

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Vírusok okozta komplex oktanú
enterális megbetegedések sertésekben,
különös tekintettel a coronavírusokra**

PhD értekezés

dr. Valkó Anna

2019

Témavezetők:

Prof. Tuboly Tamás†
Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témavezető

dr. Cságola Attila
Ceva-Phylaxia Zrt.
témavezető

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

.....
dr. Valkó Anna

TARTALOMJEGYZÉK

ÁBRÁK JEGYZÉKE	5
TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	6
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. ÖSSZEFOGLALÁS.....	9
1. SUMMARY.....	10
2. BEVEZETÉS	11
2.1. A téma jelentősége.....	11
2.2. A kutatás célkitűzései	12
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
3.1. A sertések vírusok okozta enterális megbetegedése	13
3.2. Enteropatogén kórokozók	14
3.3. Immunszuppresszív vírusok.....	30
3.4. Enterális megbetegedéssel összefüggő egyéb vírusok	32
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	37
4.1. Mintagyűjtés	37
4.2. Molekuláris biológiai módszerek.....	40
4.3. Szerológiai módszerek.....	43
4.4. Vírusizolálás	44
4.5. Statisztikai elemzések	45
5. EREDMÉNYEK	46

5.1. Felmérő vizsgálat	46
5.2. TGEV szerológia	52
5.3. PEDV esetekhez kapcsolódó eredmények	55
6. MEGBESZÉLÉS	60
6.1. A sertés enterális megbetegedésével összefüggő vírusok prevalenciája.....	60
6.2. A TGEV szerológiai felmérése	63
6.3. PEDV esetek	64
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	69
8. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	70
9. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI	97
10. MELLÉKLETEK	99
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	114

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra: Súlyos hasmenés és kiszáradás jeleit mutató szopós malacok.....	13
2. ábra: Coronavírusok genomszerveződése.....	14
3. ábra: Coronavírusok elektronmikroszkópos felvétele.	15
4. ábra: Egészséges és kóros vékonybél szövettani képe.	17
5. ábra: TGEV és PRCV részleges genomjának az összehasonlítása.	17
6. ábra: Rotavírusok elektronmikroszkópos felvétele.	25
7. ábra: Rotavírus szerkezete.	26
8. ábra: Astrovírus kapszid modellje.	32
9. ábra: Kobuvírus genomelrendeződése és sematikus szerkezete.....	35
10. ábra: Bélsárminták származási helye.....	37
11. ábra: Szérumminták származási helye.....	38
12. ábra: PBoV3-4 kimutatására szolgáló PCR eredménye.	46
13. ábra: PAsTV kimutatására szolgáló PCR eredménye.	47
14. ábra: PEDV – FAM csatorna mérési eredménye.....	48
15. ábra: PDCoV – VIC/HEX csatorna mérési eredménye.....	48
16. ábra: Belső RNS kontroll – Cy5 csatorna mérési eredménye.....	49
17. ábra: TGEV – VIC/HEX csatorna mérési eredménye.....	49
18. ábra: A felmérő vizsgálat mintái telepi bontásban.	50
19. ábra: A felmérő vizsgálat mintái vírus és egészségügyi állapot szerint.....	51
20. ábra: A felmérő vizsgálat vírus- és mintaszám megoszlása korcsoport szerint.	51
21. ábra: TGEV szerológia eredményének térképes megjelenítése.....	53
22. ábra: Anti-TGEV pozitív szérumminták száma telepenként.....	53
23. ábra: A füzesabonyi sertéstelep szérummintáinak kvantitatív IFT eredménye.....	54
24. ábra: Detektált rekombináció a PEDV HUN/5031/2016 S génjében.....	57
25. ábra: 26 reprezentatív PEDV teljes genom felhasználásával készült filogenetikai fa.....	59

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat:	A felmérő vizsgálat mintái kor és egészségügyi állapot szerint.....	37
2. táblázat:	A felmérő vizsgálatához kiválasztott vírusok primerei.....	41
3. táblázat:	A felmérő vizsgálat során alkalmazott PCR reakcióelegyek	42
4. táblázat:	A felmérő vizsgálat során alkalmazott PCR kondíciói	42
5. táblázat:	A felmérő vizsgálat PCR-pozitív mintái.....	52
6. táblázat:	Füzesabonyból származó szérumminták megoszlása.....	54
7. táblázat:	A 2018-as PEDV esetekben érintett 'B' és 'C' farm vizsgálati eredményei	56

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Jelentés	
	Idegen nyelvű	Magyar
Acc. No.	GenBank accession number	génbanki azonosító szám
ÁDI	-	Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
APN	amino peptidase N	aminopeptidáz N
BSA	bovine serum albumin	szarvasmarha szérum albumin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Amerikai Járványügyi Központ
CPE	cyto pathogen effect	citopatogén hatás
Ct	threshold cycle	küszöb ciklus
CV	calici virus	calivírus
db	-	darab
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	szövettenyésztet tápfolyadék
DNS	-	de oxi-ribo nukleinsav
E	envelope	burok
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	-
FBS	foetal bovine serum	fötális szarvasmarha savó
FITC	fluorescein isothi ocyanate	fluoreszcein-izotiocianát
HBoV	human bocavirus	humán bocavírus
HE	hemagglutinin esterase	hemagglutinin-észteráz
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság
IFN	interferon	interferon
IFT	immunofluorescence test	immunfluoreszcencia teszt
IgG	immunoglobulin G	immunglobulin G
kb	kilo base	kilobázis
km	kilo meter	kilométer
L	leader (protein)	vezető (fehérje)
M	membrane	membrán
min	minute	perc
N	nucleo capsid	nukleokapszid
NÉBIH	-	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
NoV	norovirus	norovírus
NP, NS, NSP	non-structural protein	nem strukturális fehérje
nt	nucleotide	nukleotid
OIE	Office International des Epizooties	Állategészségügyi Világszervezet
ORF	open reading frame	nyitott olvasási keret
PAdV	porcine adenovirus	sertés adenovírus
PAstV	porcine astrovirus	sertés astrovírus
PBoV	porcine bocavirus	sertés bocavírus
PBS	phosphate buffered saline	foszfáttal pufferolt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció

PCV	p orcine c ircovirus	sertés circovírus
PCVAD	p orcine c ircovirus a ssociated d isease	sertés circovírushoz kapcsolódó betegség
PCVD	p orcine c ircovirus d isease	sertés circovírus betegség
PDCoV	p orcine d eltacoronavirus	sertés deltacoronavírus
PDNS	p orcine d ermatitis and n europathy syndrome	sertések bőrgyulladással és vesekárosodással járó tünetegyüttese
PEAV	p orcine e nteric a lphacoronavirus	sertés enterális alphacoronavírus
PEDV	p orcine e pidemic d iarrhea v irus	sertések járványos hasmenésének vírusa
PHEV	p orcine h emagglutinating e ncephalomyelitis v irus	malacok agy- és gerincvelő gyulladását okozó hemagglutináló vírus
PHIL	P ublic H ealth I mage L ibrary	-
PK	p orcine k idney	sertés vese
PKV	p orcine k obuvirus	sertés kobuvírus
PMWS	p ostweaning m ultisystemic w asting syndrome	választott malacok circovírus okozta sorvadása
PRCV	p orcine r espiratory c oronavirus	sertés légzőszervi coronavírusa
PRRSV	p orcine r eproductive and r espiratory syndrome v irus	sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómájának vírusa
PRV	p orcine r otavirus	sertés rotavírus
rcf	r elative c entrifugal f orce	relatív centrifugális erő
RdRp	R N A d e pendent R N A p olymerase	RNS dependens RNS polimeráz
RNS	-	ribonukleinsav
RT	r everse t ranscription	reverz transzkripció
RV	r otavirus	rotavírus
S	s pike	tüske
SADS-CoV	s wine a cute d iarrhea syndrome c oronavirus	sertés akut hasmenés szindróma coronavirus
SARS-CoV	s evere a cute r espiratory syndrome c oronavirus	humán súlyos akut légzőszervi szindróma coronavirus
SaV	s apovirus	sapovírus
sec	s econd	másodperc
SeCoV	s wine e nteral c oronavirus	sertés enterális coronavírusa
slga	s ecretory immunoglobulin A	szekretoros immunglobulin A
ST	s wine t estis	sertés here
TCID ₅₀	t issue c ulture i nfective d ose 50%	a szövettenyészetek 50%-át fertőző dózis
TGEV	t ransmissible g astroenteritis v irus	transzmisszibilis gastroenteritis vírus
TTSuV	T orque t eno s us v irus	Torque teno sertés vírus
TTV	T orque t eno v irus	Torque teno vírus
UBPV	U ngulate b ocaprovirus	patás állatok bocaprovírusa
USA	U nited S tates of A merica	Amerikai Egyesült Államok
VLP	v irus-like p articles	vírus-szerű részecskék
VP	v iral p rotein	vírusfehérje

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A sertések enterális megbetegedése világszerte az egyik leggyakoribb és nagy gazdasági veszteséggel járó bántalom, melynek a kialakításában az esetek túlnyomó többségében vírusok játszanak meghatározó szerepet. Számos vírust mutattak már ki hasmenéssel összefüggésben, amelyek összetett szerepét feltételezik a betegség kialakulásában.

Munkánk célja az volt, hogy felmérjük a bizonyított enteropatogén és a tisztázatlan szerepű, de hasmenéssel kapcsolatban leírt vírusok előfordulásának gyakoriságát Magyarországon. Napjaink egyik legfontosabb enteropatogén kórokozóra, a coronavírusrakra pedig kiemelt figyelmet kívántunk fordítani a vizsgált minták és az alkalmazott módszerek körének kiterjesztésével.

A felmérő vizsgálatra 2016 és 2018 között 17 sertéstelepről összesen 384 bélsármintát gyűjtöttünk össze, melyek öt különböző korcsoportba tartozó, hasmenéses vagy tünetmentes állatokból származtak. A mintákból a coronavírusrakat valós idejű PCR, az adeno-, astro-, boca-, calici-, kobu-, rota- és Torque teno vírusokat pedig hagyományos PCR segítségével mutattuk ki. A transzmisszibilis gastroenteritis vírus (TGEV) szerológiai felméréséhez 93 sertéstelep 908 szérummintáját, valamint 174 archív mintát választottuk ki. A felmérésen kívül négy, a sertések járványos hasmenésének vírusa (PEDV) okozta eset fordult elő, melyek kapcsán vírusizolálást és teljes genom szekvenálást is végeztünk.

A felmérő vizsgálat eredményeként a minták 51%-ában mutattunk ki legalább egy vizsgált vírust, melyek közül leggyakrabban a kobuvírusok fordultak elő, míg coronavírusrakat és rotavírus B-t nem találtunk. A 196 pozitív minta 64%-a származott hasmenéses állatokból és ugyanez az arány jellemezte az egyféle vírus okozta fertőzések előfordulását. A TGEV szerológiai vizsgálata 41 telep 140 szérummintájában mutatott ki a vírus ellen termelt ellenanyagokat és hasonló arányú pozitivitást találtunk az archív mintáknál is. A PEDV járványkitörések kapcsán két magyarországi vírust sikeresen izoláltunk és mindkettő teljes genomját meghatároztuk, melyek elemzése során rekombinációt fedeztünk fel bennük.

Felmérő vizsgálatunk során meghatároztuk a sertések hasmenésével kapcsolatos 15 víruscsoport prevalenciáját, melynek elemeztük korral és egészségügyi állapottal való összefüggését. A TGEV szerológiai vizsgálatának eredményeként talált alacsony szeropozitivitás felhívja a figyelmet a kórokozó újbóli felbukkanásának a lehetőségére. A rekombináns PEDV előfordulása pedig figyelmeztet a vírusok változékonyságára, mely új, akár magasabb patogenitású variánsok megjelenésével is járhat.

1. SUMMARY

Enteric diseases of swine induced by viruses in general are highly prevalent worldwide and have great economic importance in the industry. Several diarrhea-related viruses are known, and it is assumed that they have a complex role in the development of the disease.

The aim of our study was to determine the prevalence of diarrhea-associated viruses in Hungary, including enteropathogens known to cause diarrhea and other viruses, which have an unclarified association with the disease. At these times coronaviruses are among the most important enteropathogenic agents, therefore they were examined in a broader way with the extension of samples and methods.

Between 2016 and 2018 a total of 384 fecal samples were collected from 17 farms for the prevalence survey, originated from five different age groups of diarrheic and healthy animals. Coronaviruses were detected by real time PCR, while adeno-, astro-, boca-, calici-, kobu-, rota- and Torque teno viruses were detected with conventional PCR methods. A total of 908 serum samples from 93 farms were chosen for the serological survey of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) expanded by 174 archive samples. Apart from the survey, four cases of porcine epidemic diarrhea (PEDV) occurred. Virus strains were isolated from the outbreaks and their complete genome sequences were determined.

At least one virus was found in 51% of the samples in the prevalence survey. Kobuviruses were found most frequently, while coronaviruses and porcine rotavirus B were not detected. Out of 196 positive samples 64% were collected from diarrheic animals and the same proportion involved single infections. Antibodies produced against TGEV were detected in 140 serum samples of 41 farms in the serological survey of TGEV and similar proportion of positives were found in the archive samples. In PEDV outbreaks two strains were isolated successfully and full-length genome sequences were determined for both, which revealed recombination in them.

The prevalence of 15 virus groups and its connection with age and health status was determined in our survey. The low seropositivity in the country found in the serological survey for TGEV draws attention to the possible re-emergence of this pathogen. The appearance of recombinant PEDV draws attention to the genetic variability of viruses, which can lead to the emergence of new variants with even higher pathogenicity.

2. BEVEZETÉS

2.1. A téma jelentősége

A sertéshús és az abból készített termékek előállításának gazdaságosságát nagy mértékben befolyásolja, hogy a sertésenyésztés és -hízalás milyen költségekkel jár, melyek jelentős részét tehetik ki az állategészségügyi problémák miatti kiadások (Holtkamp *et al.*, 2007). A légzőszervi kórképek mellett a másik leggyakoribb, ezáltal jelentős veszteséget jelentő bántalom az enterális megbetegedés, mely hátterében jellemzően különböző vírusok együttes jelenléte mutatható ki (Katsuda *et al.*, 2006). Számos vírust hoztak már összefüggésbe emésztőszervi megbetegedésekkel, ezek egy része bizonyított kórtani szereppel bír, míg mások esetében továbbra is csak hipotézisekre támaszkodhatunk. Jelentőségüket jól szemlélteti, hogy a sertés, hasmenés és vírus kulcsszavak angol megfelelőjének együttes alkalmazásával több ezer publikáció érhető el az ezek keresésére szolgáló webes felületeken. Tekintettel arra, hogy az enterális fertőzések következtében kialakuló megbetegedések leginkább a fiatal korra jellemzők (Saif, 1999), a legtöbb felmérés szopós malacok vizsgálatán alapszik. Viszont a kórokozó állomány szintű fenntartásában az idősebb korosztály jelentős szerepet játszik, ezért a vírusterheltséget bemutató átfogó kép kialakításához nem hagyható el a vizsgálatuk. Az egyes vírusok malacok és hízók közötti előfordulásának felmérésére találunk magyar példákat is, komplex vizsgálat azonban még nem valósult meg.

Egyes coronavírusok esetében a kórokozó szerep tisztázott, de nem feltétlenül ismert, hogy adott járványtani környezetben a vírusok miként viselkednek. A sertés enterális coronavírusai közé tartozó transzmisszibilis gastroenteritis vírus (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) az utóbbi évtizedekben ritkán fordult elő Európában, néhány évvel ezelőtt mégis okozott egy kisebb járványkitörést Magyarországon (Lőrincz *et al.*, 2014). A TGEV újbóli megjelenése pedig felvetette a kérdést, hogy az ország sertésállományai rendelkeznek-e olyan arányú szeropozitivitással, amely képes a vírus elleni védelem kialakítására.

Napjaink talán legfontosabb enteropatogén kórokozója a sertésállományokban a szintén coronavírus sertések járványos hasmenésének vírusa (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV), mely Észak-Amerikában és Ázsiában jelentős veszteségeket okoz, míg Európa egyelőre kevésbé érintett (Pensaert & Martelli, 2016). A kontinensek közötti különbség pedig nem magyarázható egyértelműen az eltérő patogenitású vírustörzsek jelenlétével vagy a PEDV európai endémiás jelenlétével. Emiatt számos közlemény szorgalmazza az elérhető PEDV szekvenciák számának növelését a különböző tájegységekről származó vírusok összehasonlítása, valamint a coronavírusokra jellemző mutáció és rekombináció feltérképezése érdekében.

2.2. A kutatás célkitűzései

Kutatásunk célja az volt, hogy átfogó képet kapjunk Magyarország sertésállományai vírusterheltségének aktuális helyzetéről a hasmenéshez kapcsolódó kórokozók vonatkozásában. A szakirodalom részletes tanulmányozásával megállapított, enterális megbetegedésekhez köthető vírusok előfordulásának felmérésével szándékunkban állt elősegíteni annak a megismerését, hogy ezek a vírusok önállóan vagy különböző kombinációkban összefüggésbe hozhatók-e a megfigyelt gastrointestinális tünetek kialakulásával, valamint a vizsgált korcsoportokban milyen kórokozók ellen érdemes védekezési stratégiák kialakítása az ország sertéstartó telepein.

A TGEV vonatkozásában kutatási célként tűztük ki a kórokozó hazai elterjedtségének vizsgálatával az endémiás jelleg igazolását vagy kizárását. Ennek érdekében a felmérés során alkalmazott molekuláris biológiai módszereken kívül szerológiai vizsgálatokat is terveztünk, melyekbe bevontuk a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságára (NÉBIH ÁDI) egyéb vizsgálatra érkezett mintákat is.

A PEDV előfordulásának feltérképezésére kiemelt jelentőségének megfelelően külön figyelmet kívántunk szentelni, kiterjesztve saját gyűjteményünk vizsgálatát a rutin diagnosztikai vizsgálatokra a partner intézményekbe, azaz az Állatorvostudományi Egyetem Haszonállat-gyógyászati Tanszék és Klinikára, valamint a NÉBIH ÁDI-ba érkezett mintákkal. Kutatásunk célja az volt, hogy a kimutatott PEDV szekvenciákat összehasonlítsuk a korábban leírt vírusokkal, kiemelt figyelmet fordítva azon szakaszokra, amelyek a protektív immunitásban jelentősek lehetnek. Emellett megkíséreljük a vírusok izolálását, mely kezdeti lépésként szolgálhat a távlati célként kitűzött antigénszerkezeti vizsgálatok és vakcina fejlesztés megvalósításához.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A sertések vírusok okozta enterális megbetegedése

A gazdasági haszonállatként tartott sertések egyik leggyakrabban előforduló bántalma közvetlenül a légzőszervi kórképek mellett az enterális megbetegedés (Holland, 1990), mely jelentős veszteséget jelent az ágazat számára (Holtkamp *et al.*, 2007). Ezen veszteségek számos tényezőtől tevődhetnek össze (Paarlberg, 2014), melyek közül leginkább a várható súlygyarapodás elmaradása számottevő a mortalitás aránya mellett. A mortalitás magasabb aránya a betegséggel leginkább érintett szopós malacok (Saif, 1999) esetében várható. A kórkép a nagyon fiatal állatokon kívül a kórokozók elleni védekező készségüket tekintve hasonlóan sérülékeny korosztályba tartozó választás utáni malacokban is jellemző, de tulajdonképpen bármely korcsoportban előfordulhat a kor előrehaladtával általában fordítottan arányos súlyossággal. A betegség klinikailag ritkábban hányás, jellemzőbben hasmenés formájában nyilvánul meg, mely ugyan jellegétől függően utalhat a kórokra, de önmagában nem diagnosztikai értékű (1. ábra).



