

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Újgenerációs szekvenálás alkalmazása a hazai PRRSV
fertőzések genomi epidemiológiájában**

PhD értekezés

Jakab Szilvia

2024

Témavezetők:

.....

Dr. Bányai Krisztián

HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet

.....

Dr. Bálint Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

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

.....

Jakab Szilvia

Tartalomjegyzék

I Rövidítések jegyzéke	6
II Ábrák, táblázatok és mellékletek jegyzéke	7
2.1 Ábrák.....	7
2.2 Táblázatok.....	9
2.3 Mellékletek.....	10
III Összefoglalás.....	11
IV Summary.....	12
V Bevezetés	13
VI Irodalmi áttekintés	14
6.1 A PRRSV általános jellemzése	14
6.1.1 Rendszertan	14
6.1.2 Genomszerveződés és morfológia.....	14
6.1.3 A PRRS okozta megbetegedés és kórfejlődés.....	18
6.1.4 Átviteli utak, terjedés.....	21
6.2 A PRRSV változékonysága	23
6.2.1 Genetikai változatosság.....	23
6.2.2 Leszármazási vonalak és elterjedésük.....	24
6.2.3 Rekombináció.....	27
6.2.4 Kvázispecies jelleg	28
6.3 A PRRSV diagnosztikája	29
6.4 A PRRS járványtana és eliminációja Magyarországon.....	31
6.5 NGS technológia.....	33
6.5.1 Amplikon-mélyszekvenálás.....	34
VII Célkitűzések.....	36
VIII Anyagok és módszerek	37
8.1 Felhasznált minták eredete	37
8.2 Általános molekuláris módszerek.....	37
8.2.1 Virális nukleinsav-kivonás és kvantitatív RT-PCR.....	37
8.2.2 PCR termékek ellenőrzése és tisztítása.....	38
8.3 Ion Torrent szekvenálás.....	38
8.3.1 Minták eredete.....	38
8.3.2 ORF5 és ORF7 régió felerősítése.....	38

8.3.3	Hagyományos könyvtárkészítés	39
8.3.4	PCR-alapú könyvtárkészítés.....	40
8.3.5	Szekvenálás	41
8.4	Illumina szekvenálás.....	41
8.4.1	Hagyományos könyvtárkészítés	41
8.4.1.1	ORF2–7 régió felerősítése	41
8.4.1.1.1	Minták eredete.....	42
8.4.1.1.2	RT és konvencionális PCR	42
8.4.1.1.3	Könyvtárkészítés.....	43
8.4.2	Kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés	43
8.4.2.1	PCR-1	43
8.4.2.1.1	ORF7 régió felerősítése	44
8.4.2.1.2	Teljes genom felerősítése.....	45
8.4.2.2	PCR-2.....	47
8.4.3	Szekvenálás	48
8.5	Szekvenciaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek.....	48
8.5.1	Szekvenciaillesztés és annotálás.....	48
8.5.2	SNV azonosítás.....	49
8.5.3	Filogenetikai, nukleotid- és aminosavszekvencia-elemzések.....	50
8.5.4	Szekvencia-adatsorok	50
8.5.5	Epidemiológiai vizsgálatok.....	51
IX	Eredmények.....	52
9.1	A hazai PRRSV-törzsek elemzése.....	52
9.1.1	PRRSV-1-törzsek ORF5 alapú vizsgálata.....	52
9.1.2	PRRSV-2-törzsek ORF5-alapú vizsgálata	57
9.2	Hagyományos DNS-könyvtárkészítés és NGS alkalmazása a PRRSV-törzsek vizsgálataiban.....	60
9.2.1	PRRSV-2-járványkitörés vizsgálata	60
9.2.2	Kevert fertőzések azonosítása.....	66
9.3	PCR-alapú könyvtárkészítő módszerek kiértékelése	67
9.3.1	ORF5 és ORF7 elemzése Ion Torrent rendszeren.....	67
9.3.2	ORF7 elemzése Illumina rendszeren.....	67

9.3.3 Teljes genom elemzése Illumina rendszeren	70
9.4 Amplikon-mélyszekvenálás módszerének beépítése PRRSV-törzsek egyes vizsgálataiba	73
9.4.1 Kevert fertőzések feltárása	73
9.4.2 Víruspopuláció genetikai diverzitása	74
X Megbeszélés	79
10.1 PRRSV molekuláris epidemiológiai és összehasonlító genetikai vizsgálata	79
10.1.1 PRRSV-1-törzsek hazai elterjedése és genetikai változatossága	79
10.1.1.1 Leszármazási kapcsolatok és térbeli eloszlás	79
10.1.1.2 ORF5 nukleotid- és aminosavszekvencia-alapú elemzései	81
10.1.2 PRRSV-2-törzsek hazai elterjedése és genetikai változatossága	85
10.1.2.1 Leszármazási kapcsolatok és térbeli eloszlás	85
10.1.2.2 ORF5 nukleotid- és aminosavszekvencia-alapú elemzései	87
10.2 Hagyományos DNS-könyvtárkészítés és NGS alkalmazása a PRRSV-törzsek vizsgálataiban	88
10.2.1 ORF2–7 nukleotid- és aminosavszekvencia-alapú elemzései	88
10.2.2 Kevert fertőzések azonosítása	90
10.3 Illumina-kompatibilis kétlépes PCR-alapú könyvtárkészítés	90
10.3.1 Módszer kiértékelése	90
10.3.2 PRRSV-1 ORF7 nukleotidszekvencia-alapú elemzései	93
10.3.3 PRRSV-1 Porcilis PRRS vakcina genetikai stabilitása és változatossága	95
XI Új tudományos eredmények	98
XII Irodalomjegyzék	99
XIII Közlemények listája	117
13.1 A doktori kutatás eredményeiből született, lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk	117
13.2 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk	117
13.3 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó könyvfejezet	118
13.4 Konferencia közlemények	118
XIV Mellékletek	119
XV Köszönetnyilvánítás	131

I Rövidítések jegyzéke

as	aminosav
bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS (complementary DNA)
Ct	detektálás ciklus-küszöbérték (cycle threshold)
DMSO	dimetil-szulfoxid
DMV	perinukleáris kettős membránú vezikulák (double-membrane vesicle)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotid-trifoszfát
ER	endoplazmatikus retikulum
F	forward primer
kbp	kilobázispár
m/V%	vegyesszázalék, 100 cm ³ oldatban lévő oldott anyag tömege gramm mértékegységre megadva
MLV	élő attenuált vírus vakcina (modified live virus)
NÉBIH ÁDI	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
NGS	újgenerációs szekvenálási technológia (next generation sequencing)
NSP	nem-szerkezeti fehérje (non-structural protein)
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PAM	alveoláris makrofágok (porcine alveolar macrophage)
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PRRS	sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (porcine reproductive and respiratory syndrome)
PRRSV	sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa (porcine reproductive and respiratory syndrome virus)
R	reverz primer
RdRp	RNS-függő RNS polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)
RFS	leolvasásikeret-eltolódás (ribosomal frameshift)
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
Sn	szialoadhezin
sg mRNA	szubgenomiális messenger RNS
SNV	egy pontos nukleotid variáns (single nucleotide variant)
ST	szubtípus
TBE	trisz-borát-etilén-diamintetraecetsav puffer (Tris-borate-EDTA)
TRS	transzkripció-szabályzó szekvencia (transcription-regulating sequence)
U	egység (unit)
WGS	teljes genom-szekvenálás (whole genome sequencing)

II Ábrák, táblázatok és mellékletek jegyzéke

2.1 Ábrák

- 1. ábra** A PRRSV virionjának és genomszerveződésének sematikus felépítése 16.o.
- 2. ábra** Az Illumina rendszerrel kompatibilis, kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítő módszer sematikus ábrázolása. 35.o.
- 3. ábra** Az ORF7 fúziós primerek PRRSV-specifikus tapadási helyeinek szekvencialogója a PRRSV1 (n=90) és PRRSV-2 (n=466) alkotta többszörös szekvenciaillesztéseket tekintetében. 45.o.
- 4. ábra** A PRRSV1 ORF5 index szekvenciák (n=301) és egyéb az 1-es szubtípusba tartozó referencia szekvenciák (n=99) filogenetikai elemzése. 53.o.
- 5. ábra** A PRRSV-1 ORF5 index szekvenciák (n=301) aminosavszekvencia-illesztésének grafikus ábrázolása. 55.o.
- 6. ábra** A magyarországi PRRSV-1 GP5 génre (n=301) ható szignifikáns pozitív és negatív szelekciós nyomás. 56.o.
- 7. ábra** A PRRSV-2 ORF5 szekvenciák filogenetikai elemzése Shi és munkatársai klasszifikációs rendszere szerint. 58.o.
- 8. ábra** Az egyedi aminosav-szekvenciával rendelkező hazai PRRSV-2-törzsek (n=32), az L1 (IAF-exp91) és L5 (VR-2332 és Ingelvac MLV) referenciatörzsek részleges GP5 (as31–174) aminosavszekvencia-illesztése. 59.o.
- 9. ábra** A PRRSV-2 ORF2–7 nukleotidszekvenciák filogenetikai elemzése. 62.o.
- 10. ábra** A hazai PRRSV-2 Ingelvac MLV-vakcinaleszármazott törzsek ORF2–7 régiójának SNV-elemzése és összehasonlítása az Ingelvac MLV vakcina- és a VR-2332 vad típusú törzsek között megfigyelt eltérésekkel. 64.o.
- 11. ábra** A sikeresen felszaporított ORF2–7 és a két referenciatörzs konkatenált aminosavszekvenciái. 65.o.
- 12. ábra** Az általunk tervezett PCR-1 alatt alkalmazott ORF7 fúziós primerek specificitásának vizsgálata. 68.o.
- 13. ábra** A teljes genomot lefedő, multiplex PCR primerekkel egyedileg megvalósult PCR-ek gél-elektroforetikus képe. 70.o.

- 14. ábra** A Porcilis-vakcinaminták teljes genom hosszán elért szekvenálási mélység alakulása a három primerpool esetében (poolAv1, v2 és v3), viszonyítási pontként a 34 db egyedi PCR termék egyenlő arányban összekevert (pool1-34) kihozatala van feltüntetve. 71.o.
- 15. ábra** Az Unistrain-vakcinaminta teljes genom hosszán elért szekvenálási mélység alakulása a poolAv1 esetében. 73.o.
- 16. ábra** A savópoolmintákból az amplikon-mélyszekvenálás segítségével meghatározott ORF7 szekvenciák, valamint a Porcilis-vakcinatörzs páronkénti nt azonosságának összehasonlítása. 74.o.
- 17. ábra** Az azonosított SNV-k gyakorisága és eloszlása az ORF7 régión. 75.o.
- 18. ábra** A Porcilis PRRS-vakcinákban előforduló háromféle deléciós variáns érintett régiójának nukleotidszekvencia-illesztése. 76.o.
- 19. ábra** A három vizsgált Porcilis-vakcinamintában (poolAv3) azonosított SNV-k elhelyezkedése a teljes genom területén, illetve a megfigyelt átlagos gyakoriságuk. 78.o.

2.2 Táblázatok

- 1. táblázat** Az Ion Torrent szekvenálást és a hagyományos könyvtárkészítő módszert magába foglaló vizsgálatokhoz készült ORF5 és ORF7 cél régiók felszaporításához alkalmazott primerek szekvenciái. 39.o.
- 2. táblázat** Az Ion Torrent készüléken zajló, PCR-alapú könyvtárkészítő módszert magába foglaló vizsgálatokhoz készült ORF5 és ORF7 cél régiók felszaporításához alkalmazott fúziós primerek szekvenciái. 41.o.
- 3. táblázat** A PRRSV-2 ORF2–7 régiójának felszaporításához alkalmazott primerek szekvenciái. 42.o.
- 4. táblázat** A kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés PCR-1 lépésében alkalmazott fúziós primerek általános felépítése és szekvenciái. 43.o.
- 5. táblázat** Az ORF7 vizsgálatához tervezett fúziós primerek szekvenciái és tapadási helyei a két PRRSV prototípustörzshöz viszonyítva. 45.o.
- 6. táblázat** A kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés PCR-2 lépésében alkalmazott vonalkódoló primerek szekvenciái. 47.o.
- 7. táblázat** A hazánkban fellelt PRRSV-1-kládok tulajdonságai. 54.o.
- 8. táblázat** A detektált feltételezett N-glikozilációs pozíciók jelenléte és az általuk alkotott glikozilációs mintázatok előfordulása a hazai PRRSV-2 vizsgált szekvenciákban. 60.o.
- 9. táblázat** A sikeresen felszaporított ORF2–7, a VR-2332 vad típusú törzs és az Ingelvac MLV-vakcinatörzs között megfigyelt nt azonosság értékei (%). 62.o.
- 10. táblázat** A sikeresen felszaporított ORF2–7 és az Ingelvac MLV-vakcinatörzs, illetve a VR-2332 vad típusú törzsek között megfigyelt aminosavazonosság-értékei (min–max%). 63.o.
- 11. táblázat** Az ORF5 és ORF7 régiók hagyományos DNS-könyvtárkészítés és Ion Torrent készülék segítségével zajló szekvenálásának eredményei a kevert minták esetében. 66.o.
- 12. táblázat** A sertés telepekről gyűjtött savó minták adatait és az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás eredményeit összefoglaló táblázat. 69.o.
- 13. táblázat** Az amplikononkénti szekvenálási mélység összefoglalása mindhárom Porcilis-vakcinamintára, a poolAv1 és poolAv3 esetében. 72.o.

2.3 Mellékletek

- | | | |
|----------------------|--|--------|
| 1. melléklet | A Porcilis- és Unistrain-vakcinatörzsek és azok leszármazottjaira specifikus multiplex PCR-rendszerben használt primerek tulajdonságai. | 119.o. |
| 2. melléklet | Az Illumina-kompatibilis kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítési módszer második PCR körében alkalmazott összes vonalkódoló primer szekvenciája (indexek: Nextera XT Index Kit v2 Set C). | 121.o. |
| 3. melléklet | A hazánkban fellelt PRRSV-1-kládokhoz tartozó index szekvenciák térbeli eloszlása. | 122.o. |
| 4. melléklet | A magyarországi PRRSV-1-törzsek GP5 génjében a FEL, SLAC és FUBAR algoritmusokkal megállapított szignifikáns pozitív szelekció alatt álló egyedi as pozíciók. | 123.o. |
| 5. melléklet | A Magyarországon előforduló PRRSV-2-fertőzésekkel kapcsolatos epidemiológiai és klinikai adatok a 2005–2020-as időszakból. | 124.o. |
| 6. melléklet | PRRSV-2-törzsekkel fertőződött magyarországi sertéstelepek tér- (A) és időbeli (B) eloszlása. | 126.o. |
| 7. melléklet | Az Ingelvac PRRS MLV (PRRSV-2) 2020–2021-es magyarországi járványkitörésekben érintett sertéstelepek adatai. | 127.o. |
| 8. melléklet | A 2020–2021-ben zajló járványokban résztvevő PRRSV-2 Ingelvac MLV-vakcinatörzs lehetséges fertőzési útjainak sematikus ábrázolása. | 128.o. |
| 9. melléklet | A spike-in mintákkal végzett ORF7 mélyszekvenálás adatai. | 129.o. |
| 10. melléklet | A 2208_19-es minta ORF7 amplikon-mélyszekvenálásából származó readok referenciához történő illesztésének (contig fájl) képe a Geneious Prime szoftverben. | 130.o. |

III Összefoglalás

A *Nidovirales* renden belül az *Arteriviridae* családba és a *Variarterivirinae* alcsaládba tartozó, a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának (PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome) vírusai (PRRSV-1 és PRRSV-2) világszerte elterjedtek.

Kutatómunkánk során arra törekedtünk, hogy bővítsük a PRRSV molekuláris genetikai vizsgálatait támogató szekvenálási módszereket. Ennek érdekében sikeresen adaptáltuk az Illumina készülékekkel kompatibilis, PRRSV-re specifikus kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítési eljárást. Az így készült DNS-könyvtárak lehetővé teszik az újgenerációs szekvenálási technológiára (NGS, next generation sequencing) épülő ampikon-mélyszekvenálás kivitelezését. Kétféle irányvonal mentén alakítottunk ki különböző könyvtárkészítő módszereket. Az egyik mind a PRRSV-1, mind a PRRSV-2 ORF7 régiójára specifikus, míg a másik alkalmas egyes PRRSV-1 vakcinatörzsek (Porcilis® és Unistrain® PRRS) és leszármazottaik teljes genomjának felszaporítására.

Az ORF7 régiót célzó ampikon-mélyszekvenálással betekintést nyertünk a magyarországi PRRSV-1 törzsek víruspopulációjának heterogén összetételébe, valamint az ezen a régió ható mikroevolúciós mechanizmusokba. Bizonyítottuk, hogy a módszerrel egyaránt lehetséges a vakcina- és vad típusú törzsek elkülönítése, valamint több vírusvariáns egyidejű kimutatása és genetikai elemzése.

A multiplex PCR-re épülő, teljes genom ampikon-mélyszekvenálással elvégeztük három Porcilis PRRS vakcinában előforduló vírustörzs genetikai vizsgálatát. A mintákból kimutattunk már ismert delécióval rendelkező variánsokat, illetve meghatároztuk a vakcinákat alkotó kvázispecies változatosságát. Összehasonlító genomikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy ez a vakcinatörzs genetikailag stabil.

Az eredményeink megerősítették, hogy a kétlépéses PCR-alapú módszerrel készült DNS-könyvtárak újgenerációs szekvenálása a hagyományos szekvenálási technológiákhoz képest előnyökkel rendelkezik, mivel a PRRSV diagnosztikai, molekuláris epidemiológiai vagy genetikai diverzitásának vizsgálatához gyorsabb, költséghatékonyabb és érzékenyebb megoldást nyújthat klinikai minták esetében.

Mindezek mellett a 21. század kezdete óta összegyűlt ORF5 szekvenciaadatok segítségével feltártuk a hazai PRRSV-1- és PRRSV-2-törzsek eredetét és elterjedésüket, illetve az adatok elemzésével információt nyertünk mindkét PRRSV faj törzseinek genetikai változatosságáról. Egy előzetes tanulmányunk során bevontuk az NGS-technikát (hagyományos DNS-könyvtárak segítségével) a PRRS-mentesítés keretein belül zajló rutin diagnosztikába és azonosítottunk kevert fertőzéseket a vizsgált sertéstelepeken.

IV Summary

The two viral pathogens of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV-1 and PRRSV-2) are disseminated worldwide. The PRRSVs belong to the subfamily *Variarterivirinae* within the family *Arteriviridae* of the order *Nidovirales*.

Our main objective was to expand the available sequencing methods in order to support the molecular genetic studies of PRRSV. In this study, we successfully evaluated a PRRSV-specific amplicon library preparation method compatible with Illumina short-read sequencing based on a two-step PCR assay. Two different library preparation protocols have been developed. One of the approaches targets the ORF7 region of both PRRSV species, while the other is specific to the whole genome of certain PRRSV-1 vaccine strains (Porcilis® and Unistrain® PRRS) and their descendants.

The ORF7 targeted amplicon deep sequencing provided insights into the heterogeneous composition of the PRRSV-1 viral population circulating in Hungary and the microevolutionary mechanisms acting on this region. In addition, we have demonstrated that this method is suitable to discriminate between vaccine- and wild-type strains, as well as to detect multiple strains simultaneously and promote the genetic characterization of PRRSVs.

We performed deep sequencing based on tiling multiplex PCR to compare the vaccine strain components of three different Porcilis PRRS vaccine batches. Our results showed the occurrence of well-known deletion variants and high genetic complexity. The genetic stability of Porcilis vaccine strains was evaluated by comparative genome analysis of the investigated strains and additional genbank records.

We confirmed that PRRSV-specific amplicon deep sequencing possesses remarkable advantage over traditional sequencing technologies since it could provide a fast, inexpensive and sensitive tool for diagnostics, molecular epidemiological or genetic diversity testing of PRRSVs from clinical samples.

Furthermore, we determined the origin and distribution of the Hungarian PRRSV-1 and PRRSV-2 strains based on the ORF5 sequence data collected since the beginning of the 21st century. In addition, analysis of ORF5 sequence data provided relevant information on the genetic diversity of PRRSV strains in Hungary. In a preliminary study, we incorporated the NGS technology (conventional DNA libraries) into the routine diagnostic sequencing as part of the PRRS eradication and identified mixed infections in some of the investigated pig farms.

V Bevezetés

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának (PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome) kórokozóját először az USA-ban azonosították az 1980-as évek végén, míg Európában az 1990-es években mutatták ki (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991). Megjelenésétől egészen napjainkig a PRRS világszerte jelentős gazdasági károkat okoz a sertéstartók számára. A megbetegedés súlyos légzőszervi tünetek mellett csökkent testtömeggyarapodással jár a fiatal egyedekben, valamint kocákban magzatkárosodással társuló reprodukciós zavarok is jelentkezhetnek. Elhúzódó fertőzés esetén immunszuppresszió léphet fel, ami másodlagos fertőzések kialakulásához vezethet.

A PRRS kórképet a *Nidovirales* rendbe tartozó, pozitív irányultságú, egyszálú RNS genommal (+ssRNS) rendelkező vírus okozza. Jelenleg két vírusfajt különböztetünk meg a PRRS kórokozójaként: *Betaarterivirus suid 1* és *Betaarterivirus suid 2*, közismert nevükön a PRRSV-1 és PRRSV-2. A PRRSV magas mutációs rátája és a különböző vírustörzsek között zajló rekombináció nagymértékű genetikai változékonyságot eredményez (Murtaugh et al., 2010). A betegség ellen irányuló védekezés minden ország számára kihívás, mivel a keringő PRRSV-törzsek eltérő virulenciája és antigénszerkezete egyaránt megnehezíti a vakcinák, illetve a diagnosztikai módszerek alkalmazását és fejlesztését.

A sertésállományokban előforduló vírustörzsek molekuláris módszerekkel történő jellemzése és leszármazási kapcsolatainak felderítése, azaz a molekuláris epidemiológia támogatja a PRRS elleni védekezést (Murtaugh, 2012; Perez et al., 2015). Ezeknek a vizsgálatoknak az elvégzéséhez a legelterjedtebb módszerek a PCR és a DNS bázissorrendjének meghatározása Sanger-féle szekvenálással. Napjainkban az újgenerációs szekvenálási technikák (NGS, next generation sequencing) rohamos fejlődése ahhoz vezetett, hogy állatorvosi vonatkozásban egyre gyakrabban alkalmazzák egyes vírustörzsek célzott genomi régióinak vagy teljes genomszekvenciájának megismerésére (Belák et al., 2013). Az NGS végrehajtásához nélkülözhetetlen az úgynevezett DNS-könyvtárak elkészítése, amely leginkább költség- és időigényes, nem minden ország számára hozzáférhető, kereskedelmi forgalomban kapható kitekkel szokott zajlani. Az egyik piacvezető, NGS-technológiát biztosító vállalat az Illumina (San Diego, USA), mely készülékeihez már több alternatív könyvtárkészítő módszer is hozzáférhető. Ezen módszerek csak az alap molekuláris technikák kivitelezéséhez szükséges eszközparkot követelik meg, idő- és költséghatékonyak, ezáltal számos kutató- és diagnosztikai labor munkájába könnyűszerrel beépíthetőek.

Mindezekkel összefüggésben kutatómunkák fő célja volt egy újszerű, kétlépéses PCR-rendszerre épülő DNS könyvtárkészítés adaptálása, majd alkalmazása a PRRSV genetikai vizsgálataihoz.

VI Irodalmi áttekintés

6.1 A PRRSV általános jellemzése

6.1.1 Rendszertan

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome) a sertéstartás egyik legnagyobb gazdasági jelentőséggel bíró megbetegedése. A betegséget okozó vírust (PRRSV) a *Nidovirales* rendben belül az *Arteriviridae* családba és a *Variarterivirinae* alcsaládba soroljuk. A *Nidovirales* rend tagjainak közös ismertetőjegye a „beágyazott (nested)” elrendeződésű szubgenomiális messenger RNS-en (sg mRNS) alapuló replikációs stratégia. A „beágyazott” elnevezés abból ered, hogy minden sg mRNS 5' vége kiegészül az RNS genom 5' végén található leader szekvenciával, illetve mindnél megtalálható a 3' végen a poly(A) farok (Meulenberg, 2000).

2018-ban a *Nidovirales* rend taxonómiáját és nevezéktanát módosították, és jelenleg két külön fajként tartják számon a PRRS kórokozóját: *Betaarterivirus suid 1* (PRRSV-1) és *Betaarterivirus suid 2* (PRRSV-2) (<https://ictv.global/report/chapter/arteriviridae/arteriviridae>, 2023.09.20.). A két PRRSV fajhoz tartozó vírustörzsek közötti nukleotid (nt) azonosság körülbelül 60% (Allende et al., 1999).

6.1.2 Genomszerveződés és morfológia

A sima felületű virion kerek vagy tojásdad alakú, az átmérője átlagosan 54 nanométer (nm), de 50–74 nm között változhat; a külső felszínét borító lipid kettősréteg jól elkülönül, vastagsága 4,5 nm, továbbá található benne egy „core” régió amely 39 nm átmérőjű és a buroktól 2–3 nm távolságra helyezkedik el (Dokland, 2010) (**1. ábra, A**).

A PRRSV szimpla szálú, pozitív irányultságú, kb. 15 kilobázispár (kbp) hosszú, 5' cap és 3' poly(A) struktúrákkal ellátott RNS-ből álló genommal rendelkezik. Típusát tekintve policisztronos, vagyis az 5' és 3' végeken elhelyezkedő nem-átíró régiók által közrefogott genomszakasz összesen tíz nyitott leolvasási keretet (ORF, open reading frame) hordoz: a nem-szerkezeti fehérjéket kódoló két nagy (ORF1a és ORF1b), valamint a szerkezeti fehérjéket kódoló nyolc kisebb (ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 és ORF7) ORF-et. A pozitív szálú RNS-genomban található bizonyos RNS-motívumok, vagyis a transzkripció-szabályzó szekvenciák (TRS, transcription-regulating sequence) szabályozzák a negatív szálú RNS-képzést, ezek minden egyes szerkezeti fehérjét kódoló ORF előtt, illetve az RNS-genom 5' végi leader szekvencia 3' végén helyezkednek el (**1. ábra, B**) (Pasternak et al., 2001).

Az ORF1a és ORF1b régiók a genom közel kétharmad részét teszik ki. A virion sejtbe jutását követően ezekről az ORF régiókról két poliprotein (pp1a és pp1ab) íródik át, amelyhez egy leolvasásikeret-eltolódás (RFS, ribosomal frameshift) szükséges a két ORF határán. Ezt

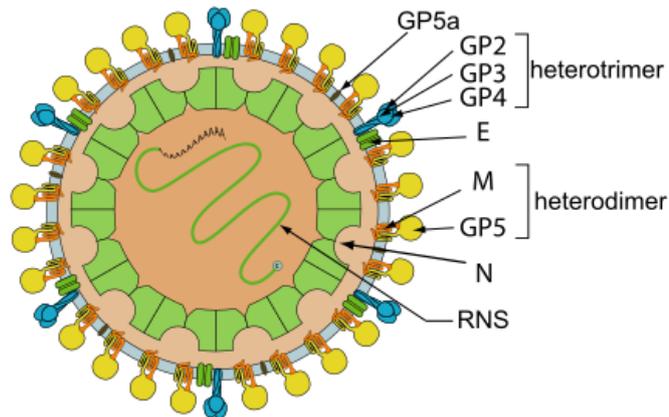
követően a virális proteázok segítségével a két poliproteinről legalább 14 nem-szerkezeti fehérje (NSP, non-structural protein) keletkezik. A folyamat kezdetén elsőként autoproteolízissel lehasad az NSP1 α/β és az NSP2, amik kihatározzák az NSP4 fő proteázot. Ezután a pp1a további feldarabolásáért (NSP3, NSP5–6, NSP7 α/β és NSP8), illetve a pp1ab poliprotein feldolgozásáért (NSP9–12) egyaránt az NSP4 felel (Fang és Snijder, 2010). Egyes kutatások bizonyították, hogy az NSP2-t kódoló régió területén szintén előfordul egy másik egyedi kereteltolódás, aminek következtében a korábban felsorolt nem-szerkezeti fehérjéken kívül keletkezik még két csonka NSP2 variáns, az NSP2TF és NSP2N (Fang et al., 2012; Yanhua Li et al., 2014).

Az említett nem-szerkezeti fehérjék egy részének már viszonylag régóta ismert a fő funkciója: az NSP1 α/β , az NSP2 és az NSP4 mint proteázok; az NSP9 mint RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase); az NSP10 mint helikáz; és az NSP11 mint endoribonukleáz vesznek részt a vírus szaporodási ciklusában az egyéb, vírusreplikációt szabályozó és immunmoduláns hatásuk mellett (Dokland, 2010; Fang és Snijder, 2010; H. Zhang et al., 2022). Az NSP3 és NSP5 a fertőzött sejt endoplazmatikus retikulumában (ER) mint transzmembrán fehérjék találhatóak meg. Újabb kutatások alapján a fertőzött sejtben az ER-ből eredő autofagoszómák felhalmozódását segítik elő azáltal, hogy gátolják azok lizoszómával történő fúzióját, azaz hiányos autofágiát idéznek elő (Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2023). Általánosságban az autofágia folyamata, valamint az NSP3 és NSP5 jelenléte hozzájárul a vírus replikációjának színtereként szolgáló perinukleáris kettős membránú vezikulák (DMV, double-membrane vesicule) létrejöttéhez, valamint fokozza a PRRSV replikációs képességét (Chen et al., 2012; Posthuma et al., 2008; X. Zhang et al., 2022). A viszonylag kevésbé kutatott, sokáig ismeretlen funkciójú nem-szerkezeti fehérjék közül az NSP7-ről az utóbbi évtizedben megállapították, hogy fontos szerepet játszik a vírus replikációjában, az aktív vírus partikulák létrejöttében és bizonyították, hogy gátolja a gazdaszervezet immunválaszát (Li et al., 2023). Az NSP6 lehetséges funkciójáról egyetlen, nemrég megjelent közleményben olvashatunk, mely szerint mérsékeli a gazdaszervezet gyulladáshoz vezető reakcióit (Gu et al., 2022). Az NSP8-ről a közelmúltban azt találták, hogy az NSP9, vagyis az RdRp N-terminális szakaszának feleltethető meg, azonban pontos szerepét mind a mai napig nem sikerült meghatározni (Liu et al., 2018). Összességében az NSP-k egyéb, gazdaszervezt eredetű faktorokkal együtt alkotják a vírus replikációs és transzkripciós komplexét, melyet magukba foglalnak a DMV-k (Pedersen et al., 1999; Wolff et al., 2020).

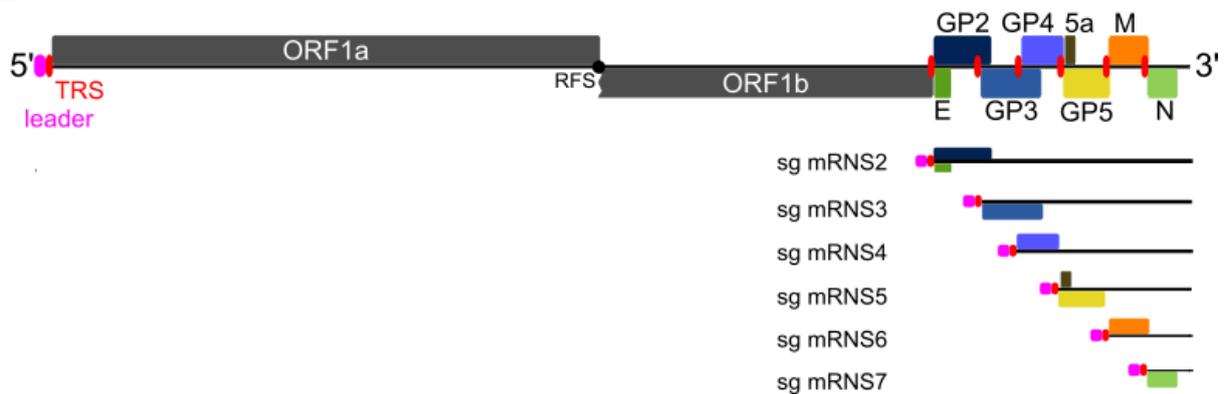
A szerkezeti fehérjék átírása nem folytonos, az őket kódoló ORF-ekről (ORF2–7) összesen hat különböző méretű, negatív szálú „beágyazott” sg mRNS segítségével valósul meg (**1. ábra, B**) (Snijder és Meulenberg, 1998). Az ORF2–5 régió a glikozilált (GP2–5), míg az ORF2b és az ORF6 a nem-glikozilált burokfehérjéket (E és M), az ORF7 a nukleokapszid-fehérjét (N) kódolja, továbbá az ORF7-tel átfedésben, az ORF7a egy további

7ap nevezetű fehérjét (Olasz et al., 2016). Mennyiségüket tekintve a GP5 és M diszulfid-hidakkal összekötött heterodimer formája található meg legnagyobb mennyiségben a burokban, míg a másik fő szerkezeti fehérje a „core” régiót alkotó nukleokapszid; a GP2, GP3 és GP4 alkotta heterotrimer, ami a PRRSV-1 esetében még kiegészül az E fehérjével, kisebb mennyiségben fordul elő (Veit et al., 2022).

A



B



1. ábra A PRRSV virionjának (A) és genomszerveződésének (B) sematikus felépítése.

A A burokban található szerkezeti fehérjék közül a GP2, GP3 és GP4 heterotrimer, míg a GP5 és M heterodimer formában fordul elő. Az N fehérje alkotja a nukleokapszidot, amelyen belül az RNS genom helyezkedik el.

B Az ábrán jelöltük a genom 5' végén található leader szekvenciát, valamint az ORF-ek előtt elhelyezkedő transzkripció-szabályzó szekvenciákat (TRS). Az ORF1a és ORF1b határán lévő leolvasásikeret-eltolódás (RFS) szükséges a pp1a és pp1ab átíródásához. A szerkezeti fehérjék átíródása hat „beágyazott” szubgenomiális mRNS-sel (sg mRNS2–7) zajlik. Az adott szerkezeti fehérjéket jelölő téglalapok színe megegyezik a virion szerkezeti ábrájával. (A kép forrása: <https://viralzone.expasy.org/>)

A PRRSV szerkezeti fehérjei közül a GP5-öt az egyik legváltozékonnyabbnak tartják számon és az M szekvenciáját pedig a legkonzervatívabbnak, pedig funkciójukban szorosan kapcsolódnak: mindkét fehérje fontos szerepet játszik a vírus fertőzőképességének kialakításában. A GP5/M heterodimer, mint adszorpciós fehérjekomplex, kiemelt szerepet játszik a vírus gazdasejthez történő kapcsolódásában. A PRRSV fertőzés szempontjából eddig

összesen két elengedhetetlen sejt felszíni receptort azonosítottak: a nem makrofág-specifikus heparán-szulfát receptort és a makrofág-specifikus szialoadhezin (Sn vagy Siglec-1) receptort. A heparán-szulfát az M fehérjével kialakított alacsony affinitású kötődésen keresztül elősegíti a virionok tapadását a célsejt felszínéhez, majd ezen kötődés hatására létrejön és egyben fokozódik a komplexként jelenlévő GP5 felszínén található szialosav és a sejt felszíni Sn receptor interakciója (Delputte et al., 2005, 2002; Shi et al., 2015; Van Breedam et al., 2010). Az Sn-nel történő összekapcsolódás felel a gazdasejtbe történő bejutás (penetráció) elindulásáért, azonban az Sn pontos szerepéről a PRRSV patogenezisében számos ellentmondó közlemény született az évek során (Prather et al., 2013; Su et al., 2021; Vanderheijden et al., 2003). A gazdasejtbe jutás folyamata klatrin-mediált endocitózissal vagy alternatív útvonalon, makropinocitózissal zajlik (Nauwynck et al., 1999; Wei et al., 2020). Az újabb kutatások szerint a gazdasejtbe történő megfelelő tapadáshoz és az endocitózishoz szükséges a GP4 kapcsolódása a 70 kilodaltonos hőszokkfehérjével, továbbá kimutatták, hogy a GP5-nek a gazdasejtbe való tapadáson kívül, a MYH9 miozin molekulához kapcsolódva szintén szerepe van az internalizációban (L. Wang et al., 2022; Xue et al., 2019; Ye et al., 2022). A GP2 és GP4 közvetlenül a CD163 receptorhoz kötődik és teszi lehetővé a PRRSV számára a gazdasejtbe történő bejutást és a dekapszidáció folyamatának megvalósulását (Das et al., 2010; Shi et al., 2015). Az eddigi kutatások szerint a CD163 receptor SRCR5 régióját kódoló genetikai állomány kiütésével a sertések teljes mértékben rezisztensek lesznek mind a PRRSV-1, mind a PRRSV-2 fertőzéssel szemben, ami bizonyítja, hogy a fertőzés létrejöttéhez egyedül a CD163 egyik régiója nélkülözhetetlen (Burkard et al., 2018; Guo et al., 2019; Prather et al., 2017; Yang et al., 2018). A PRRSV-1-ben előforduló E fehérjéről már régen bizonyosságot nyert, hogy a vírus-sejt összekapcsolódás, majd a víruspartikulák endoszómába történő szállítása után az ioncsatorna-szerű aktivitásának köszönhetően pórusokat képez a burokbán. Ezután az endoszómában található alacsony pH mediálja a virális nukleinsav nukleokapszidból történő kiszabadítását, vagyis a PRRSV-partikulák dekapszidációjához savas környezet szükséges (Kreutz és Ackermann, 1996; Lee és Yoo, 2006). Habár egy kisebb fehérjéről van szó, az évek során számos kutatás tárgya volt: sok immunmoduláns és a vírus replikációját segítő szereppel hozták kapcsolatba (Chen et al., 2023). A fertőzött sejtekben az N fehérje található meg legnagyobb mennyiségben, mely a virionban a virális RNS-hez kapcsolódva alkotja a nukleokapszidot (Dea et al., 2000; Dokland, 2010). A fertőzési folyamat során a vimentinhez és más sejt vázalkotó elemekhez kapcsolódva mediálja a vírus transzportját a citoszolban, valamint részt vesz az összeszerelés folyamatában (Kim et al., 2006). Emellett bizonyították az N fehérje többértékű immunmoduláns hatását *in vitro*, illetve kimutatták, hogy részt vehet a fertőzött sejtek transzkripció és vírusreplikációs folyamatainak szabályozásában, valamint a patogenitás mértékére is

befolyással lehet (Gong et al., 2023; Lee et al., 2006; Liu et al., 2016; Sagong és Lee, 2011; Song et al., 2009; Wongyanin et al., 2012; Zhao et al., 2019).

6.1.3 A PRRS okozta megbetegedés és kórfejlődés

Az *Arteriviridae* család tagjaira jellemző a korlátozott sejtotropizmus. A PRRSV célsejtjei elsősorban a légzőszervi és nyirokszövetekben előforduló sertés makrofág- és monocitaeredetű sejtek, például a sertés alveoláris makrofágok (PAM, porcine alveolar macrophage), ugyanakkor kimutatták már, hogy herecsírsejteket és tüdőhámsejteket is képes fertőzni (Duan et al., 1997; Halbur et al., 1995; Sur et al., 1997). Eddig számos különböző receptort azonosítottak, amelyek potenciálisan részt vesznek a fertőzés közvetítésében, továbbá egyéb alternatív fertőzési útvonalakat is leírtak már (Ye et al., 2022). A magas patogenitású PRRSV-törzsek általában kiterjedtebb szöveti tropizmust mutatnak, azonban viszonylag kevés, a megváltozott sejtotropizmussal összefüggésbe hozható receptort sikerült eddig meghatározni (Ma et al., 2022; Ruedas-Torres et al., 2021). Sokáig úgy gondolták, hogy a sertés Sn (más néven Siglec-1) elengedhetetlen a fertőzéshez, azonban több tanulmány is született arra vonatkozóan, hogy ennek a receptornak a hiányában is sikeres lehet a fertőzés *in vitro* és *in vivo* egyaránt (Prather et al., 2013; Welch és Calvert, 2010). Például, egyes magasabb patogenitású PRRSV-törzsek esetében bizonyították, hogy az alacsonyabb patogenitású törzsekhez képest az ornyálkahártya felsőbb rétegében található sertés Sn receptort nem kifejező makrofágokhoz nagyobb affinitással kötődnek, valamint fokozott replikációt mutatnak (Frydas et al., 2015, 2013; Oh et al., 2020). *In vitro* kísérletekben a szintén a szialoadhezin receptorcsaládba tartozó Siglec-10 receptort alternatív receptorként azonosították, amely ugyanakkor eltérő mértékben segíti a két PRRSV faj fertőzőképességét (Xie et al., 2017). Telepi körülmények között bizonyos PRRSV-2-törzsek emésztőrendszeri tüneteket okozhatnak, és bár egyelőre nem ismert ennek a megváltozott szervtropizmusnak a pontos mechanizmusa, állatkísérletekkel sikerült igazolni a vírus szaporodási képességét a bélrendszerben, valamint kóros elváltozásokat is megfigyeltek az emésztőrendszerben (Ma et al., 2022; Shang et al., 2013).

A fertőzés során a PRRSV először a PAM sejtekben replikálódik, majd később a vér- és nyirokrendszer közvetítésével több másik szervbe eljutva fokozza az apoptózis és nekrozis okozta szövetkárosodást (Fan, 2019; Karniychuk et al., 2011; Miller és Fox, 2004).

A PRRSV-re minden korban érzékenyek a sertések, fiatal egyedekben rendszerint súlyos, míg felnőtt egyedekben enyhe légúti tüneteket okoz, melyhez a kocák esetében szaporodásbiológiai zavarok társulhatnak (Gray et al., 2019; Klinge et al., 2009). Újszülött malacokban előfordulhat magas mortalitással járó láz és szövetközi tüdőgyulladás is. Idősebb korban a fertőzés lehet szubklinikai: láz, esetleg étvágytalanság jelentkezhethet, mindemellett gazdasági szempontból leginkább a hízósertések csökkent testtömeg-gyarapodása jelentős

(Zimmerman et al., 1997). Míg a klasszikus PRRSV-törzsek többnyire szubklinikai megbetegedést okoznak, mindkét PRRSV faj virulens törzsei magas lázzal, nagyobb fokú viraemiával, valamint magas morbiditással és mortalitással járó megbetegedést idéznek elő (Ruedas-Torres et al., 2021). A virulens törzsek okozta megbetegedéskor a légzőszervi tünetekkel (nehézlégzés, szapora légzés) és a tüdőgyulladással összefüggésben megfigyelhető a limfociták és monociták/makrofágok szeptális beszűrődése, mely társulhat vérzéses foltokkal (Canelli et al., 2017; Wang et al., 2014).

A PRRS megbetegedéssel kapcsolatos szaporodásbiológiai zavar kialakulása erősen függ a vemhesség stádiumától. A PRRSV-fertőzés nem befolyásolja a fogamzási- és termékenyítési arányt, valamint a beágyazódást és a korai embriófejlődést (16-sejtes állapot), a magzatok csupán később, a vemhesség korai (20. nap) szakaszától kezdve válnak fogékonyá a vertikális transzmisszióval szemben, ami végül magzatelhaláshoz vezet (Prieto et al., 1997a, 1996). A vemhesség középső fázisában nem nyilvánul meg klinikai tünetekben a fertőzés, valamint transzplacentáris transzmisszió sem figyelhető meg. Amennyiben a koca a vemhesség késői fázisában (70–93. nap) fertőződik, a légzőszervi tünetek mellett szaporodásbiológiai problémák, többek közt vetelés, koraellés, magzatelhalás, gyakori visszaivarzás és születési rendellenességek (halvaszületett, mumifikálódott, gyenge malacok) is jelentkezhetnek (Karniychuk és Nauwynck, 2013; Kranker et al., 1998; Zimmerman et al., 1997). A betegség reprodukciós zavarokat érintő kimenetele rendkívül változó, például a halvaszületett magzatok aránya almonként akár a 90%-ot is elérheti (Cheon és Chae, 2001; Han et al., 2013; Hu et al., 2023; Ladinig et al., 2014; Rowland, 2010).

A késői vemhesség során viraemiával a méhnyálkahártyába jutott PRRSV rövid időn belül (3–10 nap), valószínűleg az anyai makrofágok közvetítésével áterjed a placentán át a magzatba. Megfigyelések szerint mind az elvetélt, mind a halvaszületett malacokban a vírus elsődlegesen a tímuszban és a nyirokszövetekben replikálódik, valamint egyes kutatások szerint a PRRSV-2 esetében a legtöbb kóros elváltozás a bélfodri nyirokcsomókban alakul ki (Cheon és Chae, 2001; Jeong et al., 2018; Novakovic et al., 2016). Feltételezhető, hogy a szaporodásbiológiai zavarok az anyai-magzati határfelületen zajló helyi gyulladás és immun-aktiváció, továbbá az apoptotikus folyamatoknak tulajdonítható gócos leválások miatt következnek be (Karniychuk et al., 2011; Stas et al., 2022). Annak ellenére, hogy az adott vírustörzs összesített replikációs képessége a kocában nem mutat összefüggést a fertőződött magzatok arányával, az anyai-magzati kapcsolódási pontoknál megfigyelt PRRSV vírusterheléstől függ a születési súly és a magzatokban kialakult kóros elváltozások mértéke, illetve a halálozás esélye is (Jeong et al., 2022; Ladinig et al., 2015). Noha mindkét PRRSV fajhoz tartozó vírustörzsek hasonló súlyosságú reprodukciós problémákat okoznak, a PRRSV-2 esetében a szövettani elváltozások (gyulladás a méhben, a méhlepény magzati

részében és a méhnyálkahártya vérereiben) kifejezettebbek (Han et al., 2014; Jeong et al., 2022; Novakovic et al., 2016).

Koinfekció során a PRRSV-1 és PRRSV-2 fertőzőképességében különbségek figyelhetők meg. A PRRSV-2 hatékonyabb replikációs képességgel rendelkezik, mind vemhes kocákban, mind fiatal állatokban, továbbá a koinfektált malacokban a klinikai tünetek és szöveti elváltozások megegyeznek az egyedül PRRSV-2-vel fertőzött állatokéval (Choi et al., 2015; Jeong et al., 2018). Idáig sem a szaporodási zavar, sem a légzőszervi megbetegedés súlyosságában nem mutattak ki additív hatást mindkét PRRSV fajjal történő fertőződés esetében (Choi et al., 2015; Jeong et al., 2018).

A korábbiakban tárgyalt két fő kórképpel egyidejűleg jelentkező szisztémás klinikai tünetek (például bágyság, étvágytalanság, láz, cianózis, légszomj, kötőhártyagyulladás) mellett egyéb szervek is érintettek lehetnek a PRRSV okozta megbetegedés alatt. A nyirokszervekben, főleg a tímuszban, lépben, mandulákban és nyirokcsomókban kialakuló károsodások a virulens törzsek esetén kifejezettek (Han et al., 2017; He et al., 2012). A tímuszban elsősorban a CD4+/CD8+ sejtek megnövekedett járulékos apoptózisa figyelhető meg, miközben a PRRSV-re más sejtek, a CD14+ antigénprezentáló sejtek érzékenyek (Yuming Li et al., 2014; J. K. Liu et al., 2017). A sejtes immunválasz egyik központi szerve a tímusz, hiszen a T-sejtek proliferációjának, differenciálódásának és szelekciójának elsődleges helyszíne, így a fertőzés során kialakult tímuszatrófia, a T-sejtdepléción és a naiv T-sejtek fejlődésének károsodása mind hozzájárul a PRRSV immunszuppresszív hatásához (Canelli et al., 2017; Ogno et al., 2019; Wang et al., 2020). A PRRSV okozta elváltozások között előfordul vérér-, szívizom-, vese- és nem gennyes agyvelőgyulladás is (Cooper et al., 1997; Rossow et al., 1995). A HP-PRRSV-ként ismert virulens PRRSV-2-törzs esetében például kimutatták, hogy a kapilláris endotélsejteket fertőzve képes a vér-agy gátat átlépni és előidézni károsodást a központi idegrendszer idegsejtjeiben (Cao et al., 2012).

A PRRS elleni védekezés, illetve az okozott kórkép szempontjából fontos, hogy a vírus a gazdaszervezet immunrendszerének működését befolyásolja, ezáltal korlátozva a szervezet védekezőképességét. Az immunmoduláns hatás meghatározó eleme az interferonok gátlása, valamint a citokinek felszabadításán keresztül a gyulladós folyamatok fokozása (An et al., 2020; Loving et al., 2015; Lunney et al., 2016). Főleg az immunszuppressziós hatás, illetve a burokfehérjék glikozilációs módosítása következtében a neutralizáló ellenanyagok megjelenése késleltetett, többnyire a fertőzés utáni 28. nap környékére tehető, továbbá mennyiségüket tekintve is alacsony számban termelődnek (Ansari et al., 2006; Lopez és Osorio, 2004; Vu et al., 2011; Yoon et al., 1994). A fertőzés során kialakult szövetkárosodás, az immunfolyamatokban résztvevő sejtek pusztulása, illetve a gazdaszervezetre gyakorolt immunszuppresszív hatás következtében nagyon magas a rizikófaktora a másodlagos

fertőzések kialakulásának (Gómez-Laguna et al., 2013). A vírus nem megfelelő eliminációja akár több hónapig tartó perzisztens fertőzéshez is vezethet (Wills et al., 2003, 1997c).

Összefoglalva, a fertőzés kimenetelének súlyosságát több tényező együttesen határozza meg, például az adott vírustörzs replikációs képességétől, a sejtropizmusától, az immunválasz-elkerülési adottságától, illetve a gazdaszervezetben létrejövő másodlagos fertőzések jellegétől egyaránt függ (Ruedas-Torres et al., 2021). Mindezek mellett fontos megjegyezni, hogy egy-egy adott sertésállományban jelentős egyéni eltérések figyelhetők meg a megbetegedés mértékében, például a fertőzésben érintett malac fajtájának genetikai tulajdonsága befolyásolja a fogékonyságukat (Martínez-Lobo et al., 2011; Meng et al., 2018; You et al., 2023).

6.1.4 Átviteli utak, terjedés

A PRRSV mind közvetlenül, mind közvetetten hatékony terjedésre képes, nem csak egy-egy sertésállományon belül, hanem több különböző létesítmény között egyaránt. Mint ahogy az okozott megbetegedés súlyosságának mértéke is az adott vírustörzs virulenciájától függ, úgy a terjedési potenciálban is megfigyelhető eltérés a törzsek között.

A PRRS kórokozója számos különböző váladékból (vér, nyál, orrváladék, vizelet, bélsár, ondó, tej, kolosztrum) kimutatható, mely alátámasztja a fizikai érintkezéssel történő átvitelt a sertések között (Rossow et al., 1994; Swenson et al., 1994; Wagstrom et al., 2001; Wills et al., 1997b). Szintén nem lehet figyelmen kívül hagyni a PRRSV-vel fertőzött hús és takarmány fogyasztásának kockázatát. Ezt kísérleti körülmények között nem minden esetben sikerült igazolni, viszont egy 2024-es esettanulmány megállapításai szerint egy vizsgált járványnak a forrása nagy valószínűséggel a takarmány volt (Dee et al., 2024; Magar és Larochelle, 2004; Molina et al., 2009; van der Linden et al., 2003). Annak ellenére, hogy az utóbbi időben több közlemény megjelent arról, hogy a különböző (főleg szójababalapú) takarmányokban a PRRSV fertőzőképessége fennmaradhat bizonyos tárolási körülmények között, továbbra is úgy vélik, hogy az ezen az úton létrejövő fertőzés valószínűleg kis mértékben játszik szerepet a PRRSV széles körű vagy gyors terjedésében (Blomme et al., 2023; Dee et al., 2022, 2018; Galvis et al., 2022).

A mesterséges termékenyítés elterjedt gyakorlata miatt az ondó által történő fertőződés világszerte jelentős szereppel bír (Nathues et al., 2016; Prieto et al., 1997b; Yaeger et al., 1993). A kan sertésállományokhoz kapcsolódó veszélyforrást bizonyítja, hogy egy állatkísérletben a fertőzés után 43 nappal is ki tudtak mutatni élő, fertőzőképes vírust ondómintákból (Swenson et al., 1994).

A terjedési potenciál egyik meghatározó tényezője lehet a vírusürítés mértéke és időtartama. A PRRSV-törzsek orrnyálkahártyában megfigyelt replikációs képessége befolyásolhatja az oronazális úton történő átvitel szerepét a horizontális fertőzésben (Frydas

és Nauwynck, 2016). Szintén meghatározó tényező lehet a perzisztensen fertőződött és adott időközönként ürítő egyedek jelenléte a sertésállományban. Az állományban található szeropozitív, választott korban fertőződött malacok 2–5 hónapon keresztül hordozhatnak életképes vírust (Allende et al., 2000; Wills et al., 2003, 2002, 1997c).

Járványtani szempontból kulcsfontosságú és egyben a mai napig az egyik legvitatottabb kérdés, hogy a levegő útján történő terjedés ténylegesen milyen mértékben játszik szerepet a PRRSV terjedési ütemében (Arruda et al., 2019). Dee és munkatársai (2005) porlasztással képeztek PRRSV-t hordozó aeroszol részecskéket, amik akár 150 méter távolsáig életképesek maradtak kontrollált kísérleti körülmények között (Dee et al., 2005). Egy évtizeddel később sikeresen meghatározták, hogy a kilégzéssel, tüsszentéssel vagy köhögéssel a környezetbe távozó nagyobb (>2,1 μm) aeroszolzrészecskékben fertőzőképes PRRSV előfordulhat (Alonso et al., 2015). Továbbá telepi felmérésekkel arra jutottak, hogy nagyobb távolság esetében (4,7–9,1 km) bár kis koncentrációban, de élő vírus azonosítható (Dee et al., 2009; Otake et al., 2010). Ezen tények ellenére számos ellentmondó eredményről olvashatunk az irodalomban a vírus rövid vagy akár hosszabb távú, levegő útján történő terjedésére vonatkozóan. A fogékony állatok levegő útján zajló megfertőzését teljes és részleges kísérleti körülmények között csak változó mértékben sikerült reprodukálni (Brockmeier és Lager, 2002; Cho et al., 2007; Fano et al., 2005; Kristensen et al., 2004; Otake et al., 2002a; Pitkin et al., 2009a; Stein et al., 2018; Torremorell et al., 1997; Wills et al., 1997a). Az ellentmondás valószínűleg arra vezethető vissza, hogy a kísérleti elrendezés, a bevont állatok száma, és főként az alkalmazott PRRSV-törzs mind befolyásolja az eredményeket és azok összevethetőségét. Arruda és munkatársai leíró jellegű esettanulmányukban adott járványkitörésekben érintett sertésfarmoknak, illetve azok 3 kilométer sugarú környezetében elhelyezkedő sertéstelepeknek a molekuláris epidemiológiai vizsgálatát és az adott időszak időjárás adatainak elemzését végezték el. Eredményeik arra engedtek következtetni, hogy a levegő útján történő terjedés feltehetően kismértékben játszott szerepet ezeknek a PRRSV járványoknak a kialakulásában (Arruda et al., 2018).

PRRSV-2-törzsekkel végzett legújabb tanulmányok alapján a területi elterjedési mintázatban relevánsabbnak bizonyul az élőállat szállítás, azon belül is a hízósertéseké (8-25 hetes), mint a helyi lokális terjedés (térbeli közelség: <10 km) (Makau et al., 2021; Pamornchainavakul et al., 2023a; VanderWaal et al., 2020). A jelenlegi globális kereskedelmi berendezkedés, illetve a sertéstartásnak az elterjedt termelési egységekre bontott (multi site) gyakorlata miatt országon belül és kívül egyaránt nagymértékű az élőállat forgalom. Ebből következően a potenciálisan fertőzött állatok mozgatása sertéstelepek között az egyik legnagyobb jelentőséggel bíró veszélyforrása lehet a PRRSV széles körű elterjedésének.

