Heal. Prod.* 26, 146–150.
- Lowings, P., Ibata, G., Needham, J., Paton, D., 1996. Classical swine fever virus diversity and evolution. *J. Gen. Virol.* 77, 1311–1321. doi:10.1099/0022-1317-77-6-1311
- Maekawa, M., Kamimura, K., Nagano, T., 1996. Peritubular myoid cells in the testis : Their structure and function. *Arch. Histol. Cytol.* 59, 1–13. doi:10.1679/aohc.59.1
- Mcorist, S., Thornton, E., Peake, A., Walker, R., Robson, S., Finlaison, D., Kirkland, P., Reece, R., Ross, A., Walker, K., Hyatt, A., Morrissy, C., 2004. An infectious myocarditis syndrome affecting late-term and neonatal piglets. *Aust. Vet. J.* 82, 509–509. doi:10.1111/j.1751-0813.2004.tb11172.x
- Mechler, M.L., Gomes, F. dos S., Nascimento, K.A., Souza-Pollo, A. de, Pires, F.F.B., Samara, S.I., Pituco, E.M., Oliveira, L.G. de, 2018. Congenital tremor in piglets: Is bovine viral diarrhoea virus an etiological cause? *Vet. Microbiol.* 220, 107–112. doi:10.1016/j.vetmic.2018.05.009
- Meyer, D., Postel, A., Wiedemann, A., Cagatay, G.N., Ciulli, S., Guercio, A., Becher, P., 2021. Comparative Analysis of Tunisian Sheep-like Virus, Bungowannah Virus and Border Disease Virus Infection in the Porcine Host. *Viruses* 13, 1539. doi:10.3390/v13081539
- Meyers, G., Ege, A., Fetzer, C., von Freyburg, M., Elbers, K., Carr, V., Prentice, H., Charleston, B., Schürmann, E.-M., 2007. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting E rns RNase and N pro Protease. *J. Virol.* 81, 3327–3338. doi:10.1128/JVI.02372-06
- Mital, P., Hinton, B.T., Dufour, J.M., 2011. The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions1. *Biol. Reprod.* 84, 851–858. doi:10.1095/biolreprod.110.087452
- Mocsári, E., Molnár, T., 1994. Újabb ismeretek a sertéspestisről. *Magy. Állatorvosok Lapja* 49, 134–139.
- Moennig, V., 2015. The control of classical swine fever in wild boar. *Front. Microbiol.* 6, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.01211

- Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., Greiser-Wilke, I., 2003. Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever: A Review of New Knowledge. *Vet. J.* 165, 11–20. doi:10.1016/S1090-0233(02)00112-0
- Moulin, H.R., Seuberlich, T., Bauhofer, O., Bennett, L.C., Tratschin, J.-D., Hofmann, M.A., Ruggli, N., 2007. Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: Essential features for infectious particle formation. *Virology* 365, 376–389. doi:10.1016/j.virol.2007.03.056
- Muñoz-González, S., Canturri, A., Pérez-Simó, M., Bohórquez, J.A., Rosell, R., Cabezón, O., Segalés, J., Domingo, M., Ganges, L., 2017. First report of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1645–1649. doi:10.1111/tbed.12699
- Narita, M., Kawashima, K., Kimura, K., Mikami, O., Shibahara, T., Yamada, S., Sakoda, Y., 2000. Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. *Vet. Pathol.* 37, 402–408. doi:10.1354/vp.37-5-402
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press. New York.
- Nguyen, H.N., Nguyen, Q.T., Nguyen, B.T.P., Tran, T.H.A., Do, D.T., Hoang, H.T., 2022. Detection of African swine fever virus in neonatal piglets with congenital tremors. *Arch. Virol.* 167, 1131–1135. doi:10.1007/s00705-022-05378-x
- Pan, S., Mou, C., Chen, Z., 2018. An emerging novel virus: Atypical porcine pestivirus (APPV). *Rev. Med. Virol.* e2018. doi:10.1002/rmv.2018
- Paton, D., McGoldrick, A., Greiser-Wilke, I., Parchariyanon, S., Song, J.-Y., Liou, P., Stadejek, T., Lowings, J., Björklund, H., Belák, S., 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 73, 137–157. doi:10.1016/S0378-1135(00)00141-3
- Patterson, A.R., City, S., Arruda, B.L., Henrique, P., Arruda, E., Magstadt, D.R., Schwartz, K.J., 2018. Pestivirus vaccines for congenital tremors. *US 9 , 920 , 302 B2*.
- Patterson, D.S., Done, J.T., Foulkes, J.A., Sweasey, D., 1976. Neurochemistry of the spinal cord in congenital tremor of piglets (type All), a spinal dysmyelination of infectious origin. *J. Neurochem.* 26, 481–5. doi:10.1111/j.1471-4159.1976.tb01499.x
- Pedersen, K., Kristensen, C.S., Strandbygaard, B., Bøtner, A., Rasmussen, T.B., 2021. Detection of atypical porcine pestivirus in piglets from Danish sow herds. *Viruses* 13, 1–7. doi:10.3390/v13050717
- Porter, B.F., Ridpath, J.F., Calise, D. V., Payne, H.R., Janke, J.J., Baxter, D.G., Edwards, J.F., 2010. Hypomyelination Associated With Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 Infection in a Longhorn Calf. *Vet. Pathol.* 47, 658–663. doi:10.1177/0300985810370014
- Postel, A., Austermann-Busch, S., Petrov, A., Moennig, V., Becher, P., 2018. Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent developments and future challenges. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 248–261. doi:10.1111/tbed.12676