1. ábra: Súlyos hasmenés és kiszáradás jeleit mutató szopós malacok.
(Ladinig, A. Állatorvostudományi Egyetem, Bécs)

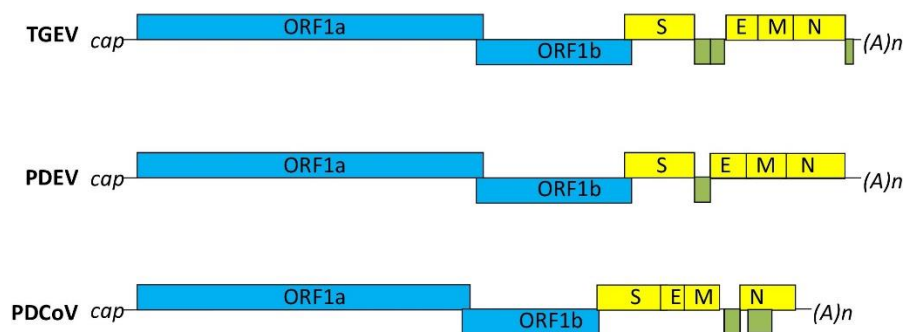
A hasmenés kialakulásának hátterében a kórokozó toxikus hatása, a fertőzött bélhámsejtek destrukciója és bélboly-atrófia állhat (Cooper, 2000), a következményes emésztési és felszívódási zavarok pedig tovább súlyosbítják a folyadékvesztést, mely végeredményben az állat kiszáradása miatt elhulláshoz vezethet. Számos olyan enteropatogén mikroorganizmust, azaz vírusokat (Saif, 1999), baktériumokat (Moxley & Duhamel, 1999) és parazitákat (Joachim & Dauschies, 2000) azonosítottak, amelyek képesek az enterocyták fertőzésével a betegség kialakítására. Ezen enteropatogén kórokozók előfordulásának

meghatározására világszerte számos vizsgálatot végeztek, kezdetben szinte mindig csupán egyetlen baktériumra (Wray *et al.*, 1993) vagy vírusra (Bohl *et al.*, 1982) fókuszálva. Ekkor még ritkának számított a kevert fertőzések kimutatására végzett felmérés (Morin *et al.*, 1983), amely inkább az utóbbi évtizedekben vált jellemzővé párhuzamosan annak a felismerésével, hogy a sertések gastrointestinális tüneteinek hátterében a légzőszervi komplexhez hasonlóan gyakrabban figyelhető meg egyidejűleg több kórokozó jelenléte (Katsuda *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013), melyek közül az esetek túlnyomó többségében a vírusok játszanak meghatározó szerepet. Ezen vírusok három nagyobb csoportba oszthatók, az első és legfontosabb az enteropatogén vírusok csoportja, melyek bizonyított kórokozó szereppel bírnak, ide tartoznak az adeno-, calici-, corona- és rotavírusok. A második csoportba sorolhatók a betegség kialakítását közvetve, az immunszuppresszió révén befolyásoló circovírusok, a harmadik csoportba pedig a tisztázatlan patogenitású, de enterális megbetegedéssel összefüggésben leírt astro-, boca-, kobu- és Torque teno vírusok tartoznak. A felsorolás természetesen tovább folytatható, de figyelembe véve az elérhető szakirodalmi adatokat, a továbbiakban részletesen tárgyalt vírusok azok, amelyek jelenlegi ismereteink szerint nagyobb jelentőséggel bírhatnak a sertések enterális tüneteinek kialakításában.

3.2. Enteropatogén kórokozók

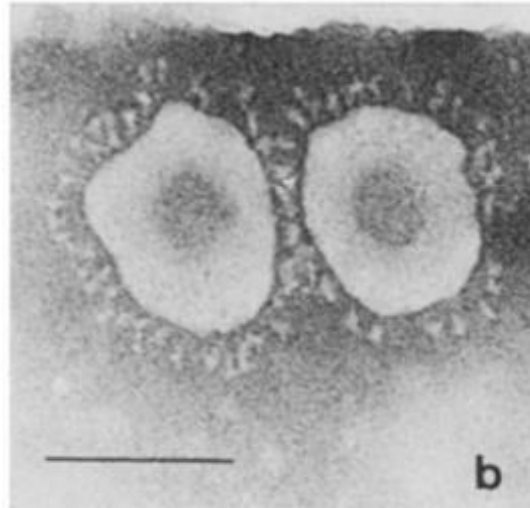
3.2.1. Coronavírusok

A coronavírusok burkos, 120–160 nm átmérőjű, és a jelenleg ismert RNS-vírusok között a legnagyobb genommal (26,4–31,7 kb) rendelkező vírusok (Woo *et al.*, 2010). A szimplaszálú, pozitív irányultságú és nem szegmentált RNS-genomot az ORF1ab (Open Reading Frame), spike (S), membrán (M), burok (envelope, E) és nukleokapszid (N) fő gének alkotják (2. ábra).



2. ábra: Coronavírusok genomszerveződése. A nem strukturális fehérjéket kódoló szakaszok késsel, a strukturális fehérjéket kódoló gének sárgával, a feltételezett járulékos gének zölddel vannak jelölve. (Gerds & Zakhartchouk, 2017)

Az ORF1ab a genom legnagyobb, nagyjából két-harmad részét adó gén, melyről a vírusreplikációhoz szükséges replikáz poliprotein képződik. A koronavírusok felületén az S génről képződő fehérjék jellegzetes nyúlványokat, tüskéket alkotnak, melyeknek köszönhetően a vírusok a napkoronához hasonló képet mutatnak elektronmikroszkópos vizsgálat során, ezért kapták a görög „korona” szóból eredő elnevezésüket (3. ábra)



3. ábra: Coronavírusok elektronmikroszkópos felvétele. A megadott mérték 100 nm-t jelöl.
(Pensaert & de Bouck, 1978)

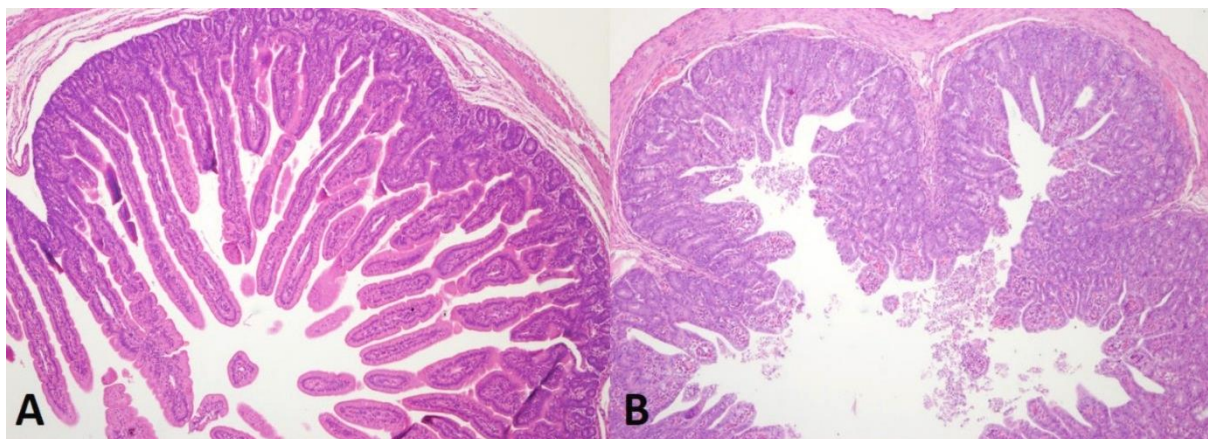
Felületi elhelyezkedésükből adódóan az S-proteinek funkciójukat tekintve a vírus gazdasejtéhez való kapcsolódásáért és a sejtbe történő bejutásáért felelősek. Az M- és E-proteinek a burokhöz kapcsolódó kis transzmembrán fehérjék, amelyek ugyan az összes koronavírusból konzervatív génekről képződnek (Woo *et al.*, 2010), rövidségük miatt azonban nem terjedtek el diagnosztikai vagy filogenetikai vizsgálatokban, ezek általánosabb célpontja a szintén konzervatív N-gén. Előbbiekén kívül kisebb járulékos gének fordulhatnak elő adott vírusokban, valamint egyes koronavírusok rendelkeznek a hemagglutinin-észteráz (HE) génnel is, amely az influenza C vírusból eredeztethető (Zeng *et al.*, 2008).

A koronavírusok rendszertani besorolása a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) döntése alapján jelentős átalakításon esett át 2018-ban. Ennek megfelelően a sertések koronavírussai a *Riboviria* birodalom *Nidovirales* rendjének *Cornidovirinae* alrendjébe tartozó *Coronaviridae* család *Orthrocoronavirinae* alcsaládjába tartoznak, mely az *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- és *Gammacoronavirus* nemzetségeket foglalja magába (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Az új taxonómiában négy coronavirus faj vonatkozásában van szerepe a sertéseknek, ezek a sertések járványos hasmenésének vírusa (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) az *Alphacoronavirus* nemzetség *Pedacovirus* alnemzetségében, a nemzetség típusfaját adó *Alphacoronavirus 1* faj, melyben összevonásra került a kutya és macska koronavírussal a transzmisszibilis gastroenteritis vírusa (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) és a

sertések légzőszervi coronavírusa (porcine respiratory coronavirus, PRCV) a *Tegacovirus* alnemzetségben, a *Betacoronavirus 1* faj a *Betacoronavirus* nemzetség *Embecovirus* alnemzetségében, mely magába foglal a malacok agy- és gerincvelő gyulladását okozó hemagglutináló vírus (porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, PHEV) mellett egyes humán, szarvasmarha és ló coronavírussokat is, valamint a *Coronavirus HKU15* a *Deltacoronavirus* nemzetség *Buldecovirus* alnemzetségében, mely a sertés deltacoronavírus (porcine deltacoronavirus, PDCoV) különböző változatait egyesíti. Előbbiekén kívül nemrég fedeztek fel egy valószínűleg denevér vírusból származó sertés enterális alphacoronavírust (porcine enteric alphacoronavirus, PEAV) vagy más néven a sertés akut hasmenés szindróma coronavírust (swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV) Kínában (Fu *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018), valamint megkülönböztetnek egy, feltehetően a TGEV és a PEDV rekombinációja révén létrejött sertés enterális coronavírust (swine enteral coronavirus, SeCoV) is (Boniotti *et al.*, 2016), melyeket az ICTV egyelőre nem ismert el. A PHEV a többi sertés coronavírustól eltérően rendelkezik a HE-génnel, valamint a felső légutak hámsejtjei és a központi idegrendszer iránti szövettropizmusából kifolyólag agy- és gerincvelő-gyulladást (encephalomyelitist) okoz (Vijgen *et al.*, 2006), ezért a továbbiakban nem kerül bemutatásra. A részletesen tárgyalt enteropatogén sertés coronavírussok kimutatására már kidolgoztak olyan molekuláris biológiai módszert, amellyel egy reakció összeállításával bármely nemzetségbe tartozó vírus megtalálható (Hu *et al.*, 2018).

3.2.1.1. A transzmisszibilis gastroenteritis és a sertések légzőszervi coronavírusa

A transzmisszibilis gastroenteritis vírusa (TGEV) az egyik legrégebb óta ismert vírusok közé tartozik, 1946-ban írták le először az Egyesült Államokban (Doyle & Hutchings, 1946), majd világszerte kimutatták. Hazánkban a TGE első észlelése 1963-ban történt, a betegsége ekkor még a „malacok vírusos hasmenése” elnevezést használták (Tuboly, 1996), később vették át az angolos megnevezést, mely a kórkép ragályosságára utal tekintettel arra, hogy a TGEV iránt bármely korú sertés fogékony (Saif *et al.*, 2012). Ugyanakkor a betegség súlyossága az életkor előrehaladásával fordítottan arányos, így a jellemzően téli időszakban előforduló fertőzést követő rövid lappangási idő után különböző kórkép figyelhető meg az egyes korosztályokban. A kéthetesnél fiatalabb malacok esetében hirtelen vízszerű, zöldessárga színű, profúz hasmenés, ritkábban hányás jelentkezik, a következményes súlyos kiszáradás miatt pedig a megbetegedett állatok akár 100%-a elpusztulhat pár napon belül. A három hetesnél idősebb malacok már általában átvészelik a betegséget, viszont a fejlődésben visszamaradhatnak. Süldők, kocák és hízók esetében étvágytalanság, átmeneti hasmenés és szórványosan hányás figyelhető meg. A kórbonctani, kórszövettani kép is ennek megfelelően alakul, elsődlegesen gyomor-bélgyulladás és a bélbolyhok sorvadása (4. ábra) figyelhető meg, amely kifejezett sertésekben sosem olyan kifejezett, mint szopós malacokban.

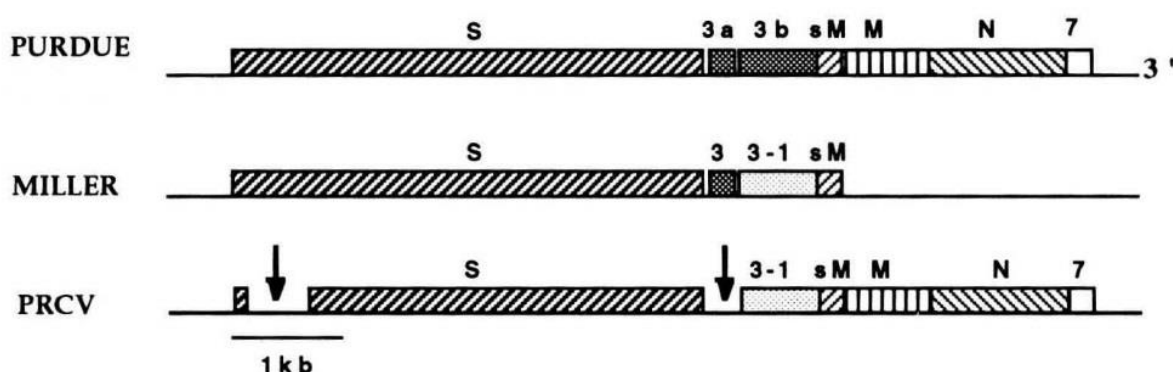


4. ábra: A – Egészséges vékonybél megfelelő hosszúságú bélbolyhokkal; B – Vírusfertőzött bélszakasz lerövidült, sorvadt, több helyen összeolvadt bélbolyhokkal és gyulladás jeleivel.

Hematoxilin-eozin festés, 40x nagyítás.

(Weissenböck, H., Állatorvostudományi Egyetem, Bécs)

Az előzőekben vázolt kórkép előfordulása azonban jelentősen visszaszorult, ugyanis a TGEV felfedezését követően néhány évtizeddel később megjelent a sertések légzőszervi coronavírusa (porcine respiratory coronavirus, PRCV) (Pensaert *et al.*, 1986), amelynek elterjedésével párhuzamosan kialakult a TGE klinikailag enyhébb, endémiás formája, felváltva a betegség eredetileg leírt epidémiás formáját (Laude *et al.*, 1993; Saif *et al.*, 2012). A PRCV a TGEV deléciós mutánsa (5. ábra), a TGEV-hez képest a legnagyobb hiányzó szakasz az S génjén található, mely méretét és az egyéb, például ORF3 génen található deléciókat és pontmutációkat tekintve törzsenként apró eltéréseket mutathat, de összességében a két vírus nukleotidjai csupán 3%-ban különböznek egymástól.



5. ábra: A TGEV két fő (Purdue és Miller) genotípusa és a PRCV részleges genomjának az összehasonlítása. A nyílak a PRCV genomban található főbb eltéréseket jelölik (Laude *et al.*, 1993).

Ez a különbség nem éri el a fajok elkülönítésére szolgáló 90%-os genetikai diverzitás határát, ezért hivatalosan az ICTV a TGEV-t és a PRCV-t a kutya és macska coronavírusokkal együtt összevonta az *Alphacoronavirus 1* fajba (Lin *et al.*, 2015). Ugyanakkor, ez a csekély mértékű genetikai különbség fenotípusosan mégis jelentős, mert az eltérő S génekről kifejeződő fehérjék kapcsolódása a különböző sejtekhez főként az aminopeptidáz N (APN) receptoron

keresztül magyarázhatja a két vírus eltérő szövettropizmusát és virulenciáját (Ballesteros *et al.*, 1997), amelyhez az ORF3b eltérései is hozzájárulhatnak (Zhang *et al.*, 2007). A PRCV ugyanis a TGEV-szel szemben az emésztőcsatornában legfeljebb nagyon korlátozottan képes a replikációra, erre alapvetően a légzőszervekben kerül sor, melynek következtében többnyire tünetmentes légúti fertőzést okoz. A PRCV-vel fertőzött állatokban viszont olyan ellenanyagok képződhetnek, amelyek keresztreakció miatt hatékonyak a TGEV-szel szemben is, így alakulhatott ki a TGE kevésbé súlyos tünetekkel és elváltozásokkal járó, lassabban terjedő endémiás formája. Ugyanakkor, a mindkét vírusra szeronegatív állományokban továbbra is előfordulhat a klasszikus formában leírt járványkitörés, így a PRCV jelenléte tulajdonképpen meghatározhatja a TGE lefolyásának súlyosságát (Saif *et al.*, 2012).

A két vírus nagyfokú hasonlósága és együttes jelenléte differenciál diagnosztikai kérdéseket vet fel, melyek megválaszolására egy olyan módszer alkalmazása szükséges, amely elsősorban a TGEV vonatkozásában képes kizárni a PRCV okozta fals pozitív reakciót. Ilyen módszerek elérhetőek molekuláris biológiai és szerológiai diagnosztikában is. Előbbi esetén olyan polimeráz láncreakciót (polymerase chain reaction, PCR) kell alkalmazni, amely multiplex rendszerben az S-génre tervezett megfelelő primerek alapján tud különbséget tenni a két vírus között (Jackwood *et al.*, 1994). Hasonló logikát alkalmazva a kifejeződő S-fehérje eltérése használható ki szerológiai vizsgálatok során, ekkor a PRCV-ről hiányzó szakasz ellen előállított monoklonális ellenanyag segítségével állapítható meg a TGEV-fertőzés, mely különböző ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerek kifejlesztésével valósítható meg (Carman *et al.*, 2002).

A kórjelzést követően a betegség elleni védekezésben régóta alkalmazzák az ún. mesterséges átvészeltetést, amelynek során a fertőzött vagy elhullott malacok belét, ill. bélsarát megetetik a vemhes kocákkal, így a főcstejben nagyobb mennyiségű ellenanyag jelenik meg, nagyobb mértékű védelmet biztosítva az újszülötteknek (Benyeda & Mocsári, 1973). Ugyanakkor, ezzel a módszerrel egyéb enterális vagy más szervrendszereket fertőző [pl. sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómájának vírusa (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)] kórokozók terjedésének is fennáll a kockázata, ezért a TGE felismerését követően hamarosan elkezdtek többek között magyar kutatók (Csontos *et al.*, 1973) is az élő attenuált és inaktivált vakcinák kifejlesztését (Gerdts & Zakhartchouk, 2017). Az eddigi tapasztalatok szerint a vemhes kocáknak két adagban, nagyjából 4–5 és 2–3 héttel a fialás előtt adott orális vakcina tűnik a leginkább hatékonynak, mert az izomba adott vakcinával ellentétben nagyobb szekretoros immunglobulin A (sIgA) szintet indukál a főcstejben és a tejben, ezáltal kifejezettebb védelmet tud nyújtani a vírus támadta enterocytáknak a szopós malacok bélnyálkahártyáján (Langel *et al.*, 2016). Másrészről TGEV elleni vakcinára nem igazán van kereslet, Magyarországon kereskedelmi forgalomban nem is kapható, hiszen a betegség már csak szórványosan fordul elő, az 1990-es éveket követően csak egy hazai esetet jelentettek

2013-ban, mikor egy nagy létszámú sertéstelepen jelentkezett egy alacsony mortalitással járó járványkitörés (Lőrincz *et al.*, 2014). Ugyanakkor, ez nem jelenti azt, hogy esetenként feltűnő epidémiás vagy enyhe, akár fel sem ismert formában, de gazdasági károkat okozva a TGEV ne lenne jelen. Sőt, a koronavírusokra jellemző gyakori genetikai változások miatt nem zárható ki a jelenleg ismert két genotípus, a Purdue és Miller klaszterek rekombinációja révén új, akár virulensebb variánsok megjelenése sem (Zhang *et al.*, 2017). Ráadásul a TGE jelenleg is szerepel az Állategészségügyi Világszervezet (Office International des Epizooties, OIE) bejelentési kötelezettség alá tartozó sertésbetegségei között (<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>). Emiatt továbbra is lényegesek a TGEV egyes törzseinek tanulmányozására készített újabb módszerek, például az enterotropizmus vizsgálata precíziós vágással nyert és *ex vivo* fenntartott bélszeleteken (Krimmling *et al.*, 2017), illetve a vakcinafejlesztésre irányuló kutatások, melyek a hagyományos megközelítéssel szemben inkább a genetikailag létrehozott, például vektor-, DNS- és szintetikus fehérjevakcinák és transzgenikus növények előállítására fókuszálnak (Gu *et al.*, 2012).