A PRRSV terjedése közvetett módon sokféleképpen megvalósulhat. A házilég és a szúnyogok lehetséges mechanikai vektoroknak számítanak az egyedek közötti vírusterjedés

folyamatában (Otake et al., 2002b; Pitkin et al., 2009c). A személyzet által a felszerelésnek, a ruházatnak és a bőrfelületnek van szerepe a PRRSV terjesztésében, melynek kockázata megfelelő fertőtlenítési gyakorlat mellett nagymértékben csökkenthető (Dee et al., 2004b; Pitkin et al., 2009b). Az egyik legjelentősebb kockázattal a közös használatú kontaminált szállítójárművek rendelkeznek, de ahogy a személyzet esetében, megfelelő intézkedésekkel ez szintén mérsékelhető (Dee et al., 2004a; Porphyre et al., 2020; Schneider et al., 2015; Thakur et al., 2017). A PRRSV átvitelében különböző létesítmények között hűvösebb időben gyakrabban szerepet játszhat a szállításkor dolgozó személyzet munkája (Dee et al., 2003, 2002). Egyes, a PRRSV terjedését modellező tanulmányok leírták, hogy a szolgáltató járművek, a személyzet és a látogatók belépése a sertésletelepekre a leggyakoribb vírusterjedési kockázattal rendelkező tényezők és ezeket érdemes figyelembe venni a járványvédelmi intézkedéseknél (Galvis et al., 2022; Lambert et al., 2023). Összességében, mint ahogy sok másik fertőző megbetegedésnél látható, a PRRSV esetében is az indirekt, ragályfogó tárgyak (például szennyezett eszközök, személyzet, szállítójárművek) támogatják leginkább a nagy távolságokra történő terjedést.

Járványvédelem szempontjából nem elhanyagolható az eddig tárgyalt horizontális terjedési módokon felül az egyedek közötti vertikális átviteli út. A fertőzött kocák jelenléte a tenyésztőletelepeken magával vonja a megbetegedés folyamatos jelenlétét, hiszen a megszületett malacok egy része fertőzötten jön világra, ami forrása lehet a fiatal egyedek közötti fertőzési láncoknak. Továbbá, ha egy létesítményen belül történik a fialás és a választott malacok nevelése, akkor a fertőzés visszafelé történő áramlása szintén megfigyelhető. Vertikális transzmisszió elsősorban a fiatal kocák között jellemző (Martín-Valls et al., 2023b). Fialáskor a legtöbb koca ürít vírust a tejben, ugyanakkor az almonkénti PCR-pozitív malacok aránya széles határok között változhat, viszont egy héten belül a legtöbb malac viraemiás lesz (Cano et al., 2009; Mengeling et al., 1998). Valószínűleg, ha a magzat a méhben nem is fertőződik, később az anyakocával és alomtársaival történő fizikai érintkezés során igen.

6.2 A PRRSV változékonysága

6.2.1 Genetikai változatosság

Ugyan eltérő megnevezéssel, például „blue-eared disease” vagy „mystery swine disease”, de az első PRRSV-1 és PRRSV-2 okozta járványkitöréseket Európában és az Amerikai Egyesült Államokban hasonló időben, 1990-ben és 1987-ben írták le először (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991). Retrospektív vizsgálatokkal már korábbi évekből, PRRSV-1 esetében 1988-ból, PRRSV-2 esetében pedig 1979-ből származó savómintákban is sikerült szeropozitivitást kimutatni (Carman et al., 1995; Ohlinger, 1992). A két PRRSV faj és a legközelebbi közös ős megjelenésének lehetséges időpontjáról eltérő becsléseket találhatunk az irodalomban (Forsberg, 2005; Hanada et al., 2005). A PRRSV-2-genom ORF5 régiójának

kiterjedt szekvenciaadataira vonatkoztatott eredményei alapján az átlagos szubsztitúciós ráta $3,2-9,6 \cdot 10^{-3}$ szubsztitúció/pozíció/év, valamint az ezen a régió végzett számítások a legközelebbi közös őst megjelenését az 1970-es és 1980-as évek közé helyezik (Pamornchainavakul et al., 2022; Shi et al., 2010b). Az amerikai kontinensen a legelterjedtebb PRRSV-2-törzsek valószínűleg Kanadából vagy a Közép-Nyugat régióban található országokból erednek (Pamornchainavakul et al., 2023b). A PRRSV-1 esetében szintén az ORF5 régió vizsgálatára támaszkodva az evolúciós ráta hasonlóan bizonyul a PRRSV-2 eredményeihez, ami $3,01-5,8 \cdot 10^{-3}$ szubsztitúció/pozíció/év, viszont a legközelebbi közös őst korábbra datálják, a 20. század első felére, ugyanakkor a PRRSV-1 európai elterjedésének filogeográfiai kiindulópontjáról továbbra is ellentmondó adatok állnak rendelkezésre (Franzo et al., 2022; Nguyen et al., 2014).

A PRRSV-genom egyik legváltozékonyabb régiójaként a GP5 szerkezeti fehérjét kódoló ORF5-öt, míg a legkonzervatívabbnak a nukleokapszid-fehérjét kódoló ORF7-et tartották számon (Andreyev et al., 1997; Suárez et al., 1996). Az ORF5 génen belül megfigyelhető nukleotid és aminosav (as) szekvencia eltérés elérheti a 18%-ot és 21%-ot (Kvisgaard et al., 2013c; Luo et al., 2023). A Franzo és munkatársai által megállapított 9%-os átlagos genetikai távolság az ORF7 esetében a korábbi megállapításokkal ellentétben nagyobb variabilitásra enged következtetni (Franzo et al., 2021). Ennélfogva ezek a génszakaszok a legnagyobb mértékben kutatott és szekvenált genomi régiók, valamint közülük leginkább az ORF5-re támaszkodva történnek a filogenetikai és molekuláris epidemiológiai vizsgálatok (lásd a következő fejezetben). Az NSP2 fehérjét kódoló genom szakasz egy másik, gyakran az érdeklődés középpontjába kerülő magas variabilitással rendelkező régió (aminosav hasonlóság 63,9–99,4%), ami leginkább a számottevő, elszórtan elhelyezkedő deléciók és inszerciók következményeként kialakuló hosszpolimorfizmusban mutatkozik meg (Wang et al., 2019b; Zhang et al., 2023).

A PRRSV genetikai változatosságát nagyobb léptékben vizsgálva, úgy találták, hogy egy-egy adott járványkitörés során a PRRSV nagy változatosságot képes felhalmozni viszonylag rövid időn belül, ugyanakkor idővel ez jelentősen csökkenhet és az adott törzs egy új változata terjedhet el (Clilverd et al., 2023; Kikuti et al., 2023; Martín-Valls et al., 2023a).

6.2.2 Leszármazási vonalak és elterjedésük

A PRRS-t okozó két vírusfaj földrajzi eloszlása nem egyenletes: míg a PRRSV-1 fő elterjedési területe Európa, addig a PRRSV-2-nek főleg Amerika és Ázsia. Annak ellenére, hogy a PRRSV világszerte elterjedt, néhány országnak sikerült elérnie, illetve fenntartania a PRRS-mentességet (<https://www.woah.org/en/disease/porcine-reproductive-and-respiratory-syndrome/>, 2023.01.26.).

A PRRSV-1- és PRRSV-2-törzsek klasszifikációja és nevezéktana nem egységes. A PRRSV-2 esetében a monofiletikus fő- és alcsoportokra azoknak az angol megfelelőjével fogunk utalni. A lineage és sublineage (genetikai vonal és alvonal) elnevezések nemzetközileg is elismert és alkalmazott fogalmak, ezért ezektől a továbbiakban nem szeretnénk eltérni. A PRRSV-1 esetében a fő monofiletikus csoportkategóriára az angol fogalommal (ST, subtype) megegyező szubtípus elnevezést, míg az alcsoportokra szintén a nemzetközi szaknyelvnek megfelelően a lineage szót fogjuk használni a disszertációban.

A PRRSV-2-törzsek klasszifikációs rendszerét 2010-ben alapozták meg, melyben az ORF5 szekvencaanalízise alapján kilenc lineage-et (L1–9) és ezeken belül számos sublineage-et karakterizáltak (Shi et al., 2010b). Több, mint egy évtizeddel később a klasszifikációs rendszer finomítása ahhoz vezetett, hogy összesen 11 lineage-et és további 21 sublineage-et határoztak meg 2023-ban (Yim-im et al., 2023). Amerikában az elmúlt évtizedben az L1 és L9 vad típusú törzsek, illetve élő attenuált (MLV, modified live viruses) vakcinatörzseket és azok leszármazottait magába foglaló L5 és L8 csoportok tagjai terjedtek el döntő többségben (Pamornchainavakul et al., 2023b; Paploski et al., 2021; Ramos et al., 2022; Yim-im et al., 2023). A genetikai diverzitás szempontjából érdekes fejlemény, hogy az L5 és L8 lineage-ek jelenléte folyamatosan csökken az USA-ban. Valószínűleg az MLV-vakcinák kiterjedt alkalmazásának köszönhetően a vad típusú törzsek kiszorultak, bár egyelőre kérdéses, hogy nem csupán a szekvencaadatok torzítása látható-e (Kikuti et al., 2021). Kínában az Amerikában is jellemzően uralkodó L1, L5 és L8 mellett az L3 található meg főként (Fang et al., 2022; Gao et al., 2017). Dél-Koreában szintén az L1, L5 és L8 fordul elő, viszont az L5 első azonosítását követően közel egy évtizedig nem történt másik leszármazási vonal behurcolása és az országban egyedi evolúciós hatásoknak köszönhetően országspecifikus kládok kialakulása volt megfigyelhető (Kim et al., 2022, 2021; Lee et al., 2023). Délkelet-Ázsiában ugyanúgy az L1, L5 és L8 tagjai azonosíthatók (Do et al., 2016; Jantafong et al., 2015). Korlátozott számú szekvencaadatokkal rendelkező országok közül például Japánban elsősorban az L4, Indiában pedig az L8 jelenléte detektálható (Cui et al., 2022; Murtaugh et al., 2015; Rajkhowa et al., 2018).

A disszertáció szempontjából az L5-öt szeretnénk kiemelni és részletesebben bemutatni. Ebbe a lineage-be sorolódnak a PRRSV-2 prototípus vad típusú törzsének (VR-2332), illetve az abból származtatott élő, attenuált vakcinatörzsnek (Ingelvac PRRS MLV, vagy régebbi nevén RespPRRS MLV) a leszármazottai (Shi et al., 2010b). A legtöbb országban ennek a lineage-nek a megjelenése és azonosítása az Ingelvac PRRS MLV vakcina rendszeres alkalmazásának következménye. Globális elterjedését tekintve az L5 leginkább Kanadában, Kínában, USA-ban, Mexikóban, Koreában és Dániában fordul elő (Murtaugh et al., 2015). A PRRSV-2 elszórt európai megjelenése nagyrészt az L5-höz köthető és behurcolása vélhetően egy MLV-vakcina preventív használata miatt történhetett 1996-ban, Dániában (Bøtner et al.,

1997; Stadejek et al., 2013). Az L5 európai törzseiről szekvenciaadat csak korlátozott számban érhető el, kivéve a Dániából származó adatok, ahol nagy erőket fektetnek a keringő törzsek jellemzésébe, lévén az egyik legmeghatározóbb sertéskereskedelmet folytató európai ország (Balka et al., 2008; Greiser-Wilke et al., 2010; Indik et al., 2005; Kvisgaard et al., 2013a; Papatsiros et al., 2020).

L1-be tartozó vad típusú PRRSV-2-törzsek jelenlétét Európában először Magyarországon, majd később Szlovákiában mutatták ki (Balka et al., 2015, 2008; Jacková et al., 2013).

A PRRSV-1-törzsek csoportosításának alapjait az ORF5 és ORF7 szekvenciaelemzése alapján Stadejek és munkatársai fektették le, majd ezt két jelentős közlemény bővítette és finomította az egyre több rendelkezésre álló ORF5 szekvenciaadat támogatásával (Balka et al., 2018; Shi et al., 2010a; Stadejek et al., 2006). Az eredetileg megállapított 4 szubtypuson (ST1–ST4) belül a legnagyobb diverzitású filogenetikai csoport, az ST1 képviselőit három leszármazási vonalra (L1–L3) vagy számos kládra bontották (Balka et al., 2018; Shi et al., 2010a). Az ORF5, ORF7 vagy teljesgenomalapú filogenetikai elemzéseket nézve az Oroszországból származó törzsek egy része kérdéses helyet foglal el ebben a klasszifikációs rendszerben, több esetben nem alkotnak monofiletikus kládot a szubtypusok többi tagjával (Shi et al., 2010a; Yuzhakov et al., 2020). Az ST1 az egyetlen klád, amely Európa határain túl is előfordul. Eddig ebbe a szubtypusba sorolták az Amerikában, Tajvanban és Thaiföldön azonosított, relatív sporadikus elterjedésű törzseket, valamint a Koreában PRRSV-2-höz hasonló gyakorisággal izolált törzseket is (Hsueh et al., 2023; Jantafong et al., 2015; Lee et al., 2023; Wang et al., 2019b). Kínában az ST1-törzsek prevalenciája növekvő tendenciát mutat az utóbbi évek adatai szerint (Gao et al., 2017; Sun et al., 2023). Mint ahogy a PRRSV-2 MLV-vakcináknál is megfigyelhető volt, Koreában bizonyos PRRSV-1-kládok detektálásának gyakorisága az adott vakcina bevezetését követően nőtt meg, továbbá az elterjedésük szerepet játszott a többi törzs diverzifikálásában (Kim et al., 2021; Kwon et al., 2019). Összességében az Európán kívüli kontinenseken keringő PRRSV-1-törzsekre jellemző, hogy országonként nagymértékben eltérnek egymástól, valószínűleg egymástól függetlenül fejlődtek, aminek alapja az Európából történő behurcolások korlátozott száma lehet (Kim et al., 2021; Nilubol et al., 2013; Wang et al., 2019b; Yu et al., 2022).

Az ORF5-szekvenciaalapú klasszifikációt számos kritika éri, mivel az ORF5 mindössze 4%-át teszi ki a teljes genomnak. Az utóbbi évtizedben történt technológiai fejlődésnek köszönhetően a nagyszámú elérhető teljes genom átfogó filogenetikai vizsgálata alapján a PRRSV-2-törzsek három genocsoportra és további alcsoportokra bonthatók (Guo et al., 2021). Szintén tovább nehezíti a PRRSV világszintű genetikai változatosságának megismerését, hogy a legtöbb szekvenciaadat, akár a teljes genom, akár az ORF5 szekvenciát vesszük alapul, csupán három országból származik (Kína, USA és Dél-Korea) (Frias-De-Diego et al., 2021). Annak ellenére, hogy 2010-től kezdődően a teljesgenomalapú vizsgálatok száma

majdnem kétszer annyi, mint az egy-egy adott ORF-alapúak, a filogenetikai elemzések nagyrészt továbbra is az ORF5 alapján zajlanak (Frias-De-Diego et al., 2021).

6.2.3 Rekombináció

A magas mutációs rátán felül a rekombináció a másik meghatározó mozgatórugó a PRRSV törzsek gyors evolúciójában (Murtaugh et al., 2010). A rekombinációs események a résztvevő törzsek szerint a következő három fő csoportba sorolhatóak: vad- és vad-; vakcina- és vakcina-; vakcina- és vad típusú törzsek között jön-e létre. Emellett meg szokták határozni, hogy a rekombináció lineage-eken belül vagy lineage-ek között zajlott-e. A génbankban található PRRSV-2-rekordok között igen magas, Cui és munkatársai eredményei alapján akár a 35%-ot is eléri a rekombinánsok jelenléte, melyből következtethetünk az állományokban cirkuláló rekombináns törzsek nagy számára is (Cui et al., 2022). A rekombinációs töréspontok az egész genomon elszórtan helyezkednek el, a forró pontok pedig az NSP1, NSP9, NSP11, illetve az ORF2–4 régió területére koncentrálnak (Cui et al., 2022; Yu et al., 2020). Az USA-ban és Kínában főként az L1 és L8 tagjai kerültek azonosításra a rekombináns vírusok, mindemellett Kínában kimutattak többszörös rekombináns törzseket is, melyek eredete három vagy akár négy lineage-hez is köthető (Chen et al., 2018; Cui et al., 2022; Liu et al., 2019). PRRSV-1-törzsek átfogó elemzése alapján, a génbankban található teljes genom rekordok több mint fele rekombinánsnak bizonyult, a rekombinációs töréspontok szintén az NSP2, illetve az ORF2–4, továbbá az NSP1, NSP7 és az ORF6-7 régiókban halmozódtak fel (Vandenbussche et al., 2021; Yu et al., 2022).

A sertésstelepeken keringő MLV-vakcinatörzsek vonatkozásában nem csak a virulencia visszanyerése (reverzió), hanem a más vakcinatörzsekkel, illetve vad típusú törzsekkel létrejövő rekombináció veszélye is fennáll. Számos vakcina eredetű rekombináns vírustörzs esetében azt észlelték, hogy a szülői vakcinatörzshöz képest megnövekedett virulenciával rendelkeznek vagy nagyobb mortalitást okoznak, ezért járványtani szerepük nem elhanyagolható. PRRSV-1 esetében eddig kettő, különböző vakcinászerű törzsek alkotta rekombináns izolátum teljes genomját írták le, amely rekombinációs eseményeket az alábbi kereskedelmi forgalomban kapható vakcinák használatát követően észleltek: Unistrain® és Porcilis®, illetve Unistrain® és Suvaxyn® PRRS vakcinák (Kvisgaard et al., 2020; Renson et al., 2017; Sun et al., 2022). Az izolált rekombináns törzsek közül az egyik járványkitörést és jelentős gazdasági károkat okozott Dániában (Kristensen et al., 2020; Kvisgaard et al., 2020). Különböző vírustörzseket tartalmazó MLV-vakcinák párhuzamos használatát egyes vakcinákat forgalmazó cégek sem ajánlják (<https://www.msd-animal-health-hub.co.uk/Products/Porcilis-PRRS>, 2024.01.28.). Az USA-ban, a 2023-as év során került először leírásra olyan törzs, amely feltételezhetően PRRSV-2 MLV-vakcinatörzsek között lezajlott rekombinációt mutatott (Trevisan et al., 2023). Gyakrabban, és főleg a PRRSV-2

esetében kerültek azonosításra olyan törzsek, amelyek valószínűleg valamilyen vakcina- és vad típusú törzs kereszteződéséből alakultak ki (Chen et al., 2017; J. Liu et al., 2017; Wang et al., 2019a; Xia et al., 2023; Zhang et al., 2020). Ezen vírustörzseknek változó volt a patogenitása, illetve nagyrészt járványkitörésekből vagy megbetegedett sertésekből izolálták őket.

Egyes kutatások alapján bizonyos filogenetikai csoportok egy adott rekombinációs eseményt követően jöttek létre és nagyszámú rekombináns leszármazottat foglalnak magukba, amelyek az adott ország több pontján, több évet átölelően keringenek (Kim et al., 2022; Shi et al., 2013).

6.2.4 Kvázispecies jelleg

Az RNS-vírusokra, így a PRRSV-re is jellemző a nagy hibaarányú replikáció következtében kialakuló magas mutációs ráta. Ennek folytán az RNS-víruspopulációt a gazdaszervezeten belül nem egy, hanem több eltérő, de egymással szoros rokonságban álló genomok halmaza, más néven kvázispecies alkotja (Domingo et al., 2021; Holland et al., 1992). A széles mutáns spektrummal bíró víruspopuláció úgy biztosítja a vírus folyamatos alkalmazkodását, hogy az adott környezeti feltételek szabta szelekciós nyomásnak legjobban megfelelő variánsok kerülnek előnybe (Andino és Domingo, 2015). A kisebb arányban jelen lévő variánsok karakterizálásához és a kvázispecies sokrétű vizsgálatához az újgenerációs szekvenálás (NGS, next-generation sequencing; részletesebben lásd később: 6.5 fejezet, 33.o.) az utóbbi évtizedben kiváltotta a régebbi módszert, azaz a PCR-termékek klónozást követő Sanger-szekvenálását (Lu et al., 2020). Egy adott mintában található víruspopuláció genetikai változatosságát az összeállított konszenszus szekvenciától eltérést mutató nukleotidokkal szokás karakterizálni, amelyre elsősorban egy pontos nukleotid variánsként (SNV, single nucleotide variant) vagy minor variánsként szokás hivatkozni. A víruspopulációban előforduló, adott SNV-k által meghatározott szekvenciavariánsok csoportját nevezhetjük haplotípusnak (Knyazev et al., 2021).

Az irodalmi adatok áttekintése során azt tapasztaltuk, hogy bár viszonylag korlátozott számú kutatás fókuszál a PRRSV kvázispeciesének vizsgálatára, jelentősen hozzájárulnak a PRRSV-ről alkotott ismereteinkhez. A PRRSV elleni hatástalan védekezés már a 2000-es évek elején azt eredményezte, hogy az egyeden belüli kvázispecies adta változatosságot kezdték vizsgálni és kimutatták, hogy a fertőzött sertések valóban genetikailag és szerkezetileg eltérő vírusváltozatokat hordoznak (Goldberg et al., 2003). Egy másik viszonylag korai tanulmány *in vitro* bizonyította, hogy az antitestek által gyakorolt szelekciós nyomás hatással volt a víruspopuláció összetételére (Zhao et al., 2012). Az újabb átfogó kutatások szerint az SNV-k előfordulása és gyakorisága a PRRSV-genomon a vizsgált egyedtől függően eltérő mintázatot mutat, bár egységesen megfigyelhető, hogy leginkább a nem-szerkezeti

régiókon koncentrálnak, továbbá a legjellemzőbb mutáció a cisztein/timin tranzíció (Brar et al., 2014; Chen et al., 2016; Clilverd et al., 2023; Evans et al., 2017; Xing et al., 2022). Mindemellett, a víruspopulációban fellelt diverzitás a minta típusától és a fertőzés óta eltelt időtől egyaránt függhet, ami alátámasztja az egyedekre, illetve a szervek/szövetek között ható folyamatos szelekciós nyomás hatását (Chen et al., 2016, 2015; Clilverd et al., 2023; Evans et al., 2017; Lu et al., 2017).

Chen és munkatársai mesterségesen fertőzött malacok kvázispecies-változatosságát vizsgálták. A fertőzést követően (4., 28. és 42. napokon) azonosítottak olyan pozitív szelekció alatt álló SNV-eket a GP5-ben, amiről úgy vélték, hogy az immunrendszer elkerülését és a PRRSV perzisztenciáját segítik elő (Chen et al., 2016). Hasonlóképpen, Evans és munkatársai igazolták, hogy a fertőzés korai szakaszában kialakuló változatosság (több, akár eltérő SNV együttes jelenléte) a vírusneutralizáció, vagy a replikáció hatékonyságára egyaránt hatással volt (Evans et al., 2017). Továbbá, a víruspopuláció genetikai diverzitásának vizsgálatával fény derült arra, hogy az egyedek közötti vírusterjedés mechanizmusára jellemző a palacknyak-hatás, vagyis az újonnan fertőzött egyedekben kevésbé heterogén víruspopuláció telepedik meg, majd idővel ennek az alapító víruspopulációnak a genetikai diverzitása növekszik (Cortey et al., 2018).

Annak ellenére, hogy az MLV-vakcinák széles körben elterjedt eszközei a PRRS elleni védekezésnek, a vakcinatörzsek genetikai változékonyságára és stabilitására vonatkozó információk korlátozottak, pedig ezek hatással lehetnek a vakcinavírusok reverziójára vagy a hatékonyságukra. PRRSV esetében eddig kevésbé vizsgált ez a kérdéskör, azonban jelentőségét mutatja egy közlemény, miszerint közvetlenül a vakcinafiolából vizsgált Ingelvac MLV (PRRSV-2) vakcinavírus már egy eleve nagyon heterogén víruspopulációt hordoz, amely az adott sertés négyes kromoszómáján található egy pontos nukleotid polimorfizmus markernek (WUR10000125) a genotípusától függően tovább nőhet vagy mérséklődhet, befolyásolva a vakcina hatékonyságát (Rowland et al., 2022).

6.3 A PRRSV diagnosztikája

Mivel a PRRS-nek nincsen patognomikus tünete, a kórokozó azonosításához elengedhetetlen valamilyen diagnosztikai módszer alkalmazása. A PRRS világszerte súlyos gazdasági kárt okozó megbetegedésnek számít, így a megjelenése óta a sokrétű diagnosztikai módszerek folyamatos fejlődésen és optimalizáláson estek át, melyekhez szorosan kapcsolódik a betegség elleni védekezésben és a mentesítésben elengedhetetlen, a kórokozókat célzó folyamatos monitoring is (Alvarez et al., 2016; Holtkamp et al., 2011; Pan et al., 2023). Alapvetően két fő irányvonalon történik a diagnosztika, az egyik a kórokozó vírus közvetlen, a másik a közvetett, azaz a kórokozó ellen termelődött specifikus ellenanyagok kimutatása. Mindkét megközelítés a fertőzés különböző aspektusaira enged következtetni,

ezért alkalmazásukat az aktuális célokhoz érdemes igazítani (Christopher-Hennings et al., 2002).

Az indirekt víruskimutatás a sertésállományok szintjén mérvadó és elsősorban enzimhez kötött immunadszorpciós vizsgálatokkal (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay) valósul meg. Az ELISA esetében a hagyományos antigén (leginkább rekombináns nukleokapszid) mellett szintetikus peptid, illetve nemrégiben nanorészecske alapúakat is kifejlesztettek (Duan et al., 2021; Zhao et al., 2021). A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-kitek eltérő specificitása és szenzitivitása főként a PRRS-mentes sertésállományok, valamint a PRRSV-re nézve stabil kocaállományokon felül olyan telepek vizsgálatánál bír jelentőséggel ahol aktuálisan nincs víruskeringés vagy csak a hízósertéseknél figyelhető meg fertőződés, ezért ilyen esetekben tanácsos a diagnosztikát valamilyen direkt kimutatási módszerrel kiegészíteni (Biernacka et al., 2018). A módszerek eme csoportjába tartoznak még a vírusneutralizációs és az indirekt immunfluoreszcens próbák, továbbá az immunperoxidáz festéssel történő ellenanyagkimutatás egyrétegű sejtenyészeten (IPMA) is. Ennek a diagnosztikai megközelítésnek az az előnye, hogy az ellenanyagok a fertőzést követően akár 4–5 hónapon keresztül is kimutathatók a vérből, azonban csak a vadvírus, illetve az alkalmazott vakcinák közvetett hatását képesek felmérni, mely adatokból a fertőzés lefolyására és a különböző korcsoportok immunológiai státuszára következtethetünk az állományokban.

A direkt víruskimutatás során vagy a vírus antigénjeit, vagy a genetikai állományát vizsgáljuk. Főleg a betegség heveny fázisában, az egy-egy konzervatív genomszakasz (általában ORF6 és ORF7) sokszorozására támaszkodó, nagy érzékenységgel bíró polimeráz láncreakció (PCR) rendszerek – mint például beágyazott (nested) vagy egyszerű (single) reverz transzkripció PCR (RT-PCR), digitális PCR, valós idejű (real-time) PCR, hurokközvetített izotermikus amplifikáció, vagy a PRRSV-2-törzsek restrikciós fragmenshossz polimorfizmus-mintázata – közül az RT-PCR a legelterjedtebben alkalmazott technika mind a mai napig (Pan et al., 2023). A PCR-módszerek számos előnye ellenére, egyik hátránya abban mutatkozik meg, hogy a cél régióra specifikus primerszekvenciák folyamatos felülvizsgálata és az adott földrajzi régióhoz történő igazítása elengedhetetlen a PRRSV törzsek nagyfokú genetikai változatossága miatt (Drigo et al., 2014; Toplak et al., 2012; Truyen et al., 2006). A PRRSV jelenlétének kimutatásán túl a PCR-termékek nukleotidszekvenciájának meghatározása hozzájárul a törzsek közötti rokonsági és hasonlósági kapcsolatok feltárásához, ezzel segítve a régi és újonnan felbukkanó törzsek eredetének vizsgálatát, valamint a diagnosztikai módszerek fejlesztését. Ezzel kapcsolatban a hagyományos PCR-rendszereknek és egyben a Sanger-szekvenálásnak egy másik hátránya, hogy a sertésállományokban egy időpontban több heterogén vírus keringése nehezítheti a törzsek detektálását és jellemzését (Cheng et al., 2022; Greiser-Wilke et al., 2010; Nilubol et al., 2013).

A keringő vírustörzsek molekuláris diagnosztikai azonosítása rendszerint az ORF5 régió szekvenciájának vizsgálatával történik, azonban ez, ahogy a korábbi fejezetekben is említésre került, a kiterjedt rekombináció következtében nem minden esetben ad megbízható eredményt (Dortmans et al., 2019; Martín-Valls et al., 2014; Vandenbussche et al., 2021). A hagyományos PCR-módszerek hátrányai, valamint az NGS térhódításának köszönhetően a nagy áteresztőképességű rendszerek is egyre gyakrabban válnak az állatorvosi diagnosztika meghatározó elemévé (Belák et al., 2013; Granberg et al., 2016). Az NGS egy konszenzus szekvencia, legyen az akár egy genomszakasz vagy a teljes genom, megállapítása mellett például több, párhuzamosan keringő törzs azonosítására és a kvázispecies komplexitásának felmérésére egyidejűleg alkalmazható, bizonyos esetekben akár kiválthatja a Sanger-szekvenálást (Maloney et al., 2019; McNaughton et al., 2018; Quer et al., 2015; Ramakrishnan et al., 2009; Sikkema-Raddatz et al., 2013).

Az elmúlt években mind a short-read, mind a long-read technológiával rendelkező NGS-módszerek (részletesebben lásd később: 6.5 fejezet) diagnosztikai alkalmazása kiterjedt a PRRSV-re (Gagnon et al., 2021; Lalonde et al., 2020; Tan et al., 2019; Vandenbussche et al., 2021; Zhang et al., 2017). Döntő többségében a vizsgálatok idő- és költségigényes módszereket és reagenseket igényelnek.

6.4 A PRRS járványtana és eliminációja Magyarországon

A PRRS elterjedése, terjedési mintázata és az ellene irányuló védekezési törekvések tekintetében a hazai története három fő periódusra osztható (Dr. Bálint Ádám személyes közlése alapján).

A hazai sertésállományokban a PRRS jelenlétének az első kimutatása szerológiai vizsgálatok segítségével 1995-ben történt, majd nem sokkal később megállapították, hogy az európai genotípusba, azaz a PRRSV-1-be tartoztak a magyarországi törzsek (Hornyák et al., 1997). Rövid időn belül felvették a bejelentési kötelezettség alá tartozó állatbetegségek közé (1996.07-től, 41/1997.(V.28.) FM rendelet), azonban az európai uniós jogharmonizáció miatt a PRRS-re vonatkozó végrehajtási szabályokat hatályon kívül helyezték (2001.07-től, 30/2002. (IV. 19.) FVM rendelet). Ebben az első időszakban (1996–2004) az állattartás egyenlő arányban oszlott meg a nagylétszámú farmok és háztáji farmok között. Mivel nem volt kötelező a PRRS-fertőzés bejelentése, a kezdeti alacsony fertőzöttségi arány (2–3%) növekedése volt megfigyelhető, a külföldről behurcolt fertőzések főként a korlátozott számú tenyészkocák importálásához voltak köthetőek (Dr. Bálint Ádám személyes közlése alapján).

A második időszakot (2004–2014) az Európai Unióhoz történő csatlakozás következtében megnövekedett, ismeretlen eredetű és státuszú állatforgalom határozta meg, ezzel együtt a kislétszámú állományokban tartott sertések arányának csökkenése és a nagylétszámú telepek számának rohamos növekedése (Abonyi et al., 2021a). Mindemellett a hazánkba behurcolt,

valamint az endemikusan keringő törzsek nagymértékű terjedésének is kedvezett a változó állategészségügyi igazgatás, a járvány megelőzés háttérbe szorulása, illetve az állatszállítási és karantén eljárások enyhítése. A PRRS prevalenciája 2005 és 2008 között hozzávetőlegesen 10% volt a nagylétszámú sertéstelepek esetében, majd 2011-ben már 25%, míg a háztáji állományok körülbelül 4%-ában fordultak elő szeropozitív egyedek a 2012-2013-as években (Balka, 2009; Nemes et al., 2019). A második időszakban a hazai sertésállományokból heterogén PRRSV-1-populációt sikerült kimutatni, továbbá az első PRRSV-2-vírustörzs hazai kimutatása szintén ekkor történt (Balka et al., 2018, 2008). A PRRSV-fertőzöttséget idővel elkezdte mérsékelni, hogy 2008-tól újra felvették a bejelentési kötelezettséggel járó megbetegedések közé (113/2008. (VIII.30.) FVM rendelet). Annak érdekében, hogy a fertőzöttség és a gazdasági kártétel mértéke tovább csökkenjen, végül az egész ország mentesüljön a PRRS alól, a PRRS Nemzeti Mentésítési Terv (3/2014 (I.16.) VM rendelet) hatályba lépett 2014-ben. A mentesítési program területi elven valósult meg, vagyis az eradikáció egy-egy adott közigazgatási egység (járás, vármegye, régió) területére koncentrált. A mentesítés kardinális eleme a folyamatosan végzett monitoring, mind szerológiai, mind PCR-vizsgálatok segítségével, illetve az adott sertésállományt megfertőző vírustörzs eredetének feltárása, a keringő törzsek elkülönítése és karakterizálása, mint telepspecifikus, vakcina- vagy vad típusú törzs (Fornyos et al., 2022).

A harmadik időszakot (2014-től napjainkig) a PRRS-mentesítés feladatainak végrehajtása, a kitűzött célok elérése és az elért eredmények, vagyis a mentes státusz fenntartása határozza meg. A mentesítés kezdetén végzett felmérés alapján 2015-ben a nagylétszámú hízóállományok 61,2%-a, a kislétszámú sertésfarmoknak mindössze 3,4%-a bizonyult fertőzöttnek (Nemes et al., 2019; Szabó et al., 2019). A kislétszámú sertéstelepeken detektált szeropozitív egyedek az ország teljes területén selejtezésre kerültek, így hivatalosan 2015 végére ezek az állományok PRRS-mentes státuszban részesültek és a következő években a szeropozitivitás csak 1% körüli volt (Nemes et al., 2019). A nagylétszámú hizlaldák mentesítésének egyik alapját az alábbi intézkedések biztosították: i) hízóalapanyag-állományok karanténba helyezése 60 napig; ii) beérkező hízóalapanyag virológiai vizsgálata (PCR) 48 órán belül; iii) beérkező hízóalapanyag karanténvégi szerológiai vizsgálata. Mivel ezen telepeknél a PRRSV-fertőzés elsődleges forrásai az importált sertésállományok, 2017-től kezdődően csak PRRS-mentes sertések vásárlása és beszállítása engedélyezett, illetve az esetükben kötelező a karantén (Országos Főállatorvos 7/2017. számú határozata). Az intézkedések eredményeképpen 2019-re az ország teljes hízóállománya PRRS-mentesnek minősült (Szabó et al., 2019). Habár a nagylétszámú tenyésztelepek 2014-ben látott PRRS fertőzöttsége kisebb mértékű volt mint a hízótelepeké, a fialástól-a-vágásig típusú sertéstelepek nagyarányú jelenléte miatt a hízóállományok mentesítéséhez képest eltérő intézkedések váltak szükségessé (Abonyi et al., 2021b). A nagylétszámú tenyészállományok

esetében bevezetésre került egy egyedi, vakcinázott mentes („MV”) státusz, ahol a tenyészkocák vakcinázása mellett bizonyítottan mentes utódállományok felnevelését immunizálás nélkül kell elérni (Országos Főállatorvos 7/2017. számú határozata) (Fornyos et al., 2023). 2019 végére a hét magyarországi régióból, amelyek meghatározása az EU által készített földrajzi alapú kódolási rendszer szerint történt, ötben minden sertéstelep mentessé vált, legyen az kislétszámú vagy nagylétszámú tenyész- és hízótelep, a maradék két régióban (Észak-Alföld és Dél-Alföld) a tenyészállományok mentesítése 2022 végéig fejeződött be (I. Szabó et al., 2020; Szabó et al., 2023). A mentesítési programot megelőző és az azt követő években gyűjtött szekvenciaadatok alapján a hazánkban keringő PRRSV-törzsek széles diverzitása volt megfigyelhető, túlnyomórészt vad típusú törzsek jelenlétével, illetve hálózatelemzés alapján több olyan variáns azonosítása is megtörtént, melyek kiemelkedő szerepet játszhattak a magyarországi törzsek elterjedésében (Balka et al., 2018; P. M. Szabó et al., 2020). A genetikai változatosság egy részéért az MLV-vírus törzsek visszaizolálása felel. Vakcinákat már jóval a mentesítési program előtt alkalmaztak, főként a Porcilis® PRRS és Amervac®, majd Unistrain® PRRS vakcinákat, majd a program elindulása után további MLV és inaktivált vakcinákat is bevontak az immunizálásba (Bálint et al., 2021). A hazai PRRSV törzsek ORF5 és ORF7 régióinak vizsgálata alapján a Porcilis-vakcinavírus bizonyult genetikailag a legstabilabbnak (Bálint et al., 2021).

6.5 NGS technológia

A DNS nukleotidsorrendjének megismerésére az első szekvenáló technológiák kifejlesztése óta folyamatos fejlődési törekvések zajlanak. A legismertebb első generációs szekvenálási eljárás láncterminációt előidéző didezoxi-nukleotidok segítségével zajlott (láncterminációs módszer vagy Sanger-szekvenálás, 1970-es évek). A négy külön reakcióelegyben ugyanazon fő összetevők (DNS-polimeráz, DNS-templát, primer és dezoxinukleotidok) mellett a didezoxi-nukleotidok eltértek, és a különböző hosszal, de adott didezoxi-nukleotiddal végződő DNS-szálakat gélelektroforetikus elválasztást követően olvasták le (Sanger et al., 1977). Ennek a módszernek az automatizált változata (jelölt didezoxi-nukleotidokkal zajló DNS-templát felsokszorozás és kapilláris elektroforézis) mind a mai napig az egyik leggyakrabban alkalmazott szekvenálási technika. Elterjedt használata ellenére a Sanger-szekvenálás rendelkezik néhány limitációval, ezek a rövidebb DNS-hossz leolvasása (300–1000 bp), az egy konszenzus szekvencia meghatározása és a viszonylag nagy bázisonkénti költsége. A 2000-es évek közepétől kezdődően a magas kihozatalú NGS rendszerek elkezdték térhódításukat, először az alapkutatás, majd a klinikum és a diagnosztika tudományterületén egyaránt. Jelenleg, adott állásfoglalástól függően második-, harmadik- és negyedik generációs szekvenáló platformok vannak kereskedelmi forgalomban (Hu et al., 2021; Slatko et al., 2018). A leolvasott szekvenciák (továbbiakban: read) hosszát

tekintve két fő csoportra bonthatók a kidolgozott technológiák: a rövid, azaz short-read, és a hosszú, más néven long-read szekvenálásra (Goodwin et al., 2016). A short-read alapú rendszerek közül az Illumina által gyártott készülékek piacvezető pozíciót töltenek be (<https://www.illumina.com/>, 2024.01.28).

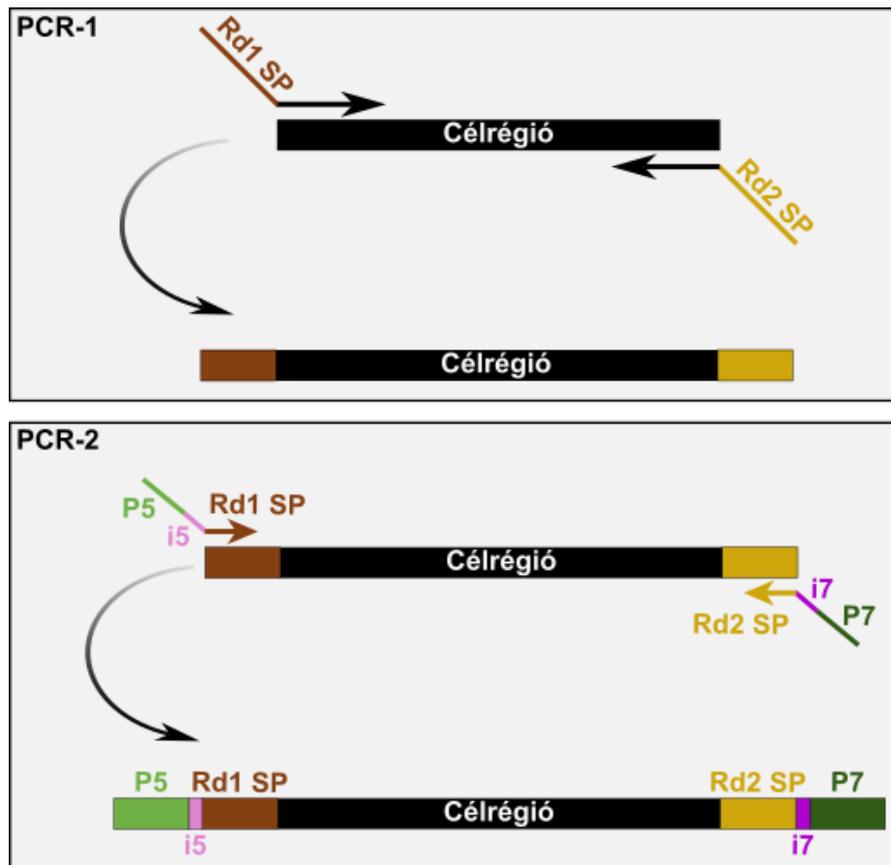
Számos szekvenálási eljáráshoz, főleg a klinikai minták esetében, szükséges a kérdéses genetikai anyag dúsításának beépítése az NGS munkafolyamatába. Az egyik ilyen költséghatékony megoldás a PCR segítségével történő felszaporítás, ami teljes genom vizsgálata esetén nagyrészt 3'-végén randomizált nukleotidokat tartalmazó primerek segítségével (úgynevezett random PCR-módszer), míg egy-egy adott genomi régió esetében pedig hagyományosan specifikus primerekkel valósul meg (Djikeng et al., 2008; Quick et al., 2017). A minta előkészítése után, függetlenül a különböző NGS-rendszerektől, nélkülözhetetlen az adott készülékkel kompatibilis RNS- vagy DNS-könyvtárak előállítása. A könyvtárkészítés eredményeként az összes RNS- vagy DNS-szál hordozni fog adaptereket (specifikus oligonukleotid, vagy fehérje) és vonalkódokat (specifikus oligonukleotid; más néven index) annak érdekében, hogy a szekvenálás megtörténjen, illetve az egyes minták egyedileg azonosíthatók legyenek. A könyvtárkészítés túlnyomórészt kereskedelmi forgalomban kapható kitekkel zajlik, és leginkább a genetikai anyag mesterséges fragmentálásán alapul, melyet méretszelekciós és tisztítási lépések követnek (Head et al., 2014). Az ilyen módon zajló könyvtárkészítésre a továbbiakban hagyományos könyvtárkészítésként fogunk hivatkozni.

6.5.1 Amplikon-mélyszekvenálás

Az amplikon-mélyszekvenálás a célzott NGS-módszerek csoportjába tartozik, aminél legtöbb esetben PCR segítségével felszaporított célrégiót vizsgálunk. Ezt az eljárást gyakran alkalmazzák a víruspopuláció diverzitásának becslésére, következtetve az eredményül kapott NGS-readekből. Habár a víruspopulációban előforduló variánsok egymáshoz viszonyított arányának megállapítása nehézkes, több tanulmánynak is sikerült validálnia az amplikon-mélyszekvenálás ilyen terű hasznosíthatóságát (Brait et al., 2022; Grubaugh et al., 2019; Ni et al., 2018).

Az Illumina rendszereket közkedvelten alkalmazzák célzott szekvenálások kivitelezésére, és könyvtárkészítő módszerként elterjedőben van az egy-, vagy kétlépéses PCR hasznosítása, amelyre új könyvtárkészítő módszerként fogunk hivatkozni. Ezen módszer során fúziós primerek segítségével az adapterek és vonalkódok a termék felszaporításával egyidőben kerülnek rá a DNS-templátra és az így készült DNS-könyvtár közvetlenül felhasználható a szekvenálási reakcióban (Holm et al., 2019). Az Illumina rendszerek esetében elérhető 2x300 bp read-hosszt biztosító szekvenáló kitekkel és paired-end beállítással (adott DNS-templát forward és reverz irányból is történő leolvasása) egy maximum 600 bp hosszúságú amplikontermék a nukleotidsorrendje határozható meg. Az Illumina

rendszerekkel kompatibilis, kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítő módszer a következőképpen zajlik (**2. ábra**). Az első PCR (PCR-1) során olyan fúziós primereket használnak, amelyeknél az adott célrégióra specifikus szekvencia szakaszok mellett az Illumina szekvenáló primerei (Rd1 SP és Rd2 SP) helyezkednek el, ezáltal ebben a reakcióban beépülnek azok a felszaporított DNS-templátba. A második PCR (PCR-2) alatt az Illumina specifikus adapterek (P5 és P7) és vonalkódok (i5 és i7) hozzákapcsolása zajlik a PCR-1 termékéhez. A PCR-2 végével teljes értékű, közvetlenül Illumina készüléken szekvenálható DNS-könyvtárakra teszünk szert.



2. ábra Az Illumina rendszerrel kompatibilis, kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítő módszer sematikus ábrázolása.

A PCR segítségével előállított DNS-könyvtárak egyszerű, gyors és költséghatékony protokollt tudnak biztosítani. Az amplicon-mélyszekvenálást PCR-alapú könyvtárkészítéssel teljes genom szekvenálására szintén lehet alkalmazni, mint ahogy azt mutatja az ARTIC által kidolgozott SARS-CoV-2-re specifikus, átfedő ampliconokkal operáló eljárás (Gohl et al., 2020). Állatorvosi vonatkozásban az amplicon-mélyszekvenálást döntő többségében metagenomikai vizsgálatokra alkalmazzák (Johnston et al., 2017; Lowman et al., 2023; Vidal et al., 2017; Wolf-Jäckel et al., 2021).

VII Célkitűzések

Munkánk során elsődleges törekvésünk volt a hagyományos és új megközelítéseket alkalmazó NGS-könyvtárkészítő módszerek kidolgozása, majd azok alkalmazása a PRRSV molekuláris epidemiológiájában és diagnosztikájában, Ion Torrent és Illumina platformokon végezve az újgenerációs szekvenálást. Ezek megvalósításához a következő célokat fogalmaztuk meg:

- A PRRSV-1- és PRRSV-2-törzsek hazai előfordulásának és diverzitásának meghatározása.
- A PRRSV-2 szerkezeti régiójának vizsgálata hagyományos könyvtárkészítő módszer felhasználásával.
- A kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés és az amplikon-mélyszekvenálás adaptálása és optimalizálása a PRRSV egy-egy adott célrégiójára (ORF5 és ORF7) és teljes genomjára.
- Az amplikon-mélyszekvenálás lehetséges diagnosztikai felhasználási területének felmérése.
- A kapott szekvenációs adatok elemzése, fókuszba helyezve a kvázispecies genetikai diverzitásának felmérését.

VIII Anyagok és módszerek

Az értekezés átláthatóságának érdekében, az anyagok és módszerek fejezetben leírásra kerülő sokféle módszer miatt, az adott módszertani leíráshoz tartozó célkitűzéseinkbe szintén betekintést adunk, továbbá a módszerek ismertetését igyekeztünk témakörök szerint csoportosítani.

8.1 Felhasznált minták eredete

A vizsgálatainkhoz felhasznált PRRSV-1 és PRRSV-2 prototípus vírustörzseit (Lelystad és VR-2332, szövetfelülűszó), a savó, szerv- és orrtampon mintákat, továbbá valamennyi kivont RNS mintát a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága (NÉBIH ÁDI) biztosította. Minden minta hazai sertéslepekről származott, amelyek gyűjtésére a mentesítés keretein belül zajló rutin diagnosztika, vagy PRRSV fertőzés gyanúja miatt került sor.

A Porcilis® PRRS és Unistrain® PRRS vakcinákat (liofilizált formában) Dr. Halas Máté (Prophyl Kft.) és Dr. Bálint Ádám (NÉBIH ÁDI) bocsájtotta rendelkezésünkre.

8.2 Általános molekuláris módszerek

Mivel PhD-munkám tárgya NGS-módszerek alkalmazása és fejlesztése különböző NGS-platformok felhasználásával, így számos különböző módszert használtunk az évek során, főként a PCR, illetve a DNS-könyvtárkészítések terén. Mindazonáltal, függetlenül a célkitűzéstől bizonyos lépések egységesen történtek minden munkafolyamatban, ezért ebben a fejezetben ezeket a módszereket foglaljuk össze.

8.2.1 Virális nukleinsav-kivonás és kvantitatív RT-PCR

Minden, a kutatás során általunk felhasznált vakcina-, savó-, és szövetfelülűszó minta virális nukleinsav kivonása a Nucleospin RNA virus kittel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) történt a gyártó által meghatározott protokoll betartásával. A savóminták esetében a 100 µl mintához 50 µl foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS, phosphate-buffered saline; Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) mértünk, a szövetfelülűszó és vakcina mintákból tisztán 150 µl-t használtunk fel. A kivont nukleinsavat 60 µl nukleázmentes vízben vettük fel, majd felhasználásig –60 °C-on tároltuk. A liofilizált vakcinamintákat kivonás előtt PBS-sel 8x-osra hígítottuk. Bizonyos savóminták, valamint a szerv-, és orrtamponminták RNS-izolálását a NÉBIH ÁDI munkatársai végezték a QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával.

A minták Ct- (cycle treshold, detektálasiciklus-küszöbérték) értékének megállapítására a rutin diagnosztikai eljárásban egyaránt alkalmazott kereskedelmi forgalomban kapható, mindkét PRRSV fajra specifikus, virotype PRRSV RT-PCR Kitet (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk a gyártó utasításait követve.

8.2.2 PCR termékek ellenőrzése és tisztítása

Mindegyik PCR-t tartalmazó munkafolyamat esetében a PCR-termékek hosszának ellenőrzését agarózgél-elektroforézissel végeztük, 1 m/V%-os vagy 1,5 m/V%-os agaróz (Lonza, Basel, Svájc) gélen és 0,5 m/V% trisz-borát-etilén-diamintetraecetsav puffer (TBE, Tris-borate-EDTA; Lonza, Basel, Svájc) felhasználásával. Molekulatömeg-markerként a O'Gene Ruler DNS-létrát (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) használtuk. A GelRed nukleinsavfesték (Biotium, Fremont, CA, USA) segítségével vizualizáltuk a DNS-t, majd a gél átéső UV-fényben vizsgáltuk és az eredményeket CSL-Microdoc Systems géldokumentációs rendszerrel (Cleaver Scientific, Rugby, Egyesült Királyság; Power Shot G12 kamera, Canon, Tokió, Japán) rögzítettük.

Az adott célkitűzésben zajló protolloknak megfelelő mérettartományban (lásd: az adott módszer leírásánál) látható PCR-terméket kimetszettük, majd oszlopos technika (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit; Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Tajvan) segítségével kitisztítottuk a gyártói utasítás alapján. A tisztított DNS-fragmenseket további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

8.3 Ion Torrent szekvenálás

A kísérleteink kezdetén az Ion Torrent Personal Genome Machine® (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) készülék állt rendelkezésre a kutatócsoportnak, ezért a célkitűzések teljesítését ehhez a készülékhez igazítottuk. A későbbiekben a kutatócsoportban az Illumina Nextseq® 500 készülékkel (Illumina, San Diego, USA) történt rutinszerűen az újgenerációs szekvenálás, így a PhD munkafolyamatait és módszereit ennek megfelelően alakítottuk át.

8.3.1 Minták eredete

Az Ion Torrent készülékkel kapcsolatos újgenerációs szekvenáláshoz minden egyes minta a PRRS-mentesítés keretein belül került begyűjtésre a hazai sertéstelepekről.

8.3.2 ORF5 és ORF7 régió felerősítése

Az ORF5 és ORF7 régiók felerősítését a NÉBIH ÁDI munkatársai végezték a PRRSV rutin diagnosztika részeként, a Balka és munkatársai (2008) által publikált, a következőekben leírt protollok szerint (Balka et al., 2008).

A PRRSV-1 ORF5 felszaporítását nested PCR segítségével végeztük, ennek első köréhez, illetve a PRRSV-2 ORF5, valamint az ORF7 egy körben történő felerősítéséhez a QIAGEN One-Step RT-PCR kitet (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk. Mindkét célrégió esetében a PCR-reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 1× Qiagen One-Step puffert, 0,4 mM dezoxinukleotid-trifoszfát keveréket (dNTP), 0,8–0,8 µM forward (F) és reverz (R) primert (**1. táblázat**), 0,16 egység (U, unit) RiboLock RNase inhibitor (Thermo Scientific™, Waltham,

MA, USA), 1 µl QIAGEN OneStep RT-PCR enzim mixet és 2 µl kivont RNS-t. A 50 °C-on 30 percig zajló reverz transzkripció (RT) lépése után a DNS denaturáció 95 °C-on 15 percig tartott, majd az ORF5 esetében 30, míg az ORF7 esetében 40 ismétlődő ciklusból álló amplifikáció (94 °C 30 mp, 52 °C 30 mp, 72 °C 60 mp) következett, végül a reakciót 72 °C-on 5 perces elongáció zárta.

A PRRSV-1 ORF5 nested PCR második körét a TopTaq DNS-polimeráz enzimmel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük. A PCR-rendszer 1× TopTaq PCR puffert, 0,2 mM dNTP-keveréket, 0,4–0,4 µM F és R primert (**1. táblázat**), 0,03 U TopTaq DNS-polimeráz enzimet és 2 µl első körös PCR-terméket tartalmazott 25 µl végtérfogatban. Az amplifikáció hőprofilja a következő volt: 95 °C 3 perc kezdeti denaturáció után 35 ismétlődő ciklussal (94 °C 30 mp, 52 °C 30 mp, 72 °C 60 mp) zajlott a felszaporítás, a végén 72 °C-on 5 percig tartó végső elongációval zárult. A kapott PCR-termékeket oszlopos technikával kitisztítottuk, majd könyvtárkészítést végeztünk.

1. táblázat Az Ion Torrent szekvenálást és a hagyományos könyvtárkészítő módszert magába foglaló vizsgálatokhoz készült ORF5 és ORF7 cél régiók felszaporításához alkalmazott primerek szekvenciái.

Cél régió	Írányultság	Szekvencia (5'–3')	Primer tapadási helye (nt)		
			Lelystad (M96262)	VR-2332 (U87392)	
ORF7	+	CAGCCAGTCAATCARCTGTG	14658–14677	14937–14956	
	-	TCGCCCTAATTGAATAGGTG	15031–15050	15345–15364	
ORF5	1. kör	+	GTTGCTSCATTTTGMTGACAC	13416–13435	-
		-	TATGTIATGCTAAAGGCTAGCAC	14138–14160	-
	2. kör	+	CAATGAGGTGGGCIACAACC	13442–13461	-
		-	ATCGTCTAGGCCTCCCATTG	14085–14104	-
ORF5	+	ACCATGAGGTGGGCAACTGT	-	13721–13740	
	-	TGGAGCCGTGCTATCATGAC	-	14400–14419	

8.3.3 Hagományos könyvtárkészítés

A hagyományos könyvtárkészítés alkalmazásával és az Ion Torrent készüléken történt újgenerációs szekvenálással elsősorban a PRRS-mentesítéshez járultunk hozzá. Célunk volt a módszer egy kiterjedt monitoring programba történő beépítésének a felmérése, fókuszba helyezve az esetleges kevert fertőzések azonosítását a vizsgált sertéstelepeken.