- Postel, A., Hansmann, F., Baechlein, C., Fischer, N., Alawi, M., Grundhoff, A., Derking, S., Tenhüdnfeld, J., Pfankuche, V.M., Herder, V., Baumgärtner, W., Wendt, M., Becher, P., 2016. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci. Rep.* 6, 27735. doi:10.1038/srep27735
- Postel, A., Meyer, D., Cagatay, G.N., Feliziani, F., De Mia, G.M., Fischer, N., Grundhoff, A., Milićević, V., Deng, M.-C., Chang, C.-Y., Qiu, H.-J., Sun, Y., Wendt, M., Becher, P., 2017a. High abundance and genetic variability of atypical porcine pestivirus in pigs from Europe and Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 2104–2107. doi:10.3201/eid2312.170951
- Postel, A., Meyer, D., Petrov, A., Becher, P., 2017b. Recent emergence of a novel porcine pestivirus: interference with classical swine fever diagnosis? *Emerg. Microbes Infect.* 6, 1–2. doi:10.1038/emi.2017.5
- Postel, A., Nishi, T., Kameyama, K., Meyer, D., Suckstorff, O., Fukai, K., Becher, P., 2019. Reemergence of Classical Swine Fever, Japan, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1228–1231. doi:10.3201/eid2506.181578
- Postel, A., Smith, D.B., Becher, P., 2021. Proposed Update to the Taxonomy of Pestiviruses: Eight Additional Species within the Genus Pestivirus, Family Flaviviridae. *Viruses* 13, 1542. doi:10.3390/v13081542
- Read, A.J., Finlaison, D.S., Kirkland, P.D., 2020a. Infection of Ruminants, Including Pregnant Cattle, with Bungowannah Virus. *Viruses* 12, 690. doi:10.3390/v12060690
- Read, A.J., Gestier, S., Parrish, K., Finlaison, D.S., Gu, X., O'Connor, T.W., Kirkland, P.D., 2020b. Prolonged detection of bovine viral diarrhoea virus infection in the semen of bulls. *Viruses* 12. doi:10.3390/v12060674
- Ren, X., Qian, P., Liu, S., Chen, H., Li, X., 2021. Fc-mediated e2-dimer subunit vaccines of atypical porcine pestivirus induce efficient humoral and cellular immune responses in piglets. *Viruses* 13. doi:10.3390/v13122443
- Richter, M., Reimann, I., Wegelt, A., Kirkland, P.D., Beer, M., 2011. Complementation studies with the novel “Bungowannah” virus provide new insights in the compatibility of pestivirus proteins. *Virology* 418, 113–122. doi:10.1016/j.virol.2011.07.014
- Riedel, C., Aitkenhead, H., El Omari, K., Rügenapf, T., Omari, K. El, Rügenapf, T., 2021. Atypical porcine pestiviruses: Relationships and conserved structural features. *Viruses* 13, 1–16. doi:10.3390/v13050760
- Rosell, R., Cabezón, O., Pujols, J., Domingo, M., Muñoz, I., Núñez, J.I., Ganges, L., 2014. Identification of a porcine pestivirus as a border disease virus from naturally infected pigs in Spain. *Vet. Rec.* 174, 18.2-18. doi:10.1136/vr.101920
- Schwarz, L., Riedel, C., Högl, S., Sinn, L.J., Voglmayr, T., Wöchtel, B., Dinhopf, N., Rebel-Bauder, B., Weissenböck, H., Ladinig, A., Rügenapf, T., Lamp, B., 2017. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Vet. Res.* 48, 1. doi:10.1186/s13567-016-0406-1