3.2.1.2. A sertés járványos hasmenése

A sertések járványos hasmenését (porcine epidemic diarrhea, PED) 1972-ben észlelték először, kezdetben a fiatal malacokat nem érintő, enyhébb formában, mely közel sem váltott ki olyan nagy tudományos érdeklődést (Pensaert & Martelli, 2016), mint a négy évvel később leírt (Wood, 1977), már minden korosztályt érintő és a szopós állatok között nagyjából 30%-os mortalitással járó járványkitörés Angliában. A betegséget okozó koronavírus hamarosan azonosították (Pensaert & de Bouck, 1978), és később ez a Belgiumban, 1977 hetedik hónapjában izolált, ezért CV777 törzsként elnevezett vírus lett a PEDV európai prototípusa (Debouck & Pensaert, 1980; Debouck *et al.*, 1981). A PED klinikai és kórbonctani megjelenésében kísértetiesen hasonlított a TGE-re, kezdeti elnevezései, így a magyar „TGE-szerű megbetegedés” (Benyeda *et al.*, 1977) is erre utalt. A PEDV kezdetben Európában és Ázsiában terjedt el, de a két kontinensen eltérően folytatódott megjelenésének gyakorisága. Az első leírását követő nagyobb járványok után az európai országokban a PED máig tisztázatlan okokból ritkává vált, az 1990-es években az első eseteket is megfigyelő angol (Pritchard *et al.*, 1999) és belga (Van & Pensaert, 1994) leírásokon kívül holland (Pijpers *et al.*, 1993), cseh (Šmíd *et al.*, 1993) és magyar (Nagy *et al.*, 1996) beszámolók készültek kisebb járványkitörésekről, a 2000-es évek elején pedig csak Olaszországból (Martelli *et al.*, 2008) jelentettek megbetegedést. Ezzel szemben Ázsiában az európaihoz hasonlóan datálódó első megjelenése óta a PEDV folyamatosan komoly problémát jelent a sertés ágazat számára, mely különösen 2010 végétől vált markánssá, amikor megjelent a vírus új, magasabb patogenitású variánsa (Li *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Genetikai

elemzések alapján feltételezhető, hogy a 2010-2011-es kínai járványból származnak azok a PEDV törzsek is, amelyek 2013 tavaszán megjelentek az Amerikai Egyesült Államokban (United States of America, USA), ahol ezt megelőzően a PED egzotikus betegségnek számított (Huang *et al.*, 2013; Stevenson *et al.*, 2013). Az első megjelenést követően azonban a vírus mind a négy égtáj felé terjedni kezdett, kezdetben szélteben az USA területén belül, majd észak felé Kanadába, végül Mexikón át a dél-amerikai országokba (Carvajal *et al.*, 2015). Viszont nem ugyanaz a vírus jelent meg mindenütt, megfigyeltek egy új variánst is (Wang *et al.*, 2014b), amelyet klinikailag enyhébb formában jelentkező járványkitörések háttérében találtak meg, genetikai elemzése pedig főleg az S génben mutatott eltéréseket. Az S génben található inzerciók és deléciók miatt az új variánsra az S INDEL elnevezést kezdték el használni megkülönböztetve a magasabb patogenitású non-S INDEL vírusoktól (Vlasova *et al.*, 2014). Az amerikai járványügyi helyzet miatt Európában is ismét elkezdtek keresni a PEDV-et az enyhe hasmenéssel járó esetekben, melynek következtében hamarosan számos ország számolt be a betegség előfordulásáról, név szerint Ausztria (Steinrigl *et al.*, 2015), Belgium (Theuns *et al.*, 2015), Franciaország (Grasland *et al.*, 2015), Németország (Stadler *et al.*, 2015), Olaszország (Bertasio *et al.*, 2016), Portugália (Mesquita *et al.*, 2015), Szerbia (Prodanov-Radulović *et al.*, 2017) és Szlovénia (Toplak *et al.*, 2016), a lista bővülése pedig továbbra is elképzelhető. Ezen esetek háttérében jellemzően az S INDEL törzshöz nagyon hasonló, alacsonyabb morbiditással és mortalitással járó megbetegedést okozó vírusokat találtak, az azonban nem tisztázott, hogy ezek mindkét kontinensen egyidejűleg jelentek-e meg, vagy csak később kerültek át az USA-ból. Ugyanakkor, a magas patogenitású non-S INDEL törzsek európai előfordulása sem zárható ki, egy esetet már jelentettek Ukrajnából (Dastjerdi *et al.*, 2015), ahol az Amerikában eredetileg megjelent vírustól csupán 0.2%-ban eltérő PEDV közel 100%-os mortalitással járó megbetegedést okozott a 10 napnál fiatalabb állatok körében. Ahogyan a legtöbb S INDEL törzs okozta esetben, úgy itt sem sikerült a járványügyi nyomozás során megállapítani, hogy a kórokozó pontosan milyen módon kerülhetett be az adott sertéstelepre, bár felmerült egy közeli farm nem dokumentált esete kapcsán a kísérleti úton alátámasztott levegőn át történő terjedés (Alonso *et al.*, 2014), mely a PEDV előfordulása szempontjából aggodalomra adhat okot.

Amint egy állományba bekerül, a PEDV az adott variánstól függő súlyossággal profúz hasmenést idéz elő a TGEV-hez hasonló kórfejlődésnek megfelelően. A két vírus között csupán néhány eltérés tapasztalható, egyrészt a vékonybélbolyhokban történő replikáció pontos helyét illetően, ugyanis a TGEV a villusok teljes hosszában megfertőzi a sejteket, de a Lieberkühn-kripták sejtjeit nem, míg a PEDV főként a villusok alapján lévő és esetenként a kriptasejteket is megfertőzi (Tuboly, 1996). Másrészt a TGEV-re nem jellemző módon a PEDV a vastagbél epithel sejtjeit is képes megfertőzni, bár sejtleválást nem okoz (Pensaert & Martelli, 2016). Az továbbra is kérdéses, hogy utóbbi eltérés hozzájárulhat-e a betegség

súlyosságához vagy az idősebb állatokban gyakran megfigyelt hasi fájdalom kialakulásához, mely a TGE esetén nem jelentkező klinikai tünet. Ugyanakkor, ezek az apró különbségek nem elegendők ahhoz, hogy a két betegséget el lehessen különíteni egymástól, ehhez mindenképpen laboratóriumi diagnosztikai módszerekre van szükség. Kezdetben a differenciál diagnosztika alapvetően elektronmikroszkópos, szövettani és immunfluoreszcenciás módszerekre épült (Mocsári, 1977), ezt követte a vírus izolálása, mely a mai napig fontos eszközként szolgál a vírus variánsainak meghatározására. A TGEV izolálása több különböző sertés sejtvonalon is viszonylag egyszerűen kivitelezhető, ezzel szemben a PEDV izolálása meglehetősen nehéz feladat (Chen *et al.*, 2014), amely először afrikai zöld majom vese eredetű, Vero sejtvonalon volt eredményes (Hofmann & Wyler, 1988). Később vált egyértelművé, hogy nem feltétlenül a kiválasztott sejtvonalon fontos, hanem a tápfolyadékhoz adott tripszin jelenléte elengedhetetlen a sikeres izoláláshoz és passzáláshoz (Wicht *et al.*, 2014). A tripszin *in vitro* használatával tulajdonképpen a vékonybélben uralkodó állapotokat lehet imitálni, amely szükséges az S fehérje aktiválásához, S1 és S2 alegységgé történő szétválásához, ezáltal a vírus és a sejtek membránja közötti fúzió létrehozásához, valamint hozzájárul a sejtkárosító hatások felerősítéséhez is. Hagyományosan továbbra is legtöbbször Vero sejteken végzik a PEDV izolálását, bár több különböző sertés sejtvonalon (Shibata *et al.*, 2000) és humán szövettenyészeten is sikeres volt az eljárás annak köszönhetően, hogy a PEDV a TGEV-vel szemben nem csak a sertés APN receptort illetve járulékos receptorokat (N-acetil-neuraminsav és N-glicolil-neuraminsav) ismer fel, hanem a humán APN-t is (Liu *et al.*, 2015). Ennek ellenére a PEDV sejtbe jutáshoz szükséges, vagyis funkcionális receptora továbbra is kérdéses, mert bizonyítást nyert, hogy ezt a szerepet nem a sertés APN tölti be. A PEDV ugyanis nem kötődik a szolubilis APN-hez, amely így nem akadályozza meg a vírusfertőzést (Shirato *et al.*, 2016), a genomszerkesztési technológiával létrehozott, APN-t nem expresszáló sejtek pedig szintén megfertőzhetők a vírussal (Ji *et al.*, 2018). Mindez alátámasztja, hogy nem az APN felelős a PEDV fertőzés kialakulásáért, legfeljebb elősegítheti azt a proteáz aktivitásán keresztül. A sertés és humán szövettenyészeten kívül a PEDV izolálása sikeres volt kacsa (Khatri, 2015) és denevér sejtvonalon is, mely felveti a szintén *Alphacoronavirus* nemzetségbe tartozó denevérvírusok és a PEDV közös eredetének lehetőségét, valamint a PEDV gazdafaj váltásának potenciálját, beleértve az embert is (Liu *et al.*, 2015). A vírusizolálás folyamata viszont időigényes, inkább az adott törzs elemzése szempontjából fontos, diagnosztikai célra érdemesebb molekuláris biológiai módszereket használni. Tekintettel a sertés alphacoronavírusok nagyfokú hasonlóságára, célszerű olyan módszert alkalmazni, amely meggyorsítva a differenciál diagnosztikát képes azok elkülönítésére. Erre alkalmas az a hagyományos módszerrel végezhető, multiplex reverz transzkripció PCR (RT-PCR), amely segítségével képesek vagyunk egyetlen reakcióelegy összeállításával meghatározni a minta TGEV, PRCV és PEDV

pozitivitását (Kim *et al.*, 2001). Hasonló rendszer működhet valós idejű, kvantitatív PCR összeállításával is, mely az előzőnél gyorsabban, már a folyamat lezajlása közben választ adhat a TGEV és PEDV által felvetett diagnosztikai kérdésre, egyúttal mennyiségi meghatározást is lehetővé tesz, mely a vírusürítés mértékére enged következtetni (Kim *et al.*, 2007). A PEDV vizsgálatára számos szerológiai módszert is kidolgoztak, melyek egy virális antigént vagy a vírus ellen termelt ellenanyagokat mutatják ki, utóbbit nem csupán vérsavóból, hanem kolosztrumból is, mely a passzív immunitás mértékének meghatározására lehet alkalmas (Gerber *et al.*, 2014). Telepi körülmények között lehetnek hasznosak azok az újabb fejlesztésű gyors diagnosztikai tesztek, melyek direkt (Kim *et al.*, 2015) vagy indirekt (Li *et al.*, 2018b) módon segíthetik a betegség korai diagnózisát és monitorozását, azonban az alkalmazásuk során kapott eredmények értékelésénél minden esetben figyelembe kell venni az egyéb módszerekkel összehasonlított és azokhoz mérten nem feltétlenül magasabb szenzitivitási és specifitási értékeket.

A PEDV pozitív diagnózist követően a TGE-hez hasonlóan gyakran próbálkoztak a mesterséges átvészeltetés módszerével, amely azonban tapasztalatok alapján kevésbé tűnik hatékonynak amellet, hogy ugyanúgy megnöveli a kockázatát egyéb fertőző ágensek terjesztésének, valamint negatívan befolyásolhat egyes szaporodásbiológiai paramétereket főleg kocasüldőkben (Olanratmanee *et al.*, 2010). Emiatt célszerű más módon erősíteni a szopós malacok passzív immunitását, melynek a kiegészítésére használtak például a tojásban PEDV ellen termeltetett ellenanyagokat (Kweon *et al.*, 2001). A védekezés másik lehetséges módja különböző vakcinák alkalmazása, melyeket Ázsiában olyan széleskörűen használnak, hogy itt már felmerült az élő attenuált vakcinák biztonságosságának kétsége, miután egy klinikai esetből származó vírus genetikai jellemzői alapján kiderült, hogy vakcinatörzsekből származhatott (Chen *et al.*, 2010). Emiatt nagyobb hangsúlyt kapott az inaktivált vakcinák alkalmazása, valamint folyamatban van rekombináns és DNS vakcinák kifejlesztése is (Gerds & Zakhartchouk, 2017). A vakcinás védelem mellett előfordulhat az egyes vírustörzsek közötti keresztvédelem kialakulása akár természetes úton is. Például egy hét hónappal korábban S INDEL törzzsel fertőzött csoporton non-S INDEL törzzsel végzett ráfertőzéses kísérlet eredményeként a kontroll csoporthoz viszonyítva minden esetben szignifikánsan csökkent a morbiditás és mortalitás aránya (Goede *et al.*, 2015). Viszont akár természetes, akár mesterséges módon alakul ki az immunitás, nem jelent teljes védelmet az újabb PEDV törzsek okozta megbetegedéstől.

3.2.1.3. A sertés enterális koronavírusa

A PEDV újabb európai kutatásai során először Olaszországból származó, 2009 és 2012 között gyűjtött archív mintákban fedeztek fel egy olyan vírust (Bonioti *et al.*, 2016), amelynek a genetikai tulajdonságai alapvetően a TGEV-re jellemzők, de az S génje inkább a PEDV-re

hasonlított, így feltehetően a két vírus rekombinációja révén jött létre. A sertés enterális koronavírusrak (swine enteric coronavirus, SeCoV) elnevezett rekombináns vírust megtalálták 2012-es archív mintákban Németországban is (Akimkin *et al.*, 2016), majd egy klinikai tünetekben is megnyilvánuló, nagyjából 10%-os mortalitással járó közép-kelet-európai járványkitörés háttérében mutatták ki 2016-ban (Belsham *et al.*, 2016). Az SeCoV részletes tulajdonságai, beleértve az önálló kórokozó szerepet, egyelőre nem ismertek, de a jelenléte felhívja a figyelmet arra, hogy az egyetlen génre irányuló vizsgálatok nem feltétlenül elegendők a sertés koronavírusrainak pontos körjelzéséhez.

3.2.1.4. A sertés akut hasmenés szindróma koronavírusa

Közel egy időben jelent meg 2017 szeptemberében két kínai kutatócsoport tanulmánya, mely egy új koronavírusrat mutatott ki szopós malacok hasmenésének háttérében, miután az ismert kórokozók vizsgálata negatív eredményt hozott. Az egyik csoport PEDV ellen vakcinázott, de ennek ellenére súlyos hasmenés tüneteit mutató három állományból származó mintákkal fertőzött kísérleti állatokat, melyek két nap elteltével mind hasonló tüneteket mutattak (Gong *et al.*, 2017). A kísérleti állatok vékonybél-homogenizátumának új generációs szekvenálással történt vizsgálata során sikerült meghatározni a sertés enterális koronavírusrat (porcine enteric alphacoronavirus, PEAV), mely a HKU2 denevér koronavírussal mutatta a legmagasabb, nagyjából 95%-os nukleotid egyezést. A másik csoport ugyanúgy Guangdong tartományból - ahol egyébként először találták meg a HKU2 denevér koronavírusrat is (Lau *et al.*, 2007) - gyűjtött mintákat egy állományból, majd hasonló kísérleti állatoltást végeztek, ezen felül sikeresen izolálták a vírust Vero sejtenyészetben (Pan *et al.*, 2017). Az előző csoport által talált PEAV GDS04 génbanki adataihoz hozzáférve meg tudták állapítani, hogy a két vírus mindössze 0,2% nukleotid eltérést mutat, mely közös eredetükre utalhat vagy adódhat akár a szekvenálás módja közötti különbségből is, mert a GD-01/2017/P2 törzs teljes genom szekvenciája nem új generációs szekvenálás útján, hanem rövid RT-PCR fragmensek konszenzus szekvenciája alapján lett meghatározva. A harmadik PEAV GD-CH/2017 teljes genomjának leírása már célzott kutatás eredménye, mely egyúttal evolúciós elemzés alapján feltételezi, hogy nagyjából 90 éve történhetett a vírus fajok közötti átváltása denevérről sertésre, melyben a vaddisznóknak is szerepe lehetett (Fu *et al.*, 2018). A PEAV okozta megbetegedés súlyosságát az első leírások megközelítőleg 35%-os mortalitási aránya alapján mérsékeltnak lehetett tekinteni, viszont ehhez képest egy újabb, négy sertéstelepet is érintő járványban 90%-os mortalitást tapasztaltak az öt napnál fiatalabb malacok korosztályában (Zhou *et al.*, 2018). Utóbbi járvány során feltűnő hasonlóságokat tapasztaltak földrajzi, időbeli, gazdasági és etiológiai vonatkozásokban a humán súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírussal (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV), ezért a PEAV elnevezését a humán vírus analógiájára megváltoztatták a sertés

akut hasmenés szindróma koronavírusra (swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV). Ezen kívül a SADS-CoV-sal rokon vírusokat mutattak ki olyan denevérek 2013 és 2016 között gyűjtött mintáiból, amelyek ismert rezervoárjai a SARS-CoV-oknak. A SADS-CoV-ról rendelkezésre álló, egyelőre csekély mennyiségű információ miatt nehéz megjósolni a vírus jövőre vonatkozó jelentőségét, jelenléte viszont mindenképpen felhívja a figyelmet a koronavírusról vizsgálatának a fontosságára, beleértve az embereket, sertéseket és denevérek vírusait is.