A hagyományos könyvtárkészítéshez a tisztított ORF5 és ORF7 PCR-termékek enzimatis fragmentálását és az Ion Torrent adapterek kapcsolását a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit és az Ion Xpress Barcode Adapters (New England Biolabs, Ipswich, USA) felhasználásával végeztük el. Az indexált könyvtárakat a Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) tisztítottuk, majd E-Gel™ SizeSelect™ II Agarose Gels, 2% (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)

segítségével méretszelektáltuk és a 300–350 bp hosszúságú termékeket visszanyertük. Ezután amplifikációt végeztünk a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit felhasználásával, gyártói utasítások alapján, a következő hőprofilal: kezdeti denaturációt (98 °C 30 mp) követően 12 ismétlődő ciklussal (98 °C 10 mp, 5 °C 30 mp, 72 °C 30 mp) zajlott a felszaporítás és 75 °C-on 5 perces elongációval zárult. Az így keletkezett termékeket újfent tisztítottuk, majd a Qubit® dsDNA BR Assay kit és Qubit® 2.0 fluorométerrel (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) végzett mennyiségi meghatározás után a DNS-könyvtárak klonális amplifikációja az Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kittel (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) történt. Ez a PCR-hez hasonló termociklusos módszer jelen esetben 200 bp hosszúságú, mikrogöngy felszínén rögzített DNS-könyvtárak klonális amplifikálására szolgál egy, a célra fejlesztett készüléken (Ion OneTouch™ 2 System; Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA).

8.3.4 PCR-alapú könyvtárkészítés

Az NGS lehetséges, PRRSV-re irányuló diagnosztikai alkalmazása miatt felmerült az igény egy egyszerűbb, költséghatékonyabb és gyorsabb könyvtárkészítő módszer fejlesztésére, ezért elkezdtünk egy PCR-alapú könyvtárkészítő megközelítést adaptálni az Ion Torrent készülékre.

Ennél a megközelítésnél konvencionális PCR, illetve fúziós primerek (**2. táblázat**) segítségével történt a DNS-szálak ellátása Ion Torrent specifikus adapterekkel és vonalkódokkal, mintánként kétféle kombinációt alkalmazva (A, B). A vonalkódokat az egyik primerpár forward tagjába, míg a másik párnak a reverz tagjába építettük be.

A kísérlethez vagy a NÉBIH ÁDI munkatársai által előállított PCR-termékek, vagy az RNS-ről SuperScript™ III (Invitrogen™) reverz transzkripcióval készített cDNS-t, a gyártó utasításait követve átírt komplementer DNS (cDNS) szolgált mintául. Az RT-t követően az ORF5 felszaporítása Phusion™ High-Fidelity DNS polimeráz enzimmel (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) valósult meg, 25 µl végtérfogatban, amely 1× HF puffert tartalmazott, 0,2 mM dNTP-keveréket, 0,2–0,2 µM F és R primert, 0,02 U Phusion™ DNS-polimeráz enzimet, és 2 µl PCR-terméket vagy cDNS-t. A reakció a kezdeti 98 °C 1 perc denaturáció után 15 (minta: PCR-termék) vagy 35 (minta: cDNS) ismétlődő ciklusból állt (98 °C 10 mp, 50 °C 30 mp, 72 °C 2 perc), és 72 °C 10 percig folyt a végső elongáció. Az ORF7 felszaporítása DreamTaq™ DNS-polimeráz enzim (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) segítségével történt 25 µl végtérfogatban az alábbi összetevőkkel: 1× DreamTaq puffer, 0,4 mM dNTP-keverék, 0,4–0,4 µM F és R primer, 0,1 U DreamTaq DNS-polimeráz enzim és 2 µl PCR-termék vagy cDNS. Az amplifikáció hőprofilja a következő volt: 95 °C 1 perc kezdeti denaturáció után 15 (minta: PCR-termék) vagy 35 (minta: cDNS) ismétlődő ciklussal (95 °C

30 mp, 54 °C 30 mp, 72 °C 1 perc) zajlott a felszaporítás, a végén 72 °C-on 5 percig tartó végső elongációval zárult.

Az így készült DNS-könyvtárakat az Ion PGM™ Template IA 500 Kit (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) segítségével klonálisan amplifikáltuk, ami a korábban leírt hagyományos könyvtárkészítő módszerrel ellentétben izotermális körülmények között, szobahőmérsékleten zajlik, azaz nem igényli speciális készülék használatát a mikrogyöngy-felületen rögzített DNS-könyvtárak klonális felerősítéséhez. Mindemellett, a reakció kevesebb időt vesz igénybe, illetve hosszabb fragmensek (körülbelül 500 bp) amplifikációja lehetséges általa.

2. táblázat Az Ion Torrent készüléken zajló, PCR-alapú könyvtárkészítő módszert magába foglaló vizsgálatokhoz készült ORF5 és ORF7 célrégiók felszaporításához alkalmazott fúziós primerek szekvenciái. A készülékkel kompatibilis adapterszekvenciákat aláhúzott betűkkel emeltük ki, a 12 bp hosszú vonalkód-szekvenciákat egy db félkövér x betűvel jelöltük, a külön nem jelölt részek a PRRSV-specifikus szekvenciák.

Célrégió	Irányultság	Szekvencia (5'–3')
ORF7	A	+ <u>CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG</u> x CAGCCAGTCAATCARCTGTG
		- <u>CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCGCCCTAATTGAATAGGTG</u>
	B	+ <u>CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGCCAGTCAATCARCTGTG</u>
		- <u>CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG</u> x TCGCCCTAATTGAATAGGTG
ORF5	A	+ <u>CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG</u> x ATGAGATGTTCTCACAAATTGGG GCG
		- <u>CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTAGGCCTCCCATTGCTCAGCCGAAGT</u>
	B	+ <u>CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATATGAGATGTTCTCACAAATTGGGGCG</u>
		- <u>CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG</u> x TAGGCCTCCCATTGCTCAGCCG AAGT

8.3.5 Szekvenálás

Akár a hagyományos, akár a PCR-alapú módszerrel történt a könyvtárkészítés, végül a klonálisan amplifikált DNS-könyvtárakat hordozó gyöngyöket Ion OneTouch™ ES (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) készülékkel dúsítottuk, majd elúciót követően Ion 314-es vagy Ion 316-os chipre töltöttük és a szekvenálást az ajánlott szekvenálási protokoll alapján végeztük.

8.4 Illumina szekvenálás

8.4.1 Hagományos könyvtárkészítés

8.4.1.1 ORF2–7 régió felerősítése

Ezzel a módszerrel kapcsolatos célkitűzésünk során arra törekedtünk, hogy a hagyományos könyvtárkészítő módszer felhasználásával segítsük a PRRS-mentesítést, és egyben hozzájáruljunk egy aktuális PRRSV-2-járványkitörés felderítéséhez. A célok teljesítése érdekében, a szimplán ORF5 régió alapultó molekuláris epidemiológiai

vizsgálatokat kiterjesztettük a teljes szerkezeti fehérjéket kódoló genomszakaszra, ezzel az ORF5 és a teljes genom karakterizálása mellett egy alternatív megoldást biztosítva.

8.4.1.1.1 Minták eredete

Az ORF2–7 régiónak a vizsgálatához a minták (savó és orrtampon) olyan hazai nagylétszámú tenyész- és hízóállományokból vagy import hízóalapanyag-szállítmányból származtak, amelyeket összefüggésbe lehetett hozni egy rövid lefolyású PRRSV-2-vakcinatörzs eredetű járványkitöréssel hazánkban. A munkafolyamatokhoz mintaként a NÉBIH ÁDI által kivont virális RNS szolgált.

8.4.1.1.2 RT és konvencionális PCR

A PRRSV-2 ORF2–7, vagyis a teljes szerkezeti régió felerősítéséhez először cDNS-t szintetizáltunk horgonyzott oligo(dT) primerrel (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTAATTWCG-3') és a SuperScript™ III reverz transzkriptázzal (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Az RT reakció 20 µl végtérfogatban tartalmazott 1× First-Strand puffert, 0,5 mM dNTP-keveréket, 1 µM primert, 0,01 M DTT-t, 40 U RiboLock RNase inhibitor (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), 5 mM MgCl₂-t, 200 U SuperScript™ III reverz transzkriptázt és 5 µl kivont RNS-t. Az RT során a primer, dNTP és RNS keverékét 65°C-on 5 percig denaturáltuk, majd 1 percig jégen hűtöttük, ezután hozzáadtuk a többi összetevőt és 50 °C-on 90 percig inkubáltuk, a folyamat pedig 85 °C-on 5 perccel zárult.

Az amplifikációt Phusion™ High-Fidelity DNS-polimeráz enzim (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük 20 µl végtérfogatban a következő komponensekkel: 1× HF puffer, 0,2 mM dNTP-keverék, 0,25–0,25 µM F és R primer (**3. táblázat**), 3% dimetil-szulfoxid (DMSO; Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), 0,0125 U Phusion™ DNS-polimeráz enzim és 1 µl cDNS. A PCR-reakció hőprofilja a következő volt: 98 °C 30 mp kezdeti denaturáció után 35 ismétlődő ciklus amplifikáció (98 °C 10 mp, 66 °C 30 mp, 72 °C 2 perc) következett, majd a végső elongáció 72 °C-on 10 percig tartott.

A keletkező PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd a 3000 bp körüli hosszúságú terméket kivágtuk és tisztítottuk.

3. táblázat A PRRSV-2 ORF2-7 régiójának felszaporításához alkalmazott primerek szekvenciái.

Primer neve	Irányultság	Szekvencia (5'-3')	Primer tapadási helye (nt)*
ORF2-7_F	+	CGKGC GCGCCAGRAAGGGAAAATTTA	11970–11995
ORF2-7_R	-	GCACARTRTCAATCAGTGCCATTAC	15311–15336

* VR-2332 (U87392) törzshöz viszonyítva

8.4.1.1.3 Könyvtárkészítés

A DNS-könyvtárak előállítását a hagyományos, fragmentáláson és ligáláson alapuló (tagmentálás) Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) segítségével végeztük, a minták egyedi jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2-t (Illumina, San Diego, USA) használtuk. A tagmentáló reakcióhoz a 0,2 ng/μl koncentrációra hígított ORF2-7 PCR-termékekhez 5 μl Tagment DNS-puffert és 2,5 μl AmpliconTagment Mix reagenst adtunk. A reakció 55 °C-on 6 percig zajlott, majd 10 °C-ra hűtöttük vissza GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Waltham, USA) készülékben. A megfelelő hőmérséklet elérése után azonnal hozzáadtunk 2,5 μl Neutralize Tagment puffert és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS-könyvtárak elkészítéséhez a reakcióelegy 7,5 μl Nextera PCR Master mixet, 2,5–2,5 μl i5 és i7 index primert és a korábban elkészült tagmentált DNS-t tartalmazott. A PCR 95 °C 30 mp kezdeti denaturáció után 12 cikusból állt (95 °C 10 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 30 mp), amit egy 72 °C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 10 °C-ra. Az elkészült indexált DNS-könyvtárakat a fentebb már említett oszlopos tisztítási technikával tisztítottuk.

8.4.2 Kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés

Mint ahogy arra az irodalmi áttekintésben kitértünk, az Illumina rendszerek esetében viszonylag hamar megjelent egy alternatív megközelítés az egyszerűbb és gyorsabb, továbbá kevesebb költséggel járó könyvtárkészítés elvégzéséhez. Ezen módszerek mellőzik a kereskedelmi forgalomban kapható, fragmentáláson és ligáláson alapuló kitek használatát, helyette egy-, vagy kétlépéses PCR-en nyugvó eljárásokat alkalmaznak. Kutatómunkánk során a PRRSV genetikai vizsgálatához kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítést adaptáltunk (2. ábra, 35.o.).

8.4.2.1 PCR-1

Függetlenül a célkitűzéstől, vagyis, hogy egy adott célrégió vagy a teljes genom vizsgálata valósul meg az amplikon-mélyszekvenálással, a PCR-1 során alkalmazott fúziós primerek 5' végén, a PRRSV-specifikus primerrégió előtt helyezkednek el az Illumina rendszerek szekvenáló primerei (4. táblázat).

4. táblázat. A kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés PCR-1 lépésében alkalmazott fúziós primerek általános felépítése és szekvenciái.

Primer neve	Irányultság	Szekvencia (5'–3')
Rd1 SP	+	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG[célrégió-specifikus szekvencia]
Rd2 SP	-	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG[célrégió-specifikus szekvencia]

8.4.2.1.1 ORF7 régió felerősítése

Az ORF7 régiót célzó kísérleteink első lépésként szolgáltak az amplikon-mélyszekvenálás adaptálására PRRSV-re specifikusan, illetve a módszer laborkörnyezetünkbe történő integrálására. A választott régió a módszer optimalizálásán és lehetséges diagnosztikai alkalmazásán kívül egyaránt betekintést nyújtott a PRRSV-fertőzés molekuláris epidemiológiájába és a kórokozó mikroevolúciós mechanizmusába.

Minták eredete

Az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás módszerfejlesztéséhez első körben a két prototípus törzset (PRRSV-1: Lelystad, és PRRSV-2: VR-2332) használtuk fel, illetve a PCR-alapú könyvtárkészítés relatív szenzitivitásának megállapításához mindkét törzsből készítettünk egy hígítási sort (hígítási fok: 10^0 – 10^{-9}) PRRSV PCR-negatív malacsavóban (spike-in minták).

A módszer tesztelését, lehetséges diagnosztikai és mentesítést elősegítő lehetőségeinek felmérését klinikai mintákon egyaránt elvégeztük, amelyhez 15 db savómintát válogattunk össze a NÉBIH ÁDI által archivált, a mentesítés során gyűjtött mintákból. Az adott telepekről, több különböző állatból származó mintákat pooloztuk, így eredményeinket a későbbiekben az adott sertéslelep összességére interpretáltuk. Előzetes diagnosztikai vizsgálatok alapján, az ORF5 szekvencia elemzésével a minták összesen 10 különböző PRRSV-1-kládba tartoztak, ami biztosította, hogy a tervezett ORF7 specifikus primerek és a PCR-rendszer reakcióképességét széles genetikai diverzitást lefedve vizsgálhassuk.

Az ORF7 primerek specifitásának ellenőrzéséhez különböző, állatorvosi jelentőséggel bíró sertésmegbetegedésekért felelős kórokozók, mint a sertés-herpeszvírus 1, sertés-parvovírus 1, sertések járványos hasmenésének vírusa, klasszikus sertéspestis vírusa, sertés-teschovírus, sertés transzmisszibilis gastroenteritis vírusa, sertés-circovírus, sertés-pestivírus és sertés-rotavírus kivont nukleinsavmintáit használtuk fel, amelyeket a NÉBIH ÁDI biztosított.

Primertervezés

Az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás esetében célunk volt egy univerzális primerpár tervezése, ezért összeállítottunk egy szekvencia-adatsort, melyhez 466 db PRRSV-2 és 90 db PRRSV-1 teljes genom rekordot töltöttünk le a génbankból. A nukleokapszid, mint az egyik legkonzervatívabb fehérjét kódoló ORF, lehetőséget nyújtott mindkét PRRSV fajra specifikus primerpár megalkotására (**5. táblázat**). A tervezett primerek és azok PRRSV-1-re és PRRSV-2-re illeszkedő tapadási helyeinek szekvencia képe az **3. ábrán** látható. A primerek mindkét faj esetében a nukleokapszid start kodonjától 5' irányban (20 bp), míg a stop kodonjától 3' irányban (Lelystad: 35 bp, VR-2332: 75 bp) tapadnak, ezzel biztosítva, hogy a szekvenálás során a teljes ORF7 régió nukleotidsorrendje meghatározható legyen.

5. táblázat Az ORF7 vizsgálatához tervezett fúziós primerek szekvenciái és tapadási helyei a két PRRSV prototípus törzshöz viszonyítva.

Primer neve	Írányultság	Szekvencia (5'–3')	Primer tapadási helye (nt)	
			Lelystad (M96262)	VR-2332 (U87392.3)
ORF7_FA	+	[Rd1 SP]AGCTGTTAARCRRGGAGTGGT	14563–14583	14854–14874
ORF7_R1	-	[Rd2 SP]CTAATTGAATAGGTGACTYAGAGGC	15021–15045	15335–15359



3. ábra Az ORF7 fúziós primerek PRRSV-specifikus tapadási helyeinek szekvencialogója a PRRSV-1 (n=90) és PRRSV-2 (n=466) alkotta többszörös szekvenciaillesztések tekintetében.

RT-PCR (PCR-1)

Az ORF7 régió felszaporításához a QIAGEN OneStep RT-PCR kitet használtuk (Qiagen, Hilden, Németország) 25 µl végtérfogatban, 1× QIAGEN OneStep RT-PCR pufferrel, 0,4 mM dNTP-keverékkel, 0,6–0,6 F és R primerrel, 4 U RiboLock RNase inhibitorral (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA), továbbá 1 µl QIAGEN OneStep RT-PCR enzim mix és 2 µl kivont RNS hozzáadásával. A reakció RT lépése 50 °C 30 perccel kezdődött, amit egy 95 °C 15 perces lépés követett, ezután a termék amplifikációja 35 ismétlődő ciklusig (94 °C 30 mp, 57 °C 30 mp, 72 °C 60 mp) zajlott, majd a végső elongáció 72 °C-on 5 percig tartott.

A keletkező PCR-termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd az 550 bp hosszúságú terméket kivágtuk és tisztítottuk. A felszaporított ORF7 hossza 483–489 bp, a többi a hozzá kapcsolt szekvenáló primerek és vonalkódok (körülbelül 135 bp).

8.4.2.1.2 Teljes genom felerősítése

Az egy adott célregióra (ORF7) fókuszáló amplikon-mélyszekvenálási megközelítést következő lépésben kiszélesítettük a teljes genomra. Ehhez az ARTIC network által fejlesztett, átfedő amplikonokat felszaporító multiplex PCR-t adaptáltuk. Célunk volt a módszer beépítése a PRRSV-vakcinatörzsek, nevezetesen a Porcilis és Unistrain PRRS genetikai stabilitásának ellenőrzésébe, illetve a kvázispecies genetikai diverzitásának felmérésébe.

Minták eredete

Ennek a kísérletnek a lebonyolításához összesen 3 db különböző gyártási tételből származó Porcilis® PRRS (A220CE01, A220AD01, A221AE01), és egy Unistrain® PRRS (09G8K) vakcinát használtunk fel.

Primertervezés

Habár a multiplex PCR-rendszer kidolgozása során a PRRSV-specifikus primerek tervezésénél a Porcilis-vakcinatörzssre koncentráltunk, az Unistrain-vakcinatörzzsel mutatott nagymértékű nt azonosság (94,8%) lehetővé tette, hogy a primerek mindkét törzzsel kompatibilisek legyenek.

A primertervezés első lépéseként a génbankból olyan teljes genomokat töltöttünk le, amelyek >95%-os nt azonosságot mutattak a két referenciavakcinatörzzsel (Porcilis, KF991509 és Unistrain, GU067771). A határérték megszabásánál figyelembe vettük, hogy több PRRSV-vakcinatörzs esetében a közlemények szerint az ORF5 régió megfigyelt 5%-os nt eltérés még vakcinaleszármazott törzset jelez, továbbá úgy véltük, hogy ilyen feltételezett genetikai diverzitás mellett a legtöbb sertéstelepen keringő Porcilis- és Unistrain-vakcinaleszármazott törzs vizsgálható lesz (Bálint et al., 2021; Kikuti et al., 2021).

A multiplex PCR-hez szükséges primerek tervezését a PrimalScheme webserver segítségével végeztük (<https://primalscheme.com/>, 2024.01.29.) (Quick et al., 2017), a korábban említett teljes genom adatsorból generált többszörös szekvenciaillesztések (más néven alignment) konszenzus szekvenciáját felhasználva (határérték: 90% nt azonosság). Az amplikonméretet úgy parametrizáltuk, hogy mindegyik termék megfeleljen az Illumina leghosszabb read leolvasási keretének: paired-end 2x300 bp, ami elméletileg 600 bp hosszágú termék szekvenciameghatározását teszi lehetővé. Az algoritmus által meghatározott primereket felülvizsgáltuk, különös tekintettel a lehetséges primerdimerek kialakulására, a termék hosszára, illetve degenerált nukleotidok szükségességére.

A folyamat végén összesen 34 db amplikont (68 db primer) határoztunk meg, melyekkel a Porcilis- és Unistrain-vakcinatörzsek teljes genomja 100%-os lefedettséggel felszaporítható és szekvenálható (**1. melléklet**, 119.o.). Az amplikonok mérete 544 és 583 bp között változott.

Mivel multiplex PCR-rendszerrel szaporítjuk fel a két vakcinatörzs teljes genomját, így a primerszettet (100 µM) két részre (páratlan és páros számú amplikonokat felerősítő szettek, azaz poolA1 és poolA2) bontottuk, majd 10×-re hígítottuk a poolokat (10 µM). Továbbá az optimalizálás érdekében három különböző módon változtattuk a primerek relatív mennyiségeit az adott poolokban (poolA v1, v2, v3) (**1. melléklet**, 119.o.).

RT és multiplex PCR (PCR-1)

A cDNS-szintézis random hexamer és oligo (dT)18 primereket tartalmazó SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) segítségével történt. A kezdeti 65 °C 5 percig tartó denaturáció 11 µl nukleázmentes víz és 5 µl kivont RNS keverékével zajlott,

majd 4 µl Master Mix hozzáadását követően a reakció az alábbi hőprofillal folytatódott: 25 °C 10 perc, 50 °C 10 perc és 85 °C 5 perc.

A teljes genom felerősítéséhez a Q5U® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase kitet (New England Biolabs, Ipswich, USA) használtuk, a poolA1 és poolA2 primerszettel külön-külön végrehajtva a reakciót. A 25 µl végtérfogatú PCR reakcióelegy 1× Q5U Reaction puffert, 0,2 mM dNTP-keveréket, 1,3 µl poolA1 vagy poolA2 primerszettet (10 µM, per primer koncentráció: 0,015 µM), 0,02 U/µl Q5U Hot Start High-Fidelity DNS-polimeráz enzimet és 2,5 µl cDNS-t tartalmazott. A PCR-t az alábbi hőprofillal kiviteleztük: 98 °C 30 mp kezdeti denaturáció után 30 ismétlődő ciklus következett (98 °C 15 mp és 65 °C 5 perc).

A PCR-termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd kivágtuk és tisztítottuk. A tisztított poolA1 és poolA2 termékeket mintánként vegyítettük majd 100×-ra hígítottuk a PCR-2-reakcióhoz.

8.4.2.2 PCR-2

Függetlenül a célkitűzéstől, vagyis, hogy egy adott célrégió vagy a teljes genom vizsgálata valósul meg az amplikon-mélyszekevenálással, a PCR-2 során alkalmazott vonalkód-szekvenciákat is tartalmazó primerek (vonalkódoló primerek) egységesek (**6. táblázat**). Tartalmazzák a linker szekvenciát, amely a PCR-1-termékhez kapcsolódást szolgálja az Illumina szekvenáló primer régió területén, az i5 and i7 vonalkódokat (Nextera XT Index Kit v2 Set C; Illumina, San Diego, USA), illetve a P5 és P7 adaptereket (**2. ábra**, 35.o.).

6. táblázat. A kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés PCR-2 lépésében alkalmazott vonalkódoló primerek szekvenciái. A linker szekvenciák dőlttel, az adapterek vonallal vannak kiemelve.

Primer neve	Írányultság	Szekvencia (5'–3')
P5_i5	+	<u>AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC</u> [i5] <u>TCGTCGGCAGCGTC</u>
P7_i7	-	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT</u> [i7] <u>GTCTCGTGGGCTCGG</u>

Minden vonalkód külön primerben található, ezzel biztosítva, hogy minden mintát egyedi azonosítóval lehessen ellátni, így a Nextera XT Index Kit v2 Set C-t teljesen lefedve 8 db F primerrel (P5_i5) és 12 db R primerrel (P7_i7) dolgoztunk (**2. melléklet**, 121.o.).

A PCR-2-t a Q5U® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) segítségével végeztük, a következő reakcióelegy összetétellel, 25 µl végtérfogatban: 1× Q5U Reaction puffer, 0,2 mM dNTP-keverék, 0,5–0,5 µM F és R vonalkódoló primer, 0,02 U/µl Q5U Hot Start High-Fidelity DNS-polimeráz. A hozzáadott minta az ORF7 vizsgálatához 5 µl tisztított, hígítatlan PCR-1-termék, míg a teljes genom vizsgálatához tisztított majd 100×-ára hígított PCR-1-termék. A PCR-2 hőprofilja a következőképpen nézett ki: 98 °C 30 mp denaturáció után 30 ismétlődő ciklus amplifikáció (98 °C 20 mp, 55 °C 15 mp, 72 °C 60 mp), majd a végső elongáció 72 °C-on 5 percig zajlott.

Az ORF7 és a teljes genom vizsgálatában a PCR-2-termékeket 1,5 m/V%-os és 1 m/V%-os agaróz gélben történő ellenőrzését követően a termékeket kivágtuk és tisztítottuk. Az így kapott végtermék az amplikon DNS-könyvtár.

8.4.3 Szekvenálás

A tisztított hagyományos és amplikon DNS-könyvtárak mennyiségi mérését a Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) segítségével kiviteleztük. A megfelelő koncentrációra történő hígítás, majd poolozás után a denaturált termékeket 1,5 pM (hagyományos) és 20 pM (amplikon) végső koncentrációra állítottuk be és 35% PhiX kontrollt mértünk hozzá.

A hagyományos DNS-könyvtárak szekvenálása Illumina® Nextseq 500 (Állatorvostudományi Kutatóintézet, Új kórokozók felderítése témacsoport, Budapest) készüléken történt, NextSeq 500/550 Mid Output flowcell-re töltve.

Bizonyos amplikon DNS-könyvtárak (ORF7 spike-in minták) újgenerációs szekvenálását egyedül az Illumina® ISeq100 készüléken az iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle; Illumina, San Diego, USA) kittel (Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Budapest) végeztük el, míg a végleges futtatások (ORF7 savóminták, teljes genom vakcinaminták) Illumina® Miseq600 készüléken (Debreceni Egyetem, Egészségtudományi Kar, "Egy Egészség" Intézet, Debrecen) történtek a MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle; Illumina, San Diego, USA) kit felhasználásával, mindkét esetben paired-end beállítással. A 2x300 bp leolvasási kerettel dolgozva maximum 600 bp hosszúságú amplikon meghatározása lehetséges, ehhez mérten mind az ORF7, mind a teljes genom átfedő amplikonjai teljes hosszukban összeállíthatók.

8.5 Szekvenciaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek

8.5.1 Szekvenciaillesztés és annotálás

Az újgenerációs szekvenálás során kapott „nyers” szekvencia readok feldolgozása a Geneious Prime® (verzió: 2022.2.2) programban történt (Biomatters Ltd., Új-Zéland; (<https://www.geneious.com/>, 2024.01.29.)).

A hagyományos könyvtárkészítő módszerrel feldolgozott mintákhoz tartozó readokat minőségi szűrésnek vetettük alá (rossz minőségű vagy túl rövid readok kizárása, adapter régiók levágása), majd az adott vizsgálatban résztvevő genomi régiókat referencia szekvenciához történő szekvenciaillesztéssel (Geneious saját algoritmusát alkalmazva, közepes érzékenységi beállítással) állítottuk össze.

Az amplikon DNS-könyvtárakból eredő readok közül kizártuk a 75 bp-nál kisebbeket és a Q10 vagy Q30 (Phred score) alatti minőségűeket, továbbá a fals szekvenciaeredmény elkerülése miatt az összes primer régiót (adapterek és a PRRSV-specifikus szekvencia

szakaszok) levágtuk. Ezeket a Geneious programba beépített BBDuk algoritmussal végeztük, kisebb változtatásokkal követve a Geneious ajánlásait (<https://help.geneious.com/hc/en-us/articles/360045070991-Assembly-of-SARS-CoV-2-genomes-from-tiled-amplicon-Illumina-sequencing-using-Geneious-Prime>, 2024.01.10.). A BBDuk beállításában a Kmer hossz 13-ra, a maximum szubsztitúciót 3-ra, a maximum szubsztitúció + indel mutációt 2-re állítottuk, és ezt a két további parancsot adtuk meg: `rcomp=f restrictleft=32` (Geneious felületén található parancssor: `java.exe -ea -Xmx1000m -cp ..\bbmap.jar jgi.BBDuk2 rcomp=f restrictleft=32 ktrimleft=t k=15 hdist=3 edist=2 mink=10`). Hogy megfelelően működjön a PRRSV-specifikus primerszekvenciák levágása, a betöltött primertáblázatban a szekvenciákban levő degenerált nukleotidpozíciókat az egyik megfeleltethető nukleotidra cseréltük. Az amplicon DNS-könyvtárak read adatainak feldolgozása során a readeket a Geneious programba beágyazott Minimap2-vel illesztettük a referencia szekvenciákhoz, mivel ez az algoritmus hatékonyabban tudja kezelni a kiméra szekvenciákat, melyek jelenlétére utaló jeleket tapasztaltunk előzetes vizsgálatainkban.

Amennyiben a klinikai mintákban több PRRSV variáns jelenlétét figyeltük meg a konszenzusok összeállítása során, a Contig fájlban látott eltérő readek alapján a génbank adatbázisában BLASTn algoritmussal (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch, 2024.01.29.) új referencia szekvenciát kerestünk, majd párhuzamos szekvenciaillesztéssel igyekeztünk mindkét előforduló konszenzus szekvencia összeállítását megkísérelni az adott mintában. Az egy referenciához történő szekvenciaillesztés során meghatározott szekvencia a major konszenzus, míg az emellett található szekvenciavariáns a minor konszenzus.

A kapott konszenzus szekvenciákat manuálisan ellenőriztük és javítottuk, majd annotáltuk. Referencia szekvenciaként az alábbi génbanki rekordokat használtuk: Porcilis MLV-DV (KJ127878), Porcilis DV (KF991509.2), Lelystad (NC_043487), VR-2332 (EF536003, U87392), Ingelvac MLV vagy más néven RespPRRS MLV (AF066183).

Az általunk meghatározott PRRSV-szekvenciákat feltöltöttük a génbankba, a génbanki azonosítókat az adott célkitűzés eredményeinél írjuk le.

8.5.2 SNV azonosítás

Az NGS-adatok alapján az adott mintákban fellelhető SNV változatosság felméréséhez a szigorúbb minőségi szűréseken átmenő readeket használtuk fel (Q30) (BBDuk paraméterei: `rcomp=f restrictleft=32 ktrimleft=t k=15 hdist=3 edist=2 mink=10 qtrim=rl trimq=30 minlength=75 ordered=t qin=33`). Az SNV pozíciókat a Geneious program beépített algoritmusával („Find Variations/SNPs”) kerestük, 1% vagy 10% gyakorisági határértékkel (részletesebben lásd az adott célkitűzés eredményeinél).

A genetikai változatosság megállapításán túl SNV-keresést és -vizsgálatot abban az esetben hajtottunk végre, ha több PRRSV-variánst határoztunk meg az adott klinikai mintákban. Ilyenkor a két konszenzus összerendezése után megállapítottuk a nt különbségeket, majd ezeket a major konszenzushoz illesztett Contig fájlban összeegyeztettük az SNV találatokkal (ebben az esetben az SNV nagyrészt megegyezik a minor konszenzus szekvenciájával), és az átlagos nt gyakoriság szerint megállapítottuk a mintában található két törzs egymáshoz viszonyított arányát.

8.5.3 Filogenetikai, nukleotid- és aminosavszekvencia-elemzések

A végleges konszenzus szekvenciák, illetve az adott célkitűzésnek megfelelően összeválogatott nukleotid- és aminosavszekvencia-adatsorok összerendezését a MUSCLE (rövid genom szakaszok) vagy a MAFFT (hosszabb régiók és teljes genomok) algoritmusokkal végeztük az AliView vagy Geneious programok segítségével (Katoh és Standley, 2013; Larsson, 2014).

A filogenetikai kapcsolatok rekonstrukciója a szekvencia-adathalmazok nagyságától függően vagy a MEGA X szoftverrel vagy az IQ-TREE webszerverrel történt (Kumar et al., 2018; Trifinopoulos et al., 2016). A szubsztitúciós modellek kiválasztása a Bayes-i kritériumrendszer szerint történt, a törzsfák készítéséhez maximum-likelihood módszert választottunk és a megbízhatóságot bootstrap-elemzésekkel biztosítottuk (Hoang et al., 2018; Kalyaanamoorthy et al., 2017; Kumar et al., 2018).

A szekvenciák közötti páronkénti nt azonosság értékeit a MEGA X programban, a *p*-distance módszerrel számoltuk ki (Kumar et al., 2018). Az N-glikozilációs pozíciók becslését a NetGlyc 1.0 Server segítségével végeztük (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) (Gupta és Brunak, 2002). A lehetséges rekombinációk jelenlétét az RDP5 szoftverrel ellenőriztük (Martin et al., 2021).

A PRRSV-1-törzsek ORF5 génjére ható szelekciós nyomás becslését a Datamonkey webszerverén elérhető FEL, SLAC és FUBAR algoritmusokkal végeztük (Weaver et al., 2018). A becsült pozitív vagy negatív szelekciós nyomást az adott egyedi as pozíciókban abban az esetben fogadtuk el, ha mindhárom algoritmus szignifikánsnak mutatta. A FEL és SLAC esetében $p < 0,1$ szignifikancia szint, a FUBAR esetében pedig $> 0,9$ poszterior valószínűség volt a kritérium.

8.5.4 Szekvencia-adatsorok

A PRRSV-1- és a PRRSV-2-törzsek hazai elterjedésének, valamint molekuláris epidemiológiájának leírásához az ORF5 szekvenciákat a NÉBIH ÁDI biztosította.

A 2003–2020-ig tartó időszakból származó PRRSV-1 ORF5 szekvenciagyűjtemény több mint 2600 szekvenciát tartalmaz, azonban ezek nagy része ismétlődő szekvencia, melyek közt a rutin diagnosztika alatt ugyanazon vírustörzsek visszaizolált változata, továbbá a vakcinázás

következményeként visszaizolált vakcinatörzsek egyaránt megtalálhatók. Az adatsorból kiválasztottunk egy reprezentatív adathalmazt, azokat a szekvenciákat megtartva (index szekvenciák), amelyek sertéstelepenként egyedinek számítottak, azaz több mint 2%-os nt eltérést mutattak a korábban azonosított szekvenciaváltozathoz képest. Összességében 301 db ORF5 szekvenciát magába foglaló adathalmaz segítségével vizsgáltuk a PRRSV-1 hazai elterjedését.

A 2005–2020-ig tartó időszakból származó PRRSV-2 ORF5 szekvenciagyűjtemény 44 db szekvenciát tartalmaz. Mivel a PRRSV-2 előfordulása hazánkban sporadikus, ezért az összes szekvenciát bevontuk a vizsgálatainkba. A PRRSV-2-törzsek lineage-ekbe történő besorolását a Dr. Mang Shi által biztosított ORF5 adatsorral végeztük (n=841).

8.5.5 Epidemiológiai vizsgálatok

Mind a PRRSV-1, mind a PRRSV-2 esetében a hatóság, illetve a mentesítési program illetékesei folyamatosan törekedtek az adott sertéstelepeken megjelenő vírustörzsek származásának visszakövetésére. Ehhez felhasználásra kerültek az importengedélyek, a szállítmányok dokumentációja (TRACES bizonyítványok), a szállító járművek mozgásának követése (például élő- és vágóhídi állatoké, takarmányé), továbbá a belépő személyek nyilvántartása.

IX Eredmények

9.1 A hazai PRRSV-törzsek elemzése

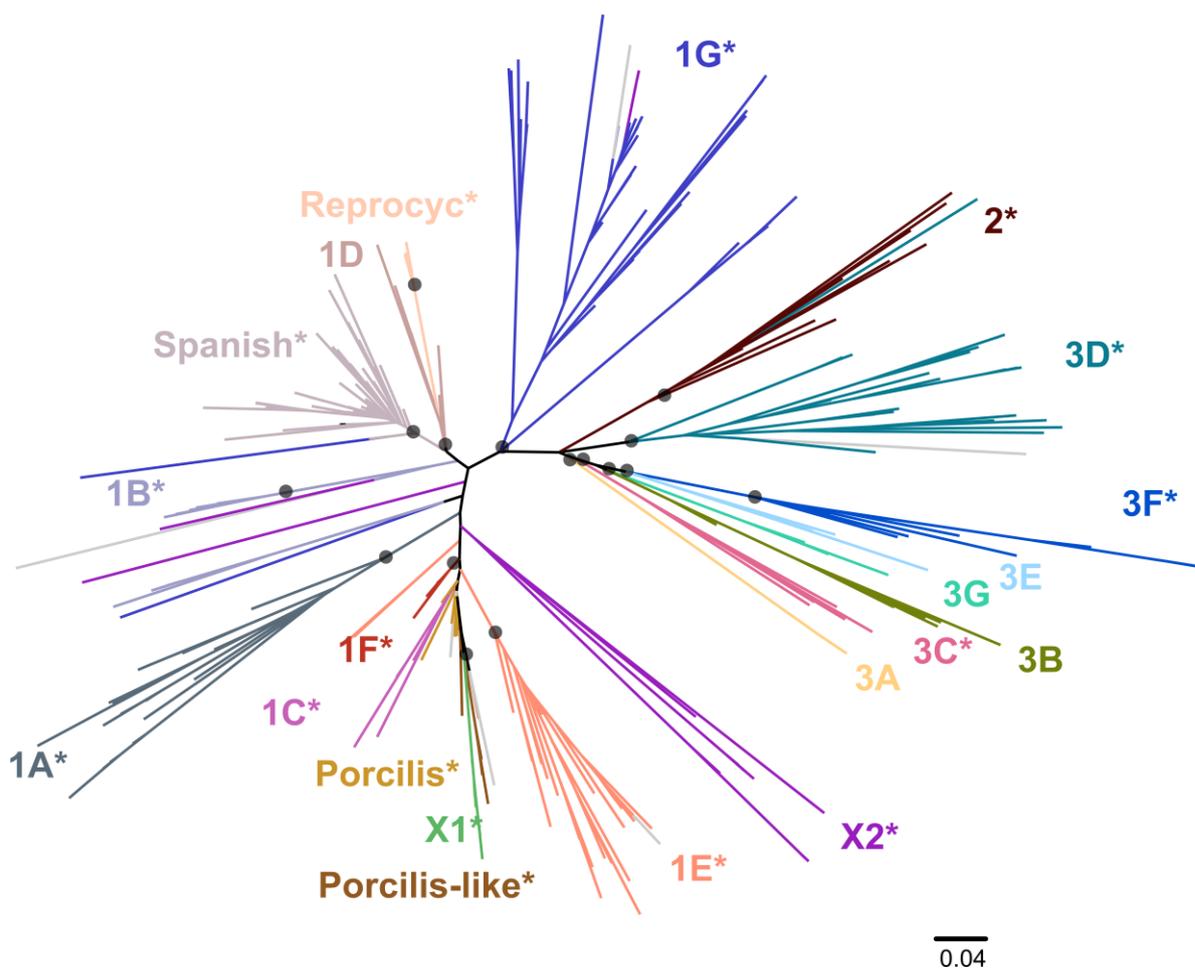
A PRRS sikeres eradikációjának fenntartása érdekében különösen fontos a törzsek elterjedését felmérni és folyamatos nyomonkövetésük feltételeit megteremteni. Ennek az igénynek eleget téve elkészítettük mind a PRRSV-1, mind a PRRSV-2 magyarországi vírustérképét reprezentatív ORF5 adatsorok filogenetikai elemzésének segítségével. Az évtizedek alatt összegyűjtött ORF5 nukleotidszekvencia és származtatott aminosavszekvencia-adatok összehasonlításával további információt kaptunk a keringő vírustörzsek genetikai változatosságára vonatkozóan.

A disszertációban először a PRRSV-1-, majd a PRRSV-2-vírustörzseivel kapcsolatos eredményeinket mutatjuk be.

9.1.1 PRRSV-1-törzsek ORF5 alapú vizsgálata

Összességében a hivatalos, magyarországi hatóságok, diagnosztikai intézetek, illetve az általunk meghatározott PRRSV-1 ORF5 szekvenciák száma Magyarországon elérte a 2739 db-t (2020. 12. 18-án, Dr. Szabó István személyes közlése alapján). Ezeknek több mint 80%-a a PRRS-mentesítési program kezdete után került kimutatásra. Az azonosított PRRSV-törzsek alapvető rokonsági kapcsolatainak elemzése érdekében szükségszerű volt ennek a kiterjedt adatsornak a szűkítése, kizárólag a genetikai diverzitás szempontjából relevánsnak minősülő szekvenciákat megtartva (index szekvenciák száma: $n=301$). Az index szekvenciák közül a 2003–2012-es időszakból csupán 13 db volt részleges (nt 97–527, 431 bp hosszú), a többi lefedte a teljes ORF5 régiót.

2020-ig bezárólag az index szekvenciák filogenetikai vizsgálata és a hatóságok által végzett járványügyi nyomozás alapján a hazai PRRSV-1-törzsek 16 kládba sorolhatók be az ST-1 (Szubtípus 1) genetikai vonalon belül (**4. ábra**). Egy korábbi tanulmányban meghatározott 10 kládon (1A, 1B, 1C, 1E, 1F, 1G, 2, 3C, 3D, 3F) felül 4, ezidáig be nem sorolt szekvenciák alkotta kládot azonosítottunk (Porcilis, Porcilis-like, Spanish és Reprocyc), illetve leírtunk 2 új kládot (X1 és X2). Az alábbi, Magyarországon előforduló kládok magas támogatottságúak (>96 bootstrap érték) voltak a filogenetikai elemzéseinkben: 1A, 1E, 1F, 1G, 2, 3C, 3D, 3F, X1, Reprocyc és Spanish. Egy-egy szekvencia kérdéses elhelyezkedésén kívül az 1B, a Porcilis, a Porcilis-like, az 1C és az X1 kládok nem alkottak monofiletikus csoportot a rekonstruált törzsfán.



4. ábra A PRRSV-1 ORF5 index szekvenciák (n=301) és egyéb az 1-es szubtypusba tartozó referencia szekvenciák (n=99) filogenetikai elemzése. A törzsfá rekonstrukció maximum-likelihood módszerrel zajlott (IQ-TREE, szubsztitúciós modell: GTR+F+R5, bootstrap: 1000 ultrafast). A kládokat eltérő színekkel jelöltük. A törzsfán a magas támogatottságú elágazásokat (>96 bootstrap érték) (●) szimbólummal tüntettük fel. A hazánkban fellelhető kládokat csillag (★) szimbólummal jelöltük.

A kládokról bővebb információ az **7. táblázatban** olvasható. A legnagyobb genetikai változatosságot a 3D és az X2 kládok mutatták (nt azonosság: 80–100% és 80,9–100%) míg a legkonzervatívabbnak az 1F, illetve a Porcilis és a Reprocyc, azaz két vakcinatörzs-eredetű klád bizonyult (nt azonosság: 99,5–99,8%, 96–100% és 96,5–100%). A Spanish kládon belül helyezkedett el a legtöbb index szekvencia (n=69), a legkevesebb pedig a 2 és 3C kládokban (n=2–2) (**7. táblázat**).

Összesen három vakcinaleszármazott törzsek alkotta kládot határoztunk meg (Porcilis, Reprocyc, Spanish – Unistrain vagy közismerten Amervac), melyek jelenléte nem meglepő, hiszen a hazánkban rendszerint használt PRRSV-1 MLV-vakcinákról van szó. Ezekben a kládokban található ORF5 index szekvenciáknak az adott szülői vakcinatörzshöz viszonyított nt azonossága a következőképpen alakult, Porcilis: 96,8–99,2%; Amervac: 94,2–99,7% és Reprocyc: 97–99%.

Besorolásuktól függetlenül vizsgálva az ORF5 index szekvenciákat az adatsoron belül az átlagos genetikai távolság 12% volt és a bázisok 64,2%-a (389/606 nt pozíció) bizonyult polimorfoknak. Rekombinációt, vagy inszerciós/deléciós mutációt egyik szekvenciában sem tapasztaltunk.

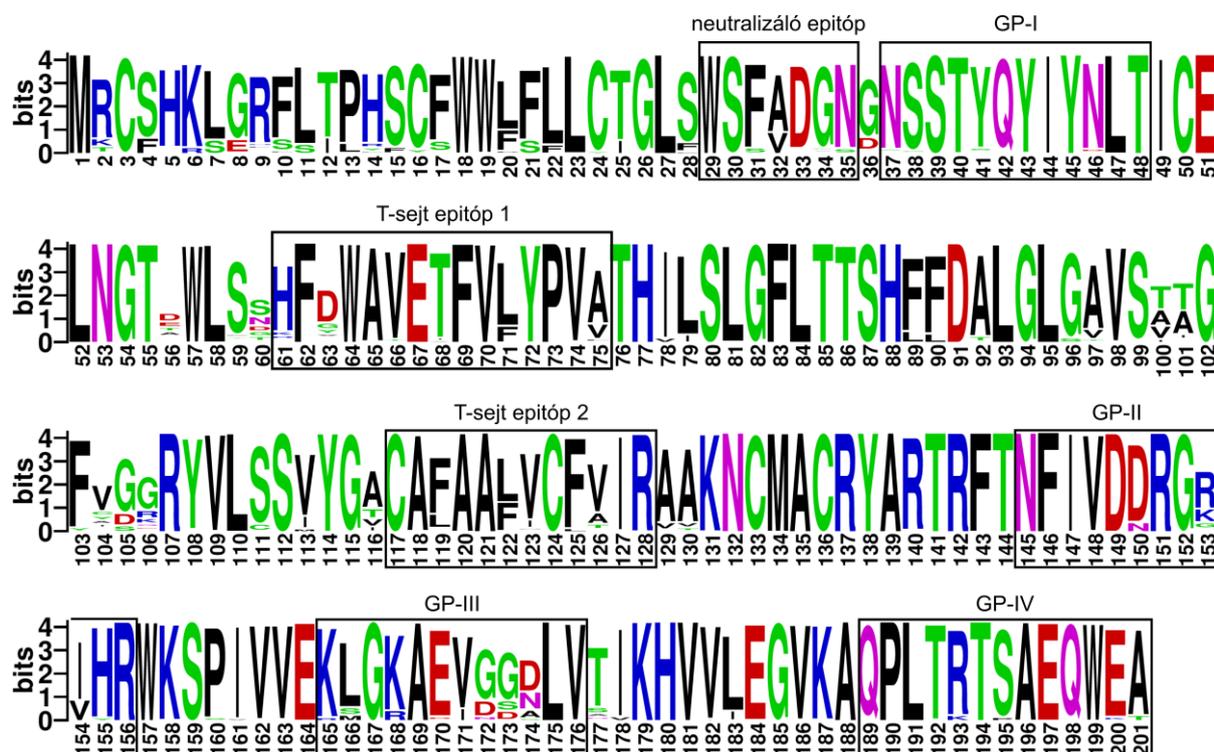
7. táblázat A hazánkban fellelt PRRSV-1-kládok tulajdonságai.

Klád	Először azonosítva (év)	Index szekvenciák (db)	Nt azonosság (min–max%)
1A	2005	21	86,3–99,7
1B	2012	6	84,5–96,4
1C	2009	9	89,3–100
1E	2003	37	87,8–99,8
1F	2014	3	99,5–99,8
1G	2013	56	82,2–100
Porcilis	2009	27	96–100
Porcilis-like	2008	6	92,2–98,8
Spanish	1990-es	69	91,4–100
Reprocyc	2016	11	96,5–100
2	2012	2	89,9
3C	2014	2	90,9
3D	2011	28	80–100
3F	2017	5	92,7–100
X1	2015	6	96,2–98,5
X2	2012	13	80,9–100

A kládok elterjedési mintázata az országon belül eltért, volt olyan klád amelyik egy bizonyos országrészre koncentrálódott, míg más kládok szétszórtan az ország egész területén azonosításra kerültek (**3. melléklet**, 122.o.). Összesítve a PRRS-mentesítés során gyűjtött adatokat azt találtuk, hogy hazánkban a PRRSV-1 terjedéséért elsősorban a fertőzött, importált hízóalapanyag sertések és az országon belül zajló élőállat szállítás felelt.

A PRRS-mentesítési program időszakában végzett epidemiológiai vizsgálatok rámutattak a kládok döntő többségének külföldi eredetére. Az 1A és 1F esetében ez Hollandia, míg az 1G-nek Hollandia, Németország és Szlovákia; a Spanish-nek Spanyolország; az X2-nek Hollandia és Németország; a 2-nek Dánia; a 3C-nek Szerbia; a 3D-nek Hollandia és Németország, a 3F-nek pedig Szlovákia volt az eredete. Az 1B, 1C, 1E, X1 és a Porcilis-like kládokat illetően a PRRSV-1-törzsek származása nem volt megállapítható, vagy nem volt köthető import sertésállományokhoz. Közülük az 1B klád alapító PRRSV-törzse feltételezhetően Nyugat-Európából származó sertésekkel érkezett valószínűleg 2010-ben, azonban ebből az évből szekvenciaadat nem állt rendelkezésünkre és először 2012-ben azonosítottunk ide tartozó variánst. Az első detektált 1C törzs (2009) eredetét nem ismerjük, azonban később egy német import sertésszállítmányból 2015-ben ismét identifikáltuk.

A hazánkban cirkuláló PRRSV-1-törzsek genetikai diverzitását lefedő GP5 származtatott aminosav-szekvenciák vizsgálata során nagy változékonyságot figyeltünk meg, az as pozíciók 73,1%-a (147/201) hordozott valamilyen szubsztitúciót (5. ábra). Ezek közül a következők bizonyultak a legvariábilisabbnak (konszenzus as és az előforduló szubsztitúciók): as56 (D56E/T/A/K/N/Q/H/R/V/S/G/Y/I), as60 (S60N/D/G/T/A/E/I/R/V), as63 (D63G/Y/V/S/N/A/H/P/E), as104 (V104C/Y/A/I/H/S/F/R/L/T), as106 (G106R/K/Q/E/S/N/H) és as153 (R153K/G/M/A/I/L/E/V). Ezenfelül az 56., 60., 100. és 101. as pozíciókban a hasonló arányban előforduló szubsztitúciók miatt konszenzus aminosav megállapítása nem volt lehetséges.



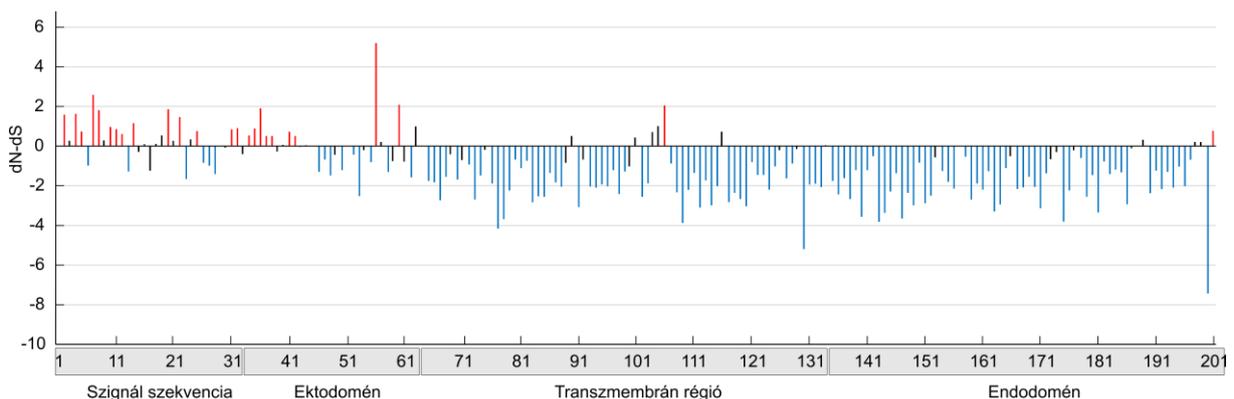
5. ábra A PRRSV-1 ORF5 index szekvenciák (n=301) aminosavszekvencia-illesztésének grafikus ábrázolása. Az egyes as pozíciókban található aminosavak relatív gyakorisága megegyezik az őket képviselő betűk magasságával és az oszlopok összesített magassága jelöli az adott as pozíció konzerváltságának mértékét. A betűk színei az őket jelölő aminosavak kémiai tulajdonsága alapján vannak jelölve, zöld – poláris, lila – neutrális, kék – bázisos, piros – savas, fekete – hidrofób. Az ábra a <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> webszerver segítségével készült.

Noha az egyetlen korábban megállapított neutralizáló epitóp (29WSFADGN35) összességében konzerválnak bizonyult, kevés szubsztitúciót hordozó as pozíciót (S30P, F31S/IC, D33E/A/V/N, G34C/A/S, N35S/D/I/K) azonosítottunk, valamint egy as pozíció (A32V) rendkívül variábilis volt. Nagymértékű diverzitást figyeltünk meg bizonyos as pozíciókban a GP-II (150., 153., 154.) és GP-III (166., 168., 171–174.) antigenikus régiókban, illetve mindkét T-sejt epitópban (61., 63., 71., 75. és 119., 122., 123., 126.). A nyolc cisztein as közül (3., 16., 24., 50., 117., 124., 133., 136.) az 50., 117., 124., és a 136. pozíció bizonyult teljes mértékben

konzerváltak. Összességében nagy aminosav-változatosságot az N-terminális régió elhelyezkedő szignálszekvencia (as1–31) mutatott.

A következő potenciális N-glikozilált pozíciókat találtuk az aminosavszekvencia-adatok elemzésénél: N35, N36, N37, N38, N46 és N53. Mintázatokba rendezve őket a leggyakrabban előforduló az N37–N46–N53 volt, mialatt az N37–N53, N46–N53, N35–N46–N53, N35–N36–N46–N53, N35–N38–N46–N53, N36–N37–N46–N53 és az N37–N38–N46–N53 kevés szekvenciában fordult elő. Irodalmi adatok alapján az N46 és N53 rendszerint konzervált. A magyar törzseknél az N53 mindegyik szekvenciában jelent volt, míg az N46 pozícióban láttunk mutációkat (N46D/K), legnagyobb arányban az 1B (1/6; 16,6%) és a Spanish (8/69; 11,6%) kládokon belül.

A szelekciós nyomás elemzéséhez a Datamonkey webszerverén elérhető különböző algoritmusokat (FEL, SLAC és FUBAR) használtuk. Az összes index szekvencia együttes vizsgálata során az általunk támasztott kritériumoknak 25 (as pozíciók: 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 20, 22, 25, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 56, 60, 106, 201), illetve 124 kodon felelt meg, amelyekre pozitív, illetve negatív szelekciós nyomás hat (**6. ábra**, **4. melléklet**, 123.o.).



6. ábra A magyarországi PRRSV-1 GP5 génre (n=301) ható szignifikáns pozitív és negatív szelekciós nyomás.

Az y-tengelyen a SLAC algoritmus által számolt dN-dS értékek szerepelnek. A kritériumoknak megfelelő (mindhárom módszerrel szignifikáns, $p < 0,1$ szignifikancia szint FEL és SLAC esetében és posterior probability $> 0,9$ a FUBAR esetében) pozitív és negatív szelekció alatt álló as pozíciók piros és kék oszlopokkal vannak kiemelve.