- Schweizer, M., Peterhans, E., 2014. Pestiviruses. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2, 141–163. doi:10.1146/annurev-animal-022513-114209
- Siemann, D.N., Strange, D.P., Maharaj, P.N., Shi, P.-Y., Verma, S., 2017. Zika Virus Infects Human Sertoli Cells and Modulates the Integrity of the In Vitro Blood-Testis Barrier Model. *J. Virol.* 91, 1570–1580. doi:10.1128/JVI.00623-17
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., Stapleton, J.T., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 2–3. doi:10.1099/jgv.0.000672
- Sipos, R., Földi, J., Jenő, R., 2021. Fertőző betegségek laboratóriumi kórjelzése elegyminták vizsgálatával. *Magy. Allatorvosok Lapja* 143, 367–381.
- Smith, D.B., Meyers, G., Bukh, J., Gould, E.A., Monath, T., Scott Muerhoff, A., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Stapleton, J.T., Simmonds, P., Becher, P., Muerhoff, A.S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Stapleton, J.T., Simmonds, P., Becher, P., 2017. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 2106–2112. doi:10.1099/jgv.0.000873
- Sozzi, E., Lavazza, A., Gaffuri, A., Bencetti, F.C., Prosperi, A., Lelli, D., Chiapponi, C., Moreno, A., 2019a. Isolation and Full-Length Sequence Analysis of a Pestivirus from Aborted Lamb Fetuses in Italy. *Viruses* 11, 744. doi:10.3390/v11080744
- Sozzi, E., Salogni, C., Lelli, D., Barbieri, I., Moreno, A., Alborali, G.L., Lavazza, A., 2019b. Molecular Survey and Phylogenetic Analysis of Atypical Porcine Pestivirus (APPV) Identified in Swine and Wild Boar from Northern Italy. *Viruses* 11, 1142. doi:10.3390/v11121142
- Stevenson, G.W., Kiupel, M., Mittal, S.K., Choi, J., Latimer, K.S., Kanitz, C.L., 2001. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 13, 57–62. doi:10.1177/104063870101300111
- Storino, G.Y., Xavier, E.B., Mechler-dreibi, M.L., Simonatto, A., Gatto, I.R.H., Oliveira, M.E.F., Pituco, E.M., de Oliveira, L.G., Yuri, G., Bellini, E., Mechler-dreibi, M.L., Simonatto, A., Renan, I., Gatto, H., Emilia, M., Oliveira, F., Maristela, E., Guilherme, L., Oliveira, D., 2020. No effects of noncytopathic bovine viral diarrhea virus type 2 on the reproductive tract of experimentally inoculated boars. *Vet. Microbiol.* 240, 108512. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108512
- Tautz, N., Tews, B.A., Meyers, G., 2015. The Molecular Biology of Pestiviruses, in: *Advances in Virus Research*. Elsevier Inc., pp. 47–160. doi:10.1016/bs.aivir.2015.03.002
- Vandekerckhove, P., 1989. Type A2 Congenital Tremor in Piglets 771, 763–771.
- Vannier, P., Plateau, E., Tillon, J.P., 1981. Congenital tremor in pigs farrowed from sows given hog cholera virus during pregnancy. *Am. J. Vet. Res.* 42, 135–7.
- Vilcek, S., Ridpath, J.F.F., Van Campen, H., Cavender, J.L.L., Warg, J., 2005.

- Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.* 108, 187–193. doi:10.1016/j.virusres.2004.09.010
- Voges, H., Horner, G., Rowe, S., Wellenberg, G., 1998a. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet. Microbiol.* 61, 165–175. doi:10.1016/S0378-1135(98)00177-1
- Voges, H., Horner, G. W., Rowe, S., Wellenberg, G. J., 1998b. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet. Microbiol.* 61, 165–175. doi:10.1016/S0378-1135(98)00177-1
- Wang, L., Madera, R., Li, Y., McVey, D.S., Drolet, B.S., Shi, J., 2020. Recent Advances in the Diagnosis of Classical Swine Fever and Future Perspectives. *Pathogens* 9, 658. doi:10.3390/pathogens9080658
- Wu, Z., Lu, L., Du, J., Yang, L., Ren, X., Liu, B., Jiang, J., Yang, J., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Li, Y., Zheng, D., Zhang, C., Su, H., Zheng, Y., Zhou, H., Zhu, G., Li, H., Chmura, A., Yang, F., Daszak, P., Wang, J., Liu, Q., Jin, Q., 2018. Comparative analysis of rodent and small mammal viromes to better understand the wildlife origin of emerging infectious diseases. *Microbiome* 6, 178. doi:10.1186/s40168-018-0554-9
- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S., Jin, Q., 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.* 86, 10999–11012. doi:10.1128/JVI.01394-12
- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C.W., Behrens, S.-E., 2000. A Stem-Loop Motif Formed by the Immediate 5' Terminus of the Bovine Viral Diarrhea Virus Genome Modulates Translation as well as Replication of the Viral RNA. *J. Virol.* 74, 5825–5835. doi:10.1128/JVI.74.13.5825-5835.2000
- Yuan, F., Feng, Y., Bai, J., Liu, X., Arruda, B., Anbalagan, S., Peddireddi, L., 2021. Genetic diversity and prevalence of Atypical Porcine Pestivirus in the Midwest of US swine herds during 2016–2018. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.14046. doi:10.1111/tbed.14046
- Yuan, J., Han, Z., Li, J., Huang, Y., Yang, J., Ding, H., Zhang, J., Zhu, M., Zhang, Y., Liao, J., Zhao, M., Chen, J., 2017. Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China. *Front. Microbiol.* 8, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2017.00862
- Zachary, James F., 2012. Nervous System, in: McGavin, M.D., Zachary, J. F (Eds.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Elsevier, St. Louis; Missouri; USA, pp. 771–870.
- Zhou, B., 2019. Classical Swine Fever in China-An Update Minireview. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–8. doi:10.3389/fvets.2019.00187

Internetes oldalak:

https://ictv.global/sites/default/files/inlineimages/OPSR.Flavi.Fig3.Pestivirus.alignment_aa.FST (Pestivírus referencia genomok)

<https://ictv.global/sites/default/files/inline-images/NS5%20alignment.FST> (Flaviviridae genomok)

WOAH Terrestrial Manual 2019. Available online:
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.03_CSF.pdf

<https://www.woah.org/en/disease/classical-swine-fever/>

[NÉBIH 2013 CSFV](#)

WOAH (2008) Manual of diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animal

11 A doktori kutatás eredményeinek közlései

Összesített IF: 48,393

11.1 A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Témában szerzett IF: 8,311

- 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/magyallorv.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