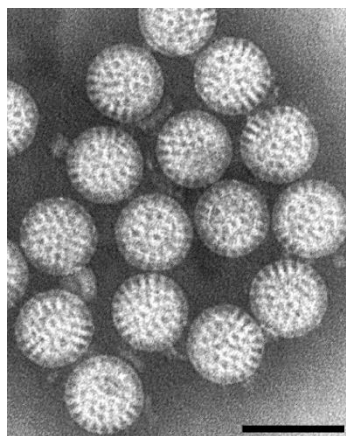
3.2.1.5. A sertés deltacoronavírus

A többi enterális koronavírustól eltérően a sertés deltacoronavírus (porcine deltacoronavirus, PDCoV) nevéből is adódóan a koronavírusról a legkisebb genommal rendelkező *Deltacoronavirus* genusba tartozik, amely nemzetséget 2009-ben javasoltak elkülöníteni új csoportként a *Coronaviridae* családon belül (Woo *et al.*, 2009). Az ICTV legutolsó taxonómiai újítását követően pedig a PDCoV jelenleg Coronavirus HKU15 néven szerepel a *Buldecovirus* alnemzetségben. A PDCoV-t először nem hasmenés háttérben találták meg, hanem egy széleskörű felmérő vizsgálat részeként írták le 2012-ben Kínában több új emlős és madár koronavírussal együtt, melyek tovább erősítették azt a teóriát, hogy az *Alpha*- és *Betacoronavirus* nemzetség tagjai denevér koronavírusról származhatnak, a *Gamma*- és *Deltacoronavirus* genus pedig madár eredetű lehet (Woo *et al.*, 2012). Hasmenés háttérben először az USA-ban mutatták ki a PDCoV-t 2014-ben, az egy éve megjelent és javában terjedő magas patogenitású PEDV okozta járványkitörésekhez viszonyítva hasonló tüneteket mutató, de alacsonyabb, nagyjából 30-40%-os mortalitással járó esetekből (Wang *et al.*, 2014a), hamarosan pedig kísérleti állatok fertőzésével bizonyították a vírus kórokozó képességét (Jung *et al.*, 2015). Az Amerikában megjelent PDCoV eredete máig sem tisztázott, bár archív minták szerológiai vizsgálata alapján feltételezik, hogy már a PEDV megjelenése előtt, 2010 óta is jelen lehetett (Thachil *et al.*, 2015). A PDCoV az USA-n kívül Kanadában is előfordult (Marthaler *et al.*, 2014b), az amerikai kontinensen kívül pedig Ázsiában okoz jelentős problémát, ahol már számos országban, így Dél-Koreában (Lee & Lee, 2014), Kínában (Song *et al.*, 2015b), Thaiföldön (Janetanakit *et al.*, 2016), Laoszban (Lorsirigool *et al.*, 2016), Vietnámban (Le *et al.*, 2018) és Japánban (Suzuki *et al.*, 2018) is megjelent. Ezen esetek is jól jelzik, milyen nagy mértékben és gyorsan terjedt el a különböző molekuláris biológiai módszerek alkalmazása, melyet némileg később követett a PDCoV ellen termelt ellenanyagok vizsgálatára irányuló ELISA kifejlesztése (Thachil *et al.*, 2015). A vírus izolálása sertés vese és here szövettényeszeten volt sikeres (Hu *et al.*, 2015), bár sejtekhez való kapcsolódása nem egyértelmű, a sertés APN receptor nem feltétlenül nélkülözhetetlen, de szerepet játszik benne (Zhu *et al.*, 2018). Nem csak a PDCoV sejtek közötti terjedése kérdéses, a sertés

állományokba való bekerülése ellen is egyelőre csak a hagyományos járványügyi és higiéniai szabályok betartásával lehet védekezni, vakcina még nem áll rendelkezésre.

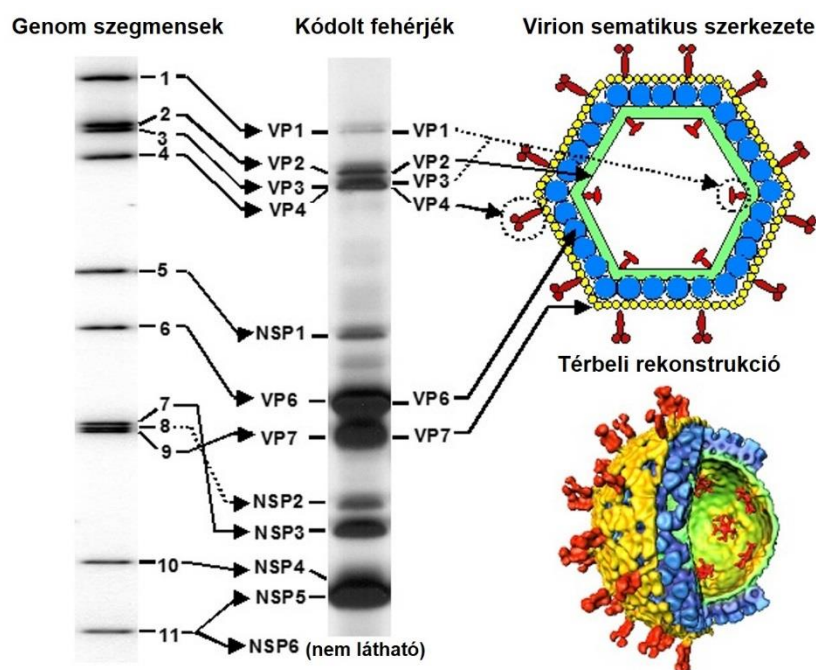
3.2.2. Rotavírusok

A rotavírusokat először elektronmikroszkópos vizsgálatok során sikerült kimutatni szarvasmarha újszülöttkori hasmenésének a hátterében (Mebus *et al.*, 1969), nem sokkal később pedig emberekben (Bishop *et al.*, 1973), sertésekben (Rodger *et al.*, 1975), majd baromfiban (Bergeland *et al.*, 1977) is találtak hasonló víruspartikulákat (6. ábra), melyeket alakjuk miatt a latin *rota*, azaz kerék szó felhasználásával nevezték el, és azóta is a fiatalkori hasmenés fő kórokozói közé tartoznak emlősökben és madarakban egyaránt (Estes & Greenberg, 2013).



6. ábra: Rotavírusok elektronmikroszkópos felvétele. A megadott mérték 100 nm-t jelöl.
(Goldsmith, 2014)

A burokkal nem rendelkező, ikozaéder szimmetriájú és 65-75 nm átmérőjű rotavírusok jellegzetes alakjukat szerkezeti vírusfehérjék (viral protein, VP) összetett morfológiai felépítésének köszönhetik. A 11 szegmensből és megközelítőleg 18500 bázispárból felépülő duplaszálú RNS genomot a VP1, VP2 és VP3 kapszidfehérjék veszik körül, ezek alkotják a virion belső rétegét, melyet a VP6 által kialakított középső réteg köt össze a külső rétegben lévő VP4 és VP7 kapszidfehérjékkel (Estes & Cohen, 1989). A rotavírus virion szerkezetét a 7. ábra mutatja be.



7. ábra: Rotavírus szerkezete. A poliakrilamid gél elektroforézissel szétválasztott 11 szegmens és a róluk képződő fehérjék láthatók a virion sematikus és 3D modelljeivel, melyeken az egyes fehérjék elhelyezkedését különböző színek jelölik.

(Mossel, E., Estes, M. és Ramig, F. munkája magyar fordításban,

http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm)

Hagyományosan a VP6 szerológiai jellemzői alapján történt a rotavírusok szerocsoportokba sorolása, melyet felváltott a VP6 gén szekvenciaelemzések alapján készült fajokba történő besorolása (Matthijnssens *et al.*, 2012), bár a kettő nagyrészt megfeleltethető egymásnak. Így jelenleg az ICTV a *Riboviria* birodalom *Reoviridae* családjának *Sedoreovirinae* alcsaládján belül a *Rotavirus* nemzetségben kilenc fajt [Rotavírus (RV) A-I] különít el, de már találtak olyan vírusszekvenciákat, amelyek a tizedik, azaz RVJ fajt alkotják (Bányai *et al.*, 2017). A fajokon belül az egyes vírusokat eredetileg egy kettős klasszifikáció során a VP7 alapján G, a VP4 alapján pedig P szerotípusokba sorolták, amely a modern kor genetikai megközelítése miatt szintén genotípusra való váltásra, vagyis a rendszer megújítására várt. Ennek érdekében alakult egy nemzetközi kutatókból álló Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport, amely mind a 11 szegmens alapján állított fel új nevezéktant, figyelembe véve a vírusok nem szerkezeti fehérjeit (non-structural protein, NSP) is (Matthijnssens *et al.*, 2011). A korábbi G és P típus megnevezései viszont sok esetben még megmaradtak, már csak azért is, mert az új rendszer egyelőre az RVA klasszifikációjára lett kidolgozva, hiszen ide tartozik a humán és állati gastrointestinális kórokozók többsége. Mindezt összevetve sertésekben eddig 12 G és 16 P genotípusú sertés RVA (PRVA), 21 G típusú PRVB, 10 G, 7 P és 7 I genotípusú PRVC, négy PRVH és egy PRVE fordult elő (Vlasova *et al.*, 2017), bár utóbbi csupán egyetlen angliai esetben szerepelt több mint 30 éve (Chasey *et al.*, 1986), és azóta sem tűnt fel. Előfordulhat, hogy egyes típusok csak adott földrajzi területeken fordulnak elő, például a G10 és G17 típusú RVB csak az USA-ban került leírásra, másrésztől ugyanazt az állatot több különböző rotavírus

is fertőzheti egy időben (Lorenzetti *et al.*, 2014). A fertőzést követően a rotavírusok több különböző mechanizmus révén okozhatnak hasmenést, ezek lehetnek például a vékonybélbolyhok apikális részén az enterocyták elpusztítása, az NSP4 glükoprotein károsító hatása enterotoxinként és az enterális idegrendszer aktivitása miatti fokozott folyadéktermelés, de a pontos patogenezist illetően csak hipotézisekre támaszkodhatunk (Lundgren & Svensson, 2001). A kórfejlődés ismeretlen részletei összefüggésben lehetnek azzal a megfigyeléssel, hogy a fertőzést követően nem feltétlenül alakul ki betegség, például egy észak-afrikai felmérésben közel ötszáz tünetmentes állatból származó minta negyede PRVA pozitív volt, az azonosított genotípusok pedig humán vírusokkal mutattak genetikailag szoros rokonságot, ismét felvetve a fajok közötti átvitel lehetőségét (Amimo *et al.*, 2015). Az esetek többségében viszont valószínűleg nagyobb arányú a betegség kialakítása, melyet jól jelez egy amerikai felmérés, mely során 2009 és 2011 között gyűjtött, hasmenéses állatokból származó 7508 minta 83%-a volt pozitív különböző rotavírusokra (Marthaler *et al.*, 2014a). Ezen tanulmányok alapjául is különböző molekuláris biológiai módszerek szolgáltak, melyek felváltották a rotavírusok szegmenseinek poliakrilamid gél elektroforézisével (PAGE) való szétválasztását és elemzését a vírusok okozta hasmenés diagnosztikájában (Elschner *et al.*, 2002). A betegség elleni védekezésre különböző vakcinázási stratégiákat alakítottak ki, melyek közül a malacoknak szájon át adott attenuált vakcinák általában kevésbé hatékonyak a gyakorlatban, ezért inkább a kocáknak kifejlesztett vakcinákat alkalmazzák, bár ezek hatékonysága is változó lehet az adott vakcina és a telepen előforduló vírus tulajdonságaitól függően (Saif & Fernandez, 1996). Ugyanakkor, a túlzott vakcinahasználat hozzájárulhat a 11 genom szegmens reasszortációja miatt eleve változékonnyá váló rotavírusok újabb genotípusainak térnyeréséhez (Molinari *et al.*, 2016).

3.2.3. Calicivírusok

A calicivírusok (CV) nagyjából 35 nm átmérőjű, ikozaéder szimmetriájú, burok nélküli és szimplaszálú, pozitív irányultságú RNS genommal rendelkező vírusok (Knowles & Reuter, 2012), melyek a *Riboviria* birodalom a *Caliciviridae* családjába tartoznak. A *Vesivirus* nemzetségbe tartozó sertés hólyagos kiütésének (vesicular exanthema of swine, VES) vírusa fontos a ragadós száj- és körömfájás differenciáldiagnosztikája szempontjából, de a betegség csak az USA-ban fordult elő és sikeresen felszámolták. A *Valovirus* nemzetségben található a Saint Valerien vírusok, melyeket tünetmentes sertések bélsár mintáiból azonosítottak Kanadában (L'Homme *et al.*, 2009), majd Olaszországban (Di Martino *et al.*, 2011). A sertések enterális kórképeiben a *Norovirus* és *Sapovirus* genusok tagjai játszanak szerepet akár egyidejűleg is (Wang *et al.*, 2006b), így a részletesebb áttekintés ezek tárgyalására szorítkozik.

3.2.3.1. Norovírusok

A norovírusok (NoV) megközelítőleg 7,3-7,7 kb hosszúságú genomja 3 ORF-ből áll, melyek közül a legnagyobb ORF1 egy olyan poliproteint kódol, amely proteáz emésztést követően nem strukturális fehérjékre válik, beleértve a vírusreplikációhoz szükséges RNS dependens RNS polimerázt (RdRp), míg az ORF2 a nagy kapszidfehérjét (VP1), az ORF3 pedig a kis kapszidfehérjét (VP2) kódolja (Wang *et al.*, 2005a; Sosnovtsev *et al.*, 2006). A nemzetség prototípusát és egyben elnevezését adó Norwalk vírust 1972-ben mutatták ki az Ohio állami Norwalk település iskolájában lezajlott gastroenteritis járvánnyal kapcsolatban (Kapikian *et al.*, 1972), bár kezdetben nem sikerült a kórokozó besorolása, mert a NoV-okon nem látszódnak a calicivírusokra jellemző kehely alakú mélyedések elektronmikroszkópos vizsgálat során (Studdert & Symes, 2008). Felfedezésük óta a NoV-ok továbbra is fontos célpontjai a kutatásnak tekintettel arra, hogy vezető szerepet játszanak a humán gastroenteritis kialakulásában, a világszerte előforduló nem bakteriális eredetű járványok több mint 90%-a hozzájuk köthető (Zheng *et al.*, 2006). Számos próbálkozás ellenére a NoV-ok nem tarthatók fenn szövettenyészetben (Duizer *et al.*, 2004), kivéve a szisztémás tüneteket is okozó, tehát klinikailag is különböző egér NoV-t (Karst *et al.*, 2003; Wobus *et al.*, 2004). Emiatt a NoV-okat VP1 génjük szekvenciája alapján sorolják hét genocsoportba, azon belül pedig több, mint 30 genotípust különböztetnek meg, mely jól mutatja NoV-ok genetikai változékonyságát (Vinjé, 2015). A GI, GII és GIV genocsoportba tartozó vírusok fertőzik az embereket, de a GII genocsoportban találhatók a sertés NoV-ok is, melyek a GII.11, GII.18 és GII.19 genotípusokat alkotják. Sertésekben először 1980-ban találtak NoV-okat rota- és astrovírusokkal együtt hasmenés tüneteit mutató választott malacokból származó mintákban (Bridger, 1980). Kísérletesen fertőzött gnotobiotikus sertésekben a vírus replikálódott és enyhe hasmenést okozva ürült (Wang *et al.*, 2005a), ráadásul hasonló eredményre jutottak humán NoV-sal fertőzött állatokban is (Cheetham *et al.*, 2006). Viszont az előfordulásuk meghatározására végzett számos vizsgálat, például egy magyarországi felmérés is csak tünetmentes sertésekből származó mintákból mutatta ki őket (Reuter *et al.*, 2007; Knowles & Reuter, 2012). A széleskörűen elterjedt, ám szubklinikai formában jelen lévő sertés NoV-okat mégis fontos tovább vizsgálni, mert egyes genotípusok genetikailag nagyon közel állnak humán NoV-okhoz, így felmerül a kérdés, hogy a sertések lehetnek-e a vírus rezervoárjai vagy az új rekombináns törzsek forrásai (Wang *et al.*, 2006b). Ugyanakkor, a NoV-ok zoonotikus transzmisszióját még nem sikerült bizonyítani, ezért más kutatók nem tartják valószínűnek az előfordulását (Mathijs *et al.*, 2012). Tekintettel arra, hogy a sertéseket a NoV-ok jellemzően tünetmentesen fertőzik, még zoonotikus potenciáljuk ellenére sem merült fel az ellenük való védekezés érdekében vakcina fejlesztése, mely a vírus izolálására alkalmas rendszer és ezáltal a vírus-neutralizáló ellenanyagok vizsgálatának hiányában egyelőre humán vonalon is csak az első klinikai fázisig jutott egy lehetséges vakcinajelölt esetében (Estes *et al.*, 2000).

3.2.3.2. Sapovírusok

A sapovírusokat (SaV) a NoV-okhoz hasonlóan egy településről, nevezetesen a japán Sapporo-ról nevezték el, ahol 1977-ben először azonosították a nemzetség prototípusának tekinthető vírust egy hasmenéssel járó gyermekjárvány során (Chiba *et al.*, 1979). A hozzávetőleg 7,1-7,5 kb hosszúságú SaV genom a NoV genomtól eltérően általában kettő ORF-ből áll, mert a VP1 fuzionál az ORF1-ben található nem strukturális fehérjékkel és az ORF2 kódolja a VP2-t, de egyes vírusokban előfordul ORF3 is, mely egy ismeretlen funkciójú, kis méretű fehérjét kódol (Li *et al.*, 2017). A SaV-ok izolálása szövettényészetben a NoV-okhoz hasonlóan szintén csekély sikerrel kecsegtető próbálkozás, mely eddig csupán egyetlen sertés SaV, a Cowden törzs esetében volt eredményes sertés vese sejttényészetben (Flynn & Saif, 1988). Így a SaV-ok klasszifikációja is a VP1, valamint részben az RdRp szekvenciákra alapul, melyek genetikai változékonysága és az újonnan leírt vírusok száma oly mértékű, hogy jelenleg már 19 genocsoportot és azon belül több, mint 50 genotípust vagy genetikai klasztert különböztetnek meg (Li *et al.*, 2018a). Az első sertés SaV-t ugyanabban az évben fedezték fel, mint a sertés NoV-t (Saif *et al.*, 1980), kórokozó készségét pedig gnotobiotikus malacok fertőzésével igazolták, valamint összehasonlították a részben attenuált, sejtvonalhoz adaptált és a vad Cowden törzs patogenezisét (Guo *et al.*, 2001). A nyolc különböző genocsoportba sorolható (GIII, GV-GXI) sertés SaV-ok (Li *et al.*, 2018a) prevalenciájának meghatározására végzett vizsgálatok azonban nem egyértelműek ilyen szempontból, mert tünetmentes állatokból származó mintákban is nagy arányban előfordulnak SaV-ok (Wang *et al.*, 2006b), sőt, akár nagyobb arányban is, mint hasmenéses mintákban (Martínez *et al.*, 2006). A felmérések során talált sertés SaV-ok között előfordulnak rekombinációk és a humán SaV-okkal magasabb genetikai hasonlóságot mutató vírusok is, mely ismét csak a NoV-okhoz hasonlóan felveti a zoonózis lehetőségét (Wang *et al.*, 2005b). Leginkább emiatt lenne célszerű sertésekben a vakcinás védelem kialakítása, melyre ígéretesnek tűnik az eredeti szerkezet megtartásával a vírus strukturális fehérjéiből összeállított, de genetikai anyagot nem tartalmazó vírus-szerű partikulák (virus-like particles, VLP) felhasználása (Yang *et al.*, 2018). A kialakult fertőzés felszámolásában pedig a theaflavinok segíthetnek antivirális szerként vagy a rendelkezésre álló fertőtlenítőszer alternatívájaként (Ohba *et al.*, 2017).

3.2.4. Adenovírusok

Az adenovírusok 70-90 nm átmérőjű, ikozaéder szimmetriájú kapsziddal és nagy méretű (26-45 kb) duplaszálú DNS genommal rendelkező vírusok, melyeket a görög „mirigy” szó alapján nevezték el, utalva arra a humán szövetre, amelyből először izolálták őket (Harrach, 2008). Az *Adenoviridae* család *Mastadenovirus* nemzetségébe tartoznak az emlősök adenovírusai, így a három A, B és C betűvel jelzett sertés adenovírus (porcine adeovirus,

PAdV) faj is, melyek vírusneutralizáció segítségével 5 szerotípusba sorolhatók (Benfield & Hesse, 2012). Az első sertés adenovírust egy hasmenéses állatból izolálták (Haig *et al.*, 1964), majd számos egyéb szerv, például idegrendszer (Kasza, 1966), légzőszervek (Hirahara *et al.*, 1990) és vese (Nietfeld & Leslie-Steen, 1993) megbetegedése kapcsán is kimutatták őket. Kórokozó készségük mégsem teljesen egyértelmű, egy PAdV törzzsel végzett kísérletben a fertőzött állatok mindegyike 3-4 nap elteltével hasmenés tüneteit mutatta (Coussement *et al.*, 1981), míg egy másik kutatócsoport ugyanazt a vírust alkalmazva nem tapasztalta klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások kialakulását sem (Sharpe & Jessett, 1967), így feltehetően hajlamosító tényezők jelenlétére van szükség a betegség kialakításához. Összességében nem jellemző, hogy a PAdV önmagában nagy gazdasági veszteséggel járó megbetegedéseket okozna, inkább mellékleteként lehet megtalálni a jellegzetes sejtmagzárványokat szövettani vizsgálatok során (Sanford & Hoover, 1983). A fertőzés viszont létrehoz immunológiai reakciót a bélnyálkahártyán, a vírus méretéből adódóan pedig alkalmas lehet vektorként való alkalmazásra, így az utóbbi évek kutatásai inkább rekombináns vakcinaként való alkalmazására irányultak a sertések enterális (Tuboly & Nagy, 2001) vagy akár egyéb betegségei (Hammond *et al.*, 2000) ellen.