A pozitív szelekciónak kitett pozíciók a GP5 gén első harmadában halmozódtak fel, lefedve az N-terminális szignálszekvenciát és az ektodomén fehérjerégiókat. A transzmembrán, illetve az endodomén fehérjerégiókban csupán egy-egy as pozíció esetében érvényesült pozitív szelekció, ezzel ellentétben a legtöbb negatív szelekciós nyomás alatt álló kodon itt helyezkedett el. Külön-külön kládonként elemezve a szelekciós nyomást, a diverzifikáló szelekció alatt álló egyedi as pozíciók száma a Spanish-ben 6 db (4., 7., 8., 20., 36., 56.), az 1G-ben 4 db (56., 60., 104., 105.), az 1A-ban 2 db (56., 106.), az 1E-ben 2 db (7., 56) volt. Az 1G-ben 56 db, a 3D-ben 54 db, az 1E-ben 54 db, a Spanish-ben 35 db, az X2-ben 25 db, az

1A-ban 20 db, az 1C-ben 5db, az 1B-ben 4 db, a Porcilis-ben 2 db, a Reprocyc-ban 1 db negatív szelekció alatt álló as pozíciót azonosítottunk. Láthatóan a szelekciós nyomás kládonként történő elemzése valamekkora eltérést mutatott a teljes adatsor vizsgálatával kapott eredményekhez képest.

9.1.2 PRRSV-2-törzsek ORF5-alapú vizsgálata

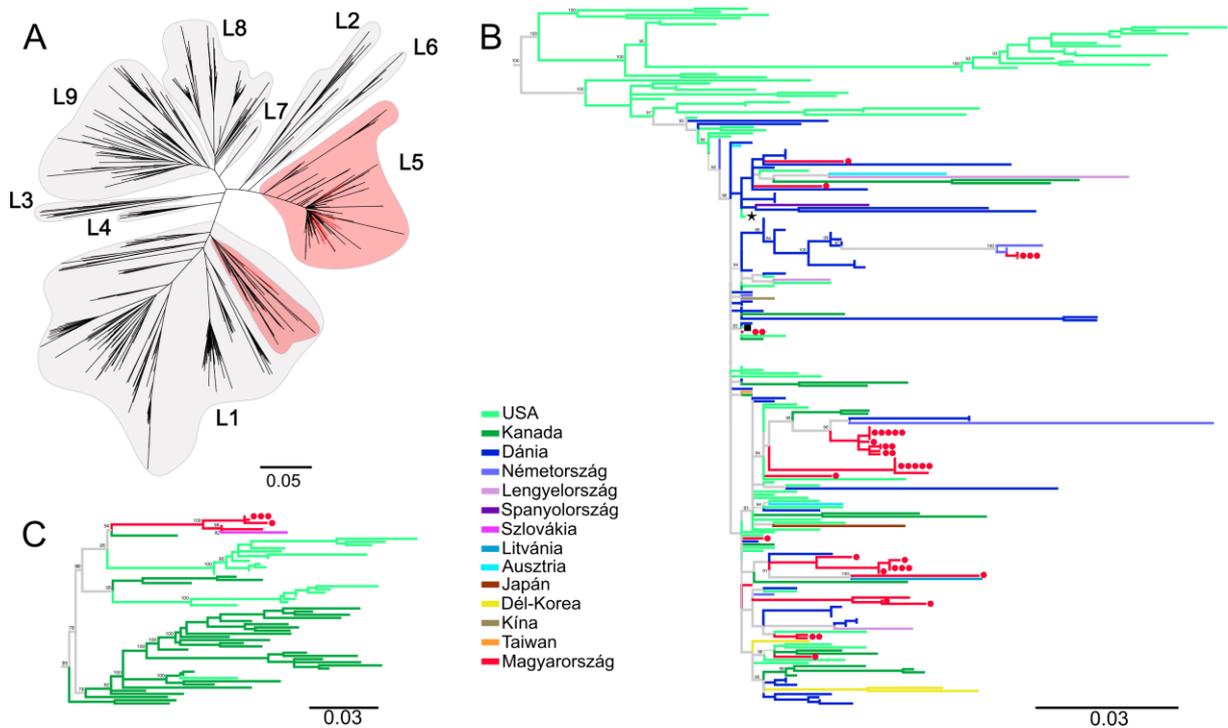
A PRRSV-1-fertőzöttséggel ellentétben hazánkban a PRRSV-2-törzsekre a sporadikus megjelenés jellemző. A PRRSV-2-fertőzéssel kapcsolatos részletes epidemiológiai és klinikai adatok a **5. mellékletben** (124.o.) olvashatók. A 2005-től 2020-ig tartó időszakban 44 db részleges ORF5 szekvencia (nt91–522, 432 bp) határozása történt meg 20 db hazai sertéstelepről, amik az ország területén szétszórva helyezkednek el (**6. melléklet**, 126.o.).

Eltérő gyakorisággal, de majdnem minden évben sikerült a PRRSV-2 jelenlétét kimutatni (**6. melléklet**). Ezzel kapcsolatban szeretnénk megjegyezni, hogy a 2014-től induló PRRS-mentesítési törekvések megnövekedett azonosítási rátával jártak, hiszen nagyobb figyelem fordult a rendszeres monitoringra.

Hazánkban eddig csak az L5 és L1 lineage-ekbe tartozó PRRSV-2-törzseket detektáltunk, az előbbibe a szekvenciák 88,6%-a, az utóbbiba 11,4%-a sorolódott (**7. ábra**).

A filogenetikai elemzés szerint a magyarországi PRRSV-2-törzsek közül az L1-be tartozók (5 db minta, 4 db sertésfarmról) a legközelebbi rokonságot egy szlovák szekvenciával mutatták (nt azonosság a 36M [KC522648] törzshöz: 94,7–99,8%), míg az L5 tagjai (39 db minta, 17 db sertésfarmról) a világszerte előforduló Ingelvac MLV-vakcinatörzsszerű szekvenciákhoz álltak a legközelebb (nt azonosság az Ingelvac MLV-vakcinatörzshöz: 95–100%). A magyarországi L5 szekvenciák nagymértékű nt azonosságot (92,6–100%) mutattak egymással és hasonló nt azonosság (95,6–99%) volt megfigyelhető az L1 szekvenciák között is. A szekvenciaadatok elemzése során nem azonosítottunk inszerciót és deléciót, valamint rekombinációt.

Mind az L5, mind az L1 törzsek hazai megjelenése döntő többségben külföldről importált sertésállományokhoz köthető, illetve spermával történő behurcolásra szintén volt példa (**5. melléklet**). Az L5 esetében egyes fertőzött sertések behozatala olyan országokból történt, főként Dániából és Szlovákiából, ahol az Ingelvac PRRS MLV vakcina használata engedélyezett. Minden meghatározott L1 szekvencia egy adott, 2005-re datálható behurcolási eseményhez köthető, amikor egy nagy integráció egyik sertéstelepén megjelent a vírus majd 2006 és 2013 között másik telephelyeire is áttért. A járványügyi vizsgálatok arra engedtek következtetni, hogy az L1 forrása Szlovákia lehetett.



7. ábra A PRRSV-2 ORF5 szekvenciák filogenetikai elemzése Shi és munkatársai klasszifikációs rendszere szerint (Shi et al., 2010b). A Dr. Mang Shi biztosította globális adatsort a hazai szekvenciák (n=44) mellett kiegészítettük további európai szekvenciákkal (összesen n=977) (A). A maximum-likelihood törzsfarekonstrukció az IQ-TREE webszerver segítségével zajlott (szubsztitúciós modell: TVM+F+R8, bootstrap: 1000 ultrafast). Az L5 (B) és az L1 (C) a dolgozat szempontjából releváns ágait külön feltüntettük. A szekvenciák származási helyeit (ország) különböző színekkel emeltük ki, továbbá a vizsgált magyarországi (●), a VR-2332 (★) és az Ingelvac MLV (■) referenciatörzseket szintén eltérő szimbólumokkal jelöltük.

A PRRSV-2-törzsek GP5 változatosságának felméréséhez az adatsorból kiválogattuk az egyedi származtatott aminosav-szekvenciákat (n=32). A részleges aminosav-szekvenciák (as31–174) nagyfokú hasonlóságot mutattak mind az L5, mind az L1 csoportokon belül (konzervatív as pozíciók aránya az L5-ben 122/144 és az L1-ben 139/144 volt) (8. ábra). Egyes polimorf as pozíciókat eddig kapcsolatba hoztak például az immunválasz elkerülésével (as56–57, as102, as104), vagy a VR-2332 attenuálásakor bekövetkező as cserével (as151, R→G) (Chen et al., 2016; Yuan et al., 2001). A 102. és a 104. as pozícióknál az Ingelvac MLV-törzshöz képest több olyan L5 szekvenciában is aminosav-változást (V102L/F és G104E) figyeltünk meg, melyek klinikai tüneteket mutató, fertőzött sertésállományokból származtak (minta 25004, 47206, 46978 és 40533). Az as151 esetében az L5 szekvenciák döntő többségében bekövetkezett valamilyen aminosav-változás (G151K/V/R) és körülbelül a felükben ez a VR-2332 törzsével megegyező (R151) volt. A GP5 mint az egyik fő neutralizáló antigén számos epitópot hordoz (epitóp B és C, as37–45 és as52–61). Az epitóp B egységes képet mutatott (37SHLQLIYNL45) mindegyik vizsgált szekvenciánál, míg az epitóp C-n belül található hipervariábilis régió (HVR-2, as57–59) változatosnak bizonyult. Kevés és eltérő as pozícióban láttunk szubsztitúciót a T-sejt epitópokban.

Sertéstelep azonosító		30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170																									
	IAF-exp91	ANSYSS	SHLQIYNI	TICELN	GTDLN	NGKED	WAVET	VFVIF	PVLTH	IVSYG	ALTTSH	FLDIT	VGLIT	VSTAGY	LHGR	YVLS	SIYAV	CAALAL	ICFV	IRLT	KNCS	MSWR	YSC	TRYTN	FLD	TGK	LYR	WR	SP	VIT	EKG	GK	VE	EG	HLLI						
L1	B HU21	.SNNN	E	L	V	Y	L	F	R	G				
	D 19678	.SNS	N	V	Y	L	F	R	G					
	A HU12	.SNNN	N	V	Y	L	F	R	G				
	C 4020	.SNDN	N	V	Y	F	G				
	B 102	.SNNN	N	V	Y	F	G			
	VR-2332	.SND	L	AN	S	A	V	FV	T	FA	A	R	R				
	Ingelvac MLV	.SND	L	AN	S	A	V	FV	T	FA	A	G	R			
	D 28663	.NS	L	AN	S	A	V	FV	I	A	A	H	V	R			
	G 32708	.NS	L	AN	S	A	V	FV	I	A	A	H	V	R			
	D 27125	.SND	L	AN	S	A	V	FV	T	FA	A	G	R		
L5	A 7703	.SND	L	AN	S	A	V	FV	T	FA	A	G	R			
	H 50708	.SGN	L	AN	S	A	V	FV	A	T	FA	A	R		
	M 8727	.SAN	L	AN	S	A	A	V	FV	T	FA	A	R	
	K 59074	.SNG	L	N	S	A	V	FV	T	FA	A	R	
	P 32607	.SNN	L	AN	S	A	V	FV	ST	FA	A	R	
	Q 55352_1-5	S.SN	L	ADR	S	A	V	FV	T	FA	A	R	
	Q 55352_16-20	FC.SN	L	ADR	S	A	V	FV	T	FA	A	R
	T 56612_40-44	.SNS	L	AN	S	A	V	FV	T	I	FA	A	R
	T 56612_45-49	.SNS	L	AN	S	A	V	FV	T	I	FA	A	R
	T 56612_81-85	.SNN	L	AN	S	A	V	FV	Q	T	FA	A	H	R
	L 61748	.SNN	L	AN	S	A	V	FV	T	FA	A	R
	O 23920	.SNSN	L	AD	S	A	V	FV	T	FA	A	R
	R 64196	.SNH	L	AN	S	A	V	FV	T	FA	A	R
	I 11033	.SAN	L	AN	S	A	V	FV	T	FA	A	R
	E 273	.N	L	AS	S	A	V	F	T	FV	A	R	
	J 6576	.SAN	L	AN	S	A	V	FF	T	FA	A	R
	N 25004	.GN	L	AN	S	A	V	F	T	FA	A	R
J 42487	.GN	L	AN	S	A	V	F	T	FA	A	R
J 35565	.GN	L	AN	S	A	V	F	T	FA	A	R
S 47206	.SNS	L	ANR	S	A	V	FF	T	FA	A	R
S 46978_1	.SNS	L	ADR	S	A	V	FF	E	T	FA	A	R	
S 40533	.SNG	L	ADR	S	A	V	FF	E	T	FA	A	R
S 46978_4	.SNS	L	ADR	S	A	V	FF	E	T	FA	A	R
F 23090	.NS	L	AN	S	A	V	FV	I	A	A	H	R
		HVR-1	epitóp B	epitóp C	HVR-2						T-sejt epitóp			T-sejt epitóp																											

8. ábra Az egyedi aminosav-szekvenciával rendelkező hazai PRRSV-2-törzsek (n=32), az L1 (IAF-exp91) és L5 (VR-2332 és Ingelvac MLV) referenciatörzsek részleges GP5 (as31–174) aminosavszekvencia-illesztése. Az epitópok (B-sejt epitóp B és C, T-sejt epitópok) és a hipervariábilis régiók (HVR-1 és HVR-2) fekete kerettel és szürke dobozzal vannak jelölve. Piros kerettel a VR-2332 attenuálását mutató pozíció van kiemelve.

A lehetséges N-glikozilált as pozíciók vizsgálata arra engedett következtetni, hogy összesen hat található az általunk vizsgált hazai PRRSV-2-törzsekben (N32, N33, N34, N35, N44 és N51). Közülük az N44 és N51 mindegyik szekvenciában előfordult, továbbá hat különböző glikozilációs mintázatot tudunk meghatározni az adatsorban (**8. táblázat**).

8. táblázat A detektált feltételezett N-glikozilációs pozíciók jelenléte és az általuk alkotott glikozilációs mintázatok előfordulása a hazai PRRSV-2 vizsgált szekvenciákban.

Glikozilációs mintázat	N-glikozilált as pozíciók						Előfordulás aránya (%)	Leszármazási vonal
	N32	N33	N34	N35	N44	N51		
A		+			+	+	34,4% (11/32)	L1, L5
B			+		+	+	25% (8/32)	L5
C				+	+	+	12,5% (4/32)	L1, L5
D	+	+			+	+	9,4% (3/32)	L5
E		+	+		+	+	9,4% (3/32)	L5
F			+	+	+	+	9,4% (3/32)	L1

9.2 Hagyományos DNS-könyvtárkészítés és NGS alkalmazása a PRRSV-törzsek vizsgálataiban

9.2.1 PRRSV-2-járványkitörés vizsgálata

Az előző fejezetben leírtuk a PRRSV-2 előfordulását hazánkban a 2005-től 2020-ig tartó időszakban. Az ezt követő évben (2020 ősz–2021 nyár) az összes további azonosított PRRSV-2-törzs kettő, az Ingelvac MLV-vakcinatörzssel fertőzött import sertésállományok behozatala után kialakult fertőzési láncsal álltak kapcsolatban. Fontos kiemelni, hogy az esettanulmányban érintett összes sertésállomány PRRS-mentes státusszal rendelkezett a megelőző években. Az érintett sertésletelepekről további információk az **7. mellékletben** olvashatók (127.o.).

Ebben a vizsgálatunkban igyekeztünk a hagyományos ORF5 alapú molekuláris epidemiológiai megközelítést az ORF2-7 (teljes szerkezeti fehérjéket kódoló régió) karakterizálásával kiegészíteni (hagyományos DNS-könyvtárkészítés, Illumina készüléken futtatás), ami lényeges információval szolgált egy PRRSV-2 élő attenuált vakcinatörzs genetikai változatosságáról egy olyan országban, ahol az nem endemikusan elterjedt.

Jelen dolgozatban az epidemiológiai vizsgálatok eredményeit röviden fogjuk összefoglalni, a hangsúlyt a genetikai vizsgálatokra szeretnénk helyezni. A PRRSV-2-vakcinatörzs által kiváltott első fertőzési láncban (Eset I.) összesen 5 db nagylétszámú tenyésztelő és hizlalda volt érintett, míg a másodikban (Eset II.) 2 db nagylétszámú hízótelep (**8. melléklet**, 128.o.). A járványok feltételezett kiindulópontja a járványügyi vizsgálatok szerint egy-egy Dániában elhelyezkedő gyűjtőállomásról érkezett sertés szállítmány. Az Eset I-ben a Farm A és Farm B között egyedüli kapcsolatként egy trágyaszállító járművet azonosítottak, így valószínűleg ez

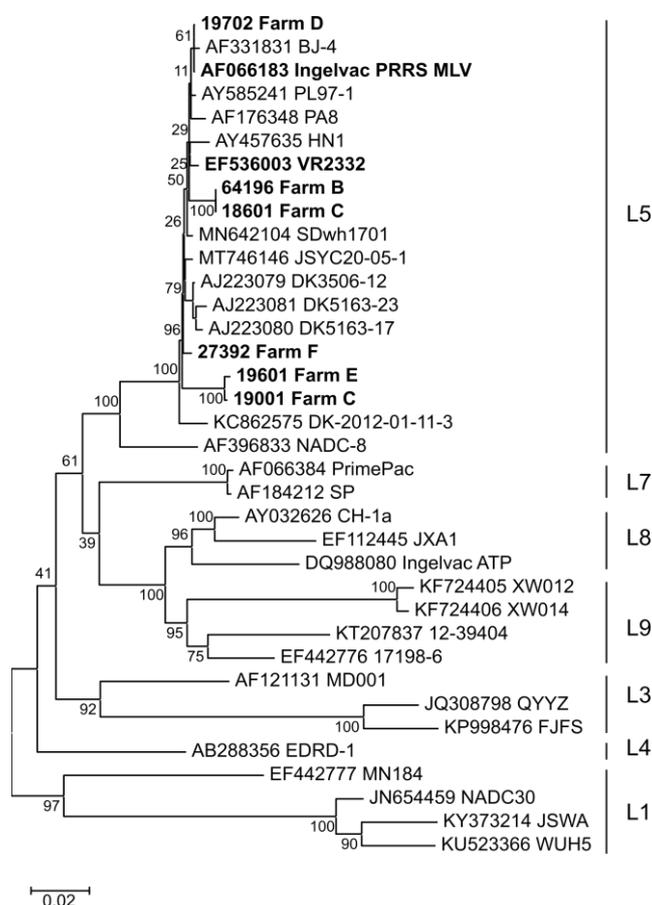
felelt a vírustörzs kezdeti terjedéséért. Lényeges információ, hogy sertések mozgása nem zajlott a Farm B és a gyűjtőállomások, valamint a Farm B és a fertőzési láncokban résztvevő egyéb sertésfarmok között. A Farm B, C és D közötti fertőzés oka elsődlegesen egy vágóhid szállítójárműve lehetett. Az eset idején a jármű felvett fertőzött sertéseket a Farm B telepről, majd folytatta útját, és a Farm D telepnél szintén felvett szállítmányt. Mivel a Farm D telepnek nincs saját mérlege, így a szállítás előtti és utáni mérést a közelben lévő Farm C telepnél végezték el (megszokott gyakorlat volt korábban is) a Farm B telepről származó sertések jelenlétével, ezzel nagy valószínűséggel behurcolták a Farm C telepre a vírust. A Farm C és D közötti vírusátvitel vagy a korábban leírt módon zajlott, vagy a már befertőződött Farm C-ről egy későbbi hízóalapanyag kihelyezéssel. A Farm E telepre egyértelműen a Farm C-ről érkező hízóalapanyag-szállítmány terjesztette a vírust. Az Eset II-ben a Farm F telepre érkező, fertőzött import sertésállomány felelt a közvetlen szomszédságában elhelyezkedő Farm G fertőződéséért.

A részletesebb genetikai elemzések kivitelezéséhez az ORF2–7 régió felszaporítása és szekvenálása sikeresnek bizonyult a Farm B, C, D, E és F sertésfarmokról gyűjtött mintákból (**7. melléklet**, 127.o.). A Farm A feltételezetten fertőzött szállítmányából a tulajdonos részéről diagnosztikai célból nem történt minta beküldése, illetve a Farm G telepről származó mintából nem sikerült a cél régió meghatározása. A kérdéses ORF2–7 szekvenciákat az OR143097–OR143102 azonosítókkal elhelyeztük a génbank adatbázisában.

A meghatározott ORF2-7 szekvenciák hossza egységesen 3188 bp volt, inszerció és deléción mutációt, illetve rekombinációt egyik mintában sem figyeltünk meg. A vizsgált szekvenciák az Ingelvac MLV-vakcinatörzsszel 98,2–99,9% nt azonosságot mutattak és a VR-2332 vad típusú szülőtörzsszel összehasonlítva hasonlóan magas azonosságot (98,1–99,6%) figyeltünk meg (**9. táblázat**). A filogenetikai rekonstrukció megerősítette, hogy minden egyes szekvencia az L5-be tartozik, amelynek az Ingelvac MLV és VR-2332 szintén tagjai (**9. ábra**). Továbbá megállapítottuk, hogy a 64196 és 18601, illetve a 19601 és 19001 szekvenciák egy-egy külön csoportot alkotnak.

9. táblázat A sikeresen felszaporított ORF2–7, a VR-2332 vad típusú törzs és az Ingelvac MLV-vakcinatörzs között megfigyelt nt azonosság értékei (%).

	VR-2332	Ingelvac MLV	64196	18601	19001	19702	19601	27392
VR-2332								
Ingelvac MLV	99,6							
64196	98,8	99						
18601	98,8	99	100					
19001	98,1	98,3	97,6	97,6				
19702	99,6	99,9	99	99	98,3			
19601	98,1	98,2	97,5	97,5	99,7	98,2		
27392	99,3	99,4	98,8	98,8	98,3	99,5	98,2	



9. ábra A PRRSV-2 ORF2–7 nukleotidszekvenciák filogenetikai elemzése. A dolgozatban vizsgált szekvenciák félkövér betűvel vannak jelölve. A maximum-likelihood törzsfá rekonstrukciót a MEGA X szoftverrel, a HKY+G (1000 bootstrap) szubsztitúciós modellel végeztük. A Shi és munkatársai által meghatározott leszármazási vonalak jelölése az ábra jobb oldalán látható (Shi et al., 2010b).

Az ORF2–7 PCR-termékeiből nyert NGS-adatok (átlagos szekvenálási mélység: 8976–22052×) elemzésével fény derült ezeknek a nem közvetlen vakcinázásból származó, sertésletelepeken belül keringő vakcinaleszármazott törzsek víruspopulációjának változatosságára. Vizsgálataink során összesen 77 db SNV-t azonosítottunk

(kritérium: minimum 10% SNV gyakoriság), 10,2% és 50,8% között változó gyakorisági értékekkel a következő mintákban: 19001, 19702, 19601 és 27392 (**10. ábra**). Az SNV-k mennyiségét tekintve az említett mintákban összesen 2 / 12 / 6 / 57 db-t találtunk. Az SNV-k ORF régiókon belüli vagy közötti elhelyezkedésében semmilyen mintázatot nem tapasztaltunk.

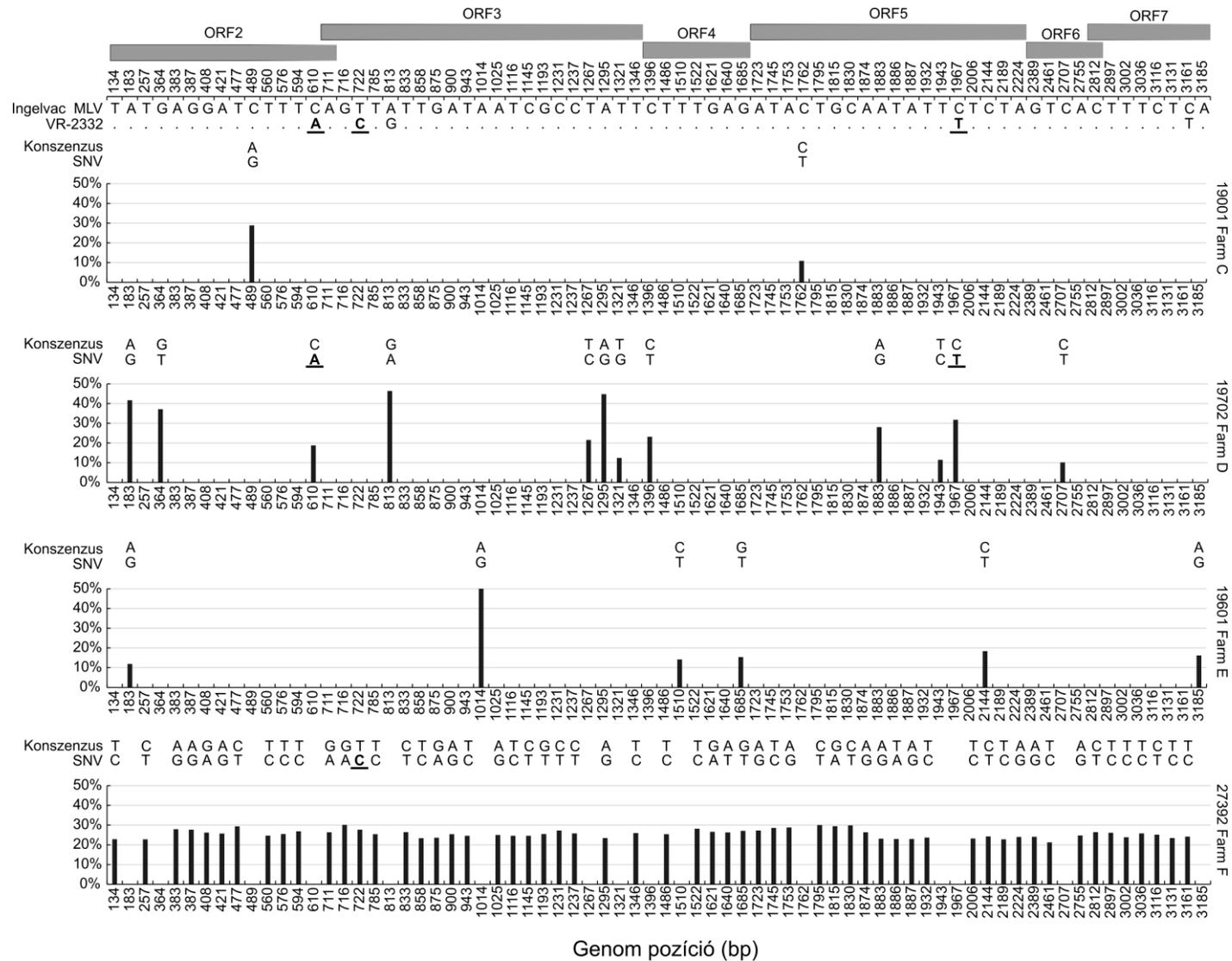
A 2020–2021-ben Magyarországon detektált vakcinaleszármazott PRRSV-2-törzsek lehetséges revertálódásának vizsgálatához összevetettük a minor nukleotidvariánsokat az Ingelvac MLV vakcina- és a VR-2332 vad típusú törzsek között megfigyelt nt eltérésekkel (**10. ábra**). A két referenciatörzs között az ORF2–7 régió területén az összes azonosított SNV-pozíció közül mindössze 5 db pozícióban (nt 610, 722, 813, 1967 és 3161) láttunk különbséget és a talált SNV-k csekély része (19702: nt 610 és 1967, 27392: nt 722) egyezett meg a vad típusú törzssel. Az SNV-k számában nem találtunk összefüggést arra nézve, hogy az adott vakcinatörzsből származó minta a fertőzési lánc időrendi sorrendjében milyen helyet foglalt el.

A vizsgált mintákból meghatározott szerkezeti fehérjéket kódoló régió aminosav szinten is magas azonosságot mutatott mind az Ingelvac MLV vakcina-, mind a VR-2332 vad típusú törzsekkel (**10. táblázat**). A referenciákhoz képest a GP3 mutatta a legnagyobb eltérést.

10. táblázat A sikeresen felszaporított ORF2–7 és az Ingelvac MLV-vakcinatörzs, illetve a VR-2332 vad típusú törzsek között megfigyelt aminosavazonosság-értékei (min–max%).

	Ingelvac MLV	VR-2332
GP2	97,7–100	96,5–98,9
GP3	95,3–99,2	95,7–99,6
GP4	98,3–100	98,3–100
GP5	98–100	97,5–98,5
M	98,3–100	98,9–100
N	99,2–100	98,4–99,2

Az illesztett aminosav-szekvenciák Ingelvac MLV-vakcinatörzssel történő összehasonlítása során a GP2, GP3, GP4, GP5, M és N géneken belül polimorf as pozíciókat megfigyeltünk: 11/256 (4,3%), 13/254 (5,1%), 3/178 (1,7%), 7/200 (3,5%), 3/174 (1,8%) és 1/123 (0,8%) (**11. ábra**). Az adatsorban több olyan aminosav-szubsztitúciót is láttunk, ahol a vizsgált hazai PRRSV-2-szekvenciák nagyrésze mindkét referenciatörzstől eltért (GP2: F10→L10; I237→M237; GP3: T30→A30; GP5: D34→H/A/G34). Összesen hét pozícióban találtunk olyan aminosavat (GP2: H204, A223, V241; GP3: I15; GP5: C11, A29; N: K10), ami az Ingelvac MLV-vakcinatörzssel mutatott azonosságot ott, ahol az eltér a VR-2332-től, míg összesen csak két olyan pozíciót (GP3: V94; M: Q16, kivéve 19702-es minta) azonosítottunk, ami a VR-2332-vel egyezik meg.



10. ábra A hazai PRRSV-2 Ingelvac MLV-vakcinaleszármazott törzsek ORF2–7 régiójának SNV-elemzése és összehasonlítása az Ingelvac MLV vakcina- és a VR-2332 vad típusú törzsek között megfigyelt eltérésekkel. A VR-2332-törzssel megegyező SNV-eket félkövér, aláhúzott betűvel jelöltük.



*Az aminosav szekvenciában elfoglalt helyüknek megfelelő pozíciók

11. ábra A sikeresen felszaporított ORF2-7 és a két referenciatorzs konkatenált aminosav-szekvenciái. Színek: zöld keret, aminosav eltérés mindkét referenciatorzshoz képest; narancssárga keret, megegyező aminosavak az Ingelvac MLV-vakcinatorzshoz; kék keret, megegyező aminosavak az VR-2332 vad típusú torzshoz.

9.2.2 Kevert fertőzések azonosítása

Az illetékes hatóságok a PRRS-mentesítés rutin diagnosztikai vizsgálatának folyamata alatt számos esetben figyeltek fel értelmezhetetlen Sanger-szekvencia adatokra. Valószínűleg ezek a minták több mint egy PRRSV-variánst tartalmaztak. A jelenség felderítése és elemzése érdekében egy előzetes tanulmány keretei között, hat hónapon keresztül végeztük a rutin diagnosztikai eljárás során keletkezett PCR-termékekből (ORF5 és ORF7) a nukleotidsorrend meghatározását hagyományos DNS-könyvtárkészítés és Ion Torrent készülék segítségével.

A különböző állategyedektől gyűjtött mintákból összesen 182 ORF5 és 10 ORF7 PCR-minta feldolgozása történt meg. Az ORF5 esetében sikeresen megállapítottuk 127 PRRSV-1 és 10 PRRSV-2 konszenzus szekvenciáját, illetve az ORF7-ek közül kilencét. Három PRRSV-1 ORF5, valamint két ORF7 mintában pedig több PRRSV-variáns jelenlétét láttuk (**11. táblázat**). Az NGS-eredményének feldolgozásakor két ORF5 mintában két-két, míg a többiben egy minor variánst azonosítottunk. Az Ion Torrenten, hagyományos DNS-könyvtárkészítésből származó readok Q30-as minőségi szűrése az adatelemzéshez kevés readet eredményezett. Mindenesetre Q10-es szűrési beállításokkal a mintán belüli variánsok aránya megbecsülhető volt. Az összeállított szekvenciapárok között 90,9–97,4% nt azonosságot figyeltünk meg. A kevert fertőzést mutató mintákból származó szekvenciaadatok elemzése szerint egyes major és minor variánsok a Porcilis- (38 major, 120 minor b, 122 minor, 1 major) vagy az Amervac-vakcinatörzsszel (120 major, 120 minor a, 122 major, 1 minor, 8 major) mutatták a legnagyobb nt azonosságot (>95%), a többi vad típusú törzsnek bizonyult.

11. táblázat. Az ORF5 és ORF7 régiók hagyományos DNS-könyvtárkészítés és Ion Torrent készülék segítségével zajló szekvenálásának eredményei a kevert minták esetében.

Régió	Minta	Leválogatott readok száma*	Szekvenálási mélység (×)	Átlagos SNV gyakoriság (%)		
				Major variáns	Minor variáns a	Minor variáns b
ORF5	38	19768	5569,3	91,3%	26,4%	26,4%
ORF5	120	5606	1507,9	81,3%	45,9%	17,1%
ORF5	122	5123	1358,9	74,6%	23,5%	-
ORF7	1	2445	693,6	91,8%	7,4%	-
ORF7	8	4338	426,3	82,7%	16,1%	-

* A readok minőségi szűrése minimum Q10 beállítással történt.

9.3 PCR-alapú könyvtárkészítő módszerek kiértékelése

Munkánk során az Ion Torrent és Illumina NGS-rendszerekre specifikusan adaptáltunk PCR-alapú könyvtárkészítő protokollokat. Ebben a fejezetben ezeknek a módszereknek a kiértékelését foglaljuk össze.

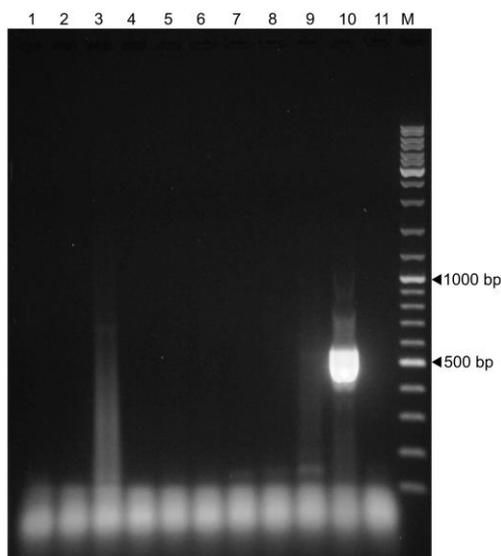
9.3.1 ORF5 és ORF7 elemzése Ion Torrent rendszeren

A hagyományos DNS-könyvtárkészítő módszerhez képest a fúziós primereket magába foglaló egylépéses PCR-alapú módszer kevésbé bizonyult hatékonynak az Ion Torrent rendszeren. Az 5 db ORF5 és 5 db ORF7 amplicon DNS-könyvtár esetében átlagosan 208 db readet kaptunk, a szekvenálási mélység $7\times$ és $132\times$ között változott. A várt read-hosszhoz (kb. 500–600 bp) képest az átlagos read-hossz mindössze 121 bp volt és mintánként átlagosan csupán 5 db 500 bp-t elérő readet sikerült generálni. Finanszírozási okok, illetve az Illumina rendszerre történő váltás miatt a módszer további optimalizálására nem került sor.

9.3.2 ORF7 elemzése Illumina rendszeren

Az ORF7-re specifikus, kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítő módszer működőképességét első lépésben ISeq100 készüléken ellenőriztük (részleges ORF7 konszenzus szekvenciákat eredményezett a 2×150 bp leolvasási keret miatt). A módszer jónak bizonyult, mind a PCR-1, mind a PCR-2 a várt hosszúságú terméket szaporította fel, továbbá az újgenerációs szekvenálás eredménye bizonyította, hogy a fúziós primerekkel beépített vonalkódok megfelelően működnek, illetve a várt konszenzus szekvenciát kapjuk.

Különböző sertéskórokozók vizsgálatával ellenőriztük a PCR-1 alatt alkalmazott, mindkét PRRSV faj ORF7 régióját célzó fúziós primerek specificitását. Ahogy a **12. ábrán** látható, a sertések járványos hasmenésének vírusát leszámítva, ahol aspecifikus termékek („smear”) jelenlétét láttuk, egyedül a PRRSV-pozitív kontrollmintában volt megfigyelhető PCR-termék a várt hosszánál (kb. 630–650 bp). A PCR-2 ampliconjainak gélképe alapján a várt mellett, 200 bp-nál is látható volt termék (jelen dolgozatban nem került feltüntetésre). Ez a hossz megegyezik a két PCR során alkalmazott primerek lehetséges összekapcsolódásából adódó termék méretével, ezért úgy gondoljuk, hogy a reakció során primerdimerek keletkezése történik. A várt és az aspecifikus primerdimer-termékek megfelelő szétválasztása megoldható, amennyiben a gélelektroforézist 1,5%-os agaróz géllal és hosszabb futtatással végezzük.



12. ábra Az általunk tervezett PCR-1 alatt alkalmazott ORF7 fúziós primerek specificitásának vizsgálata. A gélelektroforetikus képen az oszlop 1–9 jelöli a felhasznált mintákat: sertés-herpeszvírus 1 (1), sertés-parvovírus 1 (2), sertések járványos hasmenésének vírusa (3), klasszikus sertéspestis vírusa (4), sertés-teschovírus (5), sertés transzmisszibilis gastroenteritis vírusa (6), sertés-circovírus (7), sertés-pestivírus (8) és sertés-rotavírus (9); a 10. és 11. oszlop a pozitív (Lelystad törzs) és a negatív kontrollt mutatja; az M oszlop az O'Gene Ruler DNS molekulatömeg markert.

A módszerfejlesztés következő lépésében a kétlépéses PCR-rendszer szenzitivitását igyekeztünk megállapítani, amihez a Lelystad- és a VR-2332-törzsek (PRRSV-1 és PRRSV-2 prototípus törzsei) PRRSV-negatív malacsavóban hígított mintáit (spike-in minta) használtuk fel. A szenzitivitás mérőszámaként a Ct-értéket választottuk, mert a legtöbb PRRSV-re irányuló, különböző NGS-módszereket összehasonlító közleményben ezt alkalmazzák, mint viszonyítási alap a klinikai minták esetében (Gagnon et al., 2021; Vandenbussche et al., 2021; Zhang et al., 2017).

A spike-in mintákkal párhuzamos ismétléssel végezve a kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítést megállapítottuk, hogy a PCR-2 végét követően mindkét vizsgált törzsnél a sikeres amplifikáció határa Ct 34 érték körül volt. Az NGS-tesztfuttatás (ISeq100) eredményei szerint ezen Ct-értékkel rendelkező hígítási fokoknál (Lelystad: 10^{-5} ; VR-2232: $10^{-5}/10^{-6}$) össze tudunk állítani részleges ORF7 konszenzus szekvenciákat, a Lelystad esetében $1663,7\times$, míg a VR-2332-nél $578,6\times$ szekvenálási mélységgel (**9. melléklet**, 129.o.). Ezek alapján a módszer mindkét PRRSV fajra nézve hasonló szenzitivitással bír. Az összesített PRRSV-specifikus (azaz illesztett) readok aránya a különböző vírustelítettségű csoportokban a következőképpen alakult: Ct 12–15: 70,3%; Ct 15–20: 86,5%; Ct 20–25: 82,4%; Ct 25–30: 47,3%; Ct 30–36: 43,3%.

A fentebb ismertetett előzetes vizsgálatok után elvégeztük a kidolgozott könyvtárkészítő módszer hatékonyságának és alkalmazhatóságának felmérését hazai sertésletelepekről gyűjtött minták segítségével. A vizsgált 15 db savópoolminta (az ORF5 diagnosztikai vizsgálata

alapján 10 különböző kládba tartoztak) mért Ct-értékeit, illetve a Miseq készüléken végzett szekvenálás eredményeit a **12. táblázat** foglalja össze. A minták Ct-értéke 16,5 és 31,6 között változott, azonban a gélelektroforézis során a PCR-1 termék összesen öt mintánál volt látható (20424_19, 26902_21, 2586_21, 66527_20, 37613_19; jelen dolgozatban nem került feltüntetésre). A gélből a PCR-1-termék látható hiányától függetlenül mindegyik mintánál a megfelelő mérettartományba eső sávot kivágtuk és tisztítottuk. A visszanyert DNS-templát felhasználásával minden mintánál sikeresen lezajlott a DNS-könyvtárak felszaporítása (látható PCR-2-termékek mindegyik mintánál; jelen dolgozatban nem került feltüntetésre) és szekvenálása.

12. táblázat A sertésstelepekről gyűjtött savóminták adatait és az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás eredményeit összefoglaló táblázat.

Minta	Ct érték	ORF5 klád	Leválogatott readek száma	Szekvenálási mélység (×)	Átlagos SNV gyakoriság (%) [§]	
					Major variáns	Minor variáns
26940_19*	20,9	1A	502722	149864	-	-
2208_19*	27,8	1E	22306	1029	75	25
28370_20*	26,5	1E	109948	41137	-	-
20424_19*	21,5	1F	154252	38505	-	-
26902_21*	19,1	1G	93512	38471	-	-
2586_21*	16,5	1G	33762	4351	-	-
474_19*	22,3	1G	15406	305	78	22
66527_20*	22,0	Porcilis	172782	67857	-	-
9331_20*	24,4	Porcilis	105896	13271	-	-
37613_19*	22,6	Porcilis-like	31070	6245	-	-
5191_19*	27,8	Reprocyc	35600	5846	53	47
27473_19*	29,1	Spanish	5330	1605	58	42
5036_19* [°]	25,8	Spanish	898	202	62	38
30156_20	31,6	3D	-	-	-	-
52808_19*	26,5	3F	6856	939	-	-

* Az újonnan szekvenált, génbankba feltöltött szekvenciák.

[°] A readok minőségi szűrése minimum Q20 beállítással történt a többinél alkalmazott Q30 helyett.

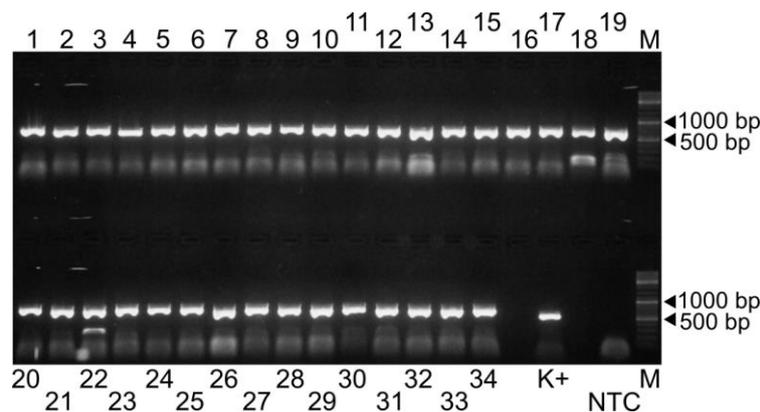
[§] Az adott mintában található két konszenzus szekvencia arányának adatai. Részletesen lásd később a 9.4.1. fejezetben.

Habár a szekvenálási mélység viszonylag tág értékek között változott az egyes minták között (202×–14986×), egy minta kivételével (30156_20) az ORF7 konszenzus szekvenciák összeállítása megvalósult, továbbá öt minta esetében két konszenzust is találtunk (részletesen lásd később: 9.4.1. fejezet, 73.o.). A meghatározott, teljes ORF7 konszenzus szekvenciák között a nt azonosság 87,4–100% volt. Az újonnan szekvenált konszenzus szekvenciák, beleértve a major és minor variánsokat is (/1 és /2 jelöléssel), megtalálhatóak a génbankban az alábbi azonosítókkal: OR427017–OR427035.

9.3.3 Teljes genom elemzése Illumina rendszeren

Az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás sikeres alkalmazása után arra törekedtünk, hogy a könyvtárkészítő PCR-rendszer alapjait (fúziós primerek és vonalkódoló PCR-2) bizonyos törzsek teljes genomszekvenciájának karakterizálásához adaptáljuk.

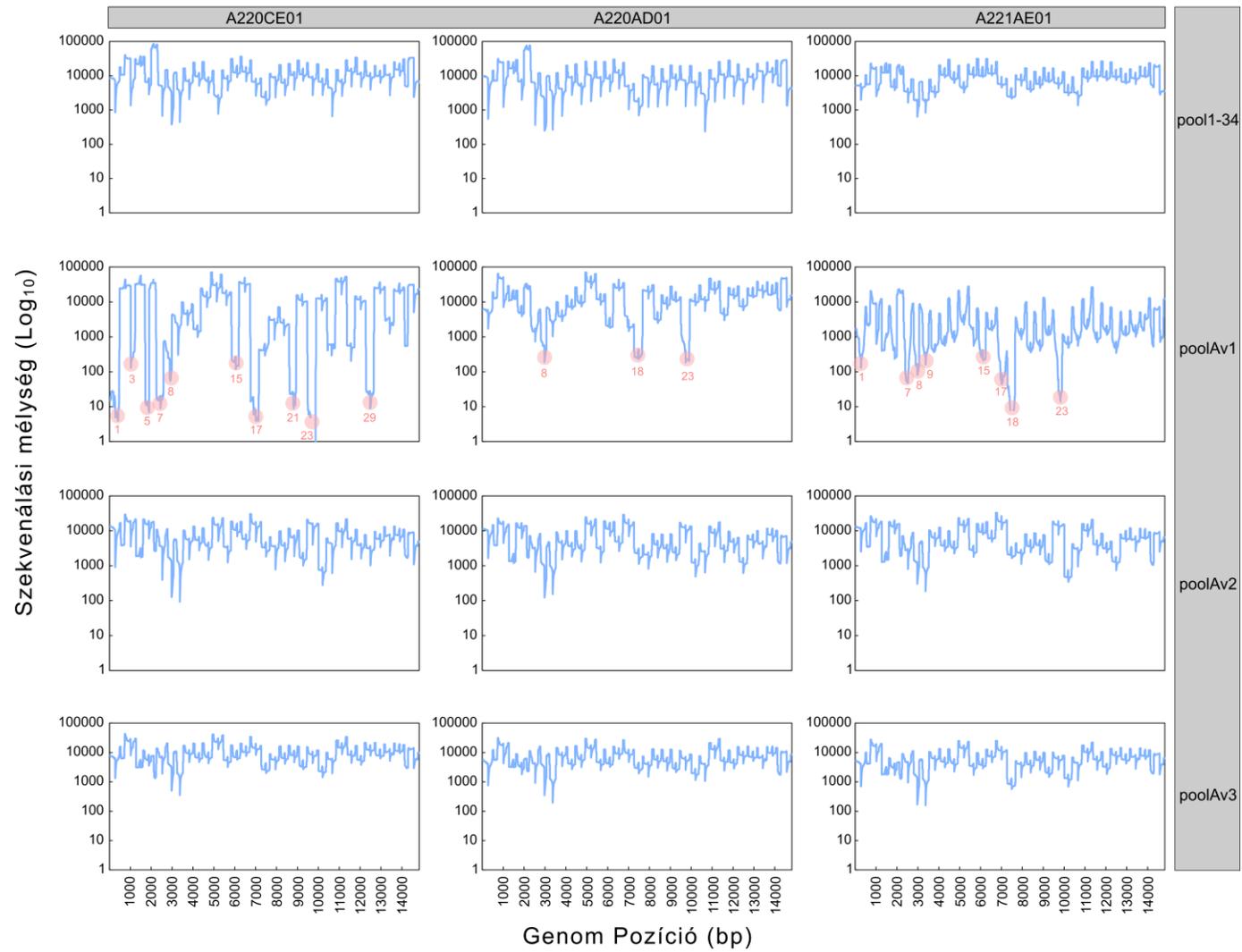
A multiplex PCR-alapú teljesgenom-felszaporításhoz tervezett Porcilis- és Unistrain-vakcinatörzsekre specifikus primereket először egyedileg teszteltük. Mind a 34 db primerpárral a várt hosszúságú PCR-terméket kaptuk (kb. 680–720 bp), egyedül a 22. amplikon esetében volt megfigyelhető egy rövidebb aspecifikus termék (**13. ábra**).



13. ábra A teljes genomot lefedő, multiplex PCR primerekkel egyedileg megvalósult PCR-ek gél-elektroforetikus képe. Mintaként egy Porcilis PRRS vakcinát, pozitív kontrollként egy, az ORF7 régiót célzó diagnosztikai primerpárt használtuk fel. Az NTC a negatív kontrollt, az M a molekuláris markert (O'Gene Ruler DNS) jelöli.

Ezt követően arra koncentráltunk, hogy a primerek PCR-1-et megelőző poolozását optimalizáljuk. Összehasonlítási alapként a Porcilis-vakcinamintáknak (A220CE01, A220AD01, A221AE01) a 34 db primerpárral előállított egyedi PCR-1-termékeit egyenlő arányban összekevertük és a második körös PCR-rel amplikon DNS-könyvtárat készítettünk, majd megszekvenáltuk azokat (**14. ábra**).

A poolAv1-ből (ahol a poolA1-ben és poolA2-ben egyenlő arányban vannak vegyítve a primerek) származó NGS-eredmények csökkent szekvenálási mélységet mutattak az alábbi amplikonoknál: az A220CE01-ben az 1., 3., 5., 7., 8., 15., 17., 21., 23. és 29.; az A220AD01-ben a 8., 18. és 23.; míg az A221AE01-ben az 1., 7., 8., 9., 15., 17., 18. és 23. (**14. ábra**). Hét primerpárnál (1., 7., 8., 15., 17., 18. és 23. amplikonok) megfigyeltük, hogy legalább két vakcinamintánál nem eredményez elegendő PCR-terméket, ebből következően readet, továbbá az A220CE01 esetében a 23. amplikon régióban egyáltalán nem keletkezett read. A poolAv1 eredményei alapján létrehoztunk két, eltérő arányú primerpárokot tartalmazó poolt (v2, v3). Ezekkel az újabb verziójú poolokkal sikerült a teljes genom hosszán egységesebb szekvenálási mélységet elérni és az alacsony mélységgel rendelkező régiókat teljes mértékben megszüntetni (**14. ábra**).



14. ábra A Porcillus-vakcinaminták teljes genom hosszán elért szekvenálási mélység alakulása a három primerpool esetében (poolAv1, v2 és v3), viszonyítási pontként a 34 db egyedi PCR-termék egyenlő arányban összekevert (pool1-34) kihozatala van feltüntetve. A poolAv1-nél az alacsonyabb szekvenálási mélységgel rendelkező ampliconokat emeltük ki.

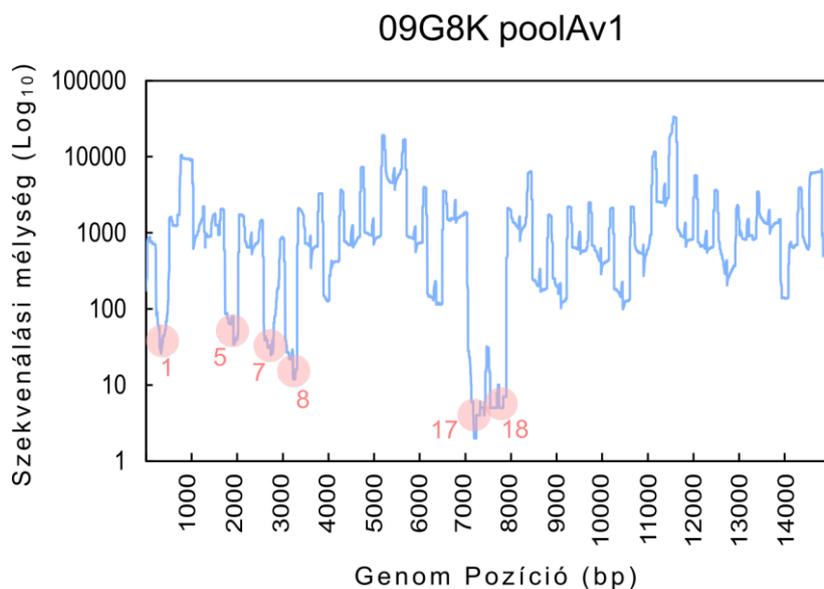
A poolAv3-ból származó nyers readok az SRA (Sequence Read Archive, génbank) adatbázisban megtalálhatók a PRJNA1026488 projektszám alatt.

Az egyes primerpárok működőképességének hatékonyabb mérése miatt mindhárom vakcinamintára kiszámoltuk az amplikononkénti átlagos szekvenálási mélységet és terjedelmet (minimum–maximum), kizárva az átfedő amplikonzakaszokat (mert azok a régiók torzítják az adatokat) (**13. táblázat**). Látható, hogy a minimum és maximum amplikononkénti szekvenálási mélységek között fennálló különbség a poolAv1-gyel (130,8–14151,5× eltérés) összehasonlítva nagymértékben csökkent a poolAv3 alkalmazásával (13,8–15,9× eltérés).

13. táblázat Az amplikononkénti szekvenálási mélység összefoglalása mindhárom Porcilis-vakcinamintára, a poolAv1 és poolAv3 esetében.

	A220CE01		A220AD01		A221AE01	
	poolAv1	poolAv3	poolAv1	poolAv3	poolAv1	poolAv3
átlag	9944,5	7335,2	11068,6	5359,1	1799,3	4745,8
min–max	2,8–	1382,4–	289,9–	964,3–	12,5–	826,9–
	39624,1	22164,9	37920,1	13270,7	18107,2	13118
min–max különbség	14151,5×	16x	130,8×	13,8x	1448,6×	15,9×

A vizsgálataink elején teszteltük a primerszettet (poolAv1) az Unistrain vakcinatörzzsel is. Mivel egyetlen Unistrain vakcinát (gyártási tétel: 09G8K) sikerült beszerezni ehhez a teljes genomot érintő módszerfejlesztési megközelítéshez, így ezzel a vakcinatörzzsel nem végeztük el a korábban említett primer pooloknak az optimalizálási lépéseit. A poolAv1-ből származó NGS-eredmények megerősítették, hogy ezen vakcinatörzsrre specifikusan szintén alkalmazható a kidolgozott kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítő módszer. Mint ahogy a Porcilis-vakcinamintáknál tapasztaltuk, az Unistrain esetében is megfigyelhető volt az alacsonyabb szekvenálási mélységű amplikonok jelenléte (1., 5., 7., 8., 17. és 18. amplikonok), azonban amplikonkiesést nem észleltünk és a genomszekvencia közel 100%-os lefedettséggel összeállítható volt (**15. ábra**).

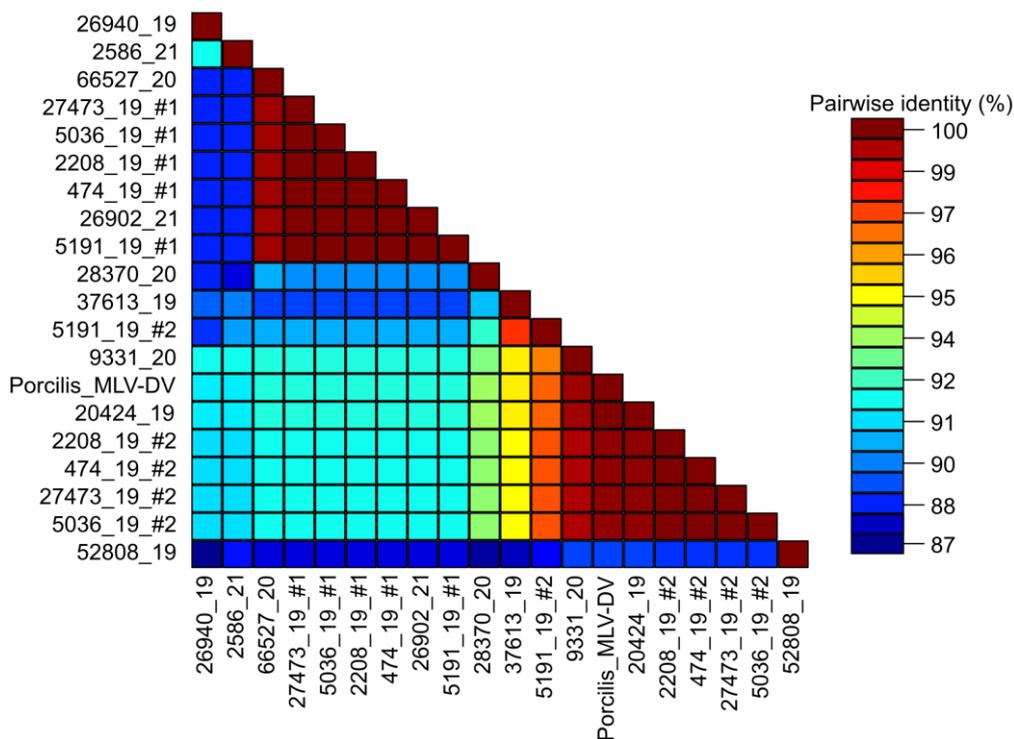


15. ábra Az Unistrain-vakcinaminta teljes genom hosszán elért szekvenálási mélység alakulása a poolAv1 esetében.