11.2 A doktori értekezés témájában tartott előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon

- Dénes, L., Balka, Gy.: The prevalence of atypical porcine pestivirus in Hungarian pig farms, European Symposium of Porcine Health Management, Budapest – előadás, 2022
- Dénes, L., Schwarz, L, Balka, Gy.: Detection and localization of atypical porcine pestivirus in various tissues of a persistently infected boar, European Society for Veterinary Virology, 12th International congress for veterinary virology, Ghent – előadás, 2022
- Dénes, L., Ruedas-Torres, I, Balka, Gy.: Detection of atypical porcine pestivirus in the testicles of swine, Fialat Biotechnológusok Konferenciája, Debrecen – előadás, 2021
- Dénes, L., Marcello, M, Rácz, B, Balka, Gy.: Detection of atypical porcine pestivirus (APPV) by *in situ* hybridization and electron microscopy in the brain tissues of CT affected piglets, NA PRRS Symposium, Chicago – előadás, 2019
- Dénes, L., Balka, Gy.: Detection and phylogenetic characterization of atypical porcine pestivirus strains in Hungary, Power of Viruses, Horvátország – előadás, 2018
- Dénes, L., Biksi, I, Albert, M, Balka, Gy.: Identification of atypical porcine pestivirus in Hungarian herds, Fialat Biotechnológusok Konferenciája, Budapest – előadás, 2018
- Dénes, L., Igriczi, B, Balka, Gy.: Az atipikus sertéspestivírus (APPV) magyarországi prevalenciájának vizsgálata, Akadémiai beszámoló, Budapest – előadás, 2022

- Dénes, L., Ruedas-Torrez, I, Balka, Gy.: Az atipikus sertés-pestivírus azonosítása reszketőkóros sertések here szövetében, Akadémiai beszámoló, Budapest – előadás, 2021
- Dénes, L., Balka, Gy.: Atipikus sertés-pestivírus kimutatása és genetikai jellemzése Magyarországon, Akadémiai beszámoló, Budapest – előadás, 2018

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

A. Publikációk

- 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.-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, IF: 4,996
- Dénes, L., Cságola, A., Schönhardt, K., Halas, M., Solymosi, N., Balka, G., 2020. First report of porcine parainfluenza virus 1 (species Porcine respirovirus 1) in Europe. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13869. doi:10.1111/tbed.13869, IF: 5,005
- Dénes, L., Horváth, D.G., Duran, O., Ratkhjen, P.H., Kraft, C., Acs, B., Szász, A.M., Rűmenapf, 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, IF: 2,314
- Igriczi, B., Dénes, L., Biksi, I., Albert, E., Révész, T., Balka, G., 2022. High Prevalence of Porcine Circovirus 3 in Hungarian Pig Herds: Results of a Systematic Sampling Protocol. *Viruses* 14, 1219. doi:10.3390/v14061219, IF: 5,818
- Woźniak, A., Cybulski, P., Denes, L., Balka, Gy., and Stadejek, T., 2022. Detection of porcine respirovirus 1 (PRV1), influenza A virus (IAV), and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in nasal swabs and oral fluids of pigs with respiratory disease, *Viruses* 14, 148. <https://doi.org/10.3390/v14010148>, IF: 5,818
- Bóna, M., Kiss, I., Dénes, L., Szilasi, A., Mándoki, M., 2023. Tissue Tropism of H9N2 Low-Pathogenic Avian Influenza Virus in Broiler Chickens by Immunohistochemistry. *Animals* 13, 1052. doi:10.3390/ani13061052, IF: 3,231