3.3. Immunszuppresszív vírusok

3.3.1. Circovírusok

Az ikozaéder szimmetriájú, burokkal nem rendelkező circovírusok mindössze 17 nm-es átmérőjükkel az ismert legkisebb állati vírusok közé tartoznak (Tischer *et al.*, 1982). Egyszálú, nagyjából 2 kb nagyságú DNS genomjuk jellegzetes körkörös (*circular covalently closed*) alakot vesz fel, erre utal elnevezésük is. Sertés vese sejtenyészet (PK-15) kontaminációjaként azonosították (Tischer *et al.*, 1974) az első circovírust, mely kísérleti körülmények között nem okozott megbetegedést a fertőzött állatokban (Meehan *et al.*, 1998). A jelentős súlyvesztéssel és az érintett állatok között magas elhullási aránnyal járó választott malacok circovírus okozta sorvadásának (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) a kialakulásával azonban egy új circovírust hoztak összefüggésbe. Emiatt szükségessé vált az eredetileg leírt apatogén sertés circovírus (porcine circovirus, PCV), azaz 1-es típus elkülönítése a patogén 2-es típusú vírustól, a közelmúltban pedig felfedezték a PCV3-at (Palinski *et al.*, 2016). Mindhárom vírus a *Circoviridae* család *Circovirus* nemzetségébe tartozik egyéb emlős, madár és hal vírusokkal, valamint a humán asszociált circovírussal együtt (Li *et al.*, 2010; Lőrincz *et al.*, 2011). Utóbbit ez idáig nem hozták összefüggésbe betegséggel és annak ellenére, hogy PCV kontaminációt kimutattak szennyvízben, ételekben és humán vakcinákban, a sertésből származó vírus bizonyítottan nem fertőzi meg az embert, tehát a zoonózis kockázata elhanyagolható (Burbelo *et al.*, 2013). A circovírusok genomja két fő ORF-ből áll, melyek a

vírusreplikációhoz szükséges (Rep) és az antigén determinánsként a virulenciát meghatározó kapszid (Cap) fehérjét kódolják (Mankertz, 2008). Számítógépes elemzéssel néhány kisebb ORF is meghatározható, de ezek expressziója nem minden esetben tisztázott. PCV2 esetén az ORF3 által kódolt fehérje részt vesz a patogenezisben és az apoptózis indukálásában, az ORF4 által kódolt protein pedig szerepet játszhat az immunrendszer modulálásában egyes T lymphocyták regulálásán keresztül (He *et al.*, 2013). Az ORF2 illetve a teljes genom analízise alapján a sertésekben eddig leírt patogén PCV2 vírusok PCV2a-f genotípusokba sorolhatók, melyek közül jelenleg a PCV2d erőteljes terjedése figyelhető meg (Bao *et al.*, 2018).

3.3.1.1. A kettes típusú sertés circovírus

A PCV2 világszerte mindenütt jelen van és első leírása óta számos betegséggel hozták összefüggésbe, melyeket összefoglalóan PCV betegségeknek (porcine circovirus diseases, PCVD) vagy az amerikai irodalom nyomán PCV-vel kapcsolatos betegségeknek (porcine circovirus associated diseases, PCVAD) neveznek (Segalés, 2012). Ide tartozik a szubklinikai fertőzés, a szisztémás megbetegedés (beleértve a PMWS-t), a légző-, emésztőszervi és reprodukciós betegségek, valamint a sertések bőrgyulladással és vesekárosodással járó tünetegyüttese (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS). Az emésztőszerveket érintő betegségről egyetlen leírás készült (Kim *et al.*, 2004), mely során hat választott malacban granulomatózus bélgyulladást, a Peyer plakkok lymphoid deplécióját és citoplazmazárványokat találtak a léziókból kimutatott vírussal együtt, emellett egy állatból *Salmonella typhimurium*-ot is izoláltak. A PCV2 okozta enteritist azóta is PCVD-ként tartják számon, bár a vírus kórokozó készségét a leginkább vizsgált PMWS esetében sem sikerült egyértelműen tisztázni, kísérleti úton fertőzött állatokban a PCV2 önállóan nem okozott betegséget, legfeljebb minimális szövettani elváltozások voltak kimutathatók (Krakowka *et al.*, 2000). Ezen kísérleti eredmények is alátámasztják, hogy a PCV2 leggyakrabban szubklinikai fertőzésként van jelen, önmagában minimális elváltozásokat okozva a lymphoid szövetekben. Ezen elváltozások viszont az immunrendszer gyengítésén keresztül teret adhatnak egyéb kórokozók megtelepedésének, melynek a bekövetkeztével, illetve egyéb immunszuppresszív hatás érvényesülésével kialakulhat PCVD. Emiatt a PCVD kórjelzésében nagyon fontos az egyes betegségekre jellemző klinikai tünetek és kórbonctani, kórszövettani elváltozások vizsgálata, hiszen a PCV2 mindenütt jelen van, így a vírus vagy az ellene termelt ellenanyagok kimutatása önmagában nem diagnosztikai értékű (Segalés, 2012). Ugyanakkor, a PCV2 detektálása jelezheti a fertőzött állatban kialakult immunszuppressziót, melynek a hatása egyértelműen megmutatkozik a vírus elleni aktív védekezéssel nyerhető termelési eredmények javulásában.

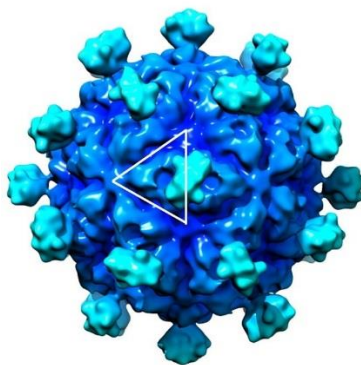
3.3.1.2. A hármastípusú sertés circovírus

A PCV3-at először az USA-ban fedezték fel pár évvel ezelőtt (Palinski *et al.*, 2016), viszont retrospektív elemzések sokkal korábbra datálják a jelenlétét, mely már Ázsiában és Európában is igazolt (Ye *et al.*, 2018). Az eddig megjelent tanulmányokban a PCV3-at ismeretlen kóroktanú PDNS, reprodukciós zavarok (Palinski *et al.*, 2016), szisztémás gyulladás (Phan *et al.*, 2016), valamint légző- és emésztőszervi megbetegedés (Zhai *et al.*, 2017) kapcsán is leírták, de tünetmentes állatokban szintén előfordultak (Franzo *et al.*, 2018), sok esetben pedig egyéb kórokozó jelenlétét is kimutatták. Az esetleírásokhoz kapcsolódó kísérleti rendszerek egyelőre nem kerültek kidolgozásra, így a PCV3 kórokozó szerepének megállapításához még nem áll rendelkezésre kellő mennyiségű információ.

3.4. Enterális megbetegedéssel összefüggő egyéb vírusok

3.4.1. Astrovírusok

Az astrovírusokat az elektronmikroszkópiának köszönhetően fedezték fel hányás és enyhe hasmenés tüneteit mutató gyermekek vizsgálata során (Madeley & Cosgrove, 1975b), és még abban az évben elnevezték a nagyjából 30 nm-es, ikozaéder szimmetriájú víruspartikulákat (8. ábra) jellegzetes felszíni képleteik alapján a görög *astron*, azaz csillag szó felhasználásával (Madeley & Cosgrove, 1975a), bár később kiderült, hogy a formát adó nyúlványok megjelenése pH függő és főleg madár astrovírusokban nem minden esetben látható, mely téves diagnózishoz vezethet (Koci & Schultz-Cherry, 2002).



8. ábra: Astrovírus kapszid modellje. A fehér vonalak egy aszimmetrikus egységet (kapszomert) jelölnek. (Dong *et al.*, 2011)

Az átlagosan 7 kb nagyságú, szimplaszálú, pozitív irányultságú RNS genommal rendelkező astrovírusok rendszertanilag a *Riboviria* birodalom *Astroviridae* családjának *Mamastrovirus* vagy *Avastrovirus* nemzetségeibe tartoznak attól függően, hogy emlős vagy madár gazdafajban találták meg őket először (De Benedictis *et al.*, 2011). A molekuláris biológiai módszerek és különösen a metagenomika terjedésével viszont kiderült, hogy szoros genetikai

kapcsolatot mutathatnak egymástól távol álló fajok, például ember és denevér astrovírusai, valamint számos új astrovírust találtak eddig nem vizsgált fajokban, mely szükségessé tette ebben az esetben is a családon belüli re-klasszifikációt. Sertésekben az első astrovírust hasmenéses választott malacokban találták meg (Bridger, 1980), jelenleg pedig öt különböző genotípust (porcine astrovirus, PAsTV1-5) tartanak számon, melyek világszerte előfordulnak (Kumthip *et al.*, 2018). PAsTV-t nem csupán hasmenéses állatokból mutattak ki, hanem akut légzőszervi megbetegedések metagenomikai vizsgálata során is detektálták őket (Padmanabhan & Hause, 2016). A közelmúltban pedig neuroinvazív astrovírusokat találtak bénulósos tüneteket mutató malacokban (Boros *et al.*, 2017). Másfelől, az elsőként Magyarországon leírt PAsTV2-t tulajdonképpen mellékletként találták egészséges állatok vizsgálatakor (Reuter *et al.*, 2011b), ahogyan más tanulmányokban is leírtak PAsTV-okat tünetmentes házisertésekben (Luo *et al.*, 2011) és vaddisznókban (Reuter *et al.*, 2012), vagy nem önállóan, hanem egyéb vírusokkal együtt mutatták ki hasmenéses állatokból (Mor *et al.*, 2012). Mindez azt jelenti, hogy a PAsTV kórokozó készségéről és kórfejlődéséről meglehetősen hiányosak az ismereteink annak ellenére, hogy a vírus izolálásának módszere, bár viszonylag nehézkes, de régóta ismert (Shimizu & Shirai, 1990) és fontos eleme a koronavírusokhoz hasonlóan a tripszin jelenléte. Kérdéses klinikai jelentőségéhez mérten az astrovírusok ellen való védekezés sem kapott hangsúlyos szerepet, legfeljebb az érintett állatok utáni intenzívebb fertőtlenítésre lehet utalást találni az elérhető szakirodalomban.

3.4.2. Bocavírusok

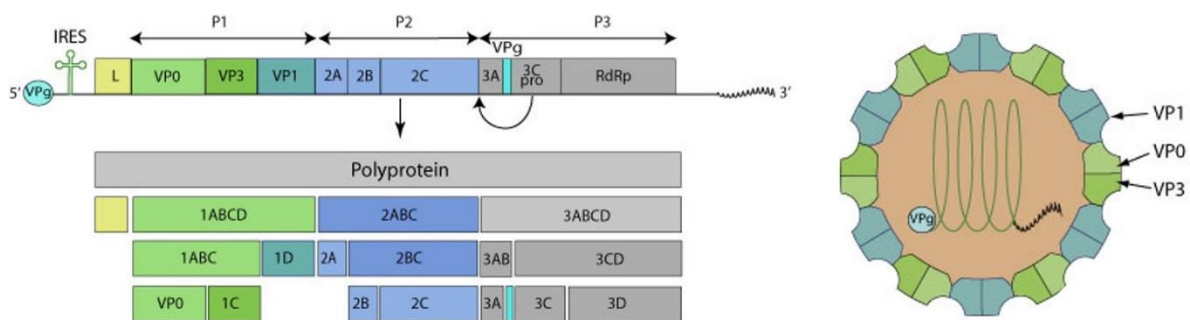
Az ikozaéder szimmetriájú, 25-30 nm átmérőjű, burok nélküli bocavírusok nagyjából 5 kb nagyságú, szimplaszálú DNS genommal rendelkeznek (Tijssen *et al.*, 2011). A bocavírusokat először szarvasmarhában (Chen *et al.*, 1986) és kutyában (Binn *et al.*, 1970) írták le, ezen állatfajok latin megfelelőjének (*bovine* és *canine*) felhasználásával kapták elnevezésüket, amely később kiegészült a magasabb rendszertani besorolásukra és egyúttal méretükre utaló *parvo* kifejezéssel. Így ezek a kis vírusok hivatalosan a *Parvoviridae* család *Parvovirinae* alcsaládjának *Bocaparvovirus* nemzetségébe tartozó bocaparvovírusok, bár az elérhető szakirodalom többsége továbbra is következetesen a rövidebb bocavírus megnevezést használja. A harmadik bocavírust az első kettő felfedezését követően viszonylag későn, néhány évtized múlva írták le (Allander *et al.*, 2005), ez volt első humán bocavírus (HBoV 1), amely az alsó légutak megbetegedését idézi elő fiatal gyerekekben, míg a később felfedezett HBoV 2-4 inkább emésztőszervi megbetegedéssel hozhatók összefüggésbe (Li *et al.*, 2015). Azóta számos állatfajban találtak bocavírusokat (Lau *et al.*, 2017), sertésekben először 2009-ben Svédországban azonosították őket mellékletként a PMWS diagnosztikája során (Blomström *et al.*, 2009). Ezt követően világszerte detektálták a sertés bocavírus (PBoV) különböző variánsait, melyeket hasonlóságuk miatt az új nomenklatúrában sok esetben

összevontak (Cotmore *et al.*, 2014), ezzel az eddig leírt hét PBoV-t besorolva négy fajba a patás állatok bocaparovírusaként (*Ungulate bocaparovirus*, UBPV). A régi és új nevezéktan közötti kapcsolat a következőképpen alakul: UBPV 2 – PBoV 1, 2, 6; UBPV 3 – PBoV 5; UBPV 4 – PBoV 7; UBPV 5 – PBoV 3, 4. A bocavírus genom három ORF-ből áll, melyek két kapszidfehérjét (VP1 és VP2), valamint három nem strukturális fehérjét (NS1-70, NS1 és NP1) kódolnak (Tijssen *et al.*, 2011). Az NS1 fehérje konzervatív a *Parvoviridae* családban, ezért ennek az aminosav szekvenciáját használták az új taxonómia megalkotására. Az NP1 csak a bocavírusokra jellemző, de a többi nem strukturális fehérjéhez hasonlóan pontos funkciója nem ismert, bár feltételezhető, hogy szerepet játszik a fertőzött gazdaszervezet immunrendszerének meggyengítésben az interferon (IFN) termelés blokkolása révén (Zhang *et al.*, 2012). Emellett az NP1 gén a VP1 génnel együtt fontos rekombináció szempontjából (Kapoor *et al.*, 2010), mely hozzájárulhat a bocavírusok növekvő diverzitásához, a vírus biológiai tulajdonságainak megváltozásához, valamint felveti a HBoV és a PBoV közötti rekombináció lehetőségét. Az egyes bocavírusok azonosítására számos molekuláris biológiai módszert dolgoztak ki, melyek segítségével különböző országokban célzott epidemiológiai vizsgálatokat végeztek elterjedtségük meghatározására (Zhou *et al.*, 2014). A felmérések során nem csak PMWS-sel diagnosztizált, hanem légző-, emésztőszervi és általános tüneteket mutató állatokból is kimutattak PBoV-okat, ugyanakkor egészséges sertésekből származó mintákban szintén nagy arányban fordultak elő. Magyarországon is készült vizsgálat a sertés parvovírusok prevalenciájának meghatározására, mely kis arányban bocavírusokat is kimutatott beteg és egészséges állatokból egyaránt (Cságola *et al.*, 2012). Szélesebb spektrumot vizsgálva rendszeresen számolnak be kevert fertőzésekről egyéb kórokozók (pl. PEDV, PRRSV), melyek számára a PBoV hajlamosító tényezőként szolgálhat a betegség kialakítására (Zhou *et al.*, 2014). A bocavírusok pontos patogenezise azonban nem tisztázott, megismerését nehezíti az állati modell és az *in vitro* replikáció hiányossága, mely PBoV esetében ez idáig csak elsődleges sertés vese tenyészetén volt sikeres (McKillen *et al.*, 2011). A vírusizolálás nehézségei egyúttal a vakcinafejlesztést is korlátozzák, de nem gátolják meg a specifikus védekezésre való törekvést, melynek a kezdete lehet a HBoV 1 immunológiaiailag domináns epitópjainak *in silico* feltérképezésével a potenciális vakcinajelöltek meghatározása (Kalyanaraman, 2018).

3.4.3. Kobuvírusok

A kobuvírusok megközelítőleg 30 nm átmérőjű, burok nélküli, ikozaéder szimmetriájú vírusok, melyek nagyjából 8 kb nagyságú szimplaszálú RNS genommal rendelkeznek (Reuter *et al.*, 2011a). Elsőként Japán Aichi prefektúrájában írtak le humán gyomor- és bélgyulladás vizsgálata során olyan citopatogén víruspartikulákat, amelyek elektronmikroszkópos képe az astrovírusokra emlékeztetett (Yamashita *et al.*, 1991). Később a japán *kobu*, vagyis „dudor”

szó felhasználásával nevezték el őket utalva egyenetlen felületükre, a típustörzs pedig az Aichi vírus elnevezést kapta (Yamashita *et al.*, 2000). Sertésekben először Magyarországon találtak egészséges állatokból származó mintákban ilyen vírust (Reuter *et al.*, 2008), melyet teljes genomjának elemzésével egyértelműen új fajként azonosítottak (Reuter *et al.*, 2009). Rendszertani besorolásuk szerint a kobuvírusok a *Riboviria* birodalom *Picornavirales* rendjén belül a *Picornaviridae* család *Kobuvirus* nemzetségébe tartoznak, az eddig azonosított vírusokat pedig leírásuk sorrendjében Aichivirus A-F fajokba sorolták, így a sertés kobuvírus (porcine kobuvirus, PKV) hivatalos megnevezése Aichivirus C lett. A PKV genomja tulajdonképpen egyetlen nagy poliproteint kódol, mely a nem strukturális vezető fehérjét (leader, L) követően strukturális kapszidfehérjékre (VP0, VP1, VP3) és további nem strukturális fehérjékre (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) osztható (Reuter *et al.*, 2009). A kobuvírusok genomszerveződését és a virion szerkezetét a 9. ábra mutatja be.



9. ábra: Kobuvírus genomelrendeződése, a képződő fehérjék és a virion sematikus szerkezete. A P1 régió a strukturális, a P2 és P3 régiók a nem strukturális fehérjéket kódolják. (ViralZone 2008, Swiss Institute of Bioinformatics, <https://viralzone.expasy.org/652>)

A genomon belül a leginkább konzervatív szakasz a 3D, azaz az RdRp-t kódoló rész, ezt használják a leggyakrabban diagnosztikai vizsgálatokhoz (Jackova *et al.*, 2017). Ily módon világszerte kimutatták a PKV-t egészséges és hasmenéses állatokból egyaránt, gyakran egyéb kórokozók együttes jelenléte mellett (Yang *et al.*, 2014; Jackova *et al.*, 2017). Összességében az elérhető publikációk eredményei ellentmondásosak a PKV kórokozó szerepét tekintve, noha a vírussal fertőzött kísérleti állatokban megfigyelték hasmenés kialakulását, valamint az emésztőcsatornán kívül a tüdő és a vesék kórszövettani elváltozásait (Yang *et al.*, 2015), mégis jelentős arányban fordulnak elő PKV-ok egészséges állatokban is.