9.4 Amplikon-mélyszekvenálás módszerének beépítése PRRSV-törzsek egyes vizsgálataiba

9.4.1 Kevert fertőzések feltárása

Az Illumina rendszerrel kompatibilis, ORF7 régiót célzó, kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítési eljárással sikerült több PRRSV-variáns kimutatása és elemzése egyes savópoolmintákból. A readok referenciákhoz történő illesztése során több esetben megfigyeltük, hogy számos read eltérő nukleotidmintázatot mutat az összeállított konszenzushoz képest (**10. melléklet**, 130.o.). Gyanítottuk, hogy ezek egy másik szekvenciavariánst képviseltek. Ezt követően a readokat párhuzamosan két referenciához illesztettük és a 15 db sertéstelepekről származó savópoolmintából ötben (474_19, 5036_19, 2208_19, 5191_19, 27473_19) két különböző konszenzus szekvenciát határoztunk meg (lásd korábban: **12. táblázat**, 69.o.). Az egy-egy variáns, avagy a szekvenciapárok tagjainak becsült arányát a mintákban az őket meghatározó SNV-k átlagos gyakoriságával számoltuk ki, ami szerint major és minor variánsokként határoztuk meg őket. A szekvenciapárok között 91,1–92,2% nt azonosság állt fenn, illetve a mintákban fellelt major és minor szekvenciák másik filogenetikai kládba csoportosultak (jelen dolgozatban nem került feltüntetésre), ami megerősítette, hogy különböző PRRSV-törzsekből származtak. Az öt azonosított szekvenciapárból négyenél a minor variáns a Porcilis-vakcinatörzsszel mutatta a legnagyobb nt azonosságot (>99%), míg az egyik mintánál (5191_19) ez az azonosság mindössze 97,3% volt (**16. ábra**).

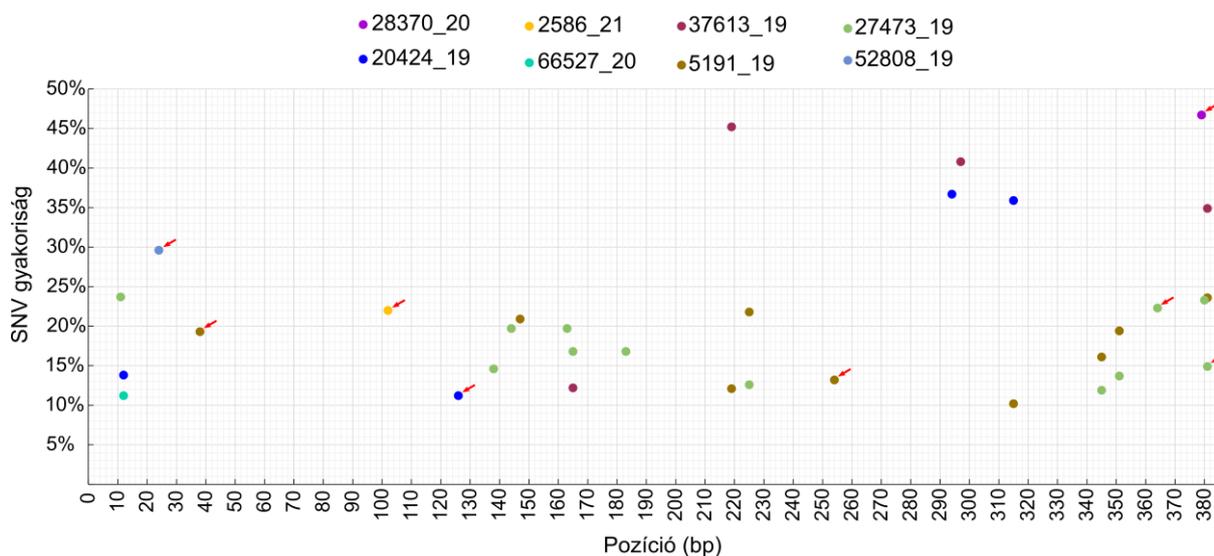


16. ábra A savópoolmintákból az ampikon-mélyszekvenálás segítségével meghatározott ORF7 szekvenciák, valamint a Porcilis-vakcinatörzs páronkénti nt azonosságának összehasonlítása. A szekvenciapárok major és minor tagjait #1 és #2 jelöléssel láttuk el a mintanév mellett.

9.4.2 Víruspopuláció genetikai diverzitása

Az ampikon-mélyszekvenálás mindamelllett, hogy hozzájárult egy-egy adott cél régió szekvenciájának meghatározásához, vagy akár egy kevert fertőzés feltárásához, a vizsgált vírustörzs víruspopulációjának genetikai diverzitásáról egyaránt információt nyújtott.

Az ORF7 ampikon-mélyszekvenálás adta megfelelő szekvenálási mélység (átlag: 26402×) mellett lehetséges volt mind a 15 db savópoolminta SNV-pozícióinak vizsgálata (feltétel: SNV gyakoriság 10% felett). Összesen a minták felében (n=8) azonosítottunk heterogén víruspopulációt. A detektált SNV-k száma elérte a 33 db-t, amik az egész ORF7 régió elszórtan helyezkedtek el (**17. ábra**). Ezekből 7 db SNV (12., 165., 219., 225., 315., 345. és 351. nt pozíciók) minimum két mintában is előfordult, valamint 1 db SNV (381. nt pozíció) megtalálható volt három különböző mintában is. A legtöbb SNV-t az 5191_19 (n=9) és a 27473_19 (n=12) mintákban detektáltuk, a többiben lényegesen kevesebbet: 28370_20 (n=1), 20424_19 (n=4), 2586_21 (n=1), 66527_20 (n=1), 37613_19 (n=4), 52808_19 (n=1). Az SNV-pozíciók számának aránya a minták között 0,3% és 3,1% között változott, illetve az adott minor nukleotidok gyakorisága 10,2% és 46,7% között (**17. ábra**). Az SNV-mutációk típusának tekintetében a tranzíciók (84,8%: C↔T és A↔G) ugyanakkora gyakorisággal és nagyobb arányban képviselték magukat a tranzverziókhöz képest (15,2%: G↔T, G↔C, A↔C, A↔T). Az SNV-k 27,3%-a valamilyen aminosav cserét okozott a nukleokapszid különböző pontjain.



17. ábra Az azonosított SNV-k gyakorisága és eloszlása az ORF7 régióban. Piros nyíllal jelöltük azokat a pozíciókat, ahol nem-szinonim mutációk álltak fenn.

A kidolgozott PCR-alapú DNS-könyvtárkészítő módszer segítségével a hazánkban is gyakran alkalmazott Porcilis-vakcinatörzs teljes genomszintű genetikai vizsgálatát egyaránt el tudtuk végezni. Mivel a PRRS hazai mentesítése sikeresen befejeződött, így az említett vakcinatörzsből csupán 3 db, különböző gyártási tételből származó Porcilis PRRS vakcina beszerzését tudtuk megvalósítani.

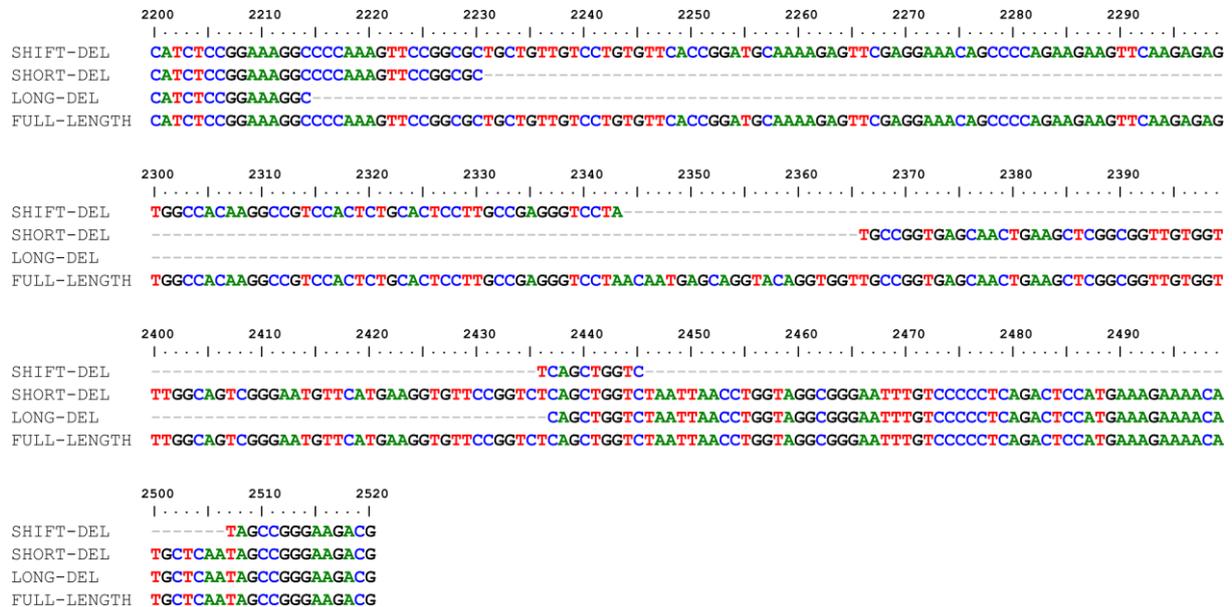
Korábban, a 9.3.3. fejezetben kifejtettük a teljes genomot lefedő primerszett különböző poolokba (poolAv1/v2/v3) történő bontásának szekvenálási mélységre gyakorolt hatását. Ebben a fejezetben szeretnénk összefoglalni, hogy a poolAv1/v2/v3-ből származó readek a konszenzus szekvenciát milyen mértékben befolyásolták, illetve ismertetjük a Porcilis PRRS vakcinákban előforduló víruspopuláció diverzitását.

Az egyes, különböző primerpoolal (pool1-34 és poolAv1/v2/v3) készített amplicon DNS-könyvtárakból származó teljes genomszekvenciák alapján képzett konszenzustól minden mintában voltak eltérések. A következő teljes genomszekvenciákban találtunk nukleotidkülönbségeket az adott konszenzushoz képest: A220CE01 poolAv1-ben 6 nt és pool1-34-ben 2 nt, A220AD01 poolAv2-ben 1 nt és A221AE01 poolAv1-ben 5 nt.

Mivel a poolAv3-ből képzett genomszekvencia mindhárom minta esetében megegyezett a konszenzussal, illetve ez adta a legegységesebb lefedettséget (lásd korábban: **14. ábra**, 71.o.), ezért a további vizsgálatokhoz is ezt használtuk fel.

A Porcilis-vakcinatörzs víruspopulációjában jelentős genetikai változatosságot találtunk, illetve valamikora különbséget a különböző gyártási tételek között szintén felfedeztünk. Erről a vakcinatörzsről a közelmúltban megállapították, hogy az úgynevezett FULL-LENGTH, vagyis a deléció nem tartalmazó variáns mellett több deléciós variáns, nevezett LONG-DEL, SHORT-DEL és SHIFT-DEL, formájában alkotja a vakcinát (**18. ábra**) (Eclercy et al., 2021).

Mindegyik variánst azonosítottuk mindhárom vakcinamintában és a korábban megfigyelttel megegyezően, a LONG-DEL formát találtuk meg legnagyobb arányban (több referenciához párhuzamosan történő szekvenciaillesztés során kapott readok mennyisége alapján; jelen dolgozatban nem került feltüntetésre).



18. ábra A Porcilis PRRS vakcinákban előforduló háromféle deléciós variáns érintett régiójának nukleotidszekvencia-illesztése (nt2215–2506, MW674755 referenciatörzshöz viszonyítva).

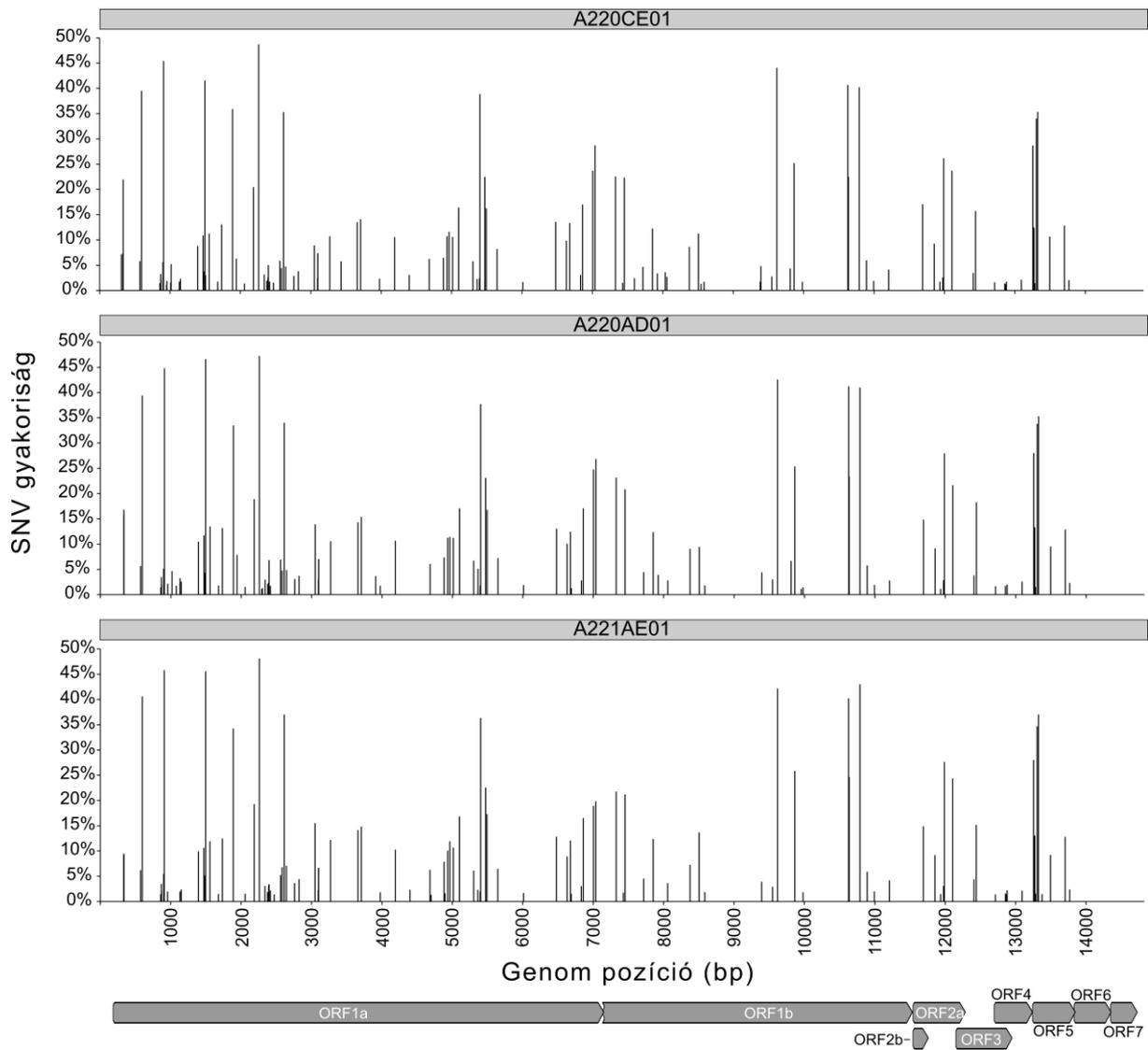
Mindhárom vizsgált Porcilis-vakcinamintában található LONG-DEL variáns 14853 bp hosszúságú genommal rendelkezett, mivel figyelmen kívül hagytuk az 1_F és a 34_R primer régiókat a teljes genom 5' és 3' végén, mert ezeknél nem található átfedő ampikon, amely kompenzálja a primerszekvenciákat.

A génbankban, a doktori értekezés írásakor, csekély számú Porcilis-vakcinatörzs teljes genomszekvenciája volt elérhető (MW674755–MW674758, KF991509, MT311646). Mindegyik letölthető rekord különböző gyártási tétellel rendelkező vakcinákból származott. Az MW674755–MW674758 génbanki azonosítóval rendelkező szekvenciák a Porcilis-vakcinatörzs két különböző vakcinában fellelhető hosszpolimorfizmust mutató variánsait reprezentálják, és a közleményben vizsgált vakcinamintákból meghatározott teljes genomszekvenciák variánsoként azonosak voltak (MW674755 FULL-LENGTH, MW674756 LONG-DEL, MW674757 SHORT-DEL, MW674758 SHIFT-DEL) (Eclercy et al., 2021). Mivel nem mindegyik vakcina esetében töltötték fel az összes variánst, ezért az egész deléciót érintő régiót (nt 2215–2506) kizártuk a teljes genomok összehasonlító vizsgálataiból.

A három vakcinamintából eredő konszenzus szekvenciák (poolAv3) egy polimorf pozíción (nt1519, KF991509 rekordhoz viszonyítva) kívül egyformának bizonyultak. Az általunk karakterizált és az elérhető referenciaként felhasznált Porcilis-vakcinatörzsek (MW674756, KF991509, MT311646) csaknem teljes mértékben megegyeztek a konszenzus szekvencia

szintjén (nt azonosság: 99,9–100%). Amennyiben mindegyiket összevetettük a szülői vad típusú DV-törzssel (KJ127878) szintén magas nt azonosságot (99,14–99,15%) figyeltünk meg. A legnagyobb számú nt eltérés (126 db) döntő többsége az ORF1 régió 5' végén és az ORF2a régió halmozódott fel.

Miután felmértük a szekvenciák egymáshoz viszonyított hasonlóságát, megvizsgáltuk a vakcinamintáink víruspopulációjának változatosságát. Az amplikon-mélyszekvenálás segítségével (poolAv3) viszonylag magas genetikai összetettséget találtunk a vakcinákban, számszerűsítve összesen 122 db (A220CE01), 115 db (A220AD01) és 113 db (A221AE01) SNV-t azonosítottunk (feltétel: SNV gyakoriság 1% felett mindkét párhuzamos futtatásban), amelyek legnagyobb részét (104 db SNV) mindhárom vakcinában megtaláltuk. A duplikált amplikon DNS-könyvtárakból számolt átlagos SNV gyakoriság a következőképpen alakult: az A220CE011-ben 1–48,7%, az A220AD01-ben 1–47,2% és az A221AE01-ben 1,3–48,1% (**19. ábra**). A detektált SNV-k elszórtan helyezkedtek el a genom teljes egészén és nagyrészt (55,4–60,9%) az ORF1a régióban koncentráálódtak, illetve az ORF5 elején volt megfigyelhető kisebb mértékű SNV-felhalmozódás, míg egyetlen SNV-t se találtunk az ORF6 vagy ORF7 régiókban. Az SNV-k detektálását követően megnéztük, hogy azok szerepet játszhattak-e a Porcilis-vakcinatörzsek belüli, illetve a DV vad típusú törzs között fellelt nt különbségekben. Az adott vakcinaminták pool1-34 és poolAv1-v3 megközelítéssel összeállított teljes genomszekvenciáiban talált nt eltérések közül 1 (A220CE01), 1 (A220AD01) és 3 (A221AE01) nt egyezett meg SNV-vel. A referencia Porcilis-vakcinatörzsek és az értekezésben vizsgált vakcinákból nyert konszenzus genomszekvenciák (poolAv3) között észlelt maximum 15 nt eltérés (620., 933., 1031., 1519., 2203., 2928., 2932., 2983., 3325., 5648., 12234., 13551., 13571., 14149. és 14300. nt pozíció; KF991509 FULL-LENGTH rekordhoz viszonyítva) közül 7 db (620., 933., 1519., 5648., 12234., 13551. és 13571. nt pozíció) az azonosított SNV-pozícióknál helyezkedett el. A DV vad típusú törzs és a vakcinatörzseink között talált 126 nt eltérés közül 9 db (505., 800., 885., 1428., 10561., 10722., 11867., 11921., 13238. nt pozíció; KJ127878 LONG-DEL rekordhoz viszonyítva) esett valamelyik SNV-pozícióra.



19. ábra A három vizsgált Porcilis-vakcinamintában (poolAv3) azonosított SNV-k elhelyezkedése a teljes genom területén, illetve a megfigyelt átlagos gyakoriságuk.

X Megbeszélés

10.1 PRRSV molekuláris epidemiológiai és összehasonlító genetikai vizsgálata

10.1.1 PRRSV-1-törzsek hazai elterjedése és genetikai változatossága

10.1.1.1 Leszármazási kapcsolatok és térbeli eloszlás

A PRRS előfordulásának első magyarországi kimutatását követően (1995) a PRRSV-1-törzsek az ország egész területén elterjedtek, végül a 2014-től hatályba lépő PRRS Nemzeti Mentésítési Terv sikeres kivitelezésének köszönhetően 2022 tavaszán az ország mentes lett a vad típusú PRRSV-törzsektől (Hornyák et al., 1997; Szabó et al., 2023).

A hazánkban közel 30 éven át keringő PRRSV esetében különböző időszakból születtek beszámolók a vírustörzsek közötti leszármazási kapcsolatokról (Bálint et al., 2021; Balka et al., 2018, 2008; P. M. Szabó et al., 2020). Összességében elmondható, hogy a PRRSV-1 nagy genetikai diverzitást mutatott és számos, többé-kevésbé összefüggő filogenetikai csoportot alkotott.

Az értekezésben vizsgált PRRSV-1-törzsek hazai változatosságát reprezentáló szekvenciagyűjtemény alapján 2020-ig összesen 16 kládot azonosítottunk (1A, 1B, 1C, 1E, 1F, 1G, 2, 3C, 3D, 3F, Porcilis, Porcilis-like, Spanish, Reprocyc, X1 és X2) (4. ábra, 53.o.). Mint ahogy az korábban is megállapításra került, a legtöbb hazai ORF5 szekvencia az 1A–1G mellett az újonnan definiált Porcilis és Spanish kládokba tartozott (Balka et al., 2018). Tudomásunk szerint korlátozott mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésre a keringő PRRSV-1-törzsek több évtizedet felölelő, országos szintű felméréséről. Ugyanakkor egy nemrég megjelent közleményben egy Belgiumban izolált PRRSV-1-törzsekből álló, nagymennyiségű teljes genom szekvenciát tartalmazó adatsort összesen 31 különböző kládba csoportosítottak (Vandenbussche et al., 2021). Ebben a tanulmányban a 2015–2019 között gyűjtött minták vizsgálata több mint 16 klád meghatározását vonta maga után, melyek közül mindössze kettő, vakcinatörzs-leszármazottakat tartalmazó csoport (Unistrain és Suvaxyn) volt nem kifejezetten belga eredetű (Vandenbussche et al., 2021). Feltételezhetnénk, hogy az idő elteltével egyre több klád alakul ki, azonban ellentmondó eredményeket láthatunk a különböző országokban folytatott elemzésekben. Ráadásul az adatok összehasonlíthatóságát befolyásolja, hogy a kládok meghatározása különböző módszerek vagy megközelítések szerint történik (Franzo et al., 2015; Greiser-Wilke et al., 2010; Kvisgaard et al., 2013c).

Nagy-Britanniában 27 év ORF5 szekvenciaadatainak összevetése során a hazánkban megfigyelthez hasonló mértékű genetikai változatosságot fedeztek fel, azonban jelentős különbség, hogy a csekély mértékű sertésimport következményeként egyedül az 1990-es években behurcolt PRRSV-1-törzsek evolúciója figyelhető meg (Frossard et al., 2013; Frossard és Williamson, 2018). Ezek az adatok megerősítik, hogy a PRRSV-1 európai

diverzitása jelentős, és országon belül sem elhanyagolható, emiatt elengedhetetlen lenne kiterjedtebb monitoringprogramok és európai szintű összehasonlító elemzések bevezetése.

Magyarországra számos PRRSV-1-törzs import sertésalapanyaggal érkezett, majd széles körben szétterjedt a hazai sertésletelepek között. Az Európai Unióhoz történő csatlakozásunkat követően Hollandiából, Dániából és Németországból kiemelkedő mennyiségű sertést vásároltunk, ami bizonyos kládok kialakulásában meghatározó szerepet játszott (Hollandia: 1A, 1F, 1G, X2, 3D; Dánia: 2, Németország: 1G, X2, 3D). Az epidemiológiai vizsgálatok továbbá rámutattak, hogy Szlovákia (1G, 3F), Spanyolország (Spanish) és Szerbia (3C) szintén hozzájárult a hazai PRRSV-1-törzsek diverzitálásához.

Magyarországon a legnépesebb és egyben az egyik legrégebb óta jelen lévő PRRSV-1-törzscsoport a Spanish klád. Ennek a kládnak az érdekessége, hogy az Unistrain® PRRS MLV-vakcinatörzs (korábbi nevén Amervac) és annak feltételezett leszármazottai mellett nagy valószínűséggel korai, vad típusú, Spanyolországból származó PRRSV-törzseket szintén tartalmaz (Balka et al., 2018). Ennélfogva nem meglepő, hogy összevetve a másik kettő vakcinatörzsek alkotta kláddal (Porcilis és Reprocyc) nagy genetikai változatosság figyelhető meg a Spanish kládon belül (nt azonosság: 91,4–100%) (7. táblázat, 54.o.). A Spanish kládba tartozó magyar törzsek és az Amervac-vakcinatörzs között észlelt genetikai eltérés (maximum 5,8%) nagyobbak bizonyult, mint más európai országokban, ahol nagyrészt >98%-os nt azonosságot figyeltek meg (Fitzgerald et al., 2020). Általában az MLV-vakcinatörzs és a vakcinatörzsszerű ORF5 szekvenciák között maximum 5%-os genetikai eltérés látható, amit egyelőre a PRRSV-2 esetében vizsgáltak részletesen (Kikuti et al., 2021; Shi et al., 2010b). Az eredeti Amervac-vakcinatörzstől genetikailag eltérő Amervac-szerű törzsek időnként megjelennek nem vakcinázott sertésállományokban és esetenként klinikai tünetekben manifesztálódtak fertőzésekkel szintén kapcsolatba hozhatók (Hsueh et al., 2023; Lin et al., 2020; Wang et al., 2016; Zhai et al., 2018). Magyarországon szintén előfordult ilyen eset: egy hízótelepen megfigyelt, magas lázzal járó súlyos légzőszervi megbetegedés kivizsgálása során a *Mycoplasma hyopneumoniae* mellett az Amervac-vakcinatörzsszel teljes genom szinten 96%-os nt azonosságot mutató vírustörzset azonosítottak (Bálint et al., 2015). Mindemellett, úgy tűnik, hogy ez a vakcinatörzs hajlamos a rekombinációra (Chen et al., 2017; Kvisgaard et al., 2020; Marton et al., 2019; Sun et al., 2022). A Reprocyc klád a ReproCyc® PRRS és PRRSFLEX EU vakcinák 2015-ös bevezetését követően volt kimutatható az országban. Annak ellenére, hogy ez a klád kevesebb, mint egy évtizede volt jelen, hasonló mértékű genetikai diverzitást halmozott fel, mint például a 2002-től engedélyezett Porcilis PRRS vakcinához köthető klád. Egyelőre a Reprocyc-vakcinatörzs genetikai változatosságáról más országokból nem áll rendelkezésünkre adat. Összegezve a korábbi és az érkekezésben megállapított tényeket, a három MLV-vakcinatörzs közül a Porcilis és a Reprocyc beleesnek a vakcinászerű törzseknél elfogadott <5% genetikai eltérésbe, közülük a

Porcilis bizonyul genetikailag a legstabilabbnak, míg a Spanish és Reprocyc kládban található vakcinaleszármazott törzsek viszonylag rövid időn belül nagyobb genetikai változásra hajlamosak (Bálint et al., 2021).

Annak ellenére, hogy az 1G klád először 10 éve jelent meg az országban, ide tartozik a második legtöbb index szekvencia, továbbá ez idő alatt jelentősen diverzifikálódott. Ezen klád alapító tagjai holland, német és szlovák import sertésállományokból származtak, tükrözve az európai országok kereskedelmi viszonyait.

Az irodalmi adatok szerint, a harmadik legtöbb index szekvenciát magába foglaló 1E klád tagjait egészen 2014-ig más európai országból nem mutatták ki (Balka et al., 2018). Emellett az epidemiológiai vizsgálataink nem utaltak külföldről történő behurcolásra, ugyanakkor a klád eredete hálózatelemzés szerint egy korai (1990-es évek-beli) német törzshöz vezethető vissza (P. M. Szabó et al., 2020). A többi ismeretlen eredetű klád közül az 1B-hez tartozó törzsek előfordultak még Lengyelországban és Hong-Kongban, illetve az 1C-t szintén azonosították Lengyelországban (Balka et al., 2018).

A hazánkban megfigyelt trendeket több tanulmány is megerősíti, melyek szerint a sertéskereskedelem játssza a fő szerepet a PRRSV-1 európai terjedésében, illetve hogy a keleti országokat az import sertésállományok célállomásaként tartják számon (Balka et al., 2018; Franzo et al., 2022).

10.1.1.2 ORF5 nukleotid- és aminosavszekvencia-alapú elemzései

A 17 évet átölelő időszakból származó, magyarországi eredetű PRRSV-1 ORF5 szekvenciákon belül átlagosan 12%-os genetikai távolságot figyeltünk meg. Ilyen mértékű genetikai diverzitás nem egyedülálló a PRRSV-1 esetében, valamint általánosan elmondható, hogy az idő előrehaladtával folyamatosan növekvő tendenciát mutat világszerte (Franzo et al., 2015; Frossard et al., 2013; Frossard és Williamson, 2018; Kim et al., 2010; Kvisgaard et al., 2013c; Mateu et al., 2006; Prieto et al., 2009; Shin et al., 2022).

A magyarországi reprezentatív ORF5 szekvenciákból összeállított adatsor vizsgálatával lehetőségünk nyílt a GP5 diverzitásáról szerzett ismeretek bővítésére (**5. ábra**, 55.o.). A GP5 as szekvenciaillesztésekor talált polimorf pozíciók számának összehasonlítása az irodalomban leírtakkal korlátokba ütközik, mivel a legtöbb közlemény jelentősen rövidebb időintervallum alatt gyűjtött adatokra támaszkodik, vagy az eredmények nem terjednek ki erre az információra. Mindenesetre dán PRRSV-1-törzsek 10 éves periódust lefedő vizsgálata kisebb mértékű diverzitást mutatott (Kvisgaard et al., 2013c).

Habár a GP5-öt az egyik fő neutralizáló antigénként tartják számon, a PRRSV-1-törzseknél eddig egyetlen feltételezett neutralizáló epitópot mutattak ki, amelynek *in vivo* szerepe továbbra is kérdéses (Van Breedam et al., 2011; Vanhee et al., 2011; Wissink et al., 2003; Wu et al., 2020). A nevezett 29WSFADGN35 epitóp jelenlétét az érett GP5 fehérje felszínén és

ezáltal annak lehetséges szerepét a vírus neutralizációban több tényező befolyásolhatja, például az N-glikoziláció vagy az N-terminális szignálszekvencia lehasadásának helye (Thaa et al., 2017; Veit et al., 2022). Mindazonáltal az epitóp 32. as pozíciójában az általunk azonosított szubsztitúciók jelenlétét korábbi közleményekben is leírták már (Fitzgerald et al., 2020; Hsueh et al., 2023; Kim et al., 2021; Lee et al., 2023). Ebben a pozícióban változatosságot egyedül két alkalmazott MLV-vakcinával (Unistrain PRRS és Porcilis PRRS) legnagyobb hasonlóságot mutató koreai PRRSV-1-törzseknél figyeltek meg nemrégiben (Kim et al., 2021; Lee et al., 2023). Kládonként vizsgálva a magyarországi eredetű PRRSV-1 GP5 szekvenciák 32. as pozícióját azt találtuk, hogy egy-egy szekvencia kivételével (1B, 1C, 1E, Reprocyc) az aminosav-változatosságot nagyrészt a Spanish (tartalmazza az Unistrain PRRS vakcina- és vakcinaszerű törzseket), 3D és X2 kládok hordozzák, valamint a két megfigyelt szubsztitúció (A/V32) eloszlása az as szekvenciák között jellegzetes mintázatot mutat. Az 1B, Spanish és Reprocyc kládokat leszámítva az alanin (A) a konszenzus as, míg az Unistrain PRRS és a Reprocyc PRRS vakcinatörzseknél, illetve azok szülői vad típusú törzseinél valin (V) található a kérdéses pozícióban. Az említett eredmények bizonyos MLV-vakcinatörzsekre ható evolúciós mozgatóerőre utalhatnak. A PRRSV-törzseknél úgy találták, hogy az állományok vakcinázása hozzájárul a genetikai heterogenitás növekedéséhez, illetve a gazdaszervezet által termelt antitestek erős szelekciós nyomást gyakorolnak a törzsekre (Chen et al., 2016; Kwon et al., 2019). Az általunk vizsgált magyar, illetve koreai törzsek esetében megfigyelhető volt pozitív szelekciós nyomás a feltételezett neutralizáló epitóp területén (**6. ábra**, 56.o.) (Kim et al., 2021; Shin et al., 2022).

A PRRSV elleni védekezésben fontos szerepet játszanak a neutralizáló ellenanyagok, valamint a sejtes immunválasz elemei is, tanulmányozásukkal lehetőség nyílik az immunválaszt elkerülő variánsok jellemzésére. Mind a neutralizáló ellenanyagokkal, mind a sejtes immunitással kapcsolatban megállapították, hogy a fertőző PRRSV-törzstől függő, lassú válaszreakció zajlik le a gazdaszervezetben (Darwich et al., 2010; Madapong et al., 2020). Az elmúlt évtizedekben számos vizsgálat mutatott ki feltételezett T-sejt epitópokat és B-sejt antigenikus régiókat a GP5-ön (Díaz et al., 2009; Mokhtar et al., 2014; Vanhee et al., 2011). A magyar PRRSV-1-törzseknél számos szubsztitúciót találtunk mindkét T-sejt epitópban (as61–75 és as117–128), illetve a GP-II (as145–156) és GP-III (as165–176) antigenikus régiókban (**5. ábra**, 55.o.). Dániában jóval kisebb mértékű változatosságot figyeltek meg ezeknél a régióknál, ellenben egyes ázsiai országokban pár évet átölelő időintervallumban az általunk megfigyelthez hasonló mértékűt (Kvisgaard et al., 2013c; Lee et al., 2023). A felsorolt epitópok és antigenikus régiók közül mi egyedül a GP-I-ben mutattunk ki diverzifikáló szelekció alatt álló kodonokat, mely megfigyelést idáig kizárólag Olaszországban előforduló PRRSV-1-törzsekkel kapcsolatban írtak le (Franzo et al., 2015). Ettől eltérő eredmények olvashatóak koreai PRRSV-1-törzsekről, ahol pozitív szelekció alatt álló as pozíciókat észleltek

a T-sejt epitópokban, méghozzá MLV-vakcinák bevezetését követően (Kwon et al., 2019). A GP-I és GP-IV régiók környékével kapcsolatban az tapasztaltuk, hogy általában más országokból származó törzseknél sem hordoz nagy változatosságot (Hsueh et al., 2023; Kvisgaard et al., 2013c; Lee et al., 2023; Veit et al., 2022).

Szakirodalmi adatok alapján mindkét PRRSV fajhoz tartozó vírustörzsek esetében megfigyelhető a pozitív szelekció alatt álló egyedi aminosavak jellegzetes mintázata: a szignálszekvencia teljes és az ektodomén-szekvencia részleges területén, illetve a transzmembrán-szekvencia egy-egy pozícióját érintő régiókban fordulnak elő (Franzo et al., 2015; Rupasinghe et al., 2022). Egy átfogó szekvenciagyűjtemény elemzése szerint a PRRSV-1-törzsek esetében a teljes GP5-re jellemző a tisztító szelekció (Franzo et al., 2015). Olaszországban, a vizsgálataink által lefedetthez hasonló időintervallumban, viszont jóval alacsonyabb számban (nagyjából fele annyi) gyűjtött szekvenciaadatok elemzésekor azonosított, diverzifikáló szelektív hatás alatt álló as pozíciókat három kivétellel (21., 63. 104.) az általunk elemzett mintákban sikerült azonosítanunk. Továbbá 13 olyan as pozíciót is kimutattunk, amit az olaszországi gyűjteményben nem azonosítottak (Franzo et al., 2015). Ezenkívül koreai PRRSV-1-törzsek elemzése a pozitív szelekció alatt álló kodonok tekintetében még nagyobb egyezést mutatott az eredményeinkkel (Kim et al., 2021). Számos további tanulmány ír le pozíciókat az általunk talált 25-ből, habár nagyságrendekkel kisebb számban, mely különbségek valószínűleg a mintaszám vagy a vizsgált időintervallum eltéréseiből adódnak. Ezek mellett a különböző módszerek és megszabott kritériumok is alapvetően befolyásolják a kapott eredményeket (Hsueh et al., 2023; Li et al., 2022; Shin et al., 2022).

A glikoziláció az egyik legelterjedtebb ER-hez kötött ko- és poszttranszlációs fehérjemódosulás, ami a gazdaszervezet glikozilációs rendszerétől függően a burkos vírusok membránfehérjéivel szintén bekövetkezik (Bagdonaite és Wandall, 2018). Három típusát különböztetjük meg aszerint, hogy az oligoszacharid oldallánc az aminosavak mely atomjához kötődik: O-, C- és N-glikoziláció. Az aszparagin (N) oldalláncában található N-atomokhoz kötött N-glikoziláció folyamatáról kimutatták, hogy fontos szerepet játszik a PRRSV *in vivo* replikációjában és az ellene történő védekezési mechanizmusokban, például a GP5 glikozilációs mintázata befolyásolja a neutralizáló ellenanyagok kötődésének hatékonyságát (Ansari et al., 2006; Faaberg et al., 2006; Wei et al., 2012). Az N46 és N53 világszerte konzerválnak bizonyul a PRRSV-1-törzsekben, mutáció ritkán fordul elő ezekben a pozíciókban (Fitzgerald et al., 2020; Greiser-Wilke et al., 2010; Kim et al., 2010; Kvisgaard et al., 2013c; Lee et al., 2017; Pesente et al., 2006; Wang et al., 2019b). Ezzel párhuzamosan az N46 és N53 mellett az N37 a másik leggyakrabban azonosított potenciális N-glikozilált pozíció (Kvisgaard et al., 2013c; Lee et al., 2017; Thaa et al., 2017; Wang et al., 2019b). Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy az N46 jelenlétének meghatározó szerepe van a

víruspartikula összeszerelődésében és a vírus fertőzőképességében (Ansari et al., 2006; Wissink et al., 2004). Ugyan csekély mennyiségben, azonban aminosavcserét ebben a pozícióban rajtuk kívül más vizsgálatok szintén azonosítottak. A glikozilációs mintázatok összehasonlítása szerint az N46 hiányával párhuzamosan az N37 jelenléte figyelhető meg, ami felveti annak a lehetőségét, hogy az N46 szerepét az N37 helyettesítheti (Franzo et al., 2015; Lee et al., 2017; Mateu et al., 2006; Wang et al., 2019b). Annak ellenére, hogy ebben a pozícióban a glikoziláció lehetséges elvesztését leginkább a Spanish, vagyis egy MLV-vakcinatörzshöz közel álló szekvenciák csoportjában észleltük, a mintázat és a törzsek szoros kapcsolatát egyéb közlemények nem támasztják alá. A magyar PRRSV-1-törzsek döntő többségében az N37–N46–N53 glikozilációs mintázatot figyeltük meg, mely szekvenciamotívum Európa és Ázsia szerte a legelterjedtebbnek bizonyul (Fitzgerald et al., 2020; Franzo et al., 2015; Kang et al., 2018; Kim et al., 2010; Kvisgaard et al., 2013c; Lee et al., 2017). A közelmúltban a PRRSV-2-törzsekkel kapcsolatban bizonyos glikozilációs mintázatok gyakori jelenlétét kifejezetten egy-egy adott kláddal társították, ezzel szemben a PRRSV-1-törzseknél ehhez hasonló klád-specifikusság leírása eddig még nem történt meg (Paploski et al., 2022; Rupasinghe et al., 2022). Ugyanakkor az egyedi pozíciók tekintetében mi az N35-öt egyedül az X2 és Spanish kládokban fedeztük fel. További elemzéseink alapján a magyar PRRSV-1-törzseknél talált potenciális N-glikozilált pozíciók egy részére (N35, N36, N37, N38) pozitív szelekciós nyomás hatott (**4. melléklet**, 123.o.). Egy tanulmány alapján feltételezhetjük, hogy ezekre az aminosavakra ható szelekciós nyomás összefüggésben áll a glikánpajzs segítségével történő immunelkerülés mechanizmusával, ezáltal szerepet játszik a törzsek között általában megfigyelt változatos antigenitásban (Paploski et al., 2022).

Az MLV-vakcinák esetében fontos szempont azok stabilitása telepi körülmények között. A hazánkban alkalmazott PRRSV-1 MLV-vakcinatörzsek nukleotid- és aminosav-alapú szekvenciaelemzése alaposabb betekintést engedtek azok genetikai heterogenitásába. A Porcilis-vakcinatörzs korábbi irodalmi adatok alapján genetikailag stabilnak tekinthető, melyet megerősítettek jelenlegi eredményeink, hiszen mind nt, mind as szinten kismértékű diverzitást láttunk a Porcilis kládon belül (Bálint et al., 2021). Ezenfelül a GP5 neutralizáló epitópja konzervatívnak mutatkozott, illetve a GP5-nek mindössze két as pozíciójára hatott negatív szelekciós nyomás. Ezzel szemben a másik leggyakrabban alkalmazott vakcinához (Unistrain® PRRS – Spanish klád) köthető törzsek nagyfokú genetikai változatosságot mutattak, mind az egyedi aminosav, mind a neutralizáló epitóp tekintetében, valamint vizsgálataink alapján a diverzifikáló szelekció jelentős volt ezen PRRSV-1-törzsek GP5 fehérjéjén.

10.1.2 PRRSV-2-törzsek hazai elterjedése és genetikai változatossága

10.1.2.1 Leszármazási kapcsolatok és térbeli eloszlás

A PRRSV-2 elterjedése mindeddig sporadikus maradt Európában (Stadejek et al., 2013). A Magyarországon gyűjtött adatokat összefoglalva szintén ez látható, a PRRSV-2-vel fertőzött hazai sertéstelepek száma évente maximum 4 vagy 5 db volt a 2005–2021-es időszakban. A PRRSV-2-pozitív minták az ország egész területéről kimutatásra kerültek, vagyis térbeli eloszlása hazánkban nem korlátozódott egy-egy adott területre (**6. melléklet**, 126.o.). Összevetve a PRRSV-2-fertőzési esetek térbeli és időbeli eloszlását arra következtethetünk, hogy több egymástól független fertőzési gócpont alakult ki az évek során, amelyek rövid időn belül megszűntek, köszönhetően a járványvédelemnek és a mentesítési törekvéseknek. Vizsgálataink alapján a PRRSV-2 hazai terjedéséhez legfőképp két tényező járult hozzá, az egyik a fertőzött vagy vakcinázott sertésállományok vásárlása és behozatala az országba, a másik az ezt követő vírusátvitel a különböző hazai sertéstelepek között.

A kilenc PRRSV-2-lineage (L1–L9) közül mindössze az L5 és az L1 előfordulását figyeltük meg hazánkban. Mindkét klád világszerte dominánsnak mondható az L9 és L8 mellett (Murtaugh et al., 2015).

Az évek során meghatározott PRRSV-2 ORF5 szekvenciák döntő többsége a VR-2332 vad típusú törzset és annak attenuált leszármazottját (Ingelvac MLV vagy RespPRRS MLV) magába foglaló L5-be tartozott. A vakcinaszertű törzsek kimutatása esetén általában kardinális kérdés, hogy ténylegesen MLV-vakcinatörzs keringéséről van-e szó. Az Ingelvac MLV-vakcinatörzssel kapcsolatban megállapították, hogy amennyiben a telepi körülmények között azonosított ORF5 szekvencia kevesebb, mint 5%-os nt eltérést mutat, akkor valószínűsíthető a vakcinaeredet, ha pedig kevesebb, mint 2%-ot, akkor vakcinatörzs visszaizolálásáról van szó (Kikuti et al., 2021; Murtaugh et al., 2015; Shi et al., 2010b; Yim-im et al., 2023). Amellett, hogy a hazánkban talált PRRSV-2-törzsek az ORF5 szekvenciaelemzése alapján megfelelnek a korábban említett kritériumnak, a járványügyi vizsgálatok megerősítették, hogy számos PRRSV-2-fertőzési eset külföldről érkezett sertésszállítmányokhoz volt köthető. Ezzel kapcsolatban szeretnénk azt a tényt kiemelni, hogy az Ingelvac PRRS® MLV nem rendelkezik forgalomba hozatali engedéllyel hazánkban, viszont néhány európai országban igen (Dánia, Belgium, Litvánia, Luxemburg, Hollandia, Lengyelország, Portugália és Spanyolország; https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/modified-live-porcine-respiratory-and-reproducti-article-35-referral-annex-i-ii-iii_en.pdf, 2024.01.15.). A magyar PRRS-mentes sertésállományokra nézve, az importált sertések okozta veszélyforrást csökkentette a 2017-től bevezetett rendelet, miszerint csak PRRSV-negatív sertések hozhatóak be az országba (Szabó et al., 2019). Ennek ellenére, a következő években továbbra is megfigyelhető volt a

PRRSV-2 jelenléte. Ide vonatkozóan szeretnénk felhívni a figyelmet Magyarország egyik fő hízóalapanyag forrására, Dániára, és az ott folytatott kereskedelmi gyakorlatra, miszerint a vásárolt sertéseket kizárólag gyűjtőállomásokon keresztül lehet exportálni az országból Magyarországra (Szabó et al., 2019). Ezekben a létesítményekben együtt tartva a több különböző telepről érkező, eltérő életkorú és immunstátuszú egyedeket, előfordulhat, hogy néhány vírust hordozó egyed megfertőzi a mentes egyedeket, illetve ugyanígy a vakcinázott egyedek terjeszthetik a vakcinatörzseket. A PRRSV-2 nem endemikus Európában, ezért az Ingelvac PRRS® MLV-vakcina nem egységes alkalmazása Európa területén minden országra veszélyforrást jelenthet, hiszen a vakcinát engedélyező országokból élőállat-forgalom segítségével időszakosan megtörténhet a vakcinatörzs elterjedése. Mint ahogy a PRRSV-1, úgy a PRRSV-2 országon belüli terjedésének szintén kedvez, ha a járványvédelmi intézkedéseket alkalmanként elhanyagolják, különböző sertéstelepek közösen használnak felszerelést vagy járműveket, valamint ha a létesítmények nem megfelelően vannak elválasztva egymástól. A nem vakcinázott sertésállományokban megjelenő MLV-vakcinatörzsek járványügyi szempontból jelentős szereppel bírnak. Hasonlóan a vad típusú törzsekhez járványkitöréseket vagy gazdasági kártételt okozhatnak, amit az Ingelvac MLV esetében hazánkban, Litvániában és Dániában egyaránt megfigyeltek már (Chen et al., 2021; grosse Beilage et al., 2009; Kvisgaard et al., 2013a; Murtaugh et al., 2003; Stankevicius et al., 2008; Storgaard et al., 1999). A hazai 2020–2021-es PRRSV-2 fertőzési lánc igazolja, hogy akár egy erős járványvédelmi stratégiával rendelkező országban is fertőződhet rövid időn belül, több egymástól távoli sertéstelep.

A PRRSV-2 L1 törzsek hazai jelenléte egyetlen integráció különböző sertéstelepeihez volt köthető. A PRRS-mentesítési program elindulása után ezekről a telepekről véglegesen felszámolták a keringő L1 törzseket. Európában ezt a lineage-et egyedül a Magyarországon azonosított ORF5 szekvenciák és egy teljes genom, valamint egyetlen Szlovákiából származó ORF5 szekvencia képviseli (Balka et al., 2015; Jacková et al., 2013). Noha a filogenetikai elemzések során ezek a szekvenciák Kanadából és USA-ból származókkal csoportosultak, mégis egy teljesen külön kládot alkottak (**7. ábra**, 58.o.). A PRRSV-2 ORF5-alapú klasszifikációját aktualizálták 2023-ban és a magyarországi eredetű, 2012-ben izolált L1 törzset (PRRSV-2_Hungary_102_2012, KM514315) az újonnan elnevezett L1E sublineage-be (korábban L1D-alpha) sorolták (Paploski et al., 2021; Yim-im et al., 2023). Ennek a sublineage-nek az eredete egészen az 1990-es évek előtti vezethető vissza és az USA-ban ez volt az egyik uralkodó klád az 1990-es évektől 2003-ig (Paploski et al., 2021; Shi et al., 2013; Yim-im et al., 2023). Hazánkban 2005-ben detektáltak először L1 szekvenciát, azonban nem áll rendelkezésre elegendő adat ahhoz, hogy pontos eredetét megállapíthassuk.

10.1.2.2 ORF5 nukleotid- és aminosavszekvencia-alapú elemzései

Mind az L5, mind az L1 hazai tagjairól elmondható, hogy kismértékű genetikai diverzitással rendelkeznek. Az ORF5 szekvencia alapján a behurcolt L5 törzsek nem halmoztak fel 5%-nál nagyobb genetikai távolságot az Ingelvac MLV-vakcinatörzsszel összehasonlítva, illetve az egymás között megfigyelt genetikai távolság maximum 7,4% volt. Az elérhető irodalmi adatok alapján az eredményeinkhez képest a legtöbb európai országban alacsonyabb, míg Dániában nagyobb genetikai diverzitást figyeltek meg az L5 szekvenciák között (Greiser-Wilke et al., 2010; Indik et al., 2005; Kvisgaard et al., 2013a; Stadejek et al., 2013).

A GP5 kizárólagos tanulmányozása alapján csupán két as cseré (as13, R→Q; as151, R→G) szolgál a VR-2332- és az Ingelvac MLV-törzsek megkülönböztetésére (Yuan et al., 2001). Mivel részleges GP5 szekvenciákkal (as31–174) dolgoztunk, kizárólag a 151. as pozíció elemzését tudtuk elvégezni (8. ábra, 59.o.). Ebben a pozícióban számos szubsztitúciót észleltünk, a szekvenciák felénél a VR-2332-re jellemző as cseré történt. Mindazonáltal ebben a pozícióban jellegzetes tulajdonság a magas mutációs ráta és a pozitív szelekciós nyomás (Delisle et al., 2012; Storgaard et al., 1999). Eredményeink alapján, járványügyi nyomozás nélkül a GP5-ben történt as cserék vizsgálatából nem vonható le egyértelmű következtetés, hogy a vadtypusú, a vakcinatörzs vagy leszármazottainak jelenlétét mutattuk-e ki.

A GP5 meghatározó szerepet játszik a vírusneutralizációs folyamatokban, továbbá a fertőzés egyeden belüli újbóli fellángolásában is (Chen et al., 2016; Ostrowski et al., 2002; Popescu et al., 2017; Robinson et al., 2015; Young et al., 2021). A magyar PRRSV-2-törzsek részleges GP5 as szekvenciáiban kevés polimorf pozíciót találtunk. Az L5 szekvenciák esetében azok az as pozíciók (as56–57, as102, as104) hordozhatnak releváns információt, amelyeket korábban immunelkerüléssel hoztak kapcsolatba, így betekintést nyerhetünk a vakcinatörzsek evolúciós változásaiba (Fan et al., 2015; Popescu et al., 2017). Az említett pozíciókban szubsztitúciót egyaránt találtunk tünetmentes, valamint megnövekedett halálozási arányt mutató sertésállományokból vett mintákban. Ezt az ellentmondást tovább erősíti, hogy például nem minden klinikai tünetekben megmutatkozó dán L5 törzs hordoz ezekben a pozíciókban as cserét (Kvisgaard et al., 2013a).

A GP5-ben található két neutralizáló epitóp közül az egyik konzervatív volt (B, as37–45), míg a másikban (C, as52–61) számos szubsztitúció előfordult a vizsgált szekvenciákban. Egy globális PRRSV-2 GP5 adatsor alapján az epitóp B régió kismértékű, mindössze három aminosavat (as38–39, as41) érintő változatosság fedezhető fel (Veit et al., 2022). A PRRSV-2 GP5-re jellemző egy úgynevezett „csali epitóp” (decoy epitope, as27–31) jelenléte, amely a szignálszekvencia hasítási helyétől függően megtalálható az érett GP5 fehérjén (Thaa et al., 2013). Habár ez a „csali epitóp” immundomináns, nem neutralizáló immunválaszt vált ki (Lopez és Osorio, 2004; Ostrowski et al., 2002). Mivel részleges szekvenciák álltak rendelkezésünkre,

így a „csali epitópot” és annak az antigenitásra gyakorolt potenciális hatását nem tudtuk elemezni a magyarországi PRRSV-2-törzsekben.

A GP5 N-glikozilációja jelentősen befolyásolja a vírus fertőzőképességét és antigenitását, valamint a gazdaszervezet immunválaszát (Ansari et al., 2006; J. Li et al., 2015; Wei et al., 2012). A számos lehetséges N-glikozilált pozíció közül az N44 és N51 konzervatívnak bizonyult a PRRSV-2-törzsekben (**8. táblázat**, 60.o.), ami utalhat arra, hogy ezek a pozíciók létfontosságúak a fertőzés kialakulásához (Ansari et al., 2006; Wei et al., 2012). Az N30 egy másik gyakran konzervált pozíció, azonban a hazai PRRSV-2-törzsek részleges szekvenciaadatai miatt nem tudtuk annak elemzését elvégezni. Az irodalmi adatok összehasonlítása érdekében az azonosított lehetséges N-glikozilált pozíciókat hat különböző mintázatba rendeztük. Ezek közül a két leggyakoribb (A, N33–N44–N51 és B, N34–N44–N51) az USA-ban is széles körben elterjedt (Delisle et al., 2012). Az Ingelvac MLV-vakcinatörzs glikozilációs mintázata az N30–N33–N44–N51. Az N30 pozíción kívül az N33-ban számos mutációt találtunk, ami jelezheti a vakcinatörzs gazdaszervezet immunválaszának megkerülésére irányuló tendenciáját.

10.2 Hagyományos DNS-könyvtárkészítés és NGS alkalmazása a PRRSV-törzsek vizsgálataiban

10.2.1 ORF2–7 nukleotid- és aminosavszekvencia-alapú elemzései

A 2020–2021-es PRRSV-2-járványok molekuláris vizsgálata során a rutin ORF5 és ORF7 mellett az ORF2–7, azaz az összes szerkezeti fehérjét kódoló régió tanulmányozására is támaszkodtunk. A két rövidebb régió alapján a mintázott PRRSV-2-törzsek az Ingelvac MLV-vakcinatörzshöz álltak genetikailag a legközelebb, azonban közismert tény, hogy egy régió vizsgálata félrevezető lehet a PRRSV-törzsekben megfigyelt széleskörű rekombináció miatt (Cui et al., 2022; Darwich et al., 2011; Dortmans et al., 2019; Yu et al., 2022).