- Horváth, D.G., Sós, E., Dénes, L., Dán, Á., Biksi, I., Balka, G., 2020. Az elefántok endotheliotropikus herpeszvírusa Irodalmi összefoglaló. *Magy. állatorvosok lapja* 142, 303–312., IF: 0,236
- Mándoki, M., Dénes, L., Dobra, P.F., Gál, J., 2019. Vírusos bélgyulladások egyes tyúkalakú madárfajokban Irodalmi áttekintés és saját vizsgálatok fácánokban. *Magy. állatorvosok lapja* 141, 523–531., IF: 0,236
- Montagnese, C., Barattini, P., Giusti, A., Balka, G., Bruno, U., Bossis, I., Gelasakis, A., Bonasso, M., Philmis, P., Dénes, L., Peransi, S., Rodrigo, M., Simón, S., Griol, A., Wozniakowski, G., Podgorska, K., Pugliese, C., Nannucci, L., D’Auria, S., Varriale, A., 2019. A Diagnostic Device for In-Situ Detection of Swine Viral Diseases: The SWINOSTICS Project. *Sensors* 19, 407. doi:10.3390/s19020407, IF: 3,275
- Gómez-Gómez, M., Sánchez, C., Peransi, S., Zurita, D., Bellieres, L., Recuero, S., Rodrigo, M., Simón, S., Camarca, A., Capo, A., Staiano, M., Varriale, A., D’Auria, S., Manassis, G., Gelasakis, A.I., Bossis, I., Balka, G., Dénes, L., Frant, M., Nannucci, L., Bonasso, M., Giusti, A., Griol, A., 2022. Photonic Label-Free Biosensors for Fast and Multiplex Detection of Swine Viral Diseases. *Sensors* 22, 708. doi:10.3390/s22030708, IF: 3,847
- Szilasi, A., Dénes, L., Balka, G., 2018. A macskák leukaemiavírusa (Feline Leukemia Virus, FeLV) Irodalmi összefoglaló. *Magy. állatorvosok lapja* 140, 457–472., IF: 0,236
- 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. Diagnostic Investig.* 32, 454–457. doi:10.1177/1040638720915449, IF: 1,647
- Szilasi, A., Dénes, L., Krikó, E., Heenemann, K., Ertl, R., Mándoki, M., Vahlenkamp, T.W., Balka, G., 2019. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary. *J. Feline Med. Surg. Open Reports* 5, 205511691989209. doi:10.1177/2055116919892094, IF: 0,52
- Szilasi, A., Koltai, Z., Dénes, L., Balka, G., Mándoki, M., 2022. In Situ Hybridization of Feline Leukemia Virus in a Case of Osteochondromatosis. *Vet. Sci.* 9, 59. doi:10.3390/vetsci9020059, IF: 2,18
- Szilasi, A., Dénes, L., Krikó, E., Murray, C., Mándoki, M., Balka, G., 2021. Prevalence of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in domestic cats in Ireland. *Acta Vet. Hung.* 68, 413–420. doi:10.1556/004.2020.00056, IF: 0,959

B. Előadások

- Dénes, L.: Swinostics: diagnostic tool in practice, 25th Graz Conference, Budapest – előadás, 2022.
- Dénes, L., Cságola, A, Schönhardt, K, Halas, M, Solymosi, N, Balka, Gy.: Magyarországi PPIV-1-törzsek azonosítása és filogenetikai elemzése, Akadémiai beszámoló, Budapest – előadás, 2021
- Dénes, L., Balka, Gy, Griol, A, Peransi, S, Rodrigo, M, Giusti, A, Bossis, I, Wozniakowski, G, D’Auria, S, Varriale, A.: A field-based diagnostic device for swine viral diseases: the SWINOSTICS H2020 project, Fialat Biotechnológusok Konferenciája, Debrecen – poszter, 2021
- Igriczi, B, Dénes, L., Balka, Gy.: Detection and prevalence of novel porcine parvoviruses (PPV2-7) in Hungarian pig herds, European Society for Veterinary Virology, 12th International congress for veterinary virology, Ghent – poszter, 2022
- Igriczi, B, Dénes, L., Albert, E, Biksi, I, Balka, Gy.: High prevalence of PCV3 in Hungarian pig herds, European Symposium of Porcine Health Management, Budapest – poszter, 2022
- Igriczi, B, Dénes, L., Balka, Gy.: A sertés-parainfluenzavírus 1 (PPIV-1) vizsgálata Magyarországon, Akadémiai beszámoló, Budapest – előadás, 2023
- Igriczi, B, Dénes, L., Albert, E, Biksi, I, Balka, Gy.: A hármastípusú sertés circovírus (PCV3) vizsgálata Magyarországon, Akadémiai beszámoló, Budapest – előadás, 2021
- Igriczi, B, Dénes, L., Schönhardt, K, Balka, Gy.: Circo- és parvovírusok fertőzésdinamikai és összehasonlító genetikai vizsgálata nagylétszámú sertésállományokban, Akadémiai beszámoló, Budapest – előadás, 2020
- Szilasi, A., Dénes, L., Balka, Gy.: Feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) prevalence in domestic cats from Hungary, 42nd World Small Animal Veterinary Association Congress and FECAVA 23rd Eurocongress - poszter, 2017.
- Szilasi, A., Dénes, L., Heenemann, K., Balka, Gy.: Phylogenetic characterization of feline retroviruses in Hungary, 43rd World Small Animal Veterinary Association Congress and 9th FASAVA Congress - poszter, 2018.
- Szilasi, A., Dénes, L., Heenemann, K., Balka, Gy.: Phylogenetic characterization of feline retroviruses in Hungary, 43rd World Small Animal Veterinary Association Congress and 9th FASAVA Congress – poszter, 2018.