3.4.4. Torque teno vírusok

A TT vírust először egy májgyulladásban szenvedő beteg vérplazmájából azonosították Japánban (Nishizawa *et al.*, 1997), az új vírust pedig a páciens nevének kezdőbetűit felhasználva nevezték el. A nagyjából 30-50 nm átmérőjű, burok nélküli vírus genetikai feltérképezése során számos hasonlóságot találtak az állati circovírusokkal, ugyanis a

TT vírus szintén egyszálú, körkörös DNS genommal rendelkezik (Mushahwar *et al.*, 1999). Emiatt a későbbiekben az ICTV az eredeti TT rövidítés tudományosabb meghatározása érdekében a Torque teno vírus (TTV) elnevezést vezette be, melyben a latin *torque* (nyaklánc) és *tenuis* (vékony) szavak a genom elrendeződésére utalnak (Biagini *et al.*, 2005). Az eddig leírt vírusokat 12 nemzetségbe osztották be az *Anelloviridae* családban, melyen belül két genusba sorolták a sertés TTV-okat (Torque teno sus virus, TTSuV). A TTSuV 1a és 1b a *Lotatorquevirus* nemzetségben, a TTSuV k2a és k2b pedig a *Kappatorquevirus* nemzetségben található. A nukleotid szekvencia egyezés a két nemzetség között kevesebb, mint 50%, az egyes fajok elkülönítése pedig az *Anelloviridae* családon belül legalább 35%-os eltérés alapján történt (Cornelissen-Keijsers *et al.*, 2012). A TTSuV genom négy ORF-ből (ORF1, ORF1/1, ORF2, ORF3) áll, melyek közül az ORF1 kódolja a legnagyobb kapszid fehérjét, valamint ennek a nukleotid szekvencia különbségein alapul a vírusok rendszertani besorolása (Jiménez-Melsió *et al.*, 2015). Az ORF2 feltehetően a vírusreplikációban szerepet játszó fehérjét kódol, míg az ORF3 által kódolt nem strukturális fehérje funkciója egyelőre nem ismert. A TTV-ok genomja meglehetősen magas változékonyságot mutat, ezért a detektálásukhoz célszerű a konzervatív nem kódoló régióra irányuló PCR vizsgálatot alkalmazni (Jarosova *et al.*, 2011). A sertés szérumban ily módon keresett TTSuV változó (24-100%) prevalenciával világszerte előfordul, akár minden sertéstelepen jelen lehet, ugyanakkor gyakran mutatható ki egészséges állatokból is (Kekarainen & Segalés, 2012). Mindez hozzájárul a TTSuV patogenitását vitató kérdéshez, melyet máig nem sikerült megválaszolni. Kórokozó szerepe elsősorban a PCVD vonatkozásában, vagyis a PCV2 társfertőzéseként merült fel, miután a TTSuV2 nagyobb arányban fordult elő PMWS-sel érintett sertésekben (91%) az egészséges állatokhoz (72%) képest (Kekarainen *et al.*, 2006). Gnotobiotikus sertések szimultán fertőzése TTSuV1-gyel és PCV2-vel a szindróma kialakulásához vezetett (Ellis *et al.*, 2008), ugyanakkor a TTSuV1-gyel önállóan fertőzött állatokban nem alakult ki betegség, csak tünetmentes enyhe intersticiális tüdőgyulladás, glomerulonephropathia és a máj mérsékelt limpho-hisztocitózis beszűrődése volt megfigyelhető (Krakowka & Ellis, 2008). A PCV2-n kívül vizsgálták a TTSuV kapcsolatát egyéb kórokozókval is, így kimutatták többek között hasmenéses bélsár mintákból PRVA mellett, bár a két vírus előfordulási gyakorisága között nem volt szignifikáns összefüggés (de Arruda Leme *et al.*, 2014). Összegezve az elérhető szakirodalmi adatokat feltételezhető, hogy az egyes TTSuV-ok nem csak genetikailag, hanem patológiailag is különbözhetnek egymástól, valamint hajlamosító tényezőként szerepet játszhatnak komplex kóroktanú betegségek kialakulásában, melyhez az immunrendszer károsodása is hozzájárul (Kekarainen & Segalés, 2012). A kórkép kialakulásának az esélye nagyobb magas vírusterhelés mellett, melynek a csökkentésére, valamint a fertőzés késleltetésére sikeres kísérletet végeztek DNS és protein alapú immunizálással (Jiménez-Melsió *et al.*, 2015).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Mintagyűjtés

4.1.1. Bélsárminták

Felmérő vizsgálatunkhoz 30 sertéstelepre juttattunk el vagy vittünk személyesen mintavételi edényeket, melynek eredményeként végül 17 különböző telepről kaptunk vissza bélsármintákat 2016 májusa és 2018 februárja között (10. ábra).



Kocák esetében a minták besorolása hasmenéses, illetve kontroll mintaként nem az adott koca, hanem az ahhoz tartozó malac állapota alapján történt. Az egyes telepekről a 40 ml űrtartalmú, biztonsági zárral rendelkező, a rektumból vagy a padozatról vett egyedi mintákat tartalmazó mintavételi edényeket +4°C-on szállították a laboratóriumunkba, melyet azonnali mintafeldolgozás és/vagy -80 °C-on történő tárolás követett.

A bélsárminta-gyűjtemény részletes adatai a származási hely és a mintavétel időpontjának feltüntetésével együtt az 1. számú mellékletben szerepelnek.

4.1.2. Szérumminták

A PRRS elleni mentesítés keretében a NÉBIH ÁDI részére 2015 és 2017 között küldött és -20°C-on tárolt szérummintákból kiválasztottunk 908 mintát, melyeket 93 sertéstelepről juttattak el az intézetbe (11. ábra).



11. ábra: Szérumminták származási helye.

Lehetőség szerint tíz mintát válogattunk ki minden telepről, de hét esetben nem állt rendelkezésre kellő számú vizsgálati anyag. A szérumminták főként kocákból származtak, de esetenként hiányzott a korra vonatkozó információ. A gyűjtemény származási helyre vonatkozó adatait a 2. számú melléklet összegzi.

A saját archívumunkból négy településről származó és több korcsoportot lefedő mintákat vizsgáltunk meg reprezentatív számban, mely Csemőnél 58, Füzesabonynál 43, Jászárokszállásnál 51, Poroszló esetében pedig 36 minta volt. Az előzetes vizsgálat eredménye alapján kiterjesztettük a vizsgálati anyag körét Füzesabony összesen 174 mintájára, melyeket 2013-ban gyűjtöttünk. Ezen archív minták 12 korosztályt fedtek le: 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60, 90, 120, 150 napos sertésekből és kocákból származtak.

Korcsopontonként általában 15 minta állt rendelkezésre, mely alól kivételt képzett a 120 napos csoport 14, a kocák csoportja pedig 10 mintával.

4.1.3. PEDV esetekhez kapcsolódó egyéb minták

4.1.3.1. PEDV eset 2016-ban

Egy Székesfehérvár melletti 60 kocás sertéstelepen zöldes-barna, vízszerű hasmenést figyeltek meg 2016. január végén. A tenyészállatok mindegyike megbetegedett, és a laktáló kocák között magas arányúvá vált a súlyos hypogalactia, de elhullás nem történt. Az újszülött malacok mindegyikénél súlyos hasmenés és esetenként hányás volt megfigyelhető, a mortalitás pedig elérte a 30%-ot a járvány megszűnéséig. Az eredménytelen antibiotikus kezelések ellenére a klinikai tünetek nagyjából három hét múlva eltűntek. Egy szopós malac hulla és különböző korosztályú állatoktól (növendék malacok, kanok, vemhes és laktáló kocák) származó 12 végbéltampon került begyűjtésre.

4.1.3.2. PEDV esetek 2018-ban

Az 'A' telep egy 1800 kocás teljes vertikumában termelő sertéstelep Nyírcsaholyban. Minden korosztályban hasmenést és étvágytalanságot figyeltek meg láz és hányás nélkül 2018. január elején. A szopós malacok közt a morbiditás aránya elérte a 100%-ot, míg a mortalitás az egy hetesnél fiatalabb állatoknál 40%-on tetőzött. Választott malacok esetében az étvágytalanság és a bőr szürke elszíneződése kifejezettebb volt, mint a hasmenéses tünetek. A hízók között jelentős volt a súlygyarapodás visszamaradása annak ellenére, hogy hasmenés az állatok mindössze 10%-ánál fordult elő. Két hulla előzetes vizsgálata után négy héttel további minták kerültek begyűjtésre kanoktól, kocáktól, kocasüldőktől, valamint négy és egy hetes malacoktól, egyenként. Ugyanazon állatoktól nyolc végbéltampont és nyolc vérmintát gyűjtöttünk, valamint minden egyes korosztályból három környezeti tamponmintát, melyek közül egy a környező falakról, egy az állatokat körülvevő rácsokról, egy pedig különböző résekből, repedésekből származott. Ezen kívül mind a nyolc kanból, hét kocasüldőből, valamint öt-öt kocából, négy és egy hetes malacoktól bélsárminták is begyűjtésre kerültek.

A 'B' telep két egységre oszlik, a fő egység ('B1') egy 1000 kocás teljes vertikumában termelő sertéstelep, mely a választott malacok egy részét a másik, csak hizlaldaként működő egységbe ('B2') szállítja. A két egység Mohácson, nagyjából öt km-re található egymástól a Duna két partján. A két egység közötti mozgás egyirányú, a takarmányt pedig különböző cégek biztosítják. Január elején hasmenést és jelentős testtömegbeli szóródást tapasztaltak a 'B2' egységben. Hányás és elhullás nem fordult elő. A 'B1' egységből hat nyálmintát gyűjtöttünk nagyjából 30 állatot számláló hat csoporttól. A 'B2' egységben öt végbél- és négy környezeti tamponmintát, valamint öt nyál- és öt vérmintát gyűjtöttünk egy-egy kutricából, összesen öt

különböző csoportból, melyben egyenként 25-30 növendék malacot tartottak. A minták begyűjtésére főleg tünetmentes állatokból, az első klinikai tünetek megjelenése után négy héttel került sor, a nyálmintákat pedig a helyszínen WITNESS PED-TGE-Rota gyorseszttel (Zoetis, New Jersey, USA) vizsgálták meg.

A 'C' telep hizlaldaként üzemel Nagyhegyesen, ahonnan rutin diagnosztikai vizsgálatra küldtek hat hullát márciusban, melyeket szintén vizsgáltak WITNESS PED-TGE-Rota gyorseszttel.

4.2. Molekuláris biológiai módszerek

4.2.1. Nukleinsav kivonás

A felaprított szervdarabokból és a bélsármintákból borsónyi mennyiséget tettünk egy 5 mm átmérőjű acél golyót tartalmazó steril 2 ml-es centrifugacsőbe. A csöveket 1,8 ml-ig feltöltöttük foszfáttal pufferolt sóoldattal (phosphate buffered saline, PBS), majd 5 percig 27/sec oszcillálási frekvencián ráztattuk, végül 5 percig 16128 rcf-fel centrifugáltuk 4°C-on. A környezeti és rektális tamponmintákat 2-3 ml PBS-ben áztattuk 30 percig, ami alatt két alkalommal vortexeltük őket, végül leöntöttük a folyadékot steril csövekbe, ahol pár percig hagytuk leülepedni. A centrifugálást követően kapott felülúszót, a tamponminták áztatásával kinyert folyadékot és a hígítatlan nyálmintákat használtuk nukleinsav kivonásra, melyet a MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával végeztünk egy King Fisher 96 Flex berendezésen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a gyártó útmutatásainak megfelelően.

4.2.2. Coronavírusok vizsgálata PCR-rel

A kivont nukleinsavból a coronavírusok kimutatásához valós idejű PCR-t alkalmaztunk a Vioreal Kit PEDV&SDCV és a Vioreal Kit TGEV (Ingenetix GmbH, Bécs, Ausztria) termékek igénybevételével követve a gyártó útmutatásait. A PCR reakcióelegyek összemérése a QIAgility (Qiagen, Hilden, Németország) automata berendezéssel történt, a reakciók pedig a Rotor-Gene Q 5plex Platform (Qiagen, Hilden, Németország) eszköz és a hozzá tartozó szoftver segítségével zajlottak.

A PEDV-pozitív mintákat a PEDV N génre irányuló PCR-rel is vizsgáltuk követve egy, a módszert leíró korábbi tanulmányt (Li *et al.*, 2013).

Két PEDV esetben a teljes genom meghatározásához alkalmazott PCR szintén ismert leírás alapján történt 33 primer pár felhasználásával (Song *et al.*, 2015a).

4.2.3. Hagyományos PCR

A koronavírusról kívül az összes többi vírus kimutatása hagyományos PCR-rel történt, melyet a szakirodalomban korábban leírt primerek (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) alapján végeztünk (2. táblázat).

2. táblázat: A felmérő vizsgálathoz kiválasztott vírusok a kimutatásukhoz használt primer párokkal, a keletkező termék nagyságával és a vonatkozó hivatkozással.

Vírus	Primerek		Termék nagysága (bp)	Referencia
DNS vírusok				
PAdV	F	GCCGCARTGGTCYTACATGCACAT	256	Kiss et al. 1996
	R	CAGCRYRCCGCGGATGTCAAART		
PBoV1-2	F	TGGTGGAAACGTCTCTCTGACA	466	Cságola et al. 2012
	R	GAGTCATTTCGGTCTCCTCCAT		
PBoV3-4	F	GCACGGAGCTATTACTGGTT	310	Ndze et al. 2013
	R	AGCTGTAGACCGGATTGTGA		
PCV2	F	GGAGGAGTAGTTTACATAGGGG	287	Cságola et al. 2006
	R	CGCACCTTCGGATATAC		
TTSuV1	F	CGGGTTCAGGAGGCTCAAT	305	Segalés et al. 2009
	R	GCCATTCGGAAGTGCACCTTACT		
TTSuV2	F	TCATGACAGGGTTCACCGGA	252	
	R	CGTCTGCGCACTTACTTATATACTCTA		
RNS vírusok				
PAstV	F	TGACATTTTGTGGATTTACAGTT	799	Reuter et al. 2011
	R	CACCCAGGGCTGACCA		
CV	F	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	317 (NoV) 329 (SaV)	Wang et al. 2006a
	R	ACDATYTCATCATCACCATA		
PKV	F	TGGATTACAAGTGTTTTGATGC	217	Yang et al. 2014
	R	ATGTTGTTAATGATGGTGTGTTGA		
PRVA	F	AAAGATGCTAGGGACAAAATTG	309	Elschner et al. 2002
	R	TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA		
PRVB	F	CTATTCAGTGTGTCGTGAGAGG	434	Gouvea et al. 1991
	R	CGTGGCTTTGGAAAATTCTTG		
PRVC	F	CTCGATGCTACTACAGAATCAG	356	
	R	AGCCACATAGTTCACATTTTCATCC		

Az egyes PCR rendszerek összeállítása nem minden esetben egyezett a megfelelő hivatkozásban szereplő leírással, RNS vírusok esetén pedig megelőzte a reverz transzkripció, mely a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) segítségével valósult meg, betartva a gyártó utasításait. Mindegyik rendszerben alkalmaztunk negatív kontrollt, pozitív kontrollként pedig a szekvenált pozitív minták szolgáltak a későbbiekben. A reakcióelegyek összeállítását a 3. táblázat, a 35 ciklussal elvégzett PCR körülményeit pedig a 4. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A felmérő vizsgálat során alkalmazott PCR reakcióelegyek.

* Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

** Institute of Applied Biotechnologies, Strašnice, Csehország

Összetevők	DNS vírusok	RNS vírusok
	mintánként (µl)	
Templát	2	2
Forward primer (25µM)	1	2
Reverse primer (25µM)	1	2
dNTP (1 mM)*	1	-
DreamTaq DNS polimeráz (5 egység/µl)*	0,2	-
DreamTaq 10x puffer*	5	-
Xceed Taq DNS polimeráz (5 egység/µl)**	-	0,4
Xceed Taq 5x puffer**	-	10
2x desztillált víz	39,8	33,6
Végső térfogat	50	50

4. táblázat: A felmérő vizsgálat során alkalmazott, 35 ciklussal elvégzett PCR kondíciói.

	DNS vírusok	PAstV	CV	PKV	PRVA	PRVB	PRVC
Első denaturálás	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 3 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min
Denaturálás	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec	94 °C 30 sec
Annealing	55 °C 30 sec	45 °C 45 sec	48 °C 40 sec	52 °C 40 sec	52 °C 30 sec	57 °C 30 sec	54 °C 30 sec
Extenzió	72 °C 40 sec	72 °C 45 sec	72 °C 40 sec	72 °C 40 sec	72 °C 40 sec	72 °C 40 sec	72 °C 40 sec
Végső extenzió	72 °C 7 min	72 °C 10 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min

A PCR-t a TGradient Thermocycler (Biometra, Göttingen, Németország) vagy a 2720 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) berendezésekkel végeztük. A PCR termékeket a várható termék nagyságától függően 2%-os (500 bp alatt) vagy 1,5%-os (500 bp felett) sűrűségű agaróz gélen futtattuk, a termékek láthatóvá tételét pedig a GR Safe Nucleic Acid Gel Stain (Excellgen, Rockville, MD, USA) biztosította. A keletkezett termékek nagyságának becsléséhez minden futtatási sorban molekulatömeg markert (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) használtunk.

A felmérő vizsgálatra gyűjtött bélsármintákon kívül az 'A' telepről származó összes bélsármintát, a 'B' telepen gyűjtött összes végbéltampon mintát, valamint a 'C' telep öt bélsármintáját is teszteltük a 2. táblázatban felsorolt vírusokra.

4.2.4. Szekvenálás, szekvencia elemzés

A felmérő vizsgálat során kapott PCR termékek egyharmada, a PEDV N gén PCR megfelelő termékei, valamint két PEDV teljes genom meghatározásához szükséges fragmensek kerültek

szekvenálásra. A termékeket az agaróz gélből az EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Minipreps Kit (Bio Basic, Markham, ON, Kanada) segítségével tisztítottuk ki a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított DNS szekvencia meghatározását a BaseClear B.V. (Leiden, Hollandia) laboratóriumában végezték, a Sanger szekvenálási módszer szerint mindkét irányban. A teljes genom szekvenálás során egyes termékek nem voltak megfelelőek, ezek ismételt szekvenálására a Biomi Kft. (Gödöllő, Magyarország) laboratóriumában került sor. A szekvenciák szerkesztéséhez és elemzéséhez a BioEdit 7.2.5 verzióját (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), valamint a DNASTAR 13 és 15.2 verzióit (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA) használtuk. A lehetséges rekombinációs események felderítéséhez az RDP4 programot vettük igénybe (Martin *et al.*, 2015), melynek eredményeit a SimPlot 3.5.1. verziójú szoftverrel ellenőriztük (Lole *et al.*, 1999).

A PEDV teljes genomok hozzárendelése a GenBank internetes adatbázisából (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) letöltött egyéb szekvenciákhoz, valamint a filogenetikai fák elkészítése a MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) szoftver segítségével történt. Saját szekvenciáinkat feltöltöttük a GenBankba, ahol a PEDV HUN/5031/2016 a KX289955, a PEDV HUN/S236/2018 pedig az MH593900 azonosító számon (Accession Number, Acc. No.) érhető el.