Az összesen hét érintett sertéstelep közül öt esetében sikerült az ORF2–7 nukleotidsorrendjének meghatározása hagyományos DNS-könyvtárak Illumina készüléken zajlott futtatásával és az NGS-eredmények elemzésével. Az ORF2–7 szekvenciák és a járványügyi nyomozás segítségével igazoltuk, hogy az Ingelvac MLV-vakcinatörzs terjedése történt 2020–2021-ben.

Az ORF2–7 régión maximum 1,8%-os genetikai távolságot láttunk a vakcinatörzshöz képest, ugyanakkor az általunk vizsgált PRRSV-2-törzsek között ennél az értéknél magasabbat észleltünk (maximum 2,5%). Ez a genetikai változatosság váratlannak bizonyult, mindazonáltal az irodalmi adatok alátámasztották, ugyanis az Ingelvac MLV-vakcinaszerű törzsek teljes genomszekvenciájában a maximális genetikai távolság akár a 6,4%-t is elérheti

egy éven belül (Brar et al., 2014; Clilverd et al., 2023; Kvisgaard et al., 2013a; Rupasinghe et al., 2022).

Az ORF2–7 szekvenciák filogenetikai elemzése és a járványügyi vizsgálatok betekintést nyújtottak a vakcinatörzs átviteli útjaiba (**8. melléklet**, 128.o.). Az Eset I-ből két sertésfarmról származó minta mutatott (Farm B, 64196; Farm C 18601) magas nt azonosságot (99%) az Ingelvac MLV-vel, amik a filogenetikai fán is együtt csoportosultak. Ez bizonyította a két sertéstelep epidemiológiai kapcsolatát, illetve jelezte korai helyzetüket az átviteli útvonalban. A Farm C esetében a malacoktól (18601) és a kocáktól (19001) származó minták között viszonylag nagy szekvenciakülönbséget láttunk (nt azonosság 97,6%). Ez egybevágh egy 2023-as tanulmány eredményeivel, mely alapján a fertőzési ciklus során a különböző korú sertések között nagyobb mértékű lehet a vírus divergenciája (Clilverd et al., 2023). A minták közül a 19001 (Farm C) és 19601 (Farm E) egy csoportot alkotott a filogenetikai fán, rámutatva a két farm közötti fertőzési útvonalra, és genetikailag a legtávolabbinak bizonyultak a vakcinatörzshöz viszonyítva (nt azonosság: 98,3% és 98,2%). A vakcinatörzssel meglepő módon a legnagyobb nt azonosságot (99,9%) a Farm D mintája (19702) mutatta. Ennek fényében úgy gondoljuk, hogy a járvány kezdetén fertőzött sertéseket szállítottak a B farmról a vágóhidra, majd a vírus akkor terjedhetett tovább a D farmra amikor ott végezték a vágóhid szállítójárművének mérlegelését a sertések elszállítását megelőzően. Mivel ez a vírusvariáns valószínűleg elhanyagolható mennyiségű élőállatban passzálódott, így nem is tudott olyan mértékű mutációkat felhalmozni, mint a telepi körülmények között keringő variánsok.

A VR-2332 attenuálásakor as változás leginkább a nem szerkezeti régió fedezhető fel (Yuan et al., 2001). A két törzs génbankban található szekvenciáival (AF066183 és EF536003) összehasonlítva mindegyik vizsgált ORF2–7 aminosav-szekvenciát 7 db pozícióban találtunk az Ingelvac MLV-törzssel megegyező aminosavat, míg csupán 2 db volt azonos a VR-2332-törzssel. Következésképpen, mind a nukleotid- és aminosav-azonosságok, mind a járványügyi nyomozás bizonyította a 2020–2021-es járvány vakcinatörzs-eredetét.

Munkánk során célunk volt, hogy a sporadikusan megjelenő PRRSV-2-vakcinatörzsek sertéstelepeken belül zajló evolúciós változásait tanulmányozzuk. Az ORF2–7 régióknak a mélyszekvenálásával 4 db mintában széles skálán változó kvázispecies változatosságot találtunk. Lényeges kérdés volt számunkra, hogy a vakcinatörzshöz köthető variánsokban megfigyelhető-e a revertálódás tendenciája. A talált SNV-k ezt egyik mintában sem támasztották alá, csupán pár SNV egyezett meg a vad típusú VR-2332-törzssel. Az SNV-k számában nem találtunk összefüggést arra nézve, hogy a kezdeti fertőzést követően mennyi idő telt el. Mindez tovább erősíti azt az elképzelést, hogy egy-egy adott vírustörzs mindegyik variánsára egyeden belül és sertésállományok között más-más mikroevolúciós és szelekciós nyomás hat (Brar et al., 2014; Clilverd et al., 2023; Cortey et al., 2018).

10.2.2 Kevert fertőzések azonosítása

A hagyományos DNS-könyvtárkészítő módszer bevonásával az Ion Torrent készüléken zajló NGS-eljárás kevert fertőzések, vagy több PRRSV-variáns egyidejű kimutatására alkalmasnak bizonyult. Habár ez a megközelítés támogatta a rutin diagnosztikát, e dolgozatban egy későbbi fejezetben szeretnénk bemutatni alaposabban a kevert fertőzések tekintetében levont következtetéseinket, az Illumina rendszerre fejlesztett megközelítés eredményeinek együttes bemutatásával (10.3.2. fejezet).

10.3 Illumina-kompatibilis kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítés

10.3.1 Módszer kiértékelése

Megjelenése óta az NGS-technológia folyamatos térhódítása az élettudományok minden területén érzékelhető. Nincs ez másképpen az állatorvosi diagnosztikában, ahol az NGS-módszereket rutinszerűen a kórokozók azonosításában és karakterizálásában hasznosítják (Belák et al., 2013; Kaszab et al., 2020; Kumar, 2019; Suminda et al., 2022; Van Borm et al., 2016, 2015).

Munkánk elsődleges célja volt olyan NGS-módszerek kidolgozása, specifikusan a PRRSV-re, amelyek hozzájárulhatnak mind a PRRSV-törzsek kutatásához, mind a diagnosztikájához. Ennek érdekében a már meglévő, gyakran alkalmazott molekuláris módszerek mellé szerettünk volna új megközelítési módokat nyújtani. Az általános diagnosztikai munkakörnyezethez igazítva az elképzeléseinket úgy véltük, hogy az NGS lehetséges alkalmazása a gyors, egyszerű és költséghatékony DNS-könyvtárkészítésben rejlik. Az Illumina mint az egyik jelentős NGS-technológiát szolgáltató cég, számos piacvezető készüléket forgalmaz, emellett a szekvenálás kémiája lehetővé teszi ezen készülékekre specifikus, alternatív könyvtárkészítő módszerek fejlesztését. Céljainkhoz igazodva, a PRRSV vizsgálatához adaptáltunk egy érzékeny, költség-, és időhatékony, kizárólag PCR-rendszerre épülő, fúziós primerek segítségével megvalósuló DNS-könyvtárkészítő módszert (Bybee et al., 2011; Gohl et al., 2020; Holm et al., 2019; Xiao et al., 2020). Az említett, Illumina rendszerekkel kompatibilis, PCR-alapú könyvtárkészítést az állatorvosi tudományokon belül mind a mai napig rendszerint a 16S-alapú metagenomikai elemzésekhez használják (Johnston et al., 2017; Lowman et al., 2023; Vidal et al., 2017; Wolf-Jäckel et al., 2021). Az amplikon-mélyszekvenálást nem kizárólag egy-egy adott cél régió vizsgálatára lehet csak alkalmazni. Multiplex PCR és átfedő fúziós primerek segítségével a teljes genom felszaporítása és vizsgálata szintén lehetséges (Gohl et al., 2020). Ezen PCR-alapú könyvtárkészítő módszereknek a fő előnye, hogy nagyfokú rugalmasságot nyújtanak: a fúziós primerek az Illumina-specifikus szekvenáló és vonalkód-szekvenciák mellett a vizsgálni kívánt célgénre illeszkedő szakaszokat is tartalmaznak, melyek az adott igényeknek és céloknak megfelelően alakíthatóak.

Kutatómunkánk során, mint új DNS-könyvtárkészítő megközelítés, a PRRSV-törzsek ORF7 régiójára, illetve a Porcilis- és Unistrain-vakcinatörzsek teljes genomjára fókuszálva adaptáltuk a kétlépéses PCR-alapú módszert. Az Illumina egyes készülékeire (MiSeq széria és NextSeq 1000 & 2000) elérhetőek olyan szekvenáló reagensek és kitek, amelyek maximum 2x300 bp hosszú readeket biztosítanak. Ezekkel kivitelezve az amplikon-mélyszekvenálást, elméletben 600 bp hosszúságú termék (paired-end beállítás) nukleotidsorrendje állapítható meg, ezért PCR-rendszereinket ennek megfelelően alakítottuk ki. Mivel tudomásunk szerint hasonló módszer alkalmazásáról a PRRSV-vel kapcsolatban eddig egyetlen folyóiratcikk sem jelent meg, így eredményeinket teljes genom nukleotidsorrendjének meghatározására irányuló egyéb NGS-módszerekkel tudtuk összehasonlítani.

A nukleokapszidot kódoló ORF7 az egyik legkonzervatívabb szakasza a PRRSV-genomnak, ennek okán számos diagnosztikai módszer célozza a PRRS-fertőzés jelenlétének kimutatására, valamint filogenetikai elemzésekhez egyaránt felhasználható (Kvisgaard et al., 2017; Le Gall et al., 1998; Pan et al., 2023; Shi et al., 2010a; Stadejek et al., 2013, 2008). A fentiek alapján az ORF7 régió mélyszekvenálásához egy olyan univerzális primerpárt terveztünk, amely lehetővé teszi mind a PRRSV-1-, mind a PRRSV-2-törzsek detektálását és molekuláris genetikai vizsgálatát.

A primerpár tesztelését a két PRRSV prototípus törzssel (PRRSV-1: Lelystad, PRRSV-2: VR-2332) végeztük el, továbbá a PCR-rendszer érzékenységének megállapításához szintén ezen törzsek PRRSV-negatív malacsavóban hígított mintáit (spike-in) használtuk fel. Kezdeti vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy a primerpár mindkét fajra specifikus, illetve a PCR-1 során nem történik termék képződése egyéb állatorvosi jelentőséggel bíró sertésmegbetegedések kórokozóinál.

Az amplikon DNS-könyvtárkészítő módszer spike-in mintákkal végzett kísérletével kimutattuk, hogy annak vírustelítettségre vonatkozó érzékenységi határa mindkét faj esetében körülbelül a Ct 34 (**9. melléklet**, 129.o.). Egy 2021-ben megjelent teljesgenom-szekvenálási (WGS, whole genome sequencing) eljárás érzékenysége hasonlóan bizonyult (<Ct 34,1) az általunk adaptált ORF7 amplikon-mélyszekvenálási megközelítéshez (Gagnon et al., 2021). Ugyanakkor a WGS-módszerekre általában jellemzőbb, hogy Illumina készülékekkel kivitelezve, a magas Ct-értékű (25–30) savómintáknál gyakran meghiúsul a teljes genom összeállítása, ellenben az ORF7 régió meghatározása ilyen esetekben is megbízható módszernek bizonyul (Gagnon et al., 2021; Kim et al., 2022; Trevisan et al., 2022; Vandenbussche et al., 2021; Zhang et al., 2017).

Annak ellenére, hogy a célfaj specifikus readek arányát számos tényező befolyásolhatja (például a tisztítási lépés), az irodalomban általánosan jellemző ezen érték használata és összehasonlítása a különböző módszerek között, mivel információt ad az alkalmazott NGS-módszer hatékonyságáról. Az általunk fejlesztett könyvtárkészítő rendszerrel a

PRRSV-specifikus readok maximális aránya a spike-in mintákban nagyobb volt (98%), mint bármely, az Illumina platformokon történt NGS-módszerfejlesztésre irányuló korábbi kutatásban (Gagnon et al., 2021; Vandebussche et al., 2021; Zhang et al., 2017). Egyéb tényezők mellett ez a statisztika függhet az alkalmazott szekvenáló eszköztől, mivel a 454 GS Jr és a Roche 454 FLX készülékeken végzett PRRSV-vel kapcsolatos WGS-vizsgálatokkal magasabb értéket értek el (Brar et al., 2014; Kvisgaard et al., 2013b). Érdemes megjegyezni, hogy Kvisgaard és munkatársai (2013) szintén PCR-termékek újgenerációs szekvenálását hajtották végre, azonban hagyományos, kereskedelmi forgalomban kapható könyvtárkészítő kitekkel dolgoztak. A PRRSV-specifitásra vonatkozólag úgy véljük, hogy az ebben a disszertációban ismertetett, ORF7-re irányuló ampikon-mélyszekvenálási módszeré magas, mivel a 30–35 Ct-értékkel rendelkező spike-in mintákban a PRRSV-ből származó readok átlagos aránya nem esett 40% alá, az irodalmi adatokban megfigyelt <10%-hoz képest (Gagnon et al., 2021).

Az ORF7 ampikon-mélyszekvenálás alkalmazhatóságát szintén ellenőriztük hazai sertésstelepekről származó, 15 db archivált savópoolmintával (**12. táblázat**, 69.o.). Ezek a minták az ORF5 előzetes filogenetikai vizsgálata alapján változatos hazai PRRSV-kládokat képviseltek. Az ORF7 konszenzus szekvencia összeállítása egyetlen minta, a 30156_20 esetében hiúsult meg, amelynek Ct-értéke közel esett a módszer kimutatási határához (31,6/34). Feltételezzük, hogy az archivált minta tárolása, illetve az ismételt fagyasztás-olvasztás következtében az alacsony kópiaszámban jelenlévő RNS degradációja történhetett. A rendszer klinikai mintákon történő alkalmazhatóságának alaposabb felméréséhez szükséges lenne több, a PRRSV-t alacsony kópiaszámban (Ct 30–35) tartalmazó mintával is elvégezni a kísérletet. Egy másik lehetőség, hogy a 30156_20 minta olyan variánsok csoportját reprezentálta, amelyeknél a primer kötőhelyein valamilyen mutáció áll fenn. Az említett felvetésre megoldás lehet a hazai vagy akár nemzetközi kládokba tartozó mintaszám növelése. Mindazonáltal sikerült bizonyítanunk, hogy a kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítő módszer biztonsággal alkalmazható nagy genetikai diverzitást mutató PRRSV-törzsek esetében.

Egy adott járványtani vagy diagnosztikai vizsgálat elvégzéséhez az alacsony vírustelítettségű klinikai minták esetében alapos megfontolást igényel a megfelelő NGS-megközelítés kiválasztása, hiszen az korlátozhatja a tervezett elemzések sikerét. A random hexamer alapú teljes genomsekvencálás általánosan elterjedt módszer, valamint a legalkalmasabbnak bizonyul a keringő vírustörzsek genetikai jellemzéséhez, a variánsok meghatározásához, a rekombináns törzsek azonosításához, vagy a vakcina-, vakcinaleszármazott és vad típusú törzsek elkülönítéséhez (Belák et al., 2013; Cortey et al., 2017; Djikeng et al., 2008; Quer et al., 2022). A vírusgenom vagy bizonyos cél régiók előzetes dúsítása a klinikai mintáknál a legtöbb esetben elengedhetetlen (Ballester et al., 2016). Az

általunk kidolgozott ORF7 amplikon-mélyszekvenálás rendkívül hatékonynak és érzékenynek bizonyul, továbbá mivel a költsége és a ráfordítandó idő egy nested PCR munkafolyamatával egyezik meg, alkalmas lehet a fertőző PRRSV-törzsek előzetes molekuláris epidemiológiai vizsgálatára.

Miután meggyőződünk róla, hogy a kidolgozott PCR-alapú könyvtárkészítő eljárás egy adott amplikon-mélyszekvenálásra alkalmas, kísérletet tettünk arra, hogy azt egy multiplex PCR-rendszerbe beépítve, a Porcilis- és Unistrain-vakcinatörzsek teljes genomjának felszaporítását és szekvenálását megvalósítsuk. Az Illumina rendszerek nyújtotta maximum 600 bp-t átölelő amplikonméretet figyelembe vettük és mind a két vakcinatörzs 15 kbp hosszúságú genomjának 100%-os lefedéséhez 34 db fúziós primerpárt alakítottunk ki. A teljes genomot felszaporító multiplex PCR-ek esetében létező probléma a kialakuló primerdimerek miatti amplikonkiesés, ezért előzetesen elvégeztük a primerszett ilyen jellegű elemzését *in silico* (Itokawa et al., 2020). Az egyedi PCR-ek igazolták a primerek működőképességét és, mint ahogy az irodalmi adatok is számos esetben mutatják, szükségszerű volt a primerek poolozásán finomítani (Gohl et al., 2020; Quick et al., 2017). A többlépcsős optimalizálás után sikerült elérnünk, hogy a szekvenálási mélység a poolAv3 felhasználásával egységes képet mutasson a Porcilis-vakcinatörzs teljes genomjának hosszán (**14. ábra**, 71.o.). Ezt alátámasztotta az amplikononkénti minimum és maximum szekvenálási mélység elhanyagolható különbsége (14–16×). Habár csupán egy Unistrain-vakcinamintát vizsgáltunk, bizonyítottuk, hogy a primerszett szintén alkalmas ennek a vakcinatörzsnek a felszaporítására, valamint a teljes genom összeállítására. Ahhoz, hogy ellenőrizni lehessen a poolAv3 hatékonyságát erre a törzsre nézve, több vakcinaminta bevonása szükséges.

10.3.2 PRRSV-1 ORF7 nukleotidszekvencia-alapú elemzései

A munkánk egyik céljaként meghatározott, kétlépéses PCR-alapú könyvtárkészítési módszer kidolgozásával lehetővé vált a PRRSV-genom ORF7 szakaszának részletes genetikai elemzése. A dolgozatban ismertetett módszer segítségével egy vagy több PRRSV-törzs együttes jelenlétének kimutatásán felül a sertésstelepeken, vagy az egyedeken belüli víruspopuláció feltérképezése szintén megvalósítható.

Noha az ORF7 régió a PRRSV-genom egyik legkevésbé változékony szakasza, több tanulmány megállapította, hogy jelentős genetikai variabilitással rendelkezik. Az ORF7 amplikon-mélyszekvenálással vizsgált 15 db savópoolmintából nyert ORF7 konszenzus szekvenciák ezt szintén alátámasztják, hiszen közöttük hasonló mértékű változatosságot találtunk, mint amit világszerte leírtak (Franzo et al., 2021; Frossard et al., 2013; Kvisgaard et al., 2013c; Shin et al., 2022).

A konszenzus szekvenciák meghatározásán felül az amplikon-mélyszekvenálás segítségével öt mintában egyidejűleg azonosítottunk és állítottunk össze két-két ORF7

szekvenciát. A szekvenciapárok között megfigyelt genetikai eltérés mértéke arra utal, hogy az adott sertéstelepeken a mintavételi időszakban, párhuzamosan minimum két PRRSV-törzs keringett (Lalonde et al., 2020). A nt azonosság értékei alapján négy minta esetében a minor szekvenciák Porcilis-vakcinatörzseredetű variánsokat képviseltek (Bálint et al., 2021). Két mintánál (2208_19 és 474_19) ezt szintén megerősítette, hogy a mintavétel időszakában ezen vakcinával történt a telepeken a sertések immunizálása. A PRRS-fertőzés megelőzésének érdekében alkalmazott MLV-vakcinából származó vakcinatörzsek és a vad típusú törzsek együttes előfordulását a sertéstelepeken már több tanulmány is bizonyította (Cheng et al., 2022; Greiser-Wilke et al., 2010; Trevisan et al., 2022; Vandenbussche et al., 2021). A PRRS elleni védekezést támogató molekuláris epidemiológia szempontjából ez abban az esetben okoz problémát, ha a keringő vakcinatörzsek elfedik a vad típusú törzsek jelenlétét, ami rövid vagy hosszú távon hátráltatja a járványvédelmet (Harmon et al., 2019). Ennek megoldására számos, a vakcina- és vad típusú törzsek megkülönböztetésére szolgáló diagnosztikai módszer született az elmúlt években (Fornoy et al., 2022; Pan et al., 2023; Wang et al., 2021). Alkalmazásuk esetén azonban szem előtt kell tartani, hogy gyakorta farm-, vagy vakcinaszpecifikusak, ugyanakkor egyes NGS-eljárásokkal vagy az ORF7 amplikon-mélyszekvenálással kiküszöbölhető a szekvenciaspecifikus diagnosztikai módszerek szükségessége, ezzel jelentősen lerövidítve a törzsek elkülönítésére szánt időt és anyagköltséget (Lalonde et al., 2020; Trevisan et al., 2022).

Az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás segítségével betekintést nyertünk a PRRSV víruspopulációjának genetikai diverzitásába. Habár egy konzervatív génről van szó, korábbi kutatások alapján az ezen a genomszakaszon felhalmozott mutáns spektrum részét képezi a kvázispeciesnek (Brar et al., 2014; Clilverd et al., 2023; Cortey et al., 2018; Xing et al., 2022). Az értekezésben felhasznált savópoolmintákból nyolcban heterogén víruspopulációt fedeztünk fel az NGS-eredmények bioinformatikai elemzésével. Az irodalmi adatokkal megegyezően, mi sem láttunk egyértelmű mintázatot, azaz az általunk azonosított SNV-pozíciók a minták között és az ORF7 régió mentén egyenlőtlenül oszlottak el (Brar et al., 2014). Holott korábban az ORF7 régiót érintő SNV-mutációk között arányaiban több tranzíciót figyeltek meg, túlnyomó többségben a citozin/timin cserét, gyakoriságukat tekintve mi nem találtunk különbséget a citozin/timin és adenin/guanin csere között (Brar et al., 2014; Xing et al., 2022). Az eddig megvalósult, a PRRSV teljes genomjára koncentrált vizsgálatokban a potenciálisan nem-szinonim vagyis az változást okozó SNV-k aránya nagyobb volt az általunk leírtakhoz képest (Brar et al., 2014; Cortey et al., 2018). Az SNV-k száma két MLV-vakcinatörzs alkotta kládból (Spanish és Reprocyc) származó mintákban volt a legmagasabb. Vizsgálataink alapján ebben a két kládban az ORF7 gén esetében is az ORF5 régiónál megfigyelt, nagyfokú genetikai változatosság lehet jellemző, azonban ezen eredmények igazolásához szükséges lenne kládonként több minta tesztelése.

Annak ellenére, hogy a PRRS az egyik legnagyobb gazdasági kártétellel járó sertésmegbetegedés, a vírus-kvázispecies feltárásával kapcsolatos közlemények száma mindeddig elenyésző, ennél fogva mind a sertésállomány, mind az egyedek szintjén nehéz konklúzióra jutni a genomot vagy a géneket érintő mikroevolúciós hatásokról. Mindazonáltal, az eddigi ismereteink alapján feltételezhető, hogy a PRRSV-törzsekre eltérő evolúciós tényezők hatnak.

10.3.3 PRRSV-1 Porcilis PRRS vakcina genetikai stabilitása és változatossága

Munkánk során a Porcilis- és az Unistrain-vakcinatörzsek teljes genomjának meghatározása, illetve a törzsek genetikai változatosságának felmérése érdekében amplikon-mélyszekvenálást hajtottunk végre. Vizsgálatunk tárgyaként azért választottuk a PRRSV-1 ellen létrehozott Porcilis® PRRS (MSD Animal Health) és Unistrain® PRRS (HIPRA) MLV-vakcinákat, mert hazánkban és világszerte leginkább ezeket használják a kocák és a növendék sertések aktív immunizálására (Bálint et al., 2021; Chae, 2021). Az értekezés alapjául szolgáló vizsgálatokat egyedül a Porcilis PRRS vakcinával és viszonylag alacsony mintaszámmal tudtuk elvégezni, mert a sikeres PRRS-mentesítés következtében folyamatosan kivezetésre kerültek az MLV-vakcinák a hazai piacról.

Az RNS-vírusalapú MLV-vakcinák genetikai stabilitásának ismerete mind vakcinagyártásban („batch-to-batch” változatosság), mind telepi körülmények között lényeges tényező kellene, hogy legyen. Holott egyes tanulmányok felhívják a figyelmet a vakcinagyártás során kialakuló víruspopuláció mutáns spektrumára, vagy a kontamináció jelenlétére, a különböző gyártási tételből származó MLV-vakcinák összehasonlítását célzó kutatások mind a mai napig korlátozottan állnak rendelkezésre (Höper et al., 2015; Legnardi et al., 2022; Neverov és Chumakov, 2010; Serrão de Andrade et al., 2021; Victoria et al., 2010). Az irodalmi adatok és a génbank adatbázis áttekintése során mindössze négy eltérő Porcilis® PRRS-vakcinafiolából kimutatott genomszekvencia érhető el, azonban az egyetlen, ebben a témában publikált közleménynek nem volt célja a részletes genetikai összehasonlításuk (Eclercy et al., 2021). A genetikai stabilitással összefüggésben az MLV-vakcinákhoz kapcsolódó jelentős veszélyforrás az attenuáltság elvesztése és a virulencia visszaszerzése (revertált vírustörzs), továbbá a rekombináció másik vakcinatörzsekkel, vagy vadttípusú törzsekkel (Grebennikova et al., 2004; Kimman et al., 2009; Kvisgaard et al., 2020; Sun et al., 2022; Trevisan et al., 2023; J. Wang et al., 2022). A Porcilis-vakcinatörzs esetében ellentmondásos következtetéseket olvashatunk az irodalomban, hiszen az ORF5 vizsgálata alapján telepi körülmények között magas genetikai stabilitása figyelhető meg, ellenben állatkísérletekkel kimutatták, hogy revertálódásra hajlamos lehet a törzs, ami a teljes genomszekvencia szintjén is megjelenik (Bálint et al., 2021; Eclercy et al., 2021). Ezenfelül

már karakterizáltak a Porcilis- és az Unistrain-vakcinatörzsek genetikai kereszteződéséből kialakuló rekombináns törzset (Renson et al., 2017).

Eclercy és munkatársai négy különböző Porcilis-genomszekvenciavariánst írtak le (FULL-LENGTH és deléciós variánsok: LONG-DEL, SHORT-DEL, SHIFT-DEL), amelyeket mi is felfedeztük az általunk vizsgált három vakcinamintában (Eclercy et al., 2021). A három deléciós variánsban azonosított deléció az NSP2 nem-szerkezeti fehérjét kódoló régió (as386–1445) belül található (Y. Li et al., 2015). Egy korábbi kutatás és az eredményeink alapján a Porcilis PRRS vakcinában a LONG-DEL forma fordul elő a legnagyobb arányban, és a delécióban az nt2215–2436, valamint az as666–739 régiók érintettek (KF991509 rekordhoz viszonyítva, FULL-LENGTH variáns) (Eclercy et al., 2021). Az NSP2 régió belüli inszerciókat és deléciókat először a patogenitás indikátoraként tartották számon a PRRSV-2-törzseknél, viszont a legújabb tanulmányok szerint csupán részben állnak összefüggésben a virulenciával vagy a törzs attenuáltságával (Zhang et al., 2023; Zhou et al., 2009). Jóllehet a PRRSV-1-törzsek NSP2 régiójára vonatkozóan kevesebb információ áll rendelkezésünkre, azonban ezen adatok alapján, hasonlóan a PRRSV-2-törzseknél megfigyeltékhez, ez az egyik legvariábilisabb nem-szerkezeti gén és szintén jellemző rá a deléció (Vandenbussche et al., 2021; Wang et al., 2019b). Ami bizonyos, hogy az NSP2 számos inszerciós/deléciós mutációt képes tolerálni, anélkül hogy az befolyásolná a vírus fertőző és replikációs képességét (Han et al., 2007; Kim et al., 2009).

Az értekezésben vizsgált Porcilis-vakcinamintákból származó és a génbankban fellelhető teljes genomszekvenciák összehasonlításából kizártuk az említett NSP2 deléciós régiót, így mindössze 0,1%-os genetikai eltérést találtunk, mely a különböző gyártási tételek közötti csekély szintű genetikai változatosságra enged következtetni. Egyelőre hasonló témában, azaz, hogy genom szintjén mennyire térnek el a különböző vakcinafiolákban található PRRSV-1-vakcinatörzsek, tudomásunk szerint egyetlen irodalmi adat van. Az Eclercy és munkatársai által vizsgált két Porcilis PRRS-vakcinafiolából nyert teljes genomok konszenzus szekvenciái egyformának bizonyultak (Eclercy et al., 2021). Eredményeink alapján az is elmondható, hogy a Porcilis-vakcinatörzsek a DV-törzs attenuálása során sem halmoznak fel nagy genetikai eltérést (0,9%, maximum 126 nt különbség). Ez némileg nagyobbak bizonyul, mint amit leírtak egyes PRRSV-2 szülői és attenuált párok között (An et al., 2011).

Ismereteink szerint közvetlenül PRRSV-1-vakcinafiolából a kvázispecies változatosságával kapcsolatban eredményközlés eddig még nem történt. Az általunk kidolgozott módszerrel a konszenzus szekvencia meghatározásán felül az NGS-adatok elemzése egyaránt rámutatott a Porcilis-vakcinaminták széles vírusmutáns-spektrumára. Az azonosított SNV-k száma 113 db és 122 db között változott, a maximális gyakoriságuk pedig 47,2–48,7% volt (**19. ábra**, 78.o.). A felfedezett vakcinán belüli genetikai változatosság kisebbnek vagy épp nagyobbak bizonyult, mint egyes vad típusú vagy vakcinászerű

törzsekben (Brar et al., 2014; Clilverd et al., 2023; Xing et al., 2022). Az SNV-k elhelyezkedése a genomon belül hasonlóan elszórtan mutatkozott az említett közleményekkel összevetve, ugyanakkor a három általunk vizsgált vakcinamintában a kvázispecies egységes mintázatot mutatott, azaz a talált SNV-k hasonló helyeken és hasonló gyakoriságban fordultak elő. A vakcinamintákban megfigyelt SNV-k hiánya az ORF6 és ORF7 régió nem váratlan, hiszen az egyik legkonzervatívabb szakaszai a genomnak, ennek ellenére kisebb-nagyobb változatosságot hordozhatnak. A közlemények összehasonlítása félrevezető információkkal szolgálhat, hiszen az SNV-k elfogadásához és elemzéséhez más-más kritériumokat írtak elő, például az SNV gyakoriságának értékét (1% vagy 10%), továbbá ha nem is csak a teljes genom vizsgálatával, de már kimutatták, hogy a fertőzés óta eltelt idő vagy a minta forrása (savó, sejten passzált) szintén befolyásolhatja a detektált kvázispecies-t (Brar et al., 2014; Chen et al., 2016; Clilverd et al., 2023; Cortey et al., 2017; Evans et al., 2017; Lu et al., 2014; Xing et al., 2022).

Az értekezésben vizsgált és a génbankban elérhető *Porcilis* teljes genomok között látott maximum 15 nt különbség felét (7 db), mint SNV is azonosítottuk, továbbá a három vakcinamintánkban fellelt egyetlen polimorf pozíciót (nt 1519) szintén. Eclercy és munkatársai a *Porcilis*-vakcinatörzs genetikai evolúcióját vizsgálták sertések között történő kontrollált passzázsa után (Eclercy et al., 2021). Három nt pozícióról úgy vélték, hogy a gazdatesthez történő újraadaptációval állnak összefüggésben. Az általunk elvégzett elemzés alapján, ezek közül az egyik pozíció a különböző genomok közötti egyik nt különbségnek felelt meg (nt 3325). Ugyanezt állapítottuk meg egy másik pozíció esetében is (nt 13571), emellett mi ezt SNV-ként is leírtuk. Munkájuk során ezenkívül még öt pozíciót összefüggésbe hoztak a vakcinatörzs részben revertált fenotípusával, amelyek közül egy megegyezett (nt 14014) általunk meghatározott SNV-vel. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a vakcinagyártás során kialakult kvázispecies részben magyarázhatja a *Porcilis*-vakcinatörzs genetikai és fenotípusos változásait.

A szülői vad típusú DV-törzs és a *Porcilis* PRRS vakcinákból nyert teljes genomok között megfigyelt maximum 126 db nt különbség közül mindössze 9 db fedett át valamelyik SNV-vel. Közülük az egyik (nt 14014) az Eclercy és munkatársai által karakterizált, részben revertált fenotípust meghatározó mutáció volt. A *Porcilis* PRRS vakcinák mikroevolúciós mechanizmusainak mélyrehatóbb megismeréséhez azonban további kutatás szükséges.

XI Új tudományos eredmények

1. ORF5 szekvenciaadatok vizsgálatával mindkét PRRSV faj magyarországi elterjedési térképét elkészítettük, valamint genetikai diverzitásukat felmértük.
2. Elsőként adaptáltuk a PRRSV-re az Illumina rendszerekkel kompatibilis, kétlépéses PCR-alapú DNS-könyvtárkészítő módszert és hajtottunk végre amplikon-mélyszekvenálást.

Kidolgoztunk és optimalizáltunk kétféle PCR rendszert:

- i.) mindkét PRRSV faj ORF7 régiójára;
 - ii.) a Porcilis és Unistrain PRRSV-1-vakcinatörzsek és leszármazottaik teljes genomjára specifikusan.
3. Az ORF7 amplikon-mélyszekvenálás alkalmazhatóságát sikeresen felmértük hazai sertéstelepekről származó klinikai mintákon. Továbbá megállapítottuk, hogy a Porcilis- és Unistrain-vakcinatörzsek teljes genomszekvenciájának meghatározása szintén lehetséges. Eredményeink alapján elmondható, hogy mindkét megközelítés egyaránt segíti a PRRSV-t célzó diagnosztikát és kutatást, beleértve a keringő PRRSV-törzsek azonosítását, genetikai diverzitásának és a víruspopuláció komplexitásának felmérését. Kimutattuk, hogy az amplikon-mélyszekvenálás gyors, egyszerű és költséghatékony alternatív opciót kínál az NGS diagnosztikai bevezetéséhez.

XII Irodalomjegyzék

- Abonyi, T., Molnár, T., Nemes, I., Szabó, I., Terjék, Z., Bognár, L., Bálint, Á., 2021a. Magyarországi kislétszámú sertésállományok PRRS-mentesítése 2012–2019. *Magy. Állatorvosok Lapja* 143, 293–300.
- Abonyi, T., Molnár, T., Nemes, I., Szabó, I., Terjék, Z., Bognár, L., Bálint, Á., 2021b. Nagylétszámú sertés-tenyészállományok sikeres PRRS-mentesítése Magyarország 5 régiójában 2012–2019. *Magy. Állatorvosok Lapja* 143, 643–653.
- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.* 74, 10834–10837. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10834-10837.2000>
- Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R., Osorio, F.A., 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J. Gen. Virol.* 80, 307–315. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-307>
- Alonso, C., Raynor, P.C., Davies, P.R., Torremorell, M., 2015. Concentration, size distribution, and infectivity of airborne particles carrying swine viruses. *PLoS One* 10, e0135675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135675>
- Alvarez, J., Valdes-Donoso, P., Tousignant, S., Alkhamis, M., Morrison, R., Perez, A., 2016. Novel analytic tools for the study of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) in endemic settings: lessons learned in the U.S. *Porc. Heal. Manag.* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0019-0>
- An, T.-Q., Li, J.-N., Su, C.-M., Yoo, D., 2020. Molecular and cellular mechanisms for PRRSV pathogenesis and host response to infection. *Virus Res.* 286, 197980. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197980>
- An, T.-Q., Tian, Z.-J., Zhou, Y.-J., Xiao, Y., Peng, J.-M., Chen, J., Jiang, Y.-F., Hao, X.-F., Tong, G.-Z., 2011. Comparative genomic analysis of five pairs of virulent parental/attenuated vaccine strains of PRRSV. *Vet. Microbiol.* 149, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.001>
- Andino, R., Domingo, E., 2015. Viral quasispecies. *Virology* 479–480, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.022>
- Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993–1001. <https://doi.org/10.1007/s007050050134>
- Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2006. Influence of N-Linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80, 3994–4004. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.8.3994-4004.2006>
- Arruda, A.G., Sanhueza, J., Corzo, C.A., Vilalta, C., 2018. Assessment of area spread of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in three clusters of swine farms. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 1282–1289. <https://doi.org/10.1111/tbed.12875>
- Arruda, A.G., Tousignant, S., Sanhueza, J., Vilalta, C., Poljak, Z., Torremorell, M., Alonso, C., Corzo, C.A., 2019. Aerosol detection and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): What is the evidence, and what are the knowledge gaps? *Viruses* 11, 712. <https://doi.org/10.3390/v11080712>
- Bagdonaitė, I., Wandall, H.H., 2018. Global aspects of viral glycosylation. *Glycobiology* 28, 443–467. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy021>
- Bálint, Á., Balka, G., Horváth, P., Kecskeméti, S., Dán, Á., Farsang, A., Szeredi, L., Bányai, K., Bartha, D., Olasz, F., Belák, S., Zádori, Z., 2015. Full-length genome sequence analysis of a Hungarian porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated from a pig with severe respiratory disease. *Arch. Virol.* 160, 417–422. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2265-2>
- Bálint, Á., Molnár, T., Kecskeméti, S., Kulcsár, G., Soós, T., Szabó, P.M., Kaszab, E., Fornycs, K., Zádori, Z., Bányai, K., Szabó, I., 2021. Genetic variability of PRRSV vaccine strains used in the National Eradication Programme, Hungary. *Vaccines* 9, 849. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080849>
- Balka, G., 2009. A PRRS diagnosztikájának javítása, a magyarországi járványtani helyzet felmérése és az itthon előforduló törzsek genetikai tulajdonságainak vizsgálata. Szent István Egyetem.
- Balka, G., Hornyák, Á., Bálint, Á., Kiss, I., Kecskeméti, S., Bakonyi, T., Rusvai, M., 2008. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet. Microbiol.* 127, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.001>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26036-w>
- Balka, G., Wang, X., Olasz, F., Bálint, Á., Kiss, I., Bányai, K., Rusvai, M., Stadejek, T., Marthaler, D., Murtaugh, M.P., Zádori, Z., 2015. Full genome sequence analysis of a wild, non-MLV-related type 2 Hungarian PRRSV variant isolated in Europe. *Virus Res.* 200, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.014>
- Ballester, L.Y., Luthra, R., Kanagal-Shamanna, R., Singh, R.R., 2016. Advances in clinical next-generation sequencing: Target enrichment and sequencing technologies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 16, 357–372. <https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1133298>
- Belák, S., Karlsson, O.E., Leijon, M., Granger, F., 2013. High-throughput sequencing in veterinary infection biology and diagnostics. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* 32, 893–915. <https://doi.org/10.20506/rst.32.2.2206>
- Biernacka, K., Podgórska, K., Tyszcza, A., Stadejek, T., 2018. Comparison of six commercial ELISAs for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in field serum

- samples. *Res. Vet. Sci.* 121, 40–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.005>
- Blomme, A.K., Ackerman, T.L., Jones, C.K., Gebhardt, J.T., Woodworth, J.C., Paulk, C.B., Pogranichniy, R.M., 2023. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from feed ingredients and complete feed, with subsequent RT-qPCR analysis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 35, 464–469. <https://doi.org/10.1177/10406387231185080>
- Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S., 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141, 497–499. <https://doi.org/10.1136/vr.141.19.497>
- Brait, N., Külekçi, B., Goerzer, I., 2022. Long range PCR-based deep sequencing for haplotype determination in mixed HCMV infections. *BMC Genomics* 23, 31. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08272-z>
- Brar, M.S., Shi, M., Hui, R.K.-H., Leung, F.C.-C., 2014. Genomic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates revealed by deep sequencing. *PLoS One* 9, e88807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088807>
- Brockmeier, S.L., Lager, K.M., 2002. Experimental airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 89, 267–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00204-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00204-3)
- Burkard, C., Opriessnig, T., Mileham, A.J., Stadejek, T., Ait-Ali, T., Lilloco, S.G., Whitelaw, C.B.A., Archibald, A.L., 2018. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection. *J. Virol.* 92, e00415-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00415-18>
- Bybee, S.M., Bracken-Grissom, H., Haynes, B.D., Hermansen, R.A., Byers, R.L., Clement, M.J., Udall, J.A., Wilcox, E.R., Crandall, K.A., 2011. Targeted Amplicon Sequencing (TAS): A scalable next-gen approach to multilocus, multitaxa phylogenetics. *Genome Biol. Evol.* 3, 1312–1323. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr106>
- Canelli, E., Catella, A., Borghetti, P., Ferrari, L., Ogno, G., De Angelis, E., Corradi, A., Passeri, B., Bertani, V., Sandri, G., Bonilauri, P., Leung, F.C.C., Guazzetti, S., Martelli, P., 2017. Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs. *Vet. Microbiol.* 210, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.002>
- Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Rovira, A., Morrison, R.B., 2009. Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 73, 303–307.
- Cao, J., Li, B., Fang, L., Chen, H., Xiao, S., 2012. Pathogenesis of nonsuppurative encephalitis caused by highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 24, 767–771. <https://doi.org/10.1177/1040638712445764>
- Carman, S., Sanford, S.E., Dea, S., 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario – 1978 to 1982. *Can. Vet. J.* 36, 776–777.
- Chae, C., 2021. Commercial PRRS modified-live virus vaccines. *Vaccines* 9, 185. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020185>
- Chen, N., Dekkers, J.C.M., Ewen, C.L., Rowland, R.R.R., 2015. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and quasispecies evolution in pigs that lack adaptive immunity. *Virus Res.* 195, 246–249. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.006>
- Chen, N., Li, X., Xiao, Y., Li, S., Zhu, J., 2021. Characterization of four types of MLV-derived porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in unvaccinated pigs from 2016 to 2020. *Res. Vet. Sci.* 134, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.007>
- Chen, N., Liu, Q., Qiao, M., Deng, X., Chen, X., Sun, M., 2017. Whole genome characterization of a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 isolate: Genetic evidence for recombination between Amervac vaccine and circulating strains in mainland China. *Infect. Genet. Evol.* 54, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.024>
- Chen, N., Triple, B.R., Kerrigan, M.A., Tian, K., Rowland, R.R.R., 2016. ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a target of diversifying selection as infection progresses from acute infection to virus rebound. *Infect. Genet. Evol.* 40, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.002>
- Chen, N., Ye, M., Li, S., Huang, Y., Zhou, R., Yu, X., Tian, K., Zhu, J., 2018. Emergence of a novel highly pathogenic recombinant virus from three lineages of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 in China 2017. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 1775–1785. <https://doi.org/10.1111/tbed.12952>
- Chen, Q., Fang, L., Wang, D., Wang, S., Li, P., Li, M., Luo, R., Chen, H., Xiao, S., 2012. Induction of autophagy enhances porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Virus Res.* 163, 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.008>
- Chen, X., Pan, J., Huang, L., Zhao, M., 2023. Research progress on the E protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Front. Microbiol.* 14, 1139628. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139628>
- Cheng, T.-Y., Campler, M.R., Schroeder, D.C., Yang, M., Mor, S.K., Ferreira, J.B., Arruda, A.G., 2022. Detection of multiple lineages of PRRSV in breeding and growing swine farms. *Front. Vet. Sci.* 9, 884733. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.884733>
- Cheon, D.-S., Chae, C., 2001. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and liveborn piglets from experimentally infected sows. *J. Comp. Pathol.* 124, 231–237. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0457>
- Cho, J.G., Deen, J., Dee, S.A., 2007. Influence of isolate pathogenicity on the aerosol transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 71, 23–27.

- Choi, K., Lee, J., Park, C., Jeong, J., Chae, C., 2015. Comparison of the pathogenesis of single or dual infections with Type 1 and Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Comp. Pathol.* 152, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.03.002>
- Christopher-Hennings, J., Faaberg, K.S., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Roof, M.B., Vaughn, E.M., Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J., 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and limitations. *J. Swine Heal. Prod.* 10, 213–218.
- Clilverd, H., Martín-Valls, G., Li, Y., Martín, M., Cortey, M., Mateu, E., 2023. Infection dynamics, transmission, and evolution after an outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Front. Microbiol.* 14, 1109881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1109881>
- Cooper, V.L., Hesse, R.A., Doster, A.R., 1997. Renal lesions associated with experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9, 198–201. <https://doi.org/10.1177/104063879700900216>
- Cortey, M., Arocena, G., Pileri, E., Martín-Valls, G., Mateu, E., 2018. Bottlenecks in the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV1) to naïve pigs and the quasi-species variation of the virus during infection in vaccinated pigs. *Vet. Res.* 49, 107. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0603-1>
- Cortey, M., Díaz, I., Martín-Valls, G.E., Mateu, E., 2017. Next-generation sequencing as a tool for the study of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) macro- and micro- molecular epidemiology. *Vet. Microbiol.* 209, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.002>
- Cui, X., Xia, D., Huang, X., Sun, Y., Shi, M., Zhang, J., Li, G., Yang, Y., Wang, H., Cai, X., An, T., 2022. Analysis of recombinant characteristics based on 949 PRRSV-2 genomic sequences obtained from 1991 to 2021 shows that viral multiplication ability contributes to dominant recombination. *Microbiol. Spectr.* 10, e0293422. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02934-22>
- Darwich, L., Díaz, I., Mateu, E., 2010. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res.* 154, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.017>
- Darwich, L., Gimeno, M., Sibila, M., Díaz, I., de la Torre, E., Dotti, S., Kuzemtseva, L., Martín, M., Pujols, J., Mateu, E., 2011. Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains. *Vet. Microbiol.* 150, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.008>
- Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., de Lima, M., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2010. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J. Virol.* 84, 1731–1740. <https://doi.org/10.1128/JVI.01774-09>
- Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D., 2000. Current knowledge on the structural proteins of PRRSV comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 145, 659–688.
- Dee, N., Havas, K., Shah, A., Singrey, A., Spronk, G., Niederwerder, M., Nelson, E., Dee, S., 2022. Evaluating the effect of temperature on viral survival in plant-based feed during storage. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, e2105–e2110. <https://doi.org/10.1111/tbed.14546>
- Dee, S., Bauermann, F. V., Niederwerder, M.C., Singrey, A., Clement, T., de Lima, M., Long, C., Patterson, G., Sheahan, M.A., Stoian, A.M.M., Petrovan, V., Jones, C.K., De Jong, J., Ji, J., Spronk, G.D., Minion, L., Christopher-Hennings, J., Zimmerman, J.J., Rowland, R.R.R., Nelson, E., Sundberg, P., Diel, D.G., 2018. Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models. *PLoS One* 13, e0194509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194509>
- Dee, S., Clement, T., Nelson, E., 2024. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in domestic pigs via oral ingestion of feed material. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 262, 1–4. <https://doi.org/10.2460/javma.23.08.0447>
- Dee, S., Deen, J., Jacobson, L., Rossow, K.D., Mahlum, C., Pijoan, C., 2005. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 156, 501–504. <https://doi.org/10.1136/vr.156.16.501>
- Dee, S., Deen, J., Otake, S., Pijoan, C., 2004a. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can. J. Vet. Res.* 68, 128–133.
- Dee, S., Deen, J., Pijoan, C., 2004b. Evaluation of 4 intervention strategies to prevent the mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 68, 19–26.
- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Weise, C., Eliason, R., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 2003. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can. J. Vet. Res.* 67, 12–19.
- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can. J. Vet. Res.* 66, 232–239.
- Dee, S., Otake, S., Oliveira, S., Deen, J., 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* 40, 39. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009022>
- Delisle, B., Gagnon, C.A., Lambert, M.-È., D’Allaire, S., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus diversity of Eastern Canada swine herds in a large sequence dataset reveals two hypervariable regions under positive selection. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1111–1119. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.015>
- Delputte, P.L., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J. Gen. Virol.* 86, 1441–1445. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80675-0>
- Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2002. Involvement of the matrix protein in

- attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 76, 4312–4320. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4312-4320.2002>
- Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., Mateu, E., 2009. In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-1 (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27, 5603–5611. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.029>
- Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., DePasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., Afonso, C., Zhang, X., Anderson, N.G., Ghedin, E., Spiro, D.J., 2008. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics* 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-5>
- Do, H.Q., Trinh, D.T., Nguyen, T.L., Vu, T.T.H., Than, D.D., Van Lo, T., Yeom, M., Song, D., Choe, S., An, D.-J., Le, V.P., 2016. Molecular evolution of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses circulating in Vietnam from 2007 to 2015. *BMC Vet. Res.* 12, 256. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0885-3>
- Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. *Virus Res.* 154, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>
- Domingo, E., García-Crespo, C., Perales, C., 2021. Historical perspective on the discovery of the quasispecies concept. *Annu. Rev. Virol.* 8, 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-105900>
- Dortmans, J.C.F.M., Buter, G.J., Dijkman, R., Houben, M., Duinhof, T.F., 2019. Molecular characterization of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) isolated in the Netherlands from 2014 to 2016. *PLoS One* 14, e0218481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218481>
- Drigo, M., Franzo, G., Gigli, A., Martini, M., Mondin, A., Gracieux, P., Ceglie, L., 2014. The impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic heterogeneity on molecular assay performances. *J. Virol. Methods* 202, 79–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.03.006>
- Duan, H., Chen, X., Zhao, J., Zhu, J., Zhang, G., Fan, M., Zhang, B., Wang, X., Sun, Y., Liu, B., Zhou, E.-M., Zhao, Q., 2021. Development of a nanobody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for efficiently and specifically detecting antibodies against genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Clin. Microbiol. Microbiol.* 59, e0158021. <https://doi.org/10.1128/JCM.01580-21>
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 56, 9–19. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01347-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01347-8)
- Eclercy, J., Renson, P., Hirschaud, E., Andraud, M., Beven, V., Paboeuf, F., Rose, N., Blanchard, Y., Bourry, O., 2021. Phenotypic and genetic evolutions of a porcine reproductive and respiratory syndrome modified live vaccine after limited passages in pigs. *Vaccines* 9, 392. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040392>
- Evans, A., Loyd, H., Dunkelberger, J., van Tol, S., Bolton, M., Dorman, K., Dekkers, J., Carpenter, S., 2017. Antigenic and biological characterization of ORF2–6 variants at early times following PRRSV infection. *Viruses* 9, 113. <https://doi.org/10.3390/v9050113>
- Faaberg, K.S., Hocker, J.D., Erdman, M.M., Harris, D.L.H., Nelson, E.A., Torremorell, M., Plagemann, P.G.W., 2006. Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 19, 294–304. <https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.294>
- Fan, B., Liu, X., Bai, J., Zhang, T., Zhang, Q., Jiang, P., 2015. The amino acid residues at 102 and 104 in GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus regulate viral neutralization susceptibility to the porcine serum neutralizing antibody. *Virus Res.* 204, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.04.015>
- Fan, L., 2019. Signaling pathways involved in regulating apoptosis induction in host cells upon PRRSV infection. *Virus Genes* 55, 433–439. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01665-z>
- Fang, K., Liu, S., Li, X., Chen, H., Qian, P., 2022. Epidemiological and genetic characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in South China between 2017 and 2021. *Front. Vet. Sci.* 9, 853044. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.853044>
- Fang, Y., Snijder, E.J., 2010. The PRRSV replicase: Exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res.* 154, 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.030>
- Fang, Y., Treffers, E.E., Li, Y., Tas, A., Sun, Z., van der Meer, Y., de Ru, A.H., van Veelen, P.A., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Firth, A.E., 2012. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2920–E2928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211145109>
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., 2005. Evaluation of the aerosol transmission of a mixed infection of *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 157, 105–108. <https://doi.org/10.1136/vr.157.4.105>
- Fitzgerald, R.M., Collins, P.J., McMenamy, M.J., Leonard, F.C., McGlynn, H., O’Shea, H., 2020. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Phylogenetic analysis of circulating strains in the Republic of Ireland from 2016 to 2017. *Arch. Virol.* 165, 2057–2063. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04710-7>
- Fornyos, K., Szabó, I., Lehardt, K., Bálint, Á., 2022. Development of a farm-specific real-time quantitative RT-PCR assay for the detection and discrimination of wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the vaccine strain in a farm under eradication. *Acta Vet. Hung.* 70, 254–261. <https://doi.org/10.1556/004.2022.00020>
- Fornyos, K., Szegedi, L., Nagy, P., Sántha, I., Makkai, I., Búza, L., Kardos, G., Molnár, T., Bálint, Á., Szabó, I., 2023. PRRS szempontjából „Mentes vakcinázott (MV)” minősítésű nagylétszámú, fialástól a vágásig típusú sertésállomány létrehozása. *Magy. Állatorvosok Lapja* 145, 171–181.