- Szilasi, A., Dénes, L., Resende, T., Balka, Gy.: Macska-retrovírusok in situ hybridizációs vizsgálata, Akadémiai Beszámolók, Budapest – előadás, 2018.
- Szilasi, A., Dénes, L., Resende, T., Balka, Gy.: Macska-retrovírusok in situ hybridizációs vizsgálata, Akadémiai Beszámolók, Budapest – előadás, 2018.
- Dénes, L., Tömösközi, S, Tamás, L, Oszvald, M.: *In vivo* and *in vitro* examination of amaranth AMA1 albumin protein in a rice model, XXIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest – előadás, 2017
- Dénes, L, Tömösközi, S, Tamás, L, Oszvald, M.: *In vitro* examination of amaranth AMA1 albumin protein in a rice model, XX. Növénynevelési Tudományos Napok, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest – poszter, 2014

12 Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Balka Gyulának az elmúlt évek során nyújtott szakmai és baráti támogatását, türelmét, a hétféle kézirat- és előadásjavításokat és hogy közreműködése révén több nemzetközi pályázatban is részt vehettem. 2016-ban biomérnök végzettséggel jöttem a Patológiai Tanszékre egy nyugisnak vélt laboráns pozícióba és mielőtt Gyula szárnyai alatt el nem kezdtem dolgozni (és meg nem untam a monoton PCR-ezést) – korábbi rossz tapasztalataim okán –, meg se fordult a fejemben, hogy belevágjak egy PhD-képzésbe. Így minden túlzás nélkül leírhatom, nélküle már valószínűleg nem lennék a Tanszék munkatársa.

Köszönöm Pop Renátának, Schönhardt Kittinek és Igriczi Barbarának a mintaelőkészítésben nyújtott segítségüket, Pop Renátának külön köszönettel tartozom a metszetkészítés és immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezéséért.

Köszönöm dr. Szilasi Annának a boncteremben nyújtott segítségét, szakértelme nélkül valószínűleg 10-szer annyi időbe telt volna a szervtropizmus-vizsgálatokhoz szükséges minták begyűjtése.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Lukas Schwarznak a bécsi Állatorvostudományi Egyetemről, dr. Biksi Imrének, dr. Albert Ervinnek, dr. Albert Mihálynak és dr. Szeredi Leventének a klinikai és az archivált vizsgálati minták gyűjtéséért és rendelkezésemre bocsájtásáért.

Hálás vagyok dr. Inés Ruedas-Torres-nek a Cordóbai Egyetem Állatorvostudományi Karáról a szövettani vizsgálatokkal kapcsolatos szakmai tanácsaiért, továbbá az Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényszervezettani Tanszékéről dr. Knapp G. Dánielnek, aki megismertetett a filogenetikai vizsgálatok alapjaival.

Külön köszönetet szeretnék mondani a Patológiai Tanszék vezetőjének, dr. Mándoki Mírának, aki minden lehetséges módon támogatta szakmai előmeneteletem és vezetői stílusával rövid időn belül egy olyan munkakörnyezetet teremtett, ahova azóta is öröm megérkezni. Ugyanitt szeretnék köszönetet mondani a Patológiai Tanszék összes munkatársának, akik láthatatlanul ugyan, de tevékenységükkel segítették, hogy munkám a mindennapokban gördülékenyen folyjon.

Köszönöm kedves vőlegényemnek, Sági-Kazár Máténak az ELTE Növényélettani Tanszék PhD-hallgatójának, hogy mind szakmailag, mind barátilag támogatott ezen a rögzös úton.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, akik a nehéz pillanatokban is mellettem álltak.