4.3. Szerológiai módszerek

4.3.1. Immunfluoreszcencia – TGEV

Sertés here (swine testis, ST) sejteket szaporítottunk el 37°C-on 10%-os főtális szarvasmarha savóval (foetal bovine serum, FBS; Biowest, Nuaillé, Franciaország) és 0,5%-os antibiotikum-antimikotikum keverékkel (Biowest, Nuaillé, Franciaország) kiegészített komplett Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Bázél, Svájc) tápfolyadékban. A sejteket két 25 cm²-es szövettenyésztő palackra tettük, melyek közül egy a továbbiakban negatív kontrollként szolgált, a másikat pedig megfertőztük a sejthez adaptált Purdue-115 TGEV törzsszel (Tuboly & Nagy, 2001). A fertőzést követő 72 óra múlva, nagyjából 80%-os citopatogén hatás (cytopathogen effect, CPE) elérésekor a palackokat három alkalommal lefagyasztottuk -20°C-ra, majd felengedték szobahőmérsékletre, végül 1250 rcf-fel 10 percig centrifugáltuk, és a sejtmentes, TGEV-t tartalmazó felülúszót felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az így kapott vírusszuszpenzióból tízes alapú hígítási sort készítettünk és hozzáadtuk 96 lyukú lemezekre elszaporított ST sejtekhez, hogy a Spearman-Kärber módszer szerint (Ramakrishnan, 2016) meghatározzuk a szövet 50%-át fertőző dózist (50% Tissue Culture Infective Dose, TCID₅₀), azaz a vírustitert. A TCID₅₀ segítségével beállítottuk, milyen vírus-sejt arány szükséges az immunfluoreszcencia teszt (IFT) működéséhez. Ez alapján egy 96 lyukú lemezre lyukanként 10⁴ ST sejtet tettünk 100 µl komplett DMEM tápfolyadékban, majd 37°C-on

történő 24 órás inkubációt követően 100 µl, 10³ TCID₅₀ vírust tartalmazó komplett DMEM tápfolyadékot mértünk a lyukakba. A fertőzött sejteket újabb 24 óra inkubáció után fixáltuk tömény aceton és etanol 1:1 arányú keverékével, majd a lemezeket hagytuk levegőn megszáradni és -20°C-on tároltuk, ha nem kerültek azonnali felhasználásra.

A szérummintákat 1:4 arányban hígítottuk 0,5%-os szarvasmarha szérum albumint (bovine serum albumin, BSA, EuroClone, Milánó, Olaszország) tartalmazó PBS-ben, majd 37°C-on egy óráig inkubáltuk az előkészített lemezeken pozitív (archív ismert pozitív savó) és negatív (PBS) kontrollokkal együtt. Az inkubációs idő leteltével a lemezeket háromszor mostuk PBS-sel, majd ráértük a gyártó utasításainak megfelelő arányban BSA-s PBS-sel hígított, fluoreszcens festékkel (fluoreszcein-izotiocianát, FITC) jelölt anti-sertés IgG-t (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Újabb 37°C-on történő egy órás inkubáció után a lemezeket háromszor mostuk PBS-sel, majd kontrasztfestésként 0,001%-os csapvízzel hígított Evans kék oldatba merítettük egy percre, végül desztillált vízzel öblítettük. A sejtek festődését Nikon Eclipse 50i (Nikon, Tokió, Japán) mikroszkóppal vizsgáltuk.

A több korcsoportot reprezentáló füzesabonyi sertéstelep pozitív szérummintából kettes alapú hígítási sort készítettünk és újból megvizsgáltuk a specifikus ellenanyagok relatív mennyiségének meghatározása érdekében.

4.3.2. ELISA – TGEV és PRCV

Minden olyan szérummintát, amely a TGEV IFT során pozitívnak bizonyult, teszteltünk az INgezim Corona Diferencial 2.0 (Ingenasa, Madrid, Spanyolország) kit segítségével a gyártó utasításainak megfelelően annak érdekében, hogy elkülönítsük a TGEV és a PRCV ellen termelődött ellenanyagokat.

4.3.3. ELISA – PEDV

A 2018-as PEDV járványkitörésekben érintett 'A' és 'B' telepekről kapott vérmintákat megvizsgáltuk az Ingezim PEDV (Ingenasa, Madrid, Spanyolország) kit segítségével a gyártó utasításai szerint a vírus ellen termelt ellenanyagok kimutatásának céljából.

4.4. Vírusizolálás

A PCR vizsgálatot követően PEDV pozitívnak bizonyult minták felhasználásával kíséreltük meg a vírusizolálást Vero sejteken, kisebb módosításokat végrehajtva a korábban leírt módszeren (Chen *et al.*, 2014).

A 2016-os PEDV esetről a vékonybélmintát használtuk fel a vírusizolálásra, míg a 2018-as eseteknél a következő mintákkal próbálkoztunk: 'A' telep 2 bél-, 2 bélsár- és 2 végbéltampon minta, 'B' telep 3 nyál- és 2 végbéltampon minta, 'C' telep 5 bélsárminta. Borsónyi nagyságú vagy 500 µl-nyi mintát 1 ml komplett DMEM-mel kiegészítve 9391 rcf-fel 5 percig

centrifugáltunk. A felülúszót 0,22 μm átmérőjű szűrőn (Millex-GP, Merck Millipore, Burington, MA) való átengedés után használtuk a sejtek fertőzésére.

A Vero sejteket komplett DMEM-ben szaporítottuk el. A palackokat teljesen benövő sejttenyészeteket PBS-sel kimostuk, majd fertőztük a szűrlet 500 μl -nyi mennyiségével. A fertőzött sejtekhez posztinokulációs médiumot adtunk, mely a komplett médiumhoz képest tartalmazott 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú tripszint (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), de FBS-t nem. Az inokulált sejteket 37 °C-on inkubáltuk 5%-os CO_2 ellátás mellett, és naponta figyeltük a CPE megjelenését. A fertőzést követő hetedik napon vagy a CPE mértékétől függően korábban a palackokat háromszor lefagyasztottuk és felengedtük, az így kapott szuszpenziót pedig a korábban említett (lásd 4.2.2.) PEDV N gén PCR-rel vizsgáltuk a vírusizolálás sikerességének megállapítása érdekében.

4.5. Statisztikai elemzések

A felmérő vizsgálat eredményeinek statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism 7.0 programot (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) használtuk. A hasmenéses és kontroll minták arányainak összehasonlításához a Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztuk. A különböző korcsoportokban a kimutatott vírusok számában lévő eltéréseket khí-négyzet próbával vizsgáltuk meg. Az egyes korosztályok, illetve vírusok közötti kapcsolatokat pedig binomiális eloszlással elemeztük, mely során a nullhipotézis minden esetben a tesztelt csoportok közötti különbség hiánya volt.

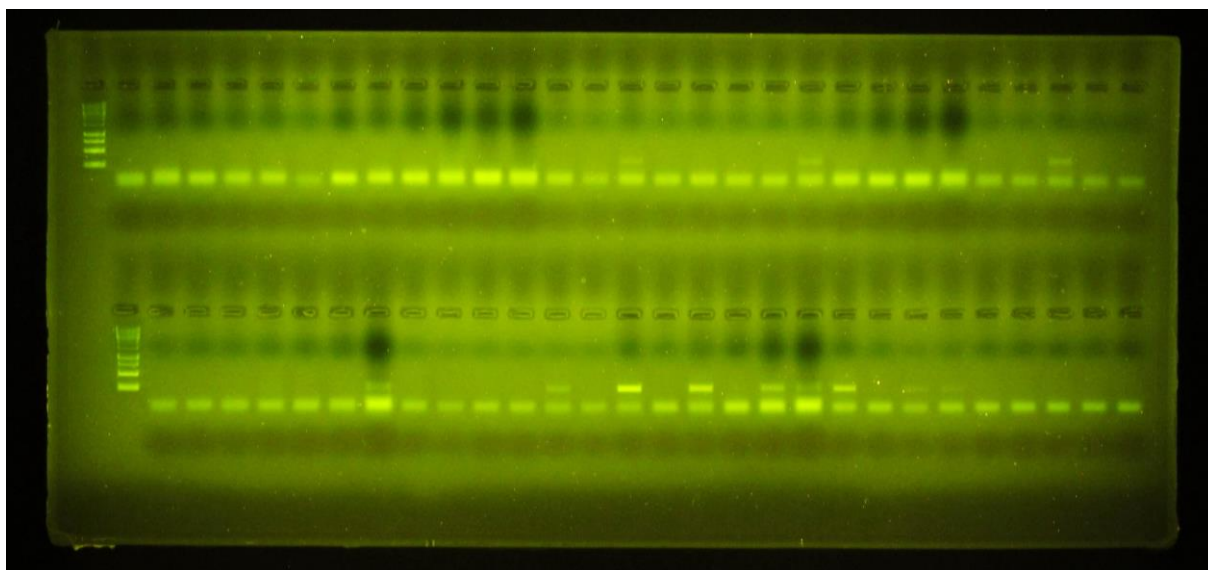
5. EREDMÉNYEK

5.1. Felmérő vizsgálat

5.1.1. PCR rendszerek működése

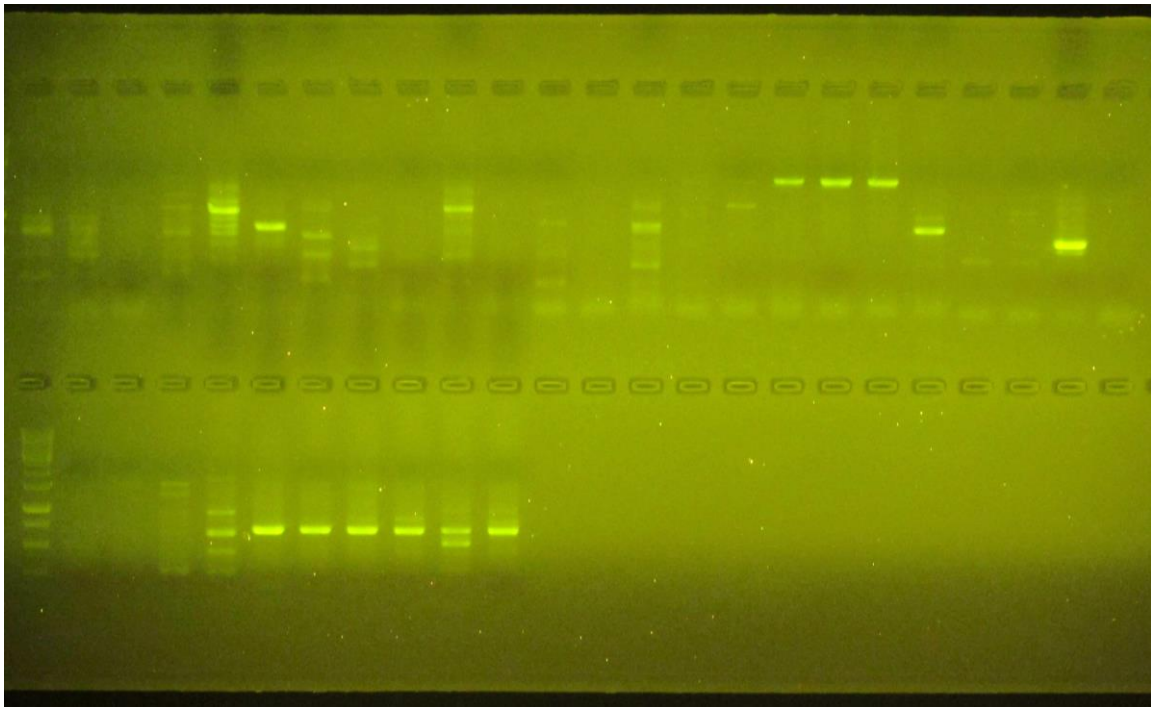
5.1.1.1. Hagyományos PCR

Az elsőként vizsgált minták esetében általában nem álltak rendelkezésre pozitív kontrollok, így a termék mérete alapján állapítottuk meg a pozitivitást, amit később szűrőpróbaszerű szekvenálással ellenőriztünk, az ily módon azonosított vírusok pedig a továbbiakban pozitív kontrollként szolgáltak (12. ábra).



12. ábra: PBoV3-4 kimutatására szolgáló PCR eredménye. A várható termék mérete 310 bp, melynek a bal oldalon látható létra legalsó, 250 bp nagyságú foka felett kell elhelyezkednie.

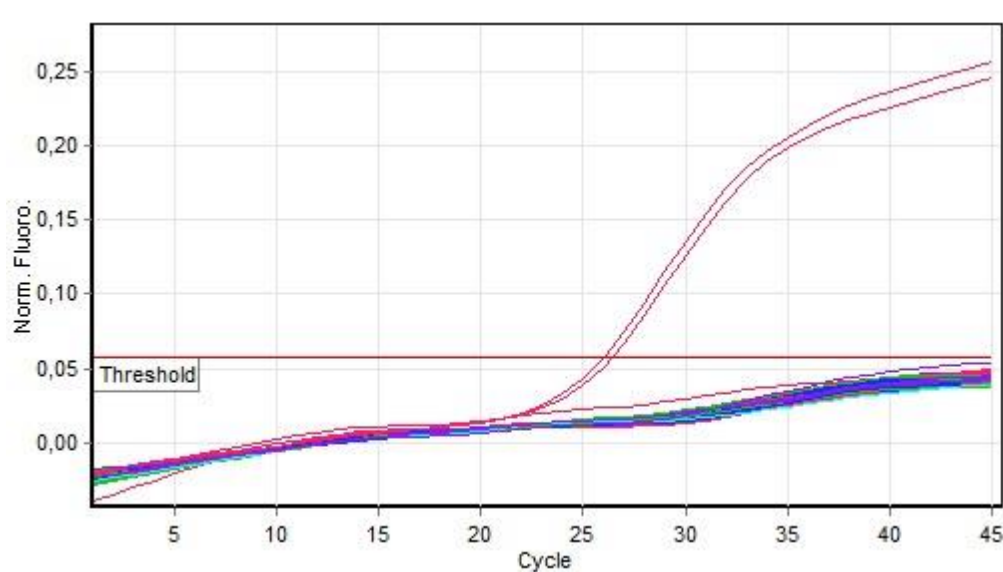
A primer specifikussága szerint az azonosítás a termék mérete alapján nem feltétlenül működött, például PAsTV kimutatásakor tipikusan megjelentek egyéb termékek is, így ebben az esetben szinte minden alkalommal szükséges volt a szekvenálás a biztos eredmény megállapításához (13. ábra).



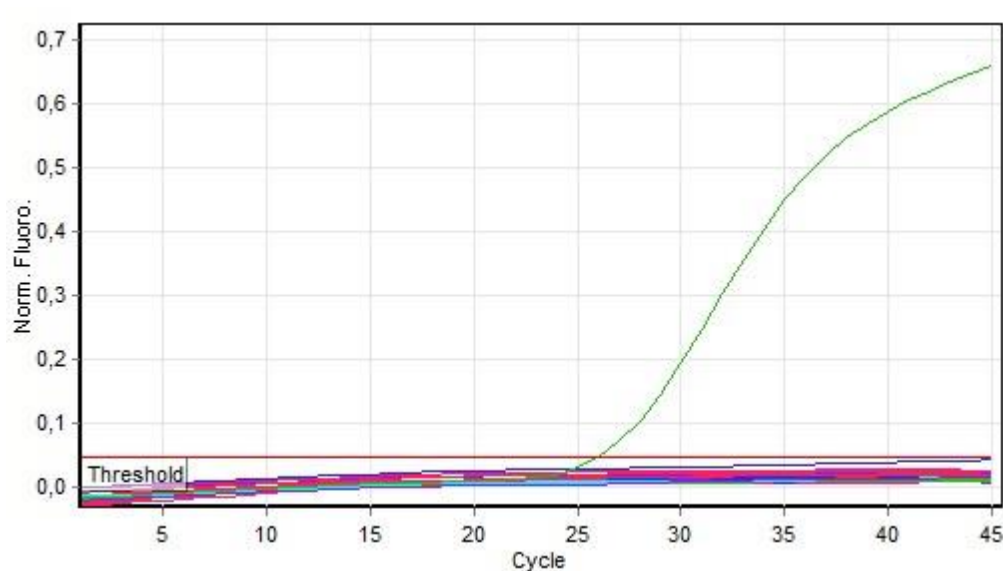
13. ábra: PAsTV kimutatására szolgáló PCR eredménye. A várható termék mérete 799 bp, melynek a bal oldalon látható létra alulról számított harmadik (750 bp) és negyedik (1000 bp) foka között kell elhelyezkednie.

5.1.1.2. Valós idejű PCR

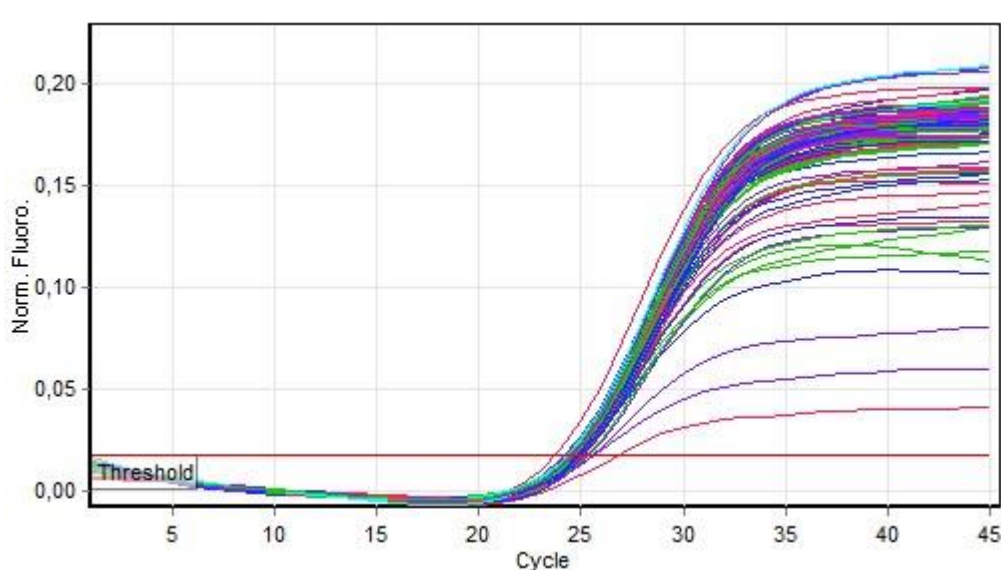
A Vioreal Kit PEDV&SDCV egy triplex valós idejű RT-PCR, mely alkalmazásával a PEDV-et a FAM csatornán (zöld), a PDCoV-t a VIC/HEX csatornán (sárga), a belső RNS kontrollt pedig a Cy5 csatornán (piros) lehet detektálni. A kit analitikai érzékenysége 10 RNS kópia/PCR a PEDV esetén és 2 RNS kópia/PCR a PDCoV esetében. A rendszer alkalmazása során kapott amplifikációs görbéket olyan függvényekkel ábrázolta a rendszer, amelyeknek az x tengelyén a ciklusok száma (Cycle), y tengelyén pedig a fluoreszcencia mértéke (Norm. Fluoro) szerepelt, valamint feltüntetésre került a küszöbérték (Threshold). Azt a ciklust, ahol a görbe eléri ezt a küszöbértéket, küszöb ciklusnak (Threshold Cycle, Ct) nevezzük, melynek a PEDV és PDCoV pozitív kontrollok esetében 26-29 közötti értékűnek kellett lennie (14-16 ábra).



14. ábra: FAM csatorna mérési eredménye. A két PEDV pozitív kontroll amplifikációs görbéje lépi át a küszöbértéket.