- Forsberg, R., 2005. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2131–2134. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi208>
- Franzo, G., Barbierato, G., Pesente, P., Legnardi, M., Tucciarone, C.M., Sandri, G., Drigo, M., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) epidemiology in an integrated pig company of Northern Italy: A multilevel threat requiring multilevel interventions. *Viruses* 13, 2510. <https://doi.org/10.3390/v13122510>
- Franzo, G., Dotto, G., Cecchinato, M., Pasotto, D., Martini, M., Drigo, M., 2015. Phylodynamic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Italy: Action of selective pressures and interactions between different clades. *Infect. Genet. Evol.* 31, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.026>
- Franzo, G., Faustini, G., Legnardi, M., Cecchinato, M., Drigo, M., Tucciarone, C.M., 2022. Phylodynamic and phylogeographic reconstruction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Europe: Patterns and determinants. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, e2175–e2184. <https://doi.org/10.1111/tbed.14556>
- Frias-De-Diego, A., Jara, M., Pecoraro, B.M., Crisci, E., 2021. Whole genome or single genes? A phylodynamic and bibliometric analysis of PRRSV. *Front. Vet. Sci.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.658512>
- Frossard, J.-P., Hughes, G.J., Westcott, D.G., Naidu, B., Williamson, S., Woodger, N.G.A., Steinbach, F., Drew, T.W., 2013. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Genetic diversity of recent British isolates. *Vet. Microbiol.* 162, 507–518. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.011>
- Frossard, J.-P., Williamson, S., 2018. Evolution of the genetic diversity of PRRSV-1 strains in Britain occurs at a steadily increasing rate, in: North American PRRS Symposium. Chicago, IL, USA. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32910.20801>
- Frydas, I.S., Nauwynck, H.J., 2016. Replication characteristics of eight virulent and two attenuated genotype 1 and 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in nasal mucosa explants. *Vet. Microbiol.* 182, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.016>
- Frydas, I.S., Trus, I., Kvisgaard, L.K., Bonckaert, C., Reddy, V.R., Li, Y., Larsen, L.E., Nauwynck, H.J., 2015. Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Vet. Res.* 46, 37. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0166-3>
- Frydas, I.S., Verbeeck, M., Cao, J., Nauwynck, H.J., 2013. Replication characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) European subtype 1 (Lelystad) and subtype 3 (Lena) strains in nasal mucosa and cells of the monocytic lineage: indications for the use of new receptors of PRRSV (Le. Vet. Res. 44, 73. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-73>
- Gagnon, C.A., Lalonde, C., Provost, C., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus whole-genome sequencing efficacy with field clinical samples using a poly(A)-tail viral genome purification method. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 33, 216–226. <https://doi.org/10.1177/1040638720952411>
- Galvis, J.A., Corzo, C.A., Machado, G., 2022. Modelling and assessing additional transmission routes for porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Vehicle movements and feed ingredients. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, e1549–e1560. <https://doi.org/10.1111/tbed.14488>
- Gao, J.-C., Xiong, J.-Y., Ye, C., Chang, X.-B., Guo, J.-C., Jiang, C.-G., Zhang, G.-H., Tian, Z.-J., Cai, X.-H., Tong, G.-Z., An, T.-Q., 2017. Genotypic and geographical distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in mainland China in 1996–2016. *Vet. Microbiol.* 208, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.003>
- Gohl, D.M., Garbe, J., Grady, P., Daniel, J., Watson, R.H.B., Auch, B., Nelson, A., Yohe, S., Beckman, K.B., 2020. A rapid, cost-effective tailed amplicon method for sequencing SARS-CoV-2. *BMC Genomics* 21, 863. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07283-6>
- Goldberg, T.L., Lowe, J.F., Milburn, S.M., Firkins, L.D., 2003. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology* 317, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.07.009>
- Gómez-Laguna, J., Salguero, F.J., Pallarés, F.J., Carrasco, L., 2013. Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *Vet. J.* 195, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.11.012>
- Gong, X., Ma, T., Wang, J., Cao, X., Zhang, Q., Wang, Y., Song, C., Lai, M., Zhang, C., Fang, X., Chen, X., 2023. Nucleocapsid protein residues 35, 36, and 113 are critical sites in up-regulating the Interleukin-8 production via C/EBP α pathway by highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Microb. Pathog.* 184, 106345. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106345>
- Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R., 2016. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17, 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Granberg, F., Bálint, Á., Belák, S., 2016. Novel technologies applied to the nucleotide sequencing and comparative sequence analysis of the genomes of infectious agents in veterinary medicine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35, 25–42. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2415>
- Gray, D.K., Dvorak, C.M.T., Robinson, S.R., Murtaugh, M.P., 2019. Characterization of age-related susceptibility of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 263, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.01.015>
- Grebennikova, T.V., Clouser, D.F., Vorwald, A.C., Musienko, M.I., Mengeling, W.L., Lager, K.M., Wesley, R.D., Biketov, S.F., Zaberezhny, A.D., Aliper, T.I., Nepoklonov, E.A., 2004. Genomic characterization of virulent, attenuated, and revertant passages of a North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain. *Virology* 321, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.01.001>
- Greiser-Wilke, I., Fiebig, K., Drexler, C., grosse Beilage, E., 2010. Genetic diversity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany. *Vet.*

- Microbiol. 143, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.006>
- grosse Beilage, E., Nathues, H., Meemken, D., Harder, T.C., Doherr, M.G., Grotha, I., Greiser-Wilke, I., 2009. Frequency of PRRS live vaccine virus (European and North American genotype) in vaccinated and non-vaccinated pigs submitted for respiratory tract diagnostics in North-Western Germany. *Prev. Vet. Med.* 92, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.07.010>
- Grubaugh, N.D., Gangavarapu, K., Quick, J., Matteson, N.L., De Jesus, J.G., Main, B.J., Tan, A.L., Paul, L.M., Brackney, D.E., Grewal, S., Gurfield, N., Van Rompay, K.K.A., Isern, S., Michael, S.F., Coffey, L.L., Loman, N.J., Andersen, K.G., 2019. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol.* 20, 8. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1618-7>
- Gu, H., Zheng, S., Han, G., Yang, H., Deng, Z., Liu, Z., He, F., 2022. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus adapts antiviral innate immunity via manipulating MALT1. *MBio* 13, e0066422. <https://doi.org/10.1128/mbio.00664-22>
- Guo, C., Wang, M., Zhu, Z., He, S., Liu, H., Liu, Xiaofeng, Shi, X., Tang, T., Yu, P., Zeng, J., Yang, L., Cao, Y., Chen, Y., Liu, Xiaohong, He, Z., 2019. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection. *Front. Immunol.* 10, 1846. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01846>
- Guo, J., Liu, Z., Tong, X., Wang, Z., Xu, S., Chen, Q., Zhou, J., Fang, L., Wang, D., Xiao, S., 2021. Evolutionary dynamics of Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus by whole-genome analysis. *Viruses* 13, 2469. <https://doi.org/10.3390/v13122469>
- Gupta, R., Brunak, S., 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symp. Biocomput.* 310–322.
- Halbur, P.G., Miller, L.D., Paul, P.S., Meng, X.J., Huffman, E.L., Andrews, J.J., 1995. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.* 32, 200–204. <https://doi.org/10.1177/030098589503200218>
- Han, J., Liu, G., Wang, Y., Faaberg, K.S., 2007. Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture. *J. Virol.* 81, 9878–9890. <https://doi.org/10.1128/JVI.00562-07>
- Han, J., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., Yang, H., 2017. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 209, 30–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.020>
- Han, K., Seo, H.W., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Ha, B.C., Kim, S.-H., Chae, C., 2013. Pathogenesis of Korean Type 1 (European genotype) porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pregnant gilts. *J. Comp. Pathol.* 148, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.09.004>
- Han, K., Seo, H.W., Park, C., Kang, I., Youn, S.-K., Lee, S.-Y., Kim, S.-H., Chae, C., 2014. Comparative virulence of reproductive diseases caused by Type 1 (European-like) and Type 2 (North American-like) porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pregnant gilts. *J. Comp. Pathol.* 150, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.11.205>
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., Gojobori, T., 2005. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1024–1031. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi089>
- Harmon, K., Bradner, L., Bieber, M., Gauger, P., 2019. PCR clamping for selectively sequencing wild-type PRRSV in vaccinated herds, in: 50th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. Orlando, Florida.
- He, Y., Wang, G., Liu, Y., Shi, W., Han, Z., Wu, J., Jiang, C., Wang, S., Hu, S., Wen, H., Dong, J., Liu, H., Cai, X., 2012. Characterization of thymus atrophy in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 160, 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.040>
- Head, S.R., Komori, H.K., LaMere, S.A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D.R., Ordoukhanian, P., 2014. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *Biotechniques* 56, 61–77. <https://doi.org/10.2144/000114133>
- Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh, L.S., 2018. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol. Biol. Evol.* 35, 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Holland, J.J., De La Torre, J.C., Steinhauer, D.A., 1992. Virus populations as quasispecies, in: Holland, J.J. (Ed.), *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Germany, pp. 1–20. https://doi.org/10.1007/978-3-642-77011-1_1
- Holm, J.B., Humphrys, M.S., Robinson, C.K., Settles, M.L., Ott, S., Fu, L., Yang, H., Gajer, P., He, X., McComb, E., Gravitt, P.E., Ghanem, K.G., Brotman, R.M., Ravel, J., 2019. Ultrahigh-throughput multiplexing and sequencing of >500-base-pair amplicon regions on the Illumina HiSeq 2500 platform. *mSystems* 4, e00029-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00029-19>
- Holtkamp, D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske, P., Zimmerman, J., 2011. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J. Swine Heal. Prod.* 19, 44–56. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1624624>
- Höper, D., Freuling, C.M., Müller, T., Hanke, D., von Messling, V., Duchow, K., Beer, M., Mettenleiter, T.C., 2015. High definition viral vaccine strain identity and stability testing using full-genome population data – The next generation of vaccine quality control. *Vaccine* 33, 5829–5837. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.091>
- Hornyák, Á., Pálfi, V., Karakas, M., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome szerológiai felmérése Magyarországon [Serological investigation of porcine reproductive and respiratory syndrome in Hungary], in:

- Abstract Book of the Academic Reports of the Veterinary Committee of the Hungarian Academy of Sciences. Hungarian Academy of Sciences, Budapest.
- Hsueh, F.-C., Kuo, K.-L., Hsu, F.-Y., Wang, S.-Y., Chiu, H.-J., Wu, M.-T., Lin, C.-F., Huang, Y.-H., Chiou, M.-T., Lin, C.-N., 2023. Molecular characteristics and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 in Taiwan during 2019–2020. *Life* 13, 843. <https://doi.org/10.3390/life13030843>
- Hu, R., Zhang, T., Lai, R., Ding, Z., Zhuang, Y., Liu, H., Cao, H., Gao, X., Luo, J., Chen, Z., Zhang, C., Liu, P., Guo, X., Hu, G., Ding, N., Deng, S., 2023. PRRSV elimination in a farrow-to-finish pig herd using Herd closure and rollover approach. *Viruses* 15, 1239. <https://doi.org/10.3390/v15061239>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., Dinh, A., 2021. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum. Immunol.* 82, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Indik, S., Schmoll, F., Sipos, W., Klein, D., 2005. Genetic variability of PRRS virus in Austria: Consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Vet. Microbiol.* 107, 171–179. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2005.01.024>
- Itokawa, K., Sekizuka, T., Hashino, M., Tanaka, R., Kuroda, M., 2020. Disentangling primer interactions improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplex tiling PCR. *PLoS One* 15, e0239403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239403>
- Jacková, A., Vlasáková, M., Mandelík, R., Vilček, S., 2013. Genetic typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from central European countries. *Acta Virol.* 57, 363–368. https://doi.org/10.4149/av_2013_03_363
- Jantafong, T., Sangtong, P., Saenglub, W., Mungkundar, C., Romlamduan, N., Lekchareonsuk, C., Lekcharoensuk, P., 2015. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. *Vet. Microbiol.* 176, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.017>
- Jeong, C.G., Nazki, S., Kim, S.C., Khatun, A., Noh, Y.H., Lee, D.U., Kang, S.C., Seo, B.J., Yang, M.S., Lee, S.I., Yoon, I.J., Kim, B., Kim, W. II, 2022. Comparison of the pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-1 and PRRSV-2 in pregnant sows. *Arch. Virol.* 167, 425–439. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05303-8>
- Jeong, J., Kang, I., Park, C., Kim, S., Park, S.-J., Park, K.H., Oh, T., Yang, S., Yoon, J.S., Lee, O., Chae, C., 2018. A comparison of the severity of reproductive failure between single and dual infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-1 and PRRSV-2 in late-term pregnancy gilts. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 1641–1647. <https://doi.org/10.1111/tbed.12921>
- Johnston, D., Earley, B., Cormican, P., Murray, G., Kenny, D.A., Waters, S.M., McGee, M., Kelly, A.K., McCabe, M.S., 2017. Illumina MiSeq 16S amplicon sequence analysis of bovine respiratory disease associated bacteria in lung and mediastinal lymph node tissue. *BMC Vet. Res.* 13, 118. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1035-2>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., Jermini, L.S., 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14, 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kang, H., Yu, J.E., Shin, J.E., Kang, A., Kim, W. II, Lee, C., Lee, J., Cho, I.S., Choe, S.E., Cha, S.H., 2018. Geographic distribution and molecular analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses circulating in swine farms in the Republic of Korea between 2013 and 2016. *BMC Vet. Res.* 14, 160. <https://doi.org/10.1186/S12917-018-1480-6/FIGURES/3>
- Karniychuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2013. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.* 44, 95. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-95>
- Karniychuk, U.U., Saha, D., Geldhof, M., Vanhee, M., Cornillie, P., Van den Broeck, W., Nauwynck, H.J., 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb. Pathog.* 51, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.04.001>
- Kaszab, E., Dospoly, A., Lanave, G., Verma, A., Bányai, K., Malik, Y.S., Marton, S., 2020. Metagenomics revealing new virus species in farm and pet animals and aquaculture, in: *Genomics and Biotechnological Advances in Veterinary, Poultry, and Fisheries*. Elsevier, pp. 29–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816352-8.00002-3>
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Keffaber, K., 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 1, 1–10.
- Kikuti, M., Sanhueza, J., Vilalta, C., Paploski, I.A.D., VanderWaal, K., Corzo, C.A., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) genetic diversity and occurrence of wild type and vaccine-like strains in the United States swine industry. *PLoS One* 16, e0259531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259531>
- Kikuti, M., Vilalta, C., Sanhueza, J., Pamornchainavakul, N., Kevill, J., Yang, M., Paploski, I.A.D., Lenskaia, T., Odogwu, N.M., Kiehne, R., VanderWaal, K., Schroeder, D., Corzo, C.A., 2023. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV2) viral diversity within a farrow-to-wean farm cohort study. *Viruses* 15, 1837. <https://doi.org/10.3390/v15091837>
- Kim, D.-Y., Kaiser, T.J., Horlen, K., Keith, M.L., Taylor, L.P., Jolie, R., Calvert, J.G., Rowland, R.R.R., 2009. Insertion and deletion in a non-essential region of the nonstructural protein 2 (nsp2) of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: effects on virulence and immunogenicity. *Virus Genes* 38, 118–128. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0303-4>
- Kim, J.-K., Fahad, A.-M., Shanmukhappa, K., Kapil, S., 2006. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J. Virol.* 80, 689–696. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.689-696.2006>

- Kim, S.-C., Jeong, C.-G., Park, G.-S., Park, J.-Y., Jeoung, H.-Y., Shin, G.-E., Ko, M.-K., Kim, S.-H., Lee, K.-K., Kim, W.-I., 2021. Temporal lineage dynamics of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea in 2014–2019. *Arch. Virol.* 166, 2803–2815. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05169-w>
- Kim, S.-C., Moon, S.-H., Jeong, C.-G., Park, G.-S., Park, J.-Y., Jeoung, H.-Y., Shin, G.-E., Ko, M.-K., Kim, S.-H., Lee, K.-K., Cho, H.-S., Kim, W.-I., 2022. Whole-genome sequencing and genetic characteristics of representative porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Korea. *Virol. J.* 19, 66. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01790-6>
- Kim, S.-H., Roh, I.-S., Choi, E.-J., Lee, C., Lee, C.-H., Lee, K.-H., Lee, K.-K., Song, Y.-K., Lee, O.-S., Park, C.-K., 2010. A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea. *Vet. Microbiol.* 143, 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.039>
- Kimman, T.G., Cornelissen, L.A., Moormann, R.J., Rebel, J.M.J., Stockhofe-Zurwieden, N., 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27, 3704–3718. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.022>
- Klinge, K.L., Vaughn, E.M., Roof, M.B., Bautista, E.M., Murtaugh, M.P., 2009. Age-dependent resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virol. J.* 6, 177. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-177>
- Knyazev, S., Hughes, L., Skums, P., Zelikovsky, A., 2021. Epidemiological data analysis of viral quasispecies in the next-generation sequencing era. *Brief. Bioinform.* 22, 96–108. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa101>
- Krunker, S., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., Bøtner, A., 1998. Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 61, 21–31. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00176-X)
- Kreutz, L.C., Ackermann, M.R., 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 42, 137–147. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(96\)01313-5](https://doi.org/10.1016/0168-1702(96)01313-5)
- Kristensen, C.S., Bøtner, A., Takai, H., Nielsen, J.P., Jorsal, S.E., 2004. Experimental airborne transmission of PRRS virus. *Vet. Microbiol.* 99, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.005>
- Kristensen, C.S., Christiansen, M.G., Pedersen, K., Larsen, L.E., 2020. Production losses five months after outbreak with a recombinant of two PRRSV vaccine strains in 13 Danish sow herds. *Porc. Heal. Manag.* 6, 26. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00165-z>
- Kumar, D., 2019. Next-generation sequencing as diagnostic tool in veterinary research. *J. Anim. Res.* 9, 500078. <https://doi.org/10.30954/2277-940X.06.2019.1>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.
- Kvisgaard, L.K., Hjulsgaard, C.K., Brar, M.S., Leung, F.C.C., Larsen, L.E., 2013a. Genetic dissection of complete genomes of Type 2 PRRS viruses isolated in Denmark over a period of 15 years. *Vet. Microbiol.* 167, 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.023>
- Kvisgaard, L.K., Hjulsgaard, C.K., Fahnøe, U., Breum, S.Ø., Ait-Ali, T., Larsen, L.E., 2013b. A fast and robust method for full genome sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) Type 1 and Type 2. *J. Virol. Methods* 193, 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.019>
- Kvisgaard, L.K., Hjulsgaard, C.K., Kristensen, C.S., Lauritsen, K.T., Larsen, L.E., 2013c. Genetic and antigenic characterization of complete genomes of Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) isolated in Denmark over a period of 10 years. *Virus Res.* 178, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.10.009>
- Kvisgaard, L.K., Kristensen, C.S., Ryt-Hansen, P., Pedersen, K., Stadejek, T., Trebbien, R., Andresen, L.O., Larsen, L.E., 2020. A recombination between two Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 1786–1796. <https://doi.org/10.1111/tbed.13555>
- Kvisgaard, L.K., Larsen, L.E., Hjulsgaard, C.K., Bøtner, A., Rathkjen, P.H., Heegaard, P.M.H., Bisgaard, N.P., Nielsen, J., Hansen, M.S., 2017. Genetic and biological characterization of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) causing significant clinical disease in the field. *Vet. Microbiol.* 211, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.10.001>
- Kwon, T., Yoo, S.J., Lee, D.-U., Sunwoo, S.Y., Je, S.H., Park, J.W., Kim, M.-H., Park, C.-K., Lyoo, Y.S., 2019. Differential evolution of antigenic regions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 before and after vaccine introduction. *Virus Res.* 260, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.11.004>
- Ladinig, A., Ashley, C., Detmer, S.E., Wilkinson, J.M., Lunney, J.K., Plastow, G., Harding, J.C., 2015. Maternal and fetal predictors of fetal viral load and death in third trimester, Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected pregnant gilts. *Vet. Res.* 46, 107. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0251-7>
- Ladinig, A., Wilkinson, J., Ashley, C., Detmer, S.E., Lunney, J.K., Plastow, G., Harding, J.C.S., 2014. Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* 9, e96104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096104>
- Lalonde, C., Provost, C., Gagnon, C.A., 2020. Whole-genome sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from field clinical samples improves the genomic surveillance of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.00097-20>
- Lambert, M.-È., Arsenault, J., Côté, J.-C., D'Allaire, S., 2023. Contacts posing risks of disease introduction in swine breeding herds in Quebec, Canada: Is the frequency of contacts associated with biosecurity measures? *Prev. Vet. Med.* 217, 105966. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105966>

- Larsson, A., 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278.
- Le Gall, A., Legeay, O., Bourhy, H., Arnauld, C., Albina, E., Jestin, A., 1998. Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res.* 54, 9–21. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)00146-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)00146-9)
- Lee, C., Hodgins, D., Calvert, J.G., Welch, S.-K.W., Jolie, R., Yoo, D., 2006. Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology* 346, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.005>
- Lee, C., Yoo, D., 2006. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology* 355, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.013>
- Lee, D.-U., Yoo, S.J., Kwon, T., Je, S.H., Shin, J.Y., Byun, J.J., Kim, M.H., Lyoo, Y.S., 2017. Genetic diversity of ORF 4–6 of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus in naturally infected pigs. *Vet. Microbiol.* 199, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.026>
- Lee, M.-A., Jayaramaiah, U., You, S.-H., Shin, E.-G., Song, S.-M., Ju, L., Kang, S.-J., Hyun, B.-H., Lee, H.-S., 2023. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea from 2018 to 2022. *Pathogens* 12, 757. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060757>
- Legnardi, M., Cecchinato, M., Homonnay, Z., Dauphin, G., Koutoulis, K.C., Tucciarone, C.M., Franzo, G., 2022. Viral subpopulation variability in different batches of Infectious bronchitis virus (IBV) vaccines based on GI-23 lineage: Implications for the field. *Virus Res.* 319, 198877. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198877>
- Li, C., Xu, H., Zhao, J., Gong, B., Sun, Q., Xiang, L., Li, W., Guo, Z., Li, J., Tang, Y., Leng, C., Peng, J., Wang, Q., An, T., Cai, X., Tian, Z.-J., Zhou, G., Zhang, H., 2022. Epidemiological investigation and genetic evolutionary analysis of PRRSV-1 on a pig farm in China. *Front. Microbiol.* 13, 1067173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067173>
- Li, H., Luo, Q., Jing, H., Song, Y., Kong, W., Zhao, M., Zhu, Q., 2023. Research progress on porcine reproductive and respiratory syndrome virus NSP7 protein. *Animals* 13, 2269. <https://doi.org/10.3390/ani13142269>
- Li, J., Tao, S., Orlando, R., Murtaugh, M.P., 2015. N-glycosylation profiling of porcine reproductive and respiratory syndrome virus envelope glycoprotein 5. *Virology* 478, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.013>
- Li, Y., Tas, A., Sun, Z., Snijder, E.J., Fang, Y., 2015. Proteolytic processing of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicase. *Virus Res.* 202, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.027>
- Li, Yanhua, Treffers, E.E., Napthine, S., Tas, A., Zhu, L., Sun, Z., Bell, S., Mark, B.L., van Veelen, P.A., van Hemert, M.J., Firth, A.E., Brierley, I., Snijder, E.J., Fang, Y., 2014. Transactivation of programmed ribosomal frameshifting by a viral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E2172–E2181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321930111>
- Li, Yuming, Wang, G., Liu, Y., Tu, Y., He, Y., Wang, Z., Han, Z., Li, L., Li, A., Tao, Y., Cai, X., 2014. Identification of apoptotic cells in the thymus of piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 189, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.011>
- Lin, W.-H., Kaewprom, K., Wang, S.-Y., Lin, C.-F., Yang, C.-Y., Chiou, M.-T., Lin, C.-N., 2020. Outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in Taiwan. *Viruses* 12, 316. <https://doi.org/10.3390/v12030316>
- Liu, J., Wei, C., Lin, Z., Fan, J., Xia, W., Dai, A., Yang, X., 2019. Recombination in lineage 1, 3, 5 and 8 of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China. *Infect. Genet. Evol.* 68, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.006>
- Liu, J., Zhou, X., Zhai, J., Wei, C., Dai, A., Yang, X., Luo, M., 2017. Recombination in JXA1-R vaccine and NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Vet. Microbiol.* 204, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.017>
- Liu, J.K., Wei, C.H., Dai, A.L., Fan, K.W., Yang, B.H., Huang, C.F., Li, X.H., Yang, X.Y., Luo, M.L., 2017. Complete genomic characterization of two European-genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Fujian province of China. *Arch. Virol.* 162, 823–833. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3136-9>
- Liu, L., Tian, J., Nan, H., Tian, M., Li, Y., Xu, X., Huang, B., Zhou, E., Hiscox, J.A., Chen, H., 2016. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein interacts with Nsp9 and cellular DHX9 to regulate viral RNA synthesis. *J. Virol.* 90, 5384–5398. <https://doi.org/10.1128/JVI.03216-15>
- Liu, Y., Hu, Y., Chai, Y., Liu, L., Song, J., Zhou, S., Su, J., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., Han, J., Yang, H., 2018. Identification of nonstructural protein 8 as the N-terminus of the RNA-dependent RNA polymerase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol. Sin.* 33, 429–439. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0054-x>
- Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.005>
- Loving, C.L., Osorio, F.A., Murtaugh, M.P., Zuckermann, F.A., 2015. Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 167, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.003>
- Lowman, M.E., Tipton, C.D., Labordère, A.L., Brown, J.A., 2023. Equine sinusitis aetiology is linked to sinus microbiome by amplicon sequencing. *Equine Vet. J.* 55, 798–807. <https://doi.org/10.1111/evj.13884>
- Lu, I.-N., Muller, C.P., He, F.Q., 2020. Applying next-generation sequencing to unravel the mutational landscape in viral quasispecies. *Virus Res.* 283, 197963. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197963>
- Lu, Z.H., Brown, A., Wilson, A.D., Calvert, J.G., Balasch, M., Fuentes-Utrilla, P., Loecherbach, J., Turner, F., Talbot, R., Archibald, A.L., Ait-Ali, T., 2014. Genomic variation in macrophage-cultured European porcine reproductive and respiratory syndrome virus Olot/91 revealed using ultra-deep next generation sequencing.

- Virol. J. 11, 42. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-42>
- Lu, Z.H., Wang, X., Wilson, A.D., Dorey-Robinson, D.L.W., Archibald, A.L., Ait-Ali, T., Frossard, J.-P., 2017. Quasispecies evolution of the prototypical genotype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus early during in vivo infection is rapid and tissue specific. *Arch. Virol.* 162, 2203–2210. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3342-0>
- Lunney, J.K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G.J., 2016. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 129–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>
- Luo, Q., Zheng, Y., He, Y., Li, G., Zhang, H., Sha, H., Zhang, Z., Huang, L., Zhao, M., 2023. Genetic variation and recombination analysis of the GP5 (GP5a) gene of PRRSV-2 strains in China from 1996 to 2022. *Front. Microbiol.* 14, 1238766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1238766>
- Ma, X., Wang, P., Zhang, R., Zhao, Y., Wu, Y., Luo, C., Zeshan, B., Yang, Z., Qiu, L., Zhou, Y., Wang, X., 2022. A NADC30-like PRRSV causes serious intestinal infections and tropism in piglets. *Vet. Microbiol.* 268, 109397. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109397>
- Madapong, A., Saeng-chuto, K., Boonsoongnern, A., Tantituvanont, A., Nilubol, D., 2020. Cell-mediated immune response and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modified-live vaccines against co-challenge with PRRSV-1 and PRRSV-2. *Sci. Rep.* 10, 1649. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58626-y>
- Magar, R., Larochele, R., 2004. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure. *Can. J. Vet. Res.* 68, 259–266.
- Makau, D.N., Alkhamis, M.A., Paploski, I.A.D., Corzo, C.A., Lycett, S., VanderWaal, K., 2021. Integrating animal movements with phylogeography to model the spread of PRRSV in the USA. *Virus Evol.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1093/ve/veab060>
- Maloney, J.G., Molokin, A., Santin, M., 2019. Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infect. Genet. Evol.* 73, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.013>
- Martín-Valls, G.E., Cortey, M., Allepuz, A., Illas, F., Tello, M., Mateu, E., 2023a. Introduction of a PRRSV-1 strain of increased virulence in a pig production structure in Spain: Virus evolution and impact on production. *Porc. Heal. Manag.* 9, 1. <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00298-3>
- Martín-Valls, G.E., Kvisgaard, L.K., Tello, M., Darwich, L., Cortey, M., Burgara-Estrella, A.J., Hernández, J., Larsen, L.E., Mateu, E., 2014. Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidence that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates. *J. Virol.* 88, 3170–3181. <https://doi.org/10.1128/JVI.02858-13>
- Martín-Valls, G.E., Li, Y., Clilverd, H., Soto, J., Cortey, M., Mateu, E., 2023b. Levels of neutralizing antibodies against resident farm strain or vaccine strain are not indicators of protection against PRRSV-1 vertical transmission under farm conditions. *BMC Vet. Res.* 19, 217. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03785-z>
- Martin, D.P., Varsani, A., Roumagnac, P., Botha, G., Maslamoney, S., Schwab, T., Kelz, Z., Kumar, V., Murrell, B., 2021. RDP5: a computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evol.* 7, 87. <https://doi.org/10.1093/VE/VEAA087>
- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C., 2011. Comparative pathogenicity of Type 1 and Type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet. Microbiol.* 154, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.025>
- Marton, S., Szalay, D., Kecskeméti, S., Forró, B., Olasz, F., Zádori, Z., Szabó, I., Molnár, T., Bányai, K., Bálint, Á., 2019. Coding-complete sequence of a vaccine-derived recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain isolated in Hungary. *Arch. Virol.* 164, 2605–2608. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04338-2>
- Mateu, E., Díaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Pujols, J., 2006. Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res.* 115, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.09.008>
- McNaughton, A.L., Sreenu, V.B., Wilkie, G., Gunson, R., Templeton, K., Leitch, E.C.M., 2018. Prevalence of mixed genotype hepatitis C virus infections in the UK as determined by genotype-specific PCR and deep sequencing. *J. Viral Hepat.* 25, 524–534. <https://doi.org/10.1111/jvh.12849>
- Meng, C., Su, L., Li, Y., Zhu, Q., Li, J., Wang, H., He, Q., Wang, C., Wang, W., Cao, S., 2018. Different susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection among Chinese native pig breeds. *Arch. Virol.* 163, 2155–2164. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3821-y>
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 1998. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval. *Am. J. Vet. Res.* 59, 52–55.
- Meulenbergh, J.J.M., 2000. PRRSV, the virus. *Vet. Res.* 31, 11–21. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000054>
- Miller, L.C., Fox, J.M., 2004. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.004>
- Mokhtar, H., Eck, M., Morgan, S.B., Essler, S.E., Frossard, J.-P., Ruggli, N., Graham, S.P., 2014. Proteome-wide screening of the European porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity. *Vaccine* 32, 6828–6837. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.054>
- Molina, R.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Hesse, R., Rowland, R.R.R., Zimmerman, J.J., 2009. Evaluation of the risk of PRRSV transmission via ingestion of muscle from persistently infected pigs.

- Transbound. Emerg. Dis. 56, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01052.x>
- Murtaugh, M.P., 2012. Use and interpretation of sequencing in PRRSV control programs. Allen D. Leman Swine Conf. 39, 48–55.
- Murtaugh, M.P., Harding, J., Faaberg, K.S., 2003. Genetic variation and biological safety of Ingelvac MLV modified live PRRS vaccine during seven years of continuous use in the field, in: 4th International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases. Rome, pp. 137–138.
- Murtaugh, M.P., Shi, M., Brar, M.S., Leung, F.C.-C., 2015. Evolutionary diversification of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 96, 1570–1580. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000104>
- Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Abrahante, J.E., Lam, T.T.Y., Leung, F.C.-C., 2010. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.015>
- Nathues, C., Perler, L., Bruhn, S., Suter, D., Eichhorn, L., Hofmann, M., Nathues, H., Baechlein, C., Ritzmann, M., Palzer, A., Grossmann, K., Schüpbach-Regula, G., Thür, B., 2016. An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Switzerland following import of boar semen. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, e251–e261. <https://doi.org/10.1111/tbed.12262>
- Nauwynck, H.J., Duan, X., Favoreel, H.W., Van Oostveldt, P., Pensaert, M.B., 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 80, 297–305. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-297>
- Nemes, I., Molnár, T., Abonyi, T., Terjék, Z., Bálint, Á., Szabó, I., 2019. Eradication of PRRS from backyard swine herds in Hungary between 2012 and 2018. *Acta Vet. Hung.* 67, 543–552. <https://doi.org/10.1556/004.2019.053>
- Neverov, A., Chumakov, K., 2010. Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 20063–20068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012537107>
- Nguyen, V.G., Kim, H.K., Moon, H.J., Park, S.J., Chung, H.C., Choi, M.K., Park, B.K., 2014. A Bayesian phylogeographical analysis of Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 537–545. <https://doi.org/10.1111/tbed.12058>
- Ni, M., Chen, C., Liu, D., 2018. An assessment of amplicon-sequencing based method for viral intrahost analysis. *Virol. Sin.* 33, 557–560. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0052-z>
- Nilubol, D., Tripipat, T., Hoonsuwan, T., Tipsombatboon, P., Piriyaongsa, J., 2013. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes I and II in Thailand. *Arch. Virol.* 158, 943–953. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1573-7>
- Novakovic, P., Harding, J.C.S., Al-Dissi, A.N., Ladinig, A., Detmer, S.E., 2016. Pathologic evaluation of Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection at the maternal-fetal interface of late gestation pregnant gilts. *PLoS One* 11, e0151198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151198>
- Ogno, G., Rodríguez-Gómez, I.M., Canelli, E., Ruedas-Torres, I., Álvarez, B., Domínguez, J., Borghetti, P., Martelli, P., Gómez-Laguna, J., 2019. Impact of PRRSV strains of different in vivo virulence on the macrophage population of the thymus. *Vet. Microbiol.* 232, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.016>
- Oh, D., Xie, J., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., 2020. Isolation and characterization of a new population of nasal surface macrophages and their susceptibility to PRRSV-1 subtype 1 (LV) and subtype 3 (Lena). *Vet. Res.* 51, 21. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00751-7>
- Ohlinger, V., 1992. PRRS/Blue ear disease, in: Meredith, M. (Ed.), *SIRS Monthly Newsletter*. Pig Disease Information Center, Cambridge.
- Olasz, F., Dénes, B., Bálint, Á., Magyar, T., Belák, S., Zádori, Z., 2016. Immunological and biochemical characterisation of 7ap, a short protein translated from an alternative frame of ORF7 of PRRSV. *Acta Vet. Hung.* 64, 273–287. <https://doi.org/10.1556/004.2016.027>
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241–4250. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4241-4250.2002>
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C.A., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet. Microbiol.* 145, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.028>
- Otake, S., Dee, S.A., Jacobson, L., Pijoan, C., Torremorell, M., 2002a. Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. *Vet. Rec.* 150, 804–808. <https://doi.org/10.1136/vr.150.26.804>
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C., 2002b. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can. J. Vet. Res.* 66, 191–195.
- Pamornchainavakul, N., Kikuti, M., Paploski, I.A.D., Makau, D.N., Rovira, A., Corzo, C.A., VanderWaal, K., 2022. Measuring how recombination re-shapes the evolutionary history of PRRSV-2: A genome-based phylodynamic analysis of the emergence of a novel PRRSV-2 variant. *Front. Vet. Sci.* 9, 846904. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.846904>
- Pamornchainavakul, N., Makau, D.N., Paploski, I.A.D., Corzo, C.A., VanderWaal, K., 2023a. Unveiling invisible farm-to-farm PRRSV-2 transmission links and routes through transmission tree and network analysis. *Evol. Appl.* 16, 1721–1734. <https://doi.org/10.1111/eva.13596>
- Pamornchainavakul, N., Paploski, I.A.D., Makau, D.N., Kikuti, M., Rovira, A., Lycett, S., Corzo, C.A., VanderWaal, K., 2023b. Mapping the dynamics of contemporary PRRSV-2 evolution and its emergence and spreading hotspots in the U.S. using phylogeography. *Pathogens* 12, 740. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050740>

- Pan, J., Zeng, M., Zhao, M., Huang, L., 2023. Research Progress on the detection methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Front. Microbiol.* 14, 1097905. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1097905>
- Papatsiros, V., Stylianaki, I., Papakonstantinou, G., Tsekouras, N., Bitchava, D., Christodouloupoulos, G., Papaioannou, N., 2020. Histopathological lesions accompanied with first-time isolation of a PRRSV-2 strain in Greece. *Viral Immunol.* 33, 1–6. <https://doi.org/10.1089/vim.2020.0087>
- Paploski, I.A.D., Makau, D.N., Pamornchainavakul, N., Baker, J.P., Schroeder, D., Rovira, A., VanderWaal, K., 2022. Potential novel N-glycosylation patterns associated with the emergence of new genetic variants of PRRSV-2 in the U.S. *Vaccines* 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122021>
- Paploski, I.A.D., Pamornchainavakul, N., Makau, D.N., Rovira, A., Corzo, C.A., Schroeder, D.C., Cheeran, M.C.-J., Doeschl-Wilson, A., Kao, R.R., Lycett, S., VanderWaal, K., 2021. Phylogenetic structure and sequential dominance of sub-lineages of PRRSV Type-2 lineage 1 in the United States. *Vaccines* 9, 608. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060608>
- Pasternak, A.O., Born, E. van den, Spaan, W.J.M., Snijder, E.J., 2001. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.* 20, 7220–7228. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7220>
- Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N., Snijder, E.J., 1999. Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J. Virol.* 73, 2016–2026. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2016-2026.1999>
- Perez, A.M., Davies, P.R., Goodell, C.K., Holtkamp, D.J., Mondaca-Fernández, E., Poljak, Z., Touseignant, S.J., Valdes-Donoso, P., Zimmerman, J.J., Morrison, R.B., 2015. Lessons learned and knowledge gaps about the epidemiology and control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in North America. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 246, 1304–1317. <https://doi.org/10.2460/javma.246.12.1304>
- Pesente, P., Rebonato, V., Sandri, G., Giovanardi, D., Ruffoni, L.S., Torriani, S., 2006. Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet. Microbiol.* 114, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.061>
- Pitkin, A., Deen, J., Dee, S., 2009a. Use of a production region model to assess the airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 136, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.013>
- Pitkin, A., Deen, J., Dee, S., 2009b. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 73, 298–302.
- Pitkin, A., Deen, J., Otake, S., Moon, R., Dee, S., 2009c. Further assessment of houseflies (*Musca domestica*) as vectors for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. *Can. J. Vet. Res.* 73, 91–96.
- Popescu, L.N., Tribble, B.R., Chen, N., Rowland, R.R.R., 2017. GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Vet. Microbiol.* 209, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.016>
- Porphyre, T., Bronsvoort, B.M. de C., Gunn, G.J., Correia-Gomes, C., 2020. Multilayer network analysis unravels haulage vehicles as a hidden threat to the British swine industry. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 1231–1246. <https://doi.org/10.1111/tbed.13459>
- Posthuma, C.C., Pedersen, K.W., Lu, Z., Joosten, R.G., Roos, N., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Snijder, E.J., 2008. Formation of the arterivirus replication/transcription complex: A key role for nonstructural protein 3 in the remodeling of intracellular membranes. *J. Virol.* 82, 4480–4491. <https://doi.org/10.1128/JVI.02756-07>
- Prather, R.S., Rowland, R.R.R., Ewen, C., Tribble, B., Kerrigan, M., Bawa, B., Teson, J.M., Mao, J., Lee, K., Samuel, M.S., Whitworth, K.M., Murphy, C.N., Egen, T., Green, J.A., 2013. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 87, 9538–9546. <https://doi.org/10.1128/JVI.00177-13>
- Prather, R.S., Wells, K.D., Whitworth, K.M., Kerrigan, M.A., Samuel, M.S., Mileham, A., Popescu, L.N., Rowland, R.R.R., 2017. Knockout of maternal CD163 protects fetuses from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Sci. Rep.* 7, 13371. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13794-2>
- Prieto, C., Suárez, P., Martín-Rillo, S., Simarro, I., Solana, A., Castro, J.M., 1996. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilized ova in vitro. *Theriogenology* 46, 687–693. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00220-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00220-8)
- Prieto, C., Suárez, P., Simarro, I., García, C., Fernández, A., Castro, J.M., 1997a. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet. Microbiol.* 57, 301–311. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00112-0)
- Prieto, C., Suárez, P., Simarro, I., García, C., Martín-Rillo, S., Castro, J.M., 1997b. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 47, 647–654. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00023-X)
- Prieto, C., Vázquez, A., Núñez, J.I., Álvarez, E., Simarro, I., Castro, J.M., 2009. Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. J.* 180, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.005>
- Quer, J., Colomer-Castell, S., Campos, C., Andrés, C., Piñana, M., Cortese, M.F., González-Sánchez, A., Garcia-Cehic, D., Ibáñez, M., Pumarola, T., Rodríguez-Frías, F., Antón, A., Taberero, D., 2022. Next-generation sequencing for confronting virus pandemics. *Viruses* 14, 600. <https://doi.org/10.3390/v14030600>
- Quer, J., Gregori, J., Rodríguez-Frías, F., Buti, M., Madejon, A., Perez-del-Pulgar, S., Garcia-Cehic, D., Casillas,

- R., Blasi, M., Homs, M., Tabernero, D., Alvarez-Tejado, M., Muñoz, J.M., Cubero, M., Caballero, A., DelCampo, J.A., Domingo, E., Belmonte, I., Nieto, L., Lens, S., Muñoz-de-Rueda, P., Sanz-Cameno, P., Sauleda, S., Bes, M., Gomez, J., Briones, C., Perales, C., Sheldon, J., Castells, L., Viladomiu, L., Salmeron, J., Ruiz-Extremera, A., Quiles-Pérez, R., Moreno-Otero, R., López-Rodríguez, R., Allende, H., Romero-Gómez, M., Guardia, J., Esteban, R., Garcia-Samaniego, J., Forns, X., Esteban, J.I., 2015. High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *J. Clin. Microbiol.* 53, 219–226. <https://doi.org/10.1128/JCM.02093-14>
- Quick, J., Grubaugh, N.D., Pullan, S.T., Claro, I.M., Smith, A.D., Gangavarapu, K., Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T.F., Beutler, N.A., Burton, D.R., Lewis-Ximenez, L.L., de Jesus, J.G., Giovanetti, M., Hill, S.C., Black, A., Bedford, T., Carroll, M.W., Nunes, M., Alcantara, L.C., Sabino, E.C., Baylis, S.A., Faria, N.R., Loose, M., Simpson, J.T., Pybus, O.G., Andersen, K.G., Loman, N.J., 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.* 12, 1261–1276. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>
- Rajkhowa, T.K., Vanlalruati, C., Singh, Y.D., Ravindran, R., Arya, R.S., 2018. Genetic variation of highly pathogenic Indian porcine reproductive and respiratory syndrome viruses after introduction in 2013. *Indian J. Anim. Sci.* 88, 1118–1126. <https://doi.org/10.56093/ijans.v88i10.84071>
- Ramakrishnan, M.A., Tu, Z.J., Singh, S., Chockalingam, A.K., Gramer, M.R., Wang, P., Goyal, S.M., Yang, M., Halvorson, D.A., Sreevatsan, S., 2009. The feasibility of using high resolution genome sequencing of influenza A viruses to detect mixed infections and quasispecies. *PLoS One* 4, e7105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007105>
- Ramos, N., Betancour, G., Puig, J., Arbiza, J., 2022. An update on genetic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 (PRRSV-2) in South America: Identification of ORF5 sequences of lineage 1A, 1C and 1G. *Arch. Microbiol.* 204, 367. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02976-w>
- Renson, P., Touzain, F., Leuret, A., Le Dimna, M., Quenault, H., Normand, V., Claude, J.-B., Pez, F., Rose, N., Blanchard, Y., Bourry, O., 2017. Complete genome sequence of a recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain from two genotype 1 modified live virus vaccine strains. *Genome Announc.* 5, e00454-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA>
- Robinson, S.R., Li, J., Nelson, E.A., Murtaugh, M.P., 2015. Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 203, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.016>
- Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., Collins, J.E., 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 6, 3–12. <https://doi.org/10.1177/104063879400600102>
- Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1995. Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Gnotobiotic Pigs. *Vet. Pathol.* 32, 361–373. <https://doi.org/10.1177/030098589503200404>
- Rowland, R.R.R., 2010. The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Virus Res.* 154, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.09.001>
- Rowland, R.R.R., Doerksen, T., Lu, A., Sheahan, M., Lunney, J., Dekkers, J., Palinski, R.M., 2022. Effect of the host genotype at a porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) resistance marker on evolution of the modified-live PRRS vaccine virus in pigs. *Virus Res.* 316, 198809. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198809>
- Ruedas-Torres, I., Rodríguez-Gómez, I.M., Sánchez-Carvajal, J.M., Larenas-Muñoz, F., Pallarés, F.J., Carrasco, L., Gómez-Laguna, J., 2021. The jigsaw of PRRSV virulence. *Vet. Microbiol.* 260, 109168. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109168>
- Rupasinghe, R., Lee, K., Liu, X., Gauger, P.C., Zhang, J., Martínez-López, B., 2022. Molecular evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus field strains from two swine production systems in the Midwestern United States from 2001 to 2020. *Microbiol. Spectr.* 10, 02634–21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02634-21>
- Sagong, M., Lee, C., 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein modulates interferon- β production by inhibiting IRF3 activation in immortalized porcine alveolar macrophages. *Arch. Virol.* 156, 2187–2195. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1116-7>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schneider, P.T., Zhang, J., Ramirez, A., 2015. Evaluation of disinfection protocols to reduce virus transmission via livestock transport vehicles using model trailers and experimental conditions. *J. Swine Heal. Prod.* 23, 306–316.
- Serrão de Andrade, A.A., Soares, A.E.R., Paula de Almeida, L.G., Ciapina, L.P., Pestana, C.P., Aquino, C.L., Medeiros, M.A., Ribeiro de Vasconcelos, A.T., 2021. Testing the genomic stability of the Brazilian yellow fever vaccine strain using next-generation sequencing data. *Interface Focus* 11, 20200063. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2020.0063>
- Shang, Y., Wang, G., Yin, S., Tian, H., Du, P., Wu, J., Chen, Y., Yang, S., Jin, Y., Zhang, K., Lu, Z., Liu, X., 2013. Pathogenic characteristics of three genotype II porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated from China. *Virol. J.* 10, 7. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-7>
- Shi, C., Liu, Y., Ding, Y., Zhang, Y., Zhang, J., 2015. PRRSV receptors and their roles in virus infection. *Arch. Microbiol.* 197, 503–512. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1088-1>
- Shi, M., Lam, T.T.-Y., Hon, C.-C., Kin-Hei Hui, R., Faaberg, K.S., Wennblom, T., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Chi-

- Ching Leung, F., 2010a. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Res.* 154, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.014>
- Shi, M., Lam, T.T.-Y., Hon, C.-C., Murtaugh, M.P., Davies, P.R., Hui, R.K.-H., Li, J., Wong, L.T.-W., Yip, C.-W., Jiang, J.-W., Leung, F.C.-C., 2010b. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.* 84, 8700–8711. <https://doi.org/10.1128/JVI.02551-09>
- Shi, M., Lemey, P., Singh Brar, M., Suchard, M.A., Murtaugh, M.P., Carman, S., D’Allaire, S., Delisle, B., Lambert, M.-É., Gagnon, C.A., Ge, L., Qu, Y., Yoo, D., Holmes, E.C., Leung, F.C.-C., 2013. The spread of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in North America: A phylogeographic approach. *Virology* 447, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.028>
- Shin, G.-E., Park, J.-Y., Lee, K.-K., Ko, M.-K., Ku, B.-K., Park, C.-K., Jeoung, H.-Y., 2022. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and evaluation of three one-step real-time RT-PCR assays in Korea. *BMC Vet. Res.* 18, 327. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03407-0>
- Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L.F., de Boer, E.N., Almomani, R., Boven, L.G., van den Berg, M.P., van Spaendonck-Zwarts, K.Y., van Tintelen, J.P., Sijmons, R.H., Jongbloed, J.D.H., Sinke, R.J., 2013. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum. Mutat.* 34, 1035–1042. <https://doi.org/10.1002/humu.22332>
- Slatko, B.E., Gardner, A.F., Ausubel, F.M., 2018. Overview of next-generation sequencing technologies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 122, e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Snijder, E.J., Meulenbergh, J.J.M., 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 79, 961–979. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-5-961>
- Song, C., Lu, R., Bienzle, D., Liu, H.-C., Yoo, D., 2009. Interaction of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein with the inhibitor of MyoD family-a domain-containing protein. *Biol. Chem.* 390, 215–223. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.028>
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Potapchuk, D., Podgórska, K., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835–1841. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81782-0>
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Scherbakov, A. V., Timina, A.M., Krabbe, J.S., Chabros, K., Potapchuk, D., 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.* 153, 1479–1488. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0146-2>
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Murtaugh, M.P., Oleksiewicz, M.B., 2013. Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play. *Vet. Microbiol.* 165, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.029>
- Stankevicius, A., Cepulis, R., Zilinskas, H., Stadejek, T., Pejsak, Z., 2008. Persistence of European and American type PRRSV strains within Lithuanian pig herd. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 52, 319–323.
- Stas, M.R., Kreutzmann, H., Stadler, J., Sassu, E.L., Mair, K.H., Koch, M., Knecht, C., Stadler, M., Dolezal, M., Balka, G., Zaruba, M., Mötz, M., Saalmüller, A., Rügenapf, T., Gerner, W., Ladinig, A., 2022. Influence of PRRSV-1 vaccination and infection on mononuclear immune cells at the maternal-fetal interface. *Front. Immunol.* 13, 1055048. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1055048>
- Stein, H., Schulz, J., Morgenstern, R., Voglmayr, T., Freymüller, G., Sinn, L., Rügenapf, T., Hennig-Pauka, I., Ladinig, A., 2018. Use of three air samplers for the detection of PRRSV-1 under experimental and field conditions. *Animals* 8, 233. <https://doi.org/10.3390/ani8120233>
- Storgaard, T., Oleksiewicz, M., Bøtner, A., 1999. Examination of the selective pressures on a live PRRS vaccine virus. *Arch. Virol.* 144, 2389–2401. <https://doi.org/10.1007/s007050050652>
- Su, C.-M., Rowland, R.R.R., Yoo, D., 2021. Recent advances in PRRS virus receptors and the targeting of receptor–ligand for control. *Vaccines* 9, 354. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040354>
- Suárez, P., Zardoya, R., Martín, M.J., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A., Castro, J., 1996. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res.* 42, 159–165. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)01305-9](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)01305-9)
- Suminda, G.G.D., Bhandari, S., Won, Y., Goutam, U., Kanth Pulicherla, K., Son, Y.-O., Ghosh, M., 2022. High-throughput sequencing technologies in the detection of livestock pathogens, diagnosis, and zoonotic surveillance. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 20, 5378–5392. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.09.028>
- Sun, Q., Xu, H., An, T., Cai, X., Tian, Z., Zhang, H., 2023. Recent progress in studies of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in China. *Viruses* 15, 1528. <https://doi.org/10.3390/v15071528>
- Sun, Q., Xu, H., Li, C., Gong, B., Li, Z., Tian, Z.-J., Zhang, H., 2022. Emergence of a novel PRRSV-1 strain in mainland China: A recombinant strain derived from the two commercial modified live viruses Amervac and DV. *Front. Vet. Sci.* 9, 974743. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.974743>
- Sur, J.H., Doster, A.R., Christian, J.S., Galeota, J.A., Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Osorio, F.A., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71, 9170–9179. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9170-9179.1997>
- Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Evans, L.E., Landgraf, J.G., Wills, R.W., Sanderson, T.P., McGinley, M.J., Brevik, A.K., Ciszewski, D.K., 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1943–1948.
- Szabó, I., Bognár, L., Molnár, T., Nemes, I., Bálint, Á., 2020. PRRS eradication from swine farms in five regions of Hungary. *Acta Vet. Hung.* 68, 257–262. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00043>

- Szabó, I., Molnár, T., Nemes, I., Abonyi, T., Terjék, Z., Bálint, Á., 2019. PRRSV eradication on large-scale fattening pig farms in Hungary between 2014 and 2019. *Acta Vet. Hung.* 67, 529–542. <https://doi.org/10.1556/004.2019.052>
- Szabó, I., Nemes, I., Bognár, L., Terjék, Z., Molnár, T., Abonyi, T., Bálint, Á., Horváth, D.G., Balka, G., 2023. Eradication of PRRS from Hungarian pig herds between 2014 and 2022. *Animals* 13, 3747. <https://doi.org/10.3390/ani13243747>
- Szabó, P.M., Szalay, D., Kecskeméti, S., Molnár, T., Szabó, I., Bálint, Á., 2020. Investigations on spreading of PRRSV among swine herds by improved minimum spanning network analysis. *Sci. Rep.* 10, 19217. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75516-5>
- Tan, S., Dvorak, C.M.T., Murtaugh, M.P., 2019. Rapid, unbiased PRRSV strain detection using MinION direct RNA sequencing and bioinformatics tools. *Viruses* 11, 1132. <https://doi.org/10.3390/v11121132>
- Thaa, B., Kaufner, S., Neumann, S.A., Peibst, B., Nauwynck, H., Krause, E., Veit, M., 2017. The complex co-translational processing of glycoprotein GP5 of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 240, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.004>
- Thaa, B., Sinhadri, B.C., Tievesch, C., Krause, E., Veit, M., 2013. Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: A minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *PLoS One* 8, e65548. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0065548>
- Thakur, K.K., Revie, C.W., Hurnik, D., Sanchez, J., 2017. Modelling contamination of trucks used in the shipment of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Swine Heal. Prod.* 25, 183–193. <https://doi.org/10.54846/jshap/978>
- Toplak, I., Rihtarič, D., Hostnik, P., Grom, J., Štukelj, M., Valenčak, Z., 2012. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *J. Virol. Methods* 179, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.019>
- Torremorell, M., Pijoan, C., Janni, K., Walker, R., Joo, H.S., 1997. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am. J. Vet. Res.* 58, 828–832.
- Trevisan, G., Magstadt, D., Woods, A., Sparks, J., Zeller, M., Li, G., Krueger, K.M., Saxena, A., Zhang, J., Gauger, P.C., 2023. A recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 field strain derived from two PRRSV-2-modified live virus vaccines. *Front. Vet. Sci.* 10, 1149293. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1149293>
- Trevisan, G., Zeller, M., Li, G., Zhang, J., Gauger, P., Linhares, D.C.L., 2022. Implementing a user-friendly format to analyze PRRSV next-generation sequencing results and associating breeding herd production performance with number of PRRSV strains and recombination events. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, e2214–e2229. <https://doi.org/10.1111/tbed.14560>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W232–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
- Truyen, U., Wilhelm, S., Genzow, M., Schagemann, G., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): A ring test performed in Germany to assess RT-PCR detection methods. *J. Vet. Med. Ser. B* 53, 68–74. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00913.x>
- Van Borm, S., Belák, S., Freimanis, G., Fusaro, A., Granberg, F., Höper, D., King, D.P., Monne, I., Orton, R., Rosseel, T., 2015. Next-generation sequencing in veterinary medicine: How can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases?, in: Cunha, M. V., Inácio, J. (Eds.), *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies*, Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY, pp. 415–436. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4>
- Van Borm, S., Wang, J., Granberg, F., Colling, A., 2016. Next-generation sequencing workflows in veterinary infection biology: Towards validation and quality assurance. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* 35, 67–81. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2418>
- Van Breedam, W., Costers, S., Vanhee, M., Gagnon, C.A., Rodríguez-Gómez, I.M., Geldhof, M., Verbeeck, M., Van Doorselaere, J., Karniyuchuk, U., Nauwynck, H.J., 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific mAbs: Supporting diagnostics and providing new insights into the antigenic properties of the virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141, 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.008>
- Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J.Q., Crocker, P.R., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010. The M/GP5 glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog.* 6, e1000730. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000730>
- van der Linden, I.F.A., van der Linde-Bril, E.M., Voermans, J.J.M., van Rijn, P.A., Pol, J.M.A., Martin, R., Steverink, P.J.G.M., 2003. Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Vet. Microbiol.* 97, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.09.015>
- Vandenbussche, F., Mathijs, E., Tignon, M., Vandersmissen, T., Cay, A.B., 2021. WGS- versus ORF5-based typing of PRRSV: A Belgian case study. *Viruses* 13, 2419. <https://doi.org/10.3390/v13122419>
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207–8215. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8207-8215.2003>
- VanderWaal, K., Paploski, I.A.D., Makau, D.N., Corzo, C.A., 2020. Contrasting animal movement and spatial connectivity networks in shaping transmission pathways of a genetically diverse virus. *Prev. Vet. Med.* 178, 104977. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104977>

- Vanhee, M., Van Breedam, W., Costers, S., Geldhof, M., Noppe, Y., Nauwynck, H., 2011. Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine* 29, 4794–4804. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.071>
- Veit, M., Gadalla, M.R., Zhang, M., 2022. Using AlphaFold2 to predict the structure of the Gp5/M dimer of porcine reproductive and reproductive syndrome virus. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 13209. <https://doi.org/10.3390/ijms232113209>
- Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M.S., Jaing, C., McLoughlin, K., Gardner, S., Delwart, E.L., 2010. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: Detection of minority variants and an adventitious virus. *J. Virol.* 84, 6033–6040. <https://doi.org/10.1128/JVI.02690-09>
- Vidal, S., Kegler, K., Posthaus, H., Perreten, V., Rodriguez-Campos, S., 2017. Amplicon sequencing of bacterial microbiota in abortion material from cattle. *Vet. Res.* 48, 64. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0470-1>
- Vu, H.L.X., Kwon, B., Yoon, K.-J., Laegreid, W.W., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2011. Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *J. Virol.* 85, 5555. <https://doi.org/10.1128/JVI.00189-11>
- Wagstrom, E.A., Chang, C.-C., Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J., 2001. Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1876–1880. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1876>
- Wang, A., Chen, Q., Wang, L., Madson, D., Harmon, K., Gauger, P., Zhang, J., Li, G., 2019a. Recombination between vaccine and field Strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 2335–2337. <https://doi.org/10.3201/eid2512.191111>
- Wang, A., Zhang, J., Shen, H., Zheng, Y., Feng, Q., Yim-Im, W., Gauger, P.C., Harmon, K., Zhu, S., An, T.-Q., Li, G., 2019b. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in the United States of America from 2010 to 2018. *Vet. Microbiol.* 239, 108486. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108486>
- Wang, G., He, Y., Tu, Y., Liu, Y., Zhou, E.-M., Han, Z., Jiang, C., Wang, S., Shi, W., Cai, X., 2014. Comparative analysis of apoptotic changes in peripheral immune organs and lungs following experimental infection of piglets with highly pathogenic and classical porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol. J.* 11, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-2>
- Wang, G., Yu, Y., Cai, X., Zhou, E.-M., Zimmerman, J.J., 2020. Effects of PRRSV infection on the porcine thymus. *Trends Microbiol.* 28, 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.10.009>
- Wang, J., Zhang, M., Cui, X., Gao, X., Sun, W., Ge, X., Zhang, Y., Guo, X., Han, J., Zhou, L., Yang, H., 2022. Attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus regains its fatal virulence by serial passaging in pigs or porcine alveolar macrophages to increase its adaptation to target cells. *Microbiol. Spectr.* 10, e0308422. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03084-22>
- Wang, L., Li, R., Geng, R., Zhang, L., Chen, X., Qiao, S., Zhang, G., 2022. Heat shock protein member 8 (HSPA8) is involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization. *Microbiol. Spectr.* 10, e01860-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01860-21>
- Wang, X., Yang, X., Zhou, R., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., Yang, H., 2016. Genomic characterization and pathogenicity of a strain of Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 225, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.09.006>
- Wang, Y., Yim-im, W., Porter, E., Lu, N., Anderson, J., Noll, L., Fang, Y., Zhang, J., Bai, J., 2021. Development of a bead-based assay for detection and differentiation of field strains and four vaccine strains of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-2) in the USA. *Transbound. Emerg. Dis.* 68, 1414–1423. <https://doi.org/10.1111/tbed.13808>
- Weaver, S., Shank, S.D., Spielman, S.J., Li, M., Muse, S. V., Kosakovsky Pond, S.L., 2018. Datamonkey 2.0: a modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Mol. Biol. Evol.* 35, 773–777. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx335>
- Wei, X., Li, R., Qiao, S., Chen, X., Xing, G., Zhang, G., 2020. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus utilizes viral apoptotic mimicry as an alternative pathway to infect host cells. *J. Virol.* 94, e00709-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00709-20>
- Wei, Z., Lin, T., Sun, L., Li, Y., Wang, X., Gao, F., Liu, R., Chen, C., Tong, G., Yuan, S., 2012. N-Linked glycosylation of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus is critically important for virus replication in vivo. *J. Virol.* 86, 9941–9951. <https://doi.org/10.1128/JVI.07067-11>
- Welch, S.-K.W., Calvert, J.G., 2010. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res.* 154, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.018>
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13, 121–130. <https://doi.org/10.1080/01652176.1991.9694296>
- Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J.A., Sur, J.-H., Osorio, F.A., 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* 41, 58–62. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.58-62.2003>
- Wills, R.W., Doster, A.R., Osorio, F.A., 2002. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) to age-matched sentinel pigs. *J. Swine Heal. Prod.* 10, 161–165.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., Yoon, K.-J., Hill, H.T., Bundy, D.S., McGinley, M.J., 1997a. Transmission of PRRSV by direct, close, or indirect contact. *J. Swine Heal. Prod.* 5, 213–218.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.-J., Swenson, S.L., Hoffman, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., 1997b. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57, 69–81. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00079-5)

- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.-J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., 1997c. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55, 231–240. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01337-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01337-5)
- Wissink, E.H.J., Kroese, M. V., Maneschijn-Bonsing, J.G., Meulenberg, J.J.M., van Rijn, P.A., Rijsewijk, F.A.M., Rottier, P.J.M., 2004. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *J. Gen. Virol.* 85, 3715–3723. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80402-0>
- Wissink, E.H.J., van Wijk, H.A.R., Kroese, M. V., Weiland, E., Meulenberg, J.J.M., Rottier, P.J.M., van Rijn, P.A., 2003. The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J. Gen. Virol.* 84, 1535–1543. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18957-0>
- Wolf-Jäckel, G.A., Strube, M.L., Schou, K.K., Schnee, C., Agerholm, J.S., Jensen, T.K., 2021. Bovine abortions revisited—enhancing abortion diagnostics by 16S rDNA amplicon sequencing and fluorescence in situ hybridization. *Front. Vet. Sci.* 8, 623666. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623666>
- Wolff, G., Melia, C.E., Snijder, E.J., Bárcena, M., 2020. Double-membrane vesicles as platforms for viral replication. *Trends Microbiol.* 28, 1022–1033. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.009>
- Wongyanin, P., Buranapraditkul, S., Yoo, D., Thanawongnuwech, R., Roth, J.A., Suradhat, S., 2012. Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in induction of interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (Treg). *J. Gen. Virol.* 93, 1236–1246. <https://doi.org/10.1099/vir.0.040287-0>
- Wu, C., Gu, G., Zhai, T., Wang, Y., Yang, Y., Li, Y., Zheng, X., Zhao, Q., Zhou, E.-M., Nan, Y., 2020. Broad neutralization activity against both PRRSV-1 and PRRSV-2 and enhancement of cell mediated immunity against PRRSV by a novel IgM monoclonal antibody. *Antiviral Res.* 175, 104716. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104716>
- Xia, Y., Zhang, T., Gong, D., Qi, J., Jiang, S., Yang, H., Zhu, X., Gan, Y., Zhang, Y., Han, Y., Li, Y., Li, J., 2023. Recombination and mutation in a new HP-PRRSV strain (SD2020) from China. *Viruses.* <https://doi.org/10.3390/v15010165>
- Xiao, M., Liu, X., Ji, J., Li, M., Li, Jiandong, Yang, L., Sun, W., Ren, P., Yang, G., Zhao, J., Liang, T., Ren, H., Chen, T., Zhong, H., Song, W., Wang, Y., Deng, Z., Zhao, Y., Ou, Z., Wang, D., Cai, J., Cheng, X., Feng, T., Wu, H., Gong, Y., Yang, H., Wang, J., Xu, X., Zhu, S., Chen, F., Zhang, Y., Chen, W., Li, Y., Li, Junhua, 2020. Multiple approaches for massively parallel sequencing of SARS-CoV-2 genomes directly from clinical samples. *Genome Med.* 12, 57. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00751-4>
- Xie, J., Christiaens, I., Yang, B., Breedam, W. Van, Cui, T., Nauwynck, H.J., 2017. Molecular cloning of porcine Siglec-3, Siglec-5 and Siglec-10, and identification of Siglec-10 as an alternative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J. Gen. Virol.* 98, 2030–2042. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000859>
- Xing, J., Zheng, Z., Cao, X., Wang, Z., Xu, Z., Gao, H., Liu, J., Xu, S., Lin, J., Chen, S., Wang, H., Zhang, G., Sun, Y., 2022. Whole genome sequencing of clinical specimens reveals the genomic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerging in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 69, e2530–e2540. <https://doi.org/10.1111/tbed.14597>
- Xue, B., Hou, G., Zhang, G., Huang, J., Li, L., Nan, Y., Mu, Y., Wang, L., Zhang, L., Han, X., Ren, X., Zhao, Q., Wu, C., Wang, J., Zhou, E.-M., 2019. MYH9 aggregation induced by direct interaction with PRRSV GP5 ectodomain facilitates viral internalization by permissive cells. *Front. Microbiol.* 10, 2313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02313>
- Yaeger, M.J., Prieve, T., Collins, J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Benfield, D., 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Heal. Prod.* 1, 7–9.
- Yang, H., Zhang, J., Zhang, X., Shi, J., Pan, Y., Zhou, R., Li, G., Li, Z., Cai, G., Wu, Z., 2018. CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Res.* 151, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.004>
- Ye, N., Wang, B., Feng, W., Tang, D., Zeng, Z., 2022. PRRS virus receptors and an alternative pathway for viral invasion. *Virus Res.* 320, 198885. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198885>
- Yim-im, W., Anderson, T.K., Paploski, I.A.D., VanderWaal, K., Gauger, P., Krueger, K., Shi, M., Main, R., Zhang, J., 2023. Refining PRRSV-2 genetic classification based on global ORF5 sequences and investigation of their geographic distributions and temporal changes. *Microbiol. Spectr.* 11, e0291623. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02916-23>
- Yoon, J., Joo, H.S., Goyal, S.M., Molitor, T.W., 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 6, 289–292. <https://doi.org/10.1177/104063879400600326>
- You, X., Li, G., Lei, Y., Xu, Z., Zhang, P., Yang, Y., 2023. Role of genetic factors in different swine breeds exhibiting varying levels of resistance/susceptibility to PRRSV. *Virus Res.* 326, 199057. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199057>
- Young, J.E., Dvorak, C.M.T., Graham, S.P., Murtaugh, M.P., 2021. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5-specific, neutralizing monoclonal antibodies from hyperimmune sows. *Front. Immunol.* 12, 638493. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638493>
- Yu, F., Liu, L., Tian, X., Chen, L., Huang, X., Sun, Y., Yan, Y., Tian, Z., Cai, X., Liu, D., An, T., 2022. Genomic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 revealed extensive recombination and potential introduction events in China. *Vet. Sci.* 9, 450. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090450>

- Yu, F., Yan, Y., Shi, M., Liu, H.-Z., Zhang, H.-L., Yang, Y.-B., Huang, X.-Y., Gauger, P.C., Zhang, J., Zhang, Y.-H., Tong, G.-Z., Tian, Z.-J., Chen, J.-J., Cai, X.-H., Liu, D., Li, G., An, T.-Q., 2020. Phylogenetics, genomic recombination, and NSP2 polymorphic patterns of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China and the United States in 2014–2018. *J. Virol.* 94, e01813–e01819. <https://doi.org/10.1128/JVI.01813-19>
- Yuan, S., Mickelson, D., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., 2001. Complete genome comparison of porcine reproductive and respiratory syndrome virus parental and attenuated strains. *Virus Res.* 74, 99–110. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00250-1)
- Yuzhakov, A.G., Raev, S.A., Shchetinin, A.M., Gushchin, V.A., Alekseev, K.P., Stafford, V. V., Komina, A.K., Zaberezhny, A.D., Gulyukin, A.M., Aliper, T.I., 2020. Full-genome analysis and pathogenicity of a genetically distinct Russian PRRSV-1 Tyu16 strain. *Vet. Microbiol.* 247, 108784. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108784>
- Zhai, S.-L., Lin, T., Zhou, X., Pei, Z.-F., Wei, Z.-Z., Zhang, H., Wen, X.-H., Chen, Q.-L., Lv, D.-H., Wei, W.-K., 2018. Phylogeographic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in Guangdong province, Southern China. *Arch. Virol.* 163, 2443–2449. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3873-z>
- Zhang, H., Luo, Q., Zheng, Y., Sha, H., Li, G., Kong, W., Huang, L., Zhao, M., 2023. Genetic variability and recombination of the NSP2 gene of PRRSV-2 strains in China from 1996 to 2021. *Vet. Sci.* 10, 325. <https://doi.org/10.3390/vetsci10050325>
- Zhang, H., Sha, H., Qin, L., Wang, N., Kong, W., Huang, L., Zhao, M., 2022. Research progress in porcine reproductive and respiratory syndrome virus–host protein interactions. *Animals* 12, 1381. <https://doi.org/10.3390/ani12111381>
- Zhang, J., Zheng, Y., Xia, X.-Q., Chen, Q., Bade, S.A., Yoon, K.-J., Harmon, K.M., Gauger, P.C., Main, R.G., Li, G., 2017. High-throughput whole genome sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from cell culture materials and clinical specimens using next-generation sequencing technology. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 29, 41–50. <https://doi.org/10.1177/1040638716673404>
- Zhang, W., Chen, K., Guo, Y., Chen, Y., Liu, X., 2019. Involvement of PRRSV NSP3 and NSP5 in the autophagy process. *Virol. J.* 16, 13. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1116-x>
- Zhang, X., Dong, W., Wang, X., Zhu, Z., He, S., Zhang, H., Chen, Y., Liu, X., Guo, C., 2022. Exostosin glycosyltransferase 1 reduces porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection through proteasomal degradation of nsp3 and nsp5. *J. Biol. Chem.* 298, 101548. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101548>
- Zhang, Z., Qu, X., Zhang, H., Tang, X., Bian, T., Sun, Y., Zhou, M., Ren, F., Wu, P., 2020. Evolutionary and recombination analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome isolates in China. *Virus Genes* 56, 354–360. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01751-7>
- Zhao, J., Zhang, R., Zhu, L., Deng, H., Li, F., Xu, L., Huan, J., Sun, X., Xu, Z., 2021. Establishment of a peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies against PRRSV M protein. *BMC Vet. Res.* 17, 355. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03060-z>
- Zhao, K., Li, L.-W., Jiang, Y.-F., Gao, F., Zhang, Y.-J., Zhao, W.-Y., Li, G.-X., Yu, L.-X., Zhou, Y.-J., Tong, G.-Z., 2019. Nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antagonizes the antiviral activity of TRIM25 by interfering with TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination. *Vet. Microbiol.* 233, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.003>
- Zhao, P., Ma, C.T., Dong, X., Cui, Z.Z., 2012. Evolution of quasispecies diversity for porcine reproductive and respiratory syndrome virus under antibody selective pressure. *Sci. China Life Sci.* 55, 788–792. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4364-1>
- Zhou, L., Zhang, J., Zeng, J., Yin, S., Li, Y., Zheng, L., Guo, X., Ge, X., Yang, H., 2009. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence. *J. Virol.* 83, 5156–5167. <https://doi.org/10.1128/JVI.02678-08>
- Zhou, Y., Li, Y., Tao, R., Li, J., Fang, L., Xiao, S., 2023. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp5 induces incomplete autophagy by impairing the interaction of STX17 and SNAP29. *Microbiol. Spectr.* 11, e0438622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04386-22>
- Zimmerman, J.J., Yoon, K.-J., Wills, R.W., Swenson, S.L., 1997. General overview of PRRSV: A perspective from the United States. *Vet. Microbiol.* 55, 187–196. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01330-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01330-2)

XIII Közlemények listája

13.1 A doktori kutatás eredményeiből született, lektorált, impakt faktoralal bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Jakab, S., Marton, S., Szabó, I., Kecskeméti, S., Bálint, Á., Bányai, K.: **Kezdeti tapasztalatok az amplikon-mélyszekvenálás PRRS-mentesítési programba történő integrálásával kapcsolatban.** Magyar Állatorvosok Lapja. 144. 115–128. 2022. SJR: Q4, IF: 0,2

Jakab, S., Kaszab, E., Marton, S., Bányai, K., Bálint, Á., Nemes, I., Szabó, I.: **Genetic diversity of imported PRRSV-2 strains, 2005–2020, Hungary.** Front. Vet. Sci. 9. 1581. 2022. doi:10.3389/fvets.2022.986850. SJR: Q1, IF: 3,2

Jakab, S., Bányai, K., Bali, K., Nemes, I., Bálint, Á., Szabó, I.: **Transmission dynamics of imported vaccine-origin PRRSV-2 within and between commercial swine Integrations in Hungary.** Animals. 13 (19). 3080. 2023. doi:10.3390/ani13193080. SJR: Q1, IF: 3

Jakab, S., Bali, K., Freytag, C., Pataki, A., Fehér, E., Halas, M., Jerzsele, Á., Szabó, I., Szarka, K., Bálint, Á., Bányai, K.: **Deep sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF7: A promising tool for diagnostics and epidemiologic surveillance.** Animals. 13(20). 3223. 2023. doi:10.3390/ani13203223. SJR: Q1, IF: 3

Jakab, S., Bálint, Á., Cseri, K., Bali, K., Kaszab, E., Domán, M., Halas, M., Szarka, K., Bányai, K.: **Genome stability assessment of PRRS vaccine strain with new ARTIC-style sequencing protocol.** Front. Vet. Sci. 10. 1327725. 2024. doi:10.3389/fvets.2023.1327725. SJR: Q1, IF: 3,2

Bálint, Á., Jakab, S., Kaszab, E., Marton, S., Bányai, K., Kecskeméti, S., Szabó, I.: **Spatiotemporal distribution of PRRSV-1 clades in Hungary with a focus on the era of disease eradication.** Animals. 14(1). 175. 2024. doi:10.3390/ani14010175. SJR: Q1, IF: 3

13.2 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

Homonnay, Z., Jakab, S., Bali, K., Kaszab, E., Mató, T., Kiss, I., Palya, V., Bányai, K.: **Genome sequencing of a novel variant of fowl adenovirus B reveals mosaicism in the pattern of homologous recombination events.** Arch. Virol. 166(5). 1477–1480. 2021. doi:10.1007/s00705-021-04972-9. SJR: Q2, IF: 2,686

Fehér, E., Jakab, S., Bali, K., Kaszab, E., Nagy, B., Ihász, K., Bálint, Á., Palya, V., Bányai, K.: **Genomic epidemiology and evolution of duck hepatitis A virus.** Viruses. 13(8). 1592. 2021. doi:10.3390/v13081592. SJR: Q1, IF: 5,818

Fehér, E., Bali, K., Kaszab, E., Ihász, K., Jakab, S., Nagy, B., Ursu, K., Farkas, S.L., Bányai, K.: **A novel gyrovirus in a common pheasant (*Phasianus colchicus*) with poult enteritis and mortality syndrome.** Arch. Virol. 167(5). 1349–1353. 2022. doi:10.1007/s00705-022-05417-7. SJR: Q2, IF: 2,7

Fornyos, K., Búza, L., Makkai, I., Polyák, F., Pogácsás, I., Savoia, L., Szegedi, L., Bálint, Á., Jakab, S., Bányai, K., Szabó, I.: **Sampling strategies in PRRS elimination in Hungary: An observational study involving four farrow-to-finish swine herds.** Vet. Sci. 10. 546. 2023. doi:10.3390/vetsci10090546.

SJR: Q1, IF: 2,4

Jakab, S., Bali, K., Homonnay, Z., Kaszab, E., Ihász, K., Fehér, E., Mató, T., Kiss, I., Palya, V., Bányai, K.: **Genomic epidemiology and evolution of fowl adenovirus 1.** Animals. 13(18). 2819. 2023. doi:10.3390/ani13182819.

SJR: Q1, IF: 3

13.3 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó könyvfejezet

Vlasova, A.N., Deol, P., Sircar, S., Ghosh, S., Jakab, S., Bányai, K., Dhama, K., Amimo, J.O., Saif, L.J., Malik, Y.S.: **Animal Rotaviruses.** In: Malik, Y.S., Singh, R.K., Dhama, K. (eds). Springer, Singapore, 163–202. 2020. doi:10.1007/978-981-15-2651-0_8.

13.4 Konferencia közlemények

Jakab, S., Bálint, Á., Szabó, I., Bányai, K.: **Current situation of the eradication program of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Hungary: The molecular epidemiological perspective.** 10th Jubilee Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, 12-13th of November 2021, Book of Abstracts.

Jakab, S., Bálint, Á., Bányai, K.: **PRRSV törzsek kimutatása és jellemzése NGS-alapú amplikon szekvenálással.** Akadémia Beszámoló, Budapest, 2023. január 30-31.

XIV Mellékletek

1. melléklet: A Porcilis- és Unistrain-vakcinatörzsek és azok leszármazottjaira specifikus multiplex PCR-rendszerben használt primerek tulajdonságai.

	Szekvencia (5'–3')	Pool	Primerek tapadási helye *		Relatív mennyiségük a különböző poolozási stratégiákban		
					v1	v2	v3
1_F	ATGATGTGTAGGGTATTCCCCCTAC	1	1	25	1	3	1,5
1_R	ACTTGGAGTTCACGAAGGTGTC	1	562	583	1	3	1,5
2_F	GCAATCACAACCTCCTCCAACG	2	490	511	1	1	1
2_R	CACGTCGGGGTTYTGACAA	2	1015	1034	1	1	1
3_F	TCTGYCCATTTGAGGAGGCTCA	1	739	760	1	3	3
3_R	AGGCGAACRAATCCTGGGGT	1	1278	1297	1	3	3
4_F	CTGTCTTGCCCCRGCTTGGATC	2	1227	1250	1	1	1
4_R	CTCACCTCTACCTCCARTGAAC	2	1710	1732	1	1	1
5_F	CTTGYTCAGGCGATYCAATGTC	1	1617	1638	1	3	1,5
5_R	AARCACYCGTCCAGRGACACA	1	2147	2167	1	3	1,5
6_F	ARAAATGCGGTGCCACGGAA	2	2020	2039	1	1	1
6_R	GTGTTTGCTCTCTACAAGGGT	2	2562	2583	1	1	1
7_F	CTCRGACYCCATGAAAGRAAAC	1	2477	2498	1	3	3
7_R	GCCTCGGTCAATTAAGGCTTG	1	3030	3050	1	3	3
8_F	ATGCTCCRGTTGGTTGAYGCC	2	2923	2942	1	3	3
8_R	TCACTCGACTARGAARATCCGG	2	3462	3483	1	3	3
9_F	TGAAGCAACTGGTGGCRCAG	1	3316	3335	1	1,5	1,5
9_R	AAAGTTGGCGCTGCTCAAGAG	1	3868	3888	1	1,5	1,5
10_F	GTTCTTGGATGGCTTTTGCTGT	2	3766	3787	1	1,5	1,5
10_R	CATTTGAYRGCCTGACTGGGAT	2	4324	4345	1	1,5	1,5
11_F	ATCAACCRACCAAAAAGCCCAT	1	4240	4261	1	1	1
11_R	GACACACAAAGTCGAGAGGAGC	1	4771	4792	1	1	1
12_F	TCAAGTGTGTGGCCGAGGAA	2	4691	4710	1	1	1
12_R	CAGTTAARGCAGCTCTCCGGAC	2	5232	5253	1	1	1
13_F	GACATCCACCAGTACACCTCTG	1	5154	5175	1	1	1
13_R	AGTTTGTGTTGAACCGGTGTGGA	1	5692	5713	1	1	1
14_F	GGAAGGGTTCGCCTTCTGTTTT	2	5612	5633	1	1	1
14_R	TGCGTAGAACGCCAGAGAAAGC	2	6143	6164	1	1	1
15_F	TCTTTGTGCTTGCATGGGCC	1	6061	6080	1	3	1,5
15_R	GCATACGCTGCYTCAATGTACTION	1	6582	6604	1	3	1,5
16_F	GTTGTCACAGGCTGACCTTGAT	2	6494	6515	1	1	1
16_R	ATCCGTGTAAGGTTGTCACCG	2	7040	7061	1	1	1
17_F	GAGAGGATGAAGAAACAYTGTGT	1	6957	6979	1	5	3

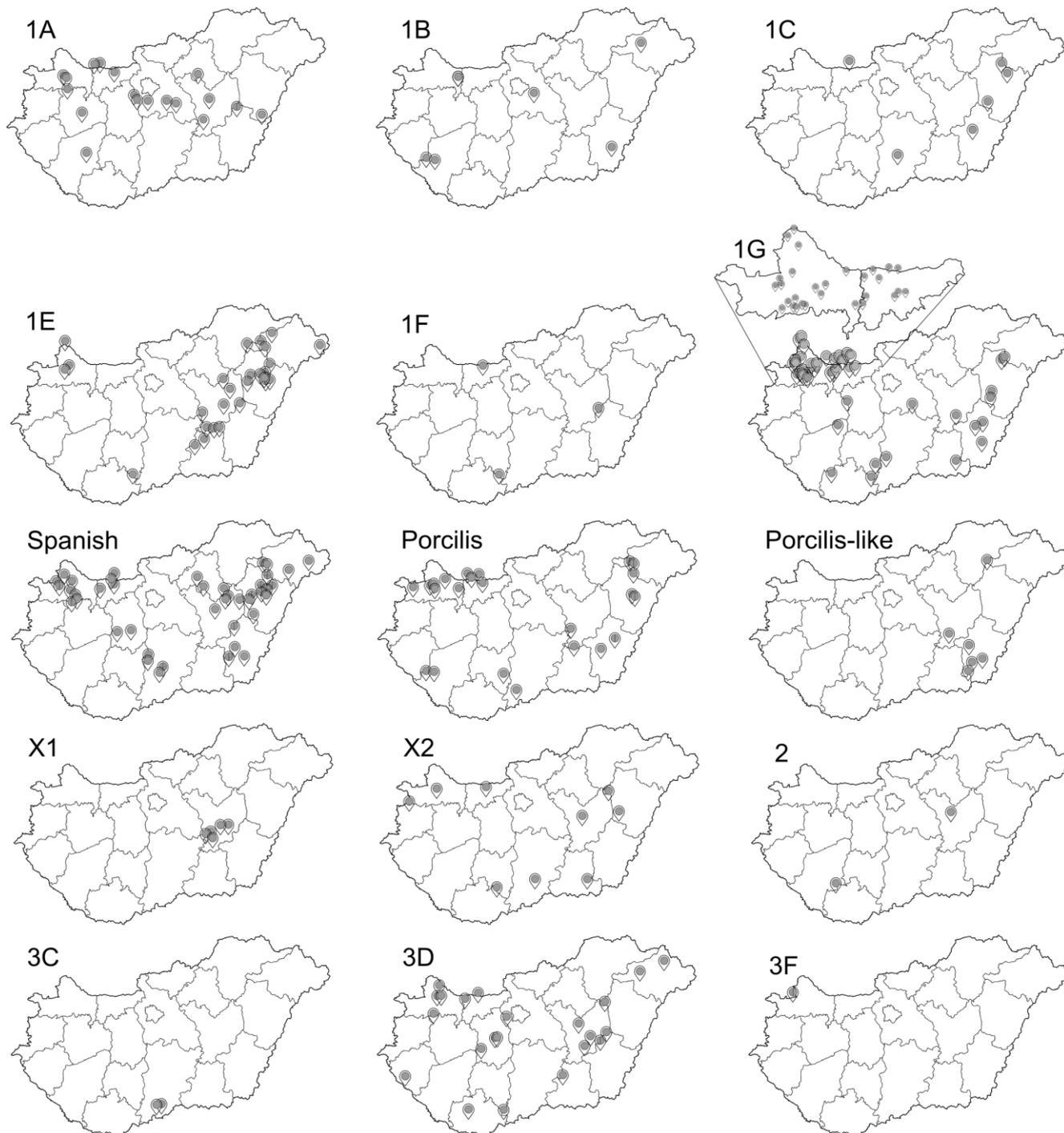
17_R	CTCRGAAGTGACTTTTAGGTCTAAAG	1	7512	7537	1	5	3
18_F	GGCGGCYTRGTTGTGACTGAAA	2	7442	7463	1	5	3
18_R	ATTTACCATCAGACACDGGGGC	2	7967	7988	1	5	3
19_F	TRCCTTACAAAACCTCAAGACA	1	7899	7922	1	1	1
19_R	ACTGAGCGCCGATCTGTGAGC	1	8453	8473	1	1	1
20_F	GTCAAGGAGAATTGGCAAACYGT	2	8348	8370	1	1	1,5
20_R	ACYAACATAGGCTGAATTTCAAGGA	2	8892	8916	1	1	1,5
21_F	ACTGGTAATYTATGCCCAGCAC	1	8794	8815	1	1,5	1,5
21_R	TGGCGGAAYTTYTTCCCTTCAT	1	9324	9345	1	1,5	1,5
22_F	AGGACCTCATCTGYGGTATTGC	2	9222	9243	1	1	1
22_R	CTACTATGAACTTGCTGAGTAGYA	2	9750	9773	1	1	1
23_F	ATGGAGACTACCARGTGGTGC	1	9678	9698	1	5	3
23_R	ACAGGYCGGGTGGTAAAAAC	1	10241	10260	1	5	3
24_F	ACTATTTACAGATTTGGCYCYAACA	2	10151	10175	1	1	1
24_R	TRTCYGGGGAAAAGTAAAACCC	2	10694	10715	1	1	1
25_F	ACCCRAGGTGCAAGTCTCTCTT	1	10608	10629	1	1	1
25_R	AGAGTGCACACGGCTTTAGC	1	11171	11190	1	1	1
26_F	GGGGTGTCAACATYACATCAA	2	11080	11102	1	1	1
26_R	CAGTGTAGTCCTTGCCGTCATT	2	11624	11645	1	1	1
27_F	CGCAGTGAAGATTTGGGGTT	1	11535	11556	1	1	1
27_R	GGARACTCGCATGTGCCAAA	1	12079	12098	1	1	1
28_F	ACTATCGAAGGTCCTATGAARGCTT	2	11995	12019	1	1	1
28_R	TGATGGTYAGCTCGAATGATGT	2	12530	12551	1	1	1
29_F	TGTGGCTTCATCTGTTACCTTGT	1	12440	12462	1	1	1,5
29_R	CGAACGCCTCAGAAACCATGA	1	12989	13009	1	1	1,5
30_F	AATAGACGGGGCAATTGGTTC	2	12916	12937	1	1	1
30_R	CAATGGTTGTAGCCCACCTCAT	2	13444	13465	1	1	1
31_F	CCAACATACCCAGCAGCATCAT	1	13374	13395	1	1	1
31_R	TGAAGTTGGTAAACCGGGTACG	1	13911	13932	1	1	1
32_F	CTTTCGCAGCGYTCGTATGTT	2	13846	13866	1	1	1
32_R	GGCAACACAATCTGCATCTGGA	2	14372	14393	1	1	1
33_F	CACCAACCGTGTGCGAYTTAC	1	14284	14304	1	1	1
33_R	CGTCTGGATCGATTGCAAGCAG	1	14822	14843	1	1	1
34_F	TCTAGTACCAGGACTTCGGAGC	2	14521	14542	1	1	1
34_R	TTAATTTGCGTCACATGGTTCTGC	2	15076	15100	1	1	1

* Porcilis PRRS referencia vakcinatörzshöz (KF991509) viszonyítva

2. melléklet: Az Illumina-kompatibilis kétlépes PCR-alapú könyvtárkészítési módszer második PCR körében alkalmazott összes vonalkódoló primer szekvenciája (indexek: Nextera XT Index Kit v2 Set C). A primerek felépítése a következő: P5 és P7 adapterek, i5 és i7 vonalkódok (vagy más néven index), Rd1 SP és Rd2 SP egy része. A vonalkódok szekvenciája félkövérrel és aláhúzott betűkkel vannak kiemelve.

index neve	index típusa	Szekvencia (5'–3')
S513	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>TCGACTAG</u> TCGTCGGCAGCGTC
S515	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>TTCTAGCT</u> TCGTCGGCAGCGTC
S516	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>CCTAGAGT</u> TCGTCGGCAGCGTC
S517	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>GCGTAAGA</u> TCGTCGGCAGCGTC
S518	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>CTATTAAG</u> TCGTCGGCAGCGTC
S520	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>AAGGCTAT</u> TCGTCGGCAGCGTC
S521	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>GAGCCTTA</u> TCGTCGGCAGCGTC
S522	i5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC <u>TTATGCGA</u> TCGTCGGCAGCGTC
N701	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TCGCCTTA</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N702	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CTAGTACG</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N703	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TTCTGCCT</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N704	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GCTCAGGA</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N705	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>AGGAGTCC</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N706	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CATGCCTA</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N707	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GTAGAGAG</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N710	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CAGCCTCG</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N711	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TGCCTCTT</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N712	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TCCTCTAC</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N714	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TCATGAGC</u> GTCTCGTGGGCTCGG
N715	i7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CCTGAGAT</u> GTCTCGTGGGCTCGG

3. melléklet: A hazánkban fellelt PRRSV-1-kládokhoz tartozó index szekvenciák térbeli eloszlása



4. melléklet: A magyarországi PRRSV-1-törzsek GP5 génjében a FEL, SLAC és FUBAR algoritmusokkal megállapított szignifikáns pozitív szelekció alatt álló egyedi as pozíciók.

As pozíció	FEL p-érték	SLAC p-érték	FUBAR Prob [$\alpha < \beta$]
2	0,0000	0,000223	1
4	0,0000	0,000434	1
5	0,0111	0,019688	0,99
7	0,0000	3,90E-09	1
8	0,0000	3,08E-05	0,999
10	0,0006	0,012892	0,999
11	0,0011	0,001585	0,998
12	0,0949	0,0841	0,946
14	0,0238	0,011767	0,984
20	0,0000	0,000105	1
22	0,0051	0,000411	0,977
25	0,0475	0,028349	0,968
31	0,0006	0,012312	0,999
32	0,0017	0,005138	0,998
34	0,0150	0,039443	0,991
35	0,0060	0,007157	0,997
36	0,0000	5,01E-05	1
37	0,0384	0,059223	0,975
38	0,0358	0,059114	0,977
41	0,0313	0,0413	0,982
42	0,0316	0,090696	0,96
56	0,0000	9,46E-08	1
60	0,0280	0,006959	0,979
106	0,0834	0,016059	0,998
201	0,0040	0,011561	0,996

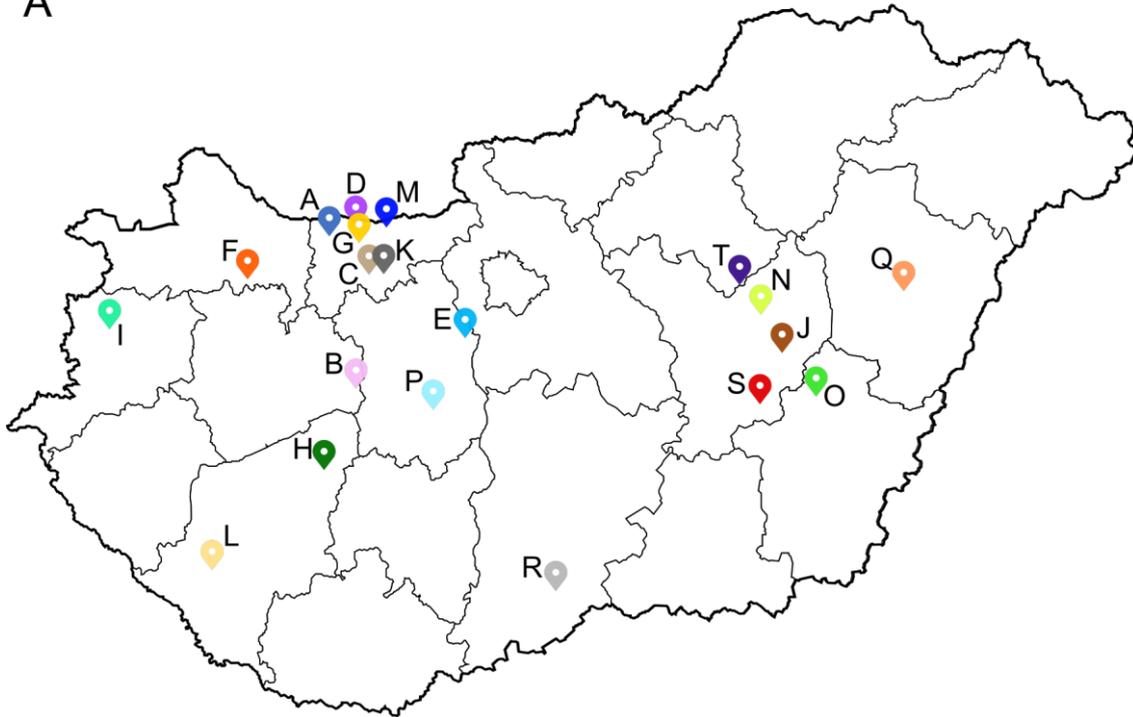
5. melléklet: A Magyarországon előforduló PRRSV-2-fertőzésekkel kapcsolatos epidemiológiai és klinikai adatok a 2005–2020-as időszakból.

Sertéstelep azonosító	Sertéstelep típusa	Minta azonosítók	Év (leszármazási vonal)	Klinikai tünetek			Mortalitás	PRRSV-2-pozitív sertések származási helye (és éve)
				Súlyosság	Légzőszervi	Szaporodási		
A	nagylétszámú tenyésztelep, fialástól-vágásig	HU12 7703_NEBIH_2013_HU	2005 (L1) 2013 (L1)	enyhe enyhe- közepes	+	-	3% előhízaláskor	import sertés Szlovákiából (2005, 2013)
B	nagylétszámú hízótelep	HU21 PRRSV-2_Hungary_102_2012	2006 (L1) 2012 (L1)	enyhe	+	nem releváns	13% hízlaláskor	keringés a magyar állományok között
C	nagylétszámú hízótelep	4020_NEBIH_2013_HU	2013 (L1)	enyhe	+	nem releváns	8% hízlaláskor	keringés a magyar állományok között
D	nagylétszámú tenyésztelep, fialástól-előnevelésig	19678_NEBIH_2010_HU 28663_NEBIH_2011_HU 27125_NEBIH_2011_HU	2010 (L1) 2011 (L5)	enyhe -	+	-	2% előhízaláskor	import sertés Szlovákiából (2011)
E	nagylétszámú hízótelep	273_NEBIH_2009_HU	2009 (L5)	enyhe	+	nem releváns	10% hízlaláskor	nincs adat
F	nagylétszámú tenyésztelep, fialástól-vágásig	23090_NEBIH_2010_HU	2010 (L5)	enyhe	+	-	10% fialástól vágásig	keringés a magyar állományok között
G	nagylétszámú hízótelep	32708_NEBIH_2011_HU	2011 (L5)	-	+	12,7 választott malac/fialás	3,5% előhízaláskor	import sertés Szlovákiából (2011)
H	nagylétszámú hízótelep	50708_NEBIH_2014_HU	2014 (L5)	-	+	nem releváns	6% hízlaláskor	import sertés Szlovákiából (2014)
I	tenyésztelep	11033_NEBIH_2015_HU	2015 (L5)	halva született malacok	csak PRRSV-fertőzés	elpusztult újszülött malacok aránya 90% normál fialási időben	nem látható	keringés a magyar állományok között
J	nagylétszámú hízótelep	6576_NEBIH_2015_HU 42487_NEBIH_2016_HU 60499_56-60_NEBIH_2017_HU 35565_96-100_NEBIH_2017_HU 3158_11-15_NEBIH_2017_HU	2015 (L5) 2016 (L5) 2017 (L5)	enyhe enyhe enyhe	+	nem releváns	kétszeres halálozási arány: 30-ról 75-re/hónap	import sertés Csehországból (2015), keringés a magyar állományok között (2016, 2017)
K	nagylétszámú hízótelep	59074_NEBIH_2015_HU	2015 (L5)	-	+	nem releváns	5% hízlaláskor	import sertés Dániából (2015)

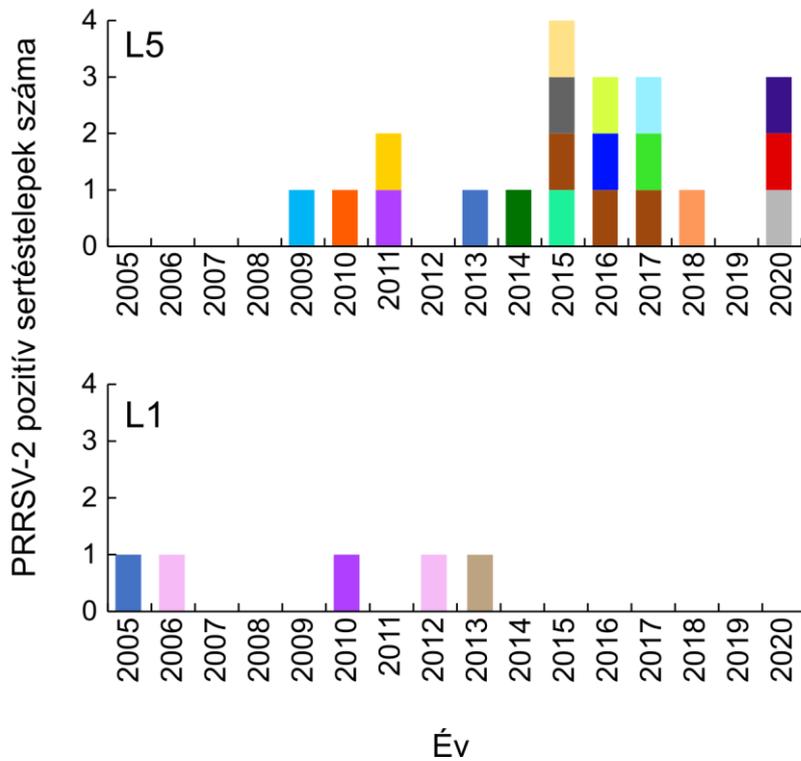
L	nagylétszámú tenyésztelep	61748_NEBIH_2015_HU	2015 (L5)	-	+	11 választott malac/fialás, fialási ráta: 84,8%	11,2% laktációkor, 2,1% előhízaláskor, 2% hízlaláskor	import sertés Belgiumból (2015)
M	nagylétszámú hízótelep	8727_NEBIH_2016_HU	2016 (L5)	-	+	nem releváns	6,5% hízaláskor	import sertés Szlovákiából (2016)
N	nagylétszámú hízótelep	25004_NEBIH_2016_HU	2016 (L5)	elhullás	+	nem releváns	kétszeres halálozási arány	import sertés Csehországból (2016)
O	nagylétszámú tenyésztelep	23920_28_NEBIH_2017_HU	2017 (L5)	-	+	-	halálozási arány a választott malacok között szignifikánsan megnövekedett	keringés a magyar állományok között
P	hízótelep	32607_NEBIH_2017_HU	2017 (L5)	-	+	nem releváns	5,5% hízaláskor	import sertés Dániából (2017)
Q	nagylétszámú hízótelep	55352_NEBIH_2018_HU 55352_5_NEBIH_2018_HU 55352_10_NEBIH_2018_HU 55352_15_NEBIH_2018_HU 55352_20_NEBIH_2018_HU 55352_16-20_NEBIH_2018_HU	2018 (L5)	-	csak PRRSV fertőzés	nem releváns	nem látható	import sertés Dániából (2018)
R	nagylétszámú tenyésztelep	64196_2_NEBIH_2020_HU	2020 (L5)	-	+	fialási ráta: 89%, vemhesülési ráta: 91%	13,8 élve született malac/fialás	keringés a magyar állományok között
S	hízótelep	47206_125_NEBIH_2020_HU 47206_150_NEBIH_2020_HU 46978_4_NEBIH_2020_HU 46978_1_NEBIH_2020_HU 46978_11_NEBIH_2020_HU 40533_NEBIH_2020_HU 32023_6-10_NEBIH_2020_HU 107f_NEBIH_2020_HU 122f_NEBIH_2020_HU 156f_NEBIH_2020_HU	2020 (L5)	halva született malacok	csak PRRSV- fertőzés	élve született malac/fialás: 14,3-ról 12,5- ra csökkent	halálozási arány előneveléskor megnövekedett 21-ről 30 malacra/hónap	import ejakulátum Írországból (2020)
T	hízótelep	56612_81-85_NEBIH_2020_HU 56612_40-44_NEBIH_2020_HU 56612_45-49_NEBIH_2020_HU	2020 (L5)	-	csak PRRSV- fertőzés	nem releváns	5/4000 elpusztult malac	import sertés Németországból (2020)

6. melléklet: PRRSV-2-törzsekkel fertőződött magyarországi sertésfarmok tér- (A) és időbeli (B) eloszlása. A sertésfarmok eltérő színű szimbólumokkal és betűvel (A–T) vannak jelölve. Az A ábrán a különböző sertésfarmok színekódja megegyezik a B ábrán látható színekódokkal.

A



B

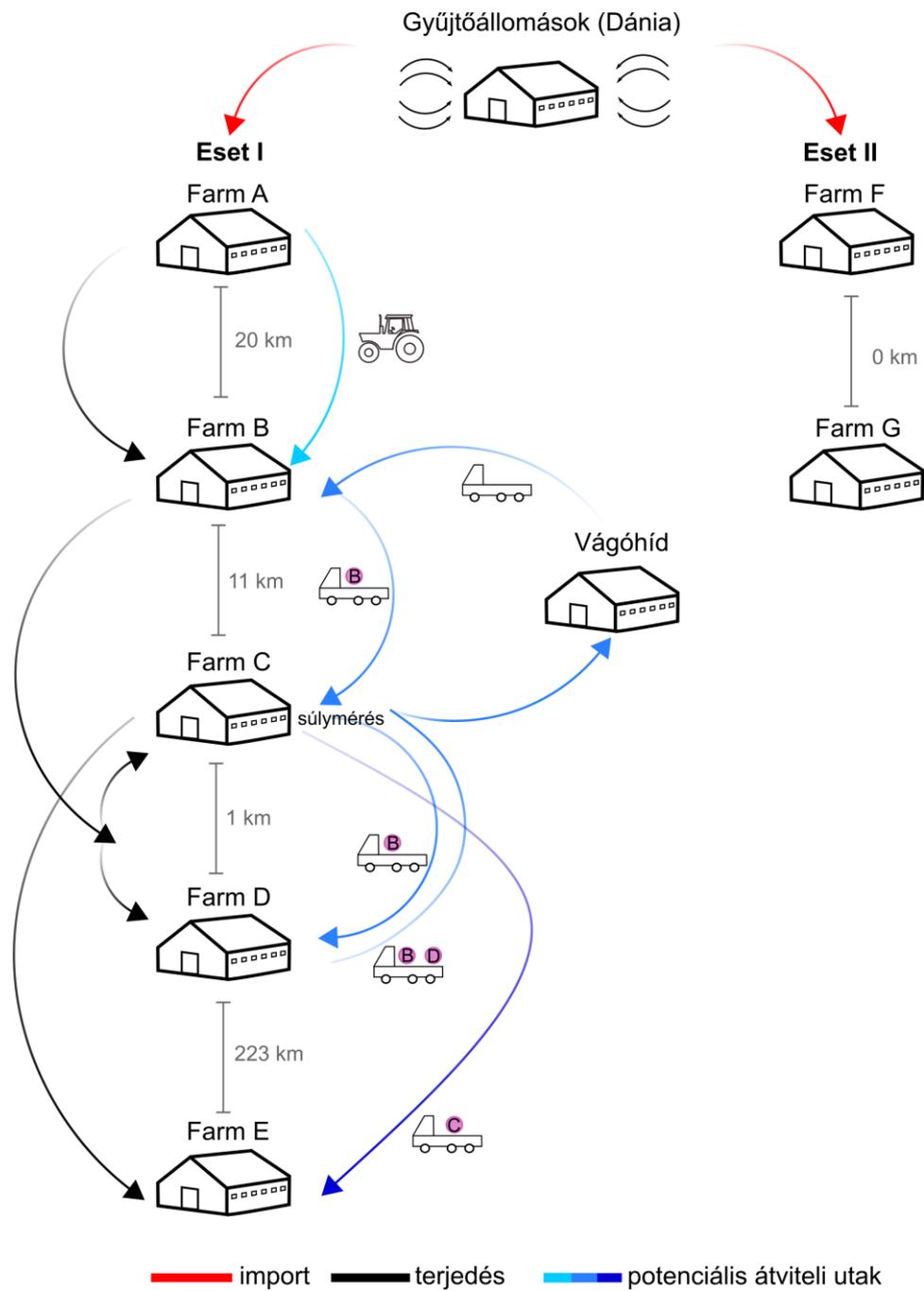


7. melléklet: Az Ingelvac PRRS MLV (PRRSV-2) 2020–2021-es magyarországi járványkitörésekben érintett sertéstelepek adatai.

Sertéstelepek azonosítója	Minta azonosító	Minta típusa	Sertéstelepek mérete és típusa	Sertések származási helye	Egyéb információ
Farm A	-*		4000 férőhelyes nagylétszámú hízlalda, folyamatos feltöltésű	Hízóalapanyag Dániából származik	
Farm B	64196	savó	600 férőhelyes nagylétszámú hízótelep, fialástól-vágásig		Ugyanabban a vármegyében található
Farm C	18601 19001	koca – orrtampon malac – savó	1820 férőhelyes nagylétszámú tenyésztelep, részben fialástól-vágásig	Az előnevelt hízók egy részét másik telepre vagy más integrátorokhoz szállítják	
Farm D	19702	savó	2700 férőhelyes nagylétszámú hízótelep, folyamatos feltöltésű	Hízóalapanyag Farm C-ről származik	
Farm E	19601	savó	9000 férőhelyes nagylétszámú hízótelep, folyamatos feltöltésű	Hízóalapanyag Farm C-ről származik	-
Farm F	27392	savó	2000 férőhelyes nagylétszámú hízótelep, folyamatos feltöltésű	Hízóalapanyag Dániából származik	-
Farm G	-*		2600 férőhelyes nagylétszámú hízótelep, folyamatos feltöltésű	Hízóalapanyag Dániából származik	-

* ORF2-7 régió felszaporítása nem sikerült

8. melléklet: A 2020–2021-ben zajló járványokban résztvevő PRRSV-2 Ingelvac MLV-vakcinatörzs lehetséges fertőzési útjainak sematikus ábrázolása. A nyilak az átviteli utakat, illetve az állat mozgásokat jelölik.

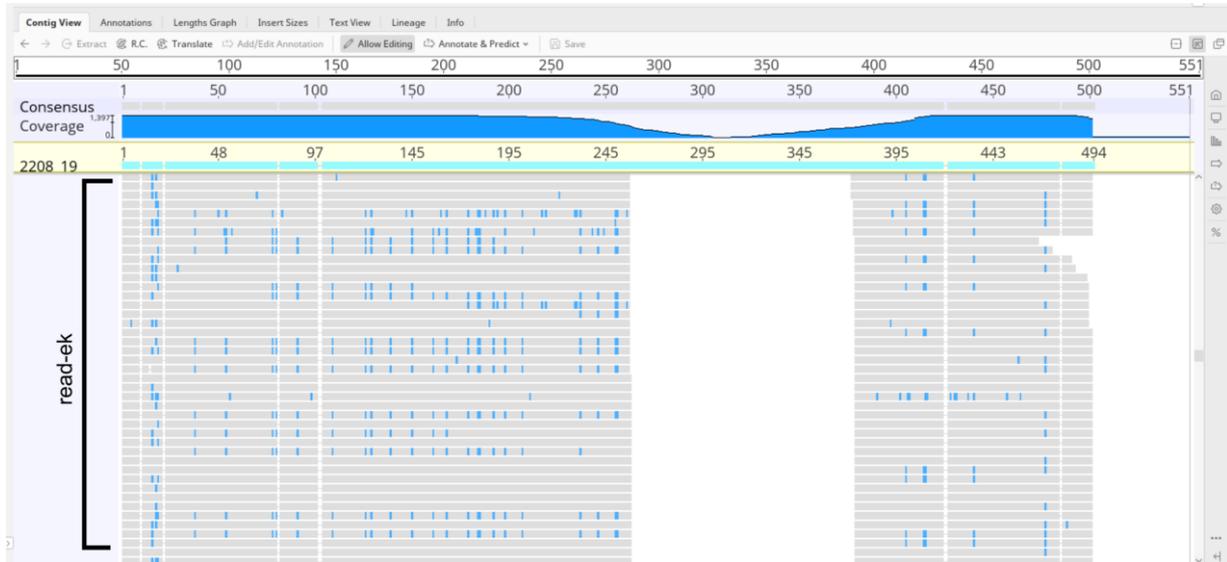


9. melléklet: A spike-in mintákkal végzett ORF7 mélyszekvenálás adatai.

	Átlagos Ct-érték	Össz read-szám	Leválogatott read-szám*	Illesztett readek aránya (%)	Átlagos szekvenálási mélység
Lelystad					
10 ⁰ /A	13,2	70158	8918	87,3	1715,1
10 ⁰ /B		46976	21778	72,1	3746,4
10 ⁻¹ /A	18,5	10770	4472	94,3	1705,4
10 ⁻¹ /B		18856	6264	72,6	1224,3
10 ⁻² /A	21,8	33460	8236	93,1	3650,6
10 ⁻² /B		15956	7316	91,6	3253,7
10 ⁻³ /A	25,6	675710	17188	18,2	1089,8
10 ⁻³ /B		39300	8362	88,4	2991,9
10 ⁻⁴ /A	29,7	154990	9926	71,9	2683,6
10 ⁻⁴ /B		149126	13556	75,1	4020,5
10 ⁻⁵ /A	34,7	178724	5998	53,4	994,6
10 ⁻⁵ /B		588092	35834	23,7	2331,7
10 ⁻⁶ /A	-	-	-	-	-
10 ⁻⁶ /B		-	-	-	-
VR2332					
10 ⁰ /A	12,7	17138	9448	77,6	1422
10 ⁰ /B		10648	5106	56,7	573,5
10 ⁻¹ /A	16,6	6462	2634	91,7	779,1
10 ⁻¹ /B		16346	3848	92,5	718
10 ⁻² /A	20,0	8702	3426	91,1	1059,9
10 ⁻² /B		14382	372	55,6	91,6
10 ⁻³ /A	23,3	37356	4534	84,6	1650,2
10 ⁻³ /B		13136	322	57,1	83,7
10 ⁻⁴ /A	26,4	88282	9838	52,0	2045,4
10 ⁻⁴ /B		17412	320	37,5	48,5
10 ⁻⁵ /A	32,3	224660	13202	19,2	915,3
10 ⁻⁵ /B		28038	996	51,0	242,3
10 ⁻⁶ /A	34,4	-	-	-	-
10 ⁻⁶ /B		41594	1426	34,9	234,5

* read hossz: >75 bp, minőségi szűrés: Q10

10. melléklet: A 2208_19-es minta ORF7 amplikon-mélyszekvenálásából származó readek referenciához történő illesztésének (contig fájl) képe a Geneious Prime szoftverben. Az összeállított konszenzus szekvenciától nagyon eltérő nukleotid mintázatú readek (kék színnel) egy másik szekvenciavariáns jelenlétét mutatják.



XV Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy megtisztelt bizalmával és lehetőséget biztosított doktori munkám végzéséhez, valamint, hogy tanácsainak, meglátásainak segítségével az önálló munkavégzés készségét elsajátíthattam. Köszönöm társtémavezetőmnek, Dr. Bálint Ádámnak a rendelkezésünkre bocsátott savómintákat és szekvenciaadatokat, a publikációk és a dolgozat lektorálását. Külön köszönet illeti Dr. Szabó Istvánt, aki szakmai tapasztalatával nagyban hozzájárult a publikációk, illetve a dolgozat megírásához.

Köszönettel tartozom a NÉBIH ÁDI és a Prophyll Kft. munkatársainak, külön kiemelve Dr. Halas Mátét, a rendelkezésünkre bocsátott mintákért és adatokért. Köszönöm, Dr. Bali Krisztinának és Dr. Marton Szilviának, valamint Dr. Szarka Krisztinának és Dr. Freytag Csongornak a hagyományos könyvtárkészítési és az újgenerációs szekvenálási folyamatokban nyújtott segítségüket.

Hálásan köszönöm volt harcedzett kollégáimnak, Eninek, Esztinek, Katának, Krisztinek, Mariannak és Reninek, hogy felkaroltak, hogy tartották bennem a lelket, hogy mindenben számíthattam és még mindig számíthatok rájuk, legyen az szakmai, vagy magánéleti probléma. Cserébe, remélem, hogy ez az összetartó csapat megfogadja a „chill tanfolyamom” tanításait. Külön köszönöm, Mariannak és Reninek, hogy elvállalták a dolgozat alapos átolvasását.

Köszönöm a családomnak, hogy támogattak és minden panaszomat meghallgatták, hogy igyekeztek nyugodt háttérrel biztosítani a számomra. Köszönöm vőlegényemnek, Gábornak, hogy mindig mellettem állt, biztatott és teljes odaadással segített a disszertáció írásának időszakában. Köszönöm Vikinek és a „Tűzvarázslóknak”, hogy sommelier estjeinken eloszlatták összes kételyemet.

A PhD munka anyagi feltételeit a Dr. Bányai Krisztián által elnyert Lendület pályázat és a Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programja biztosította.