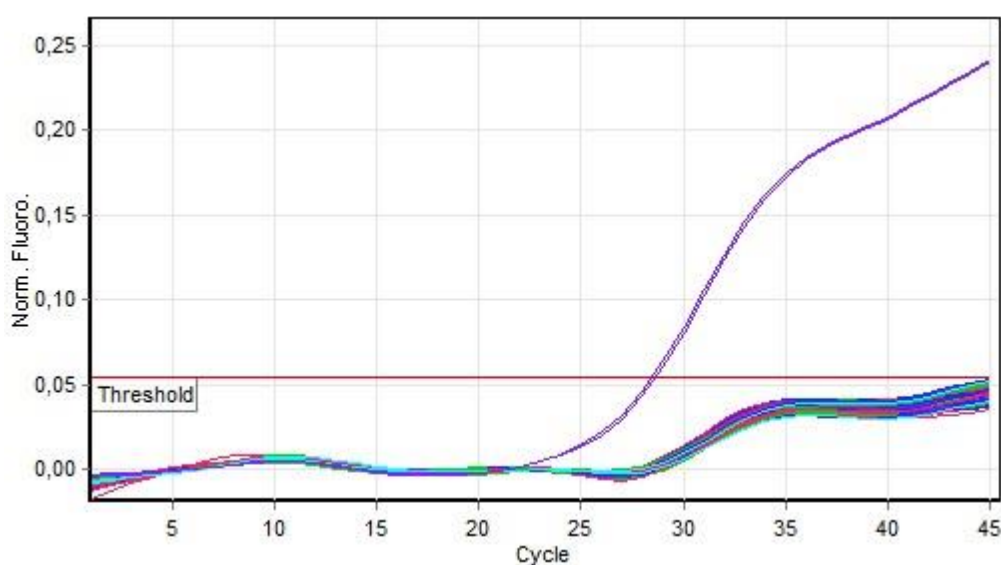


15. ábra: VIC/HEX csatorna mérési eredménye. A PDCoV pozitív kontroll amplifikációs görbéje lépi át a küszöbértéket.



16. ábra: Cy5 csatorna mérési eredménye. A belső RNS kontroll minden vizsgált minta esetében meghaladja a küszöbértéket.

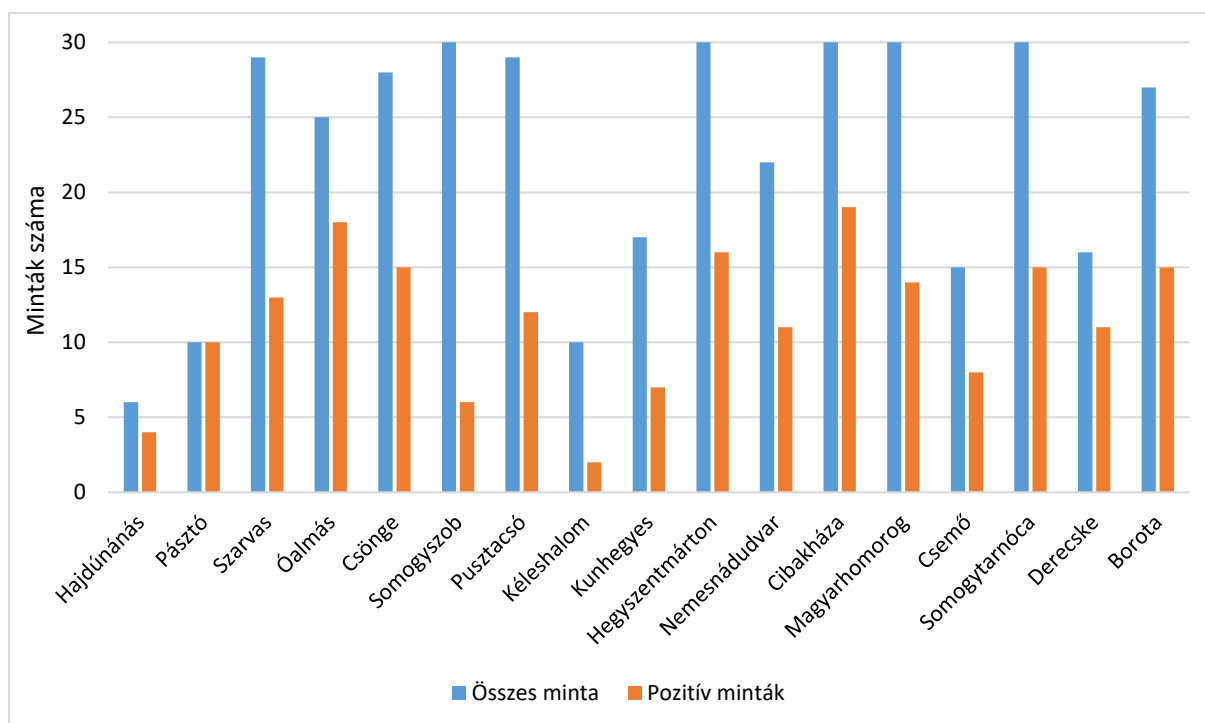
A Vioreal Kit TGEV egy duplex valós idejű RT-PCR, melynek az alkalmazása során a TGEV-t a VIC/HEX csatornán (sárga), a belső RNS kontrollt pedig a Cy5 csatornán (piros) lehet detektálni. A kit analitikai érzékenysége 3 RNS kópia/PCR. A Ct értékek a TGEV pozitív kontroll esetén 25-28, a belső RNS kontroll esetében 26-29 közé kellett esnie (17. ábra).



17. ábra: VIC/HEX csatorna mérési eredménye. A két TGEV pozitív kontroll amplifikációs görbéje lépi át a küszöbértéket.

5.1.2. PCR vizsgálatok eredménye

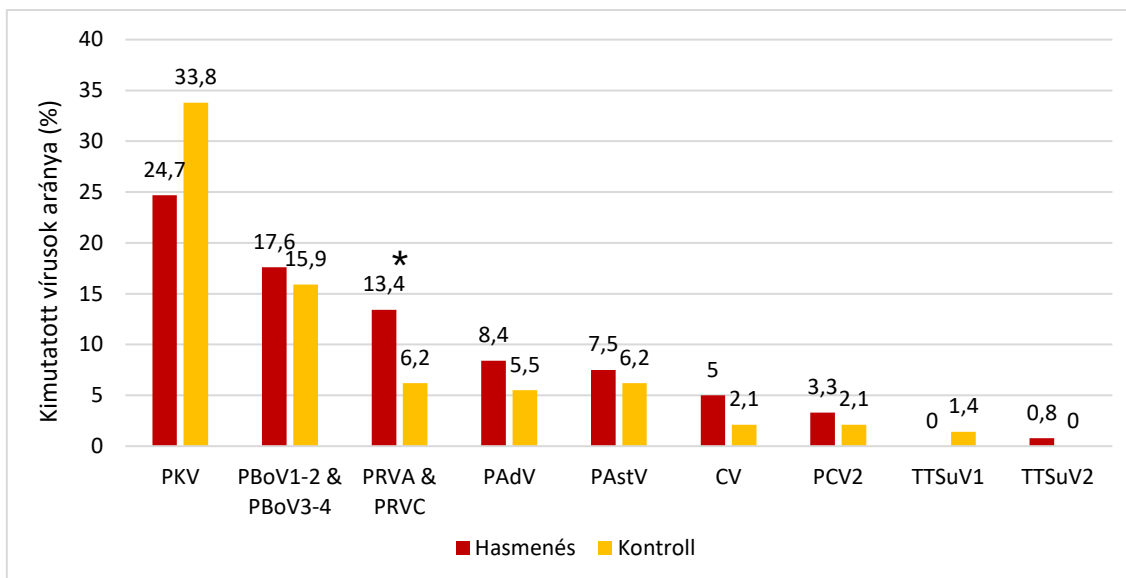
A 384 bélsármintából 196 esetben, azaz a minták 51%-ában mutattunk ki legalább egy vizsgált vírust. A valamelyik vizsgált vírussal fertőzött minták mennyiségét az összes mintához viszonyítva, telepi bontásban a 18. ábra mutatja.



18. ábra: A felmérő vizsgálatban részt vevő 17 sertéstelep legalább egy vizsgált vírussal fertőzött pozitív mintáinak száma az összes mintához viszonyítva.

Az összes pozitív mintát tekintve szignifikánsan magasabb ($p < 0,0001$) volt az egyféle vírus okozta fertőzés a kevert fertőzéssel szemben, ugyanakkor minden kimutatott vírus előfordult kevert fertőzésben is. A 196 pozitív mintából 126 esetben csak egy vírust mutattunk ki, 70 esetben pedig kevert fertőzést találtunk, mely során az esetek 63%-ában kettő, 27%-ában három, 10%-os arányban pedig négy különböző vírust találtunk egy mintában. Leggyakrabban, összesen 108 esetben kobuvírusokat mutattunk ki, vagyis a pozitív minták 55,1%-ánál fordultak elő. Gyakorisági sorrendben másodikként a PBoV1-2 és a PBoV3-4 szerepelt együtt 33,2%-os arányban, melyet a PRVA és a PRVC együttes gyakorisága követett 20,9%-kal. A többi vizsgált vírus előfordulása nem érte el a 15%-ot az összes pozitív mintához viszonyítva (PAdV – 14,3%, PAstV – 13,8%, PCV2 – 7,7%, CV – 5,6%, TTSuV1 – 1,0%, TTSuV2 – 1,0%). Coronavírusokat (TGEV, PEDV, PDCoV) és PRVB-t a felmérő vizsgálat céljából elemzett minták között egy esetben sem találtunk.

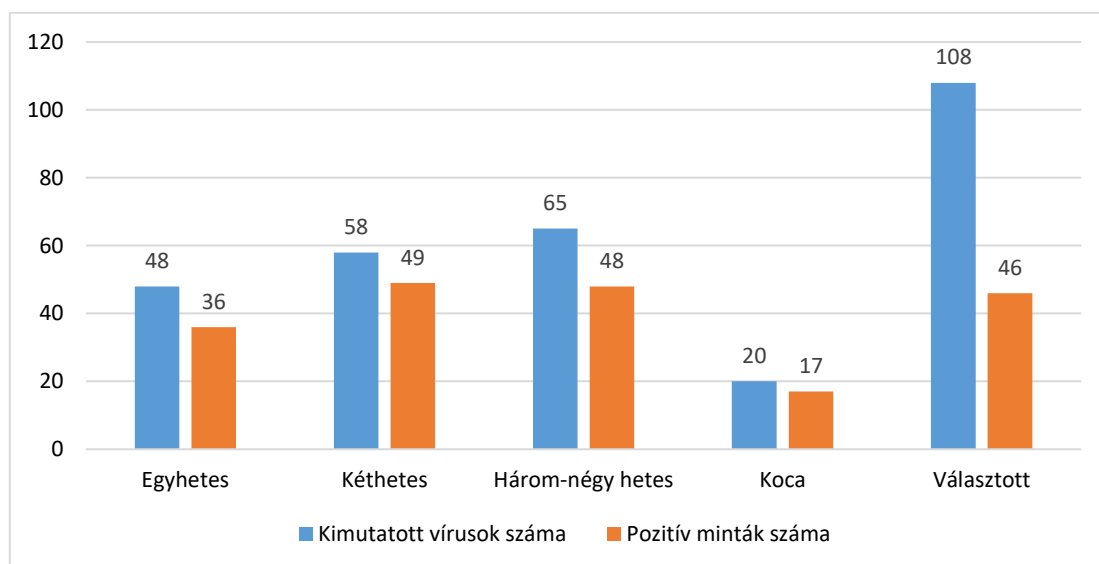
A pozitív minták 63,8%-a hasmenéses állatokból származott és a TTSuV1 kivételével minden vizsgált vírus esetén darabszám szerint magasabb értékek mutatkoztak a hasmenéses mintákban. Ugyanakkor, az összes hasmenéses (239) és kontroll (145) mintához viszonyítva elvégzett korrekcióval a PKV esetén már magasabb előfordulási gyakoriság volt látható a kontroll csoportban és csak PRV esetén volt kimutatható szignifikáns különbség ($p = 0,0275$) a hasmenéses mintákban történt detektálás javára (19. ábra).



19. ábra: A felmérő vizsgálat PCR-pozitív mintáinak megoszlása vírusok (x tengely) és egészségügyi státusz (y tengely) alapján.

* Szignifikánsan magasabb ($p=0,0275$) arány a hasmenéses mintákban a kontrollhoz viszonyítva.

Az egyes korosztályokat tekintve a legalább egy vizsgált vírust tartalmazó pozitív minták aránya csökkenő sorrendben a három-négy hetes malacok esetében 69,6% (48/69), a kéthetes malacoknál 64,5% (49/76), a választott malacoknál 63,9% (46/72), az egyhetes malacoknál 40,4% (36/89), míg a kocaik esetében 21,8% (17/78) volt. A pozitív minták arányában nem volt szignifikáns különbség az egyes korcsoportok között, a kimutatott vírusok száma azonban összességében szignifikáns eltérést ($p<0,0001$) mutatott, valamint az egyes csoportok egymáshoz való viszonyítása során is csak a kéthetes és a három-négy hetes malacok csoportja között nem volt jelentős különbség e tekintetben (20. ábra).



20. ábra: A kimutatott vírusok és a pozitív minták számának összehasonlítása korcsoportonként.

A legtöbb, összesen 108 vírus a választott malacok csoportjában fordult elő és ebben a korcsoportban volt a leggyakoribb a kevert fertőzés is a pozitív minták számához viszonyítva

76,1%-os arányban. A szopós malacok esetében az egy vírus okozta fertőzés volt gyakoribb, kevert fertőzés az egyhetes malacoknál 30,6%-os, a kéthetes malacoknál 16,3%-os, a három-négy hetes malacok esetén pedig 29,2%-os arányban fordult elő. A legkevesebb, mindösszesen 20 vírust a kocák csoportjában mutattuk ki és a kevert fertőzések aránya is ebben a korosztályban volt a legalacsonyabb 11,8%-os gyakorisággal.

A leggyakrabban előforduló PKV jellemzően a szopós malacok mintáiból származott és szignifikánsan kevesebbszer ($p < 0,0026$) mutattuk ki választott malacokból, kocákban pedig egyáltalán nem detektáltuk. A második leggyakoribb PBoV ezzel ellentétesen szignifikánsan magasabb ($p < 0,0001$) arányban fordult elő választott malacokban a többi korcsoporthoz képest. A harmadik leggyakoribb PRV esetén pedig a többi csoporthoz képest csak az egyhetes malacok esetén találtunk jelentősebb eltérést ($p = 0,0029$), amely korosztályban egyedül fordult elő PRVC.

Az eredményeket az 5. táblázat foglalja össze, feltüntetve az egyes korcsoportok, a vizsgált vírusok és az egészségügyi státusz kapcsolatát. Az egyes minták részletes adatait telep bontásban a 3. melléklet tartalmazza.

5. táblázat: A felmérő vizsgálat PCR-pozitív mintái (darab) korcsoport és vírus szerint összesítve, zárójelben a hasmenéses és tünetmentes állatokból származó minták aránya.

Vírus	Egyhetes malacok	Kéthetes malacok	Három-négy hetes malacok	Kocák	Választott malacok	Összesen
PAdV	2 (1:1)	4 (3:1)	7 (7:0)	2 (0:2)	13 (9:4)	28 (20:8)
PAstV	1 (0:1)	1 (0:1)	6 (3:3)	1 (0:1)	18 (15:3)	27 (18:9)
PBoV1-2	0	2 (2:0)	0	4 (2:2)	19 (15:4)	25 (19:6)
PBoV3-4	1 (0:1)	1 (0:1)	4 (1:3)	12 (6:6)	22 (16:6)	40 (23:17)
CV	0	1 (1:0)	3 (3:0)	0	11 (8:3)	15 (12:3)
PKV	28 (15:13)	36 (19:17)	35 (20:15)	0	9 (5:4)	108 (59:49)
PCV2	0	1 (1:0)	3 (2:1)	1 (1:0)	6 (4:2)	11 (8:3)
PRVA	9 (7:2)	11 (6:5)	6 (6:0)	0	8 (8:0)	34 (27:7)
PRVC	7 (5:2)	0	0	0	0	7 (5:2)
TTSuV1	0	1 (0:1)	1 (0:1)	0	0	2 (0:2)
TTSuV2	0	0	0	0	2 (2:0)	2 (2:0)
Összesen	48 (28: 20)	58 (32: 26)	65 (42: 23)	20 (9:11)	108 (82:26)	299 (193: 106)

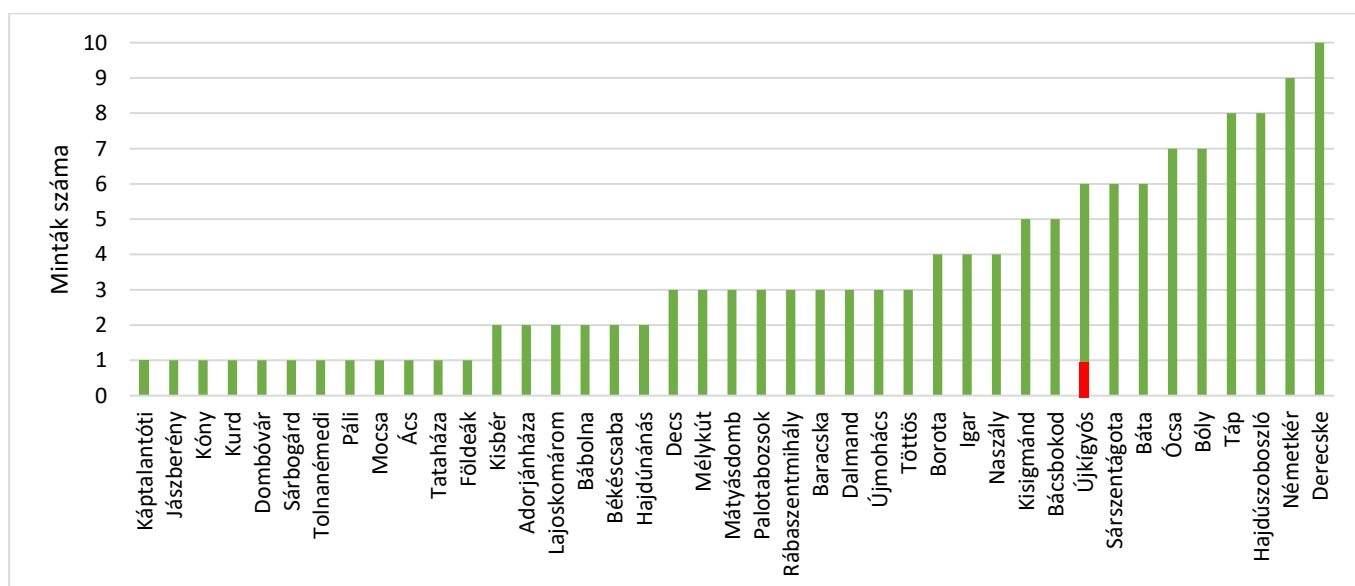
5.2. TGEV szerológia

A vizsgált 93 sertéstelep közül legalább egy pozitív minta fordult elő 41 telep esetében, melyek az országban nagyjából egyenletesen oszlottak el, halmozódás nem volt megfigyelhető (21. ábra).



21. ábra: Szérumminták származási helye a TGEV szerológia eredményének függvényében. A piros jelölés a sertés telepen a pozitív minta előfordulását, a fehér ennek hiányát jelzi. A pozitív archiv minták származási helye kékkel jelölve.

A vizsgált 908 szérumminta közül összesen 140 volt pozitív IFT-vel. A TGEV és PRCV között különbséget tevő ELISA alapján egyetlen TGEV pozitív minta kivételével az IFT pozitív minták mindegyike PRCV ellen termelt antitestet tartalmazott. Három minta esetében az ELISA teszt először negatív eredményt adott, majd ismételt vizsgálattal ezek a minták is PRCV pozitívnak bizonyultak. A legalább egy mintára pozitív telepek esetében Adorjánháza (8), Decs (8) és Borota (9) kivételével tíz szérumminta képezte a vizsgálatok alapját. Az IFT és az ELISA vizsgálatok összesítését a 21. ábra mutatja be, az IFT eredménye pedig számszerűsítve a 2. mellékletben is szerepel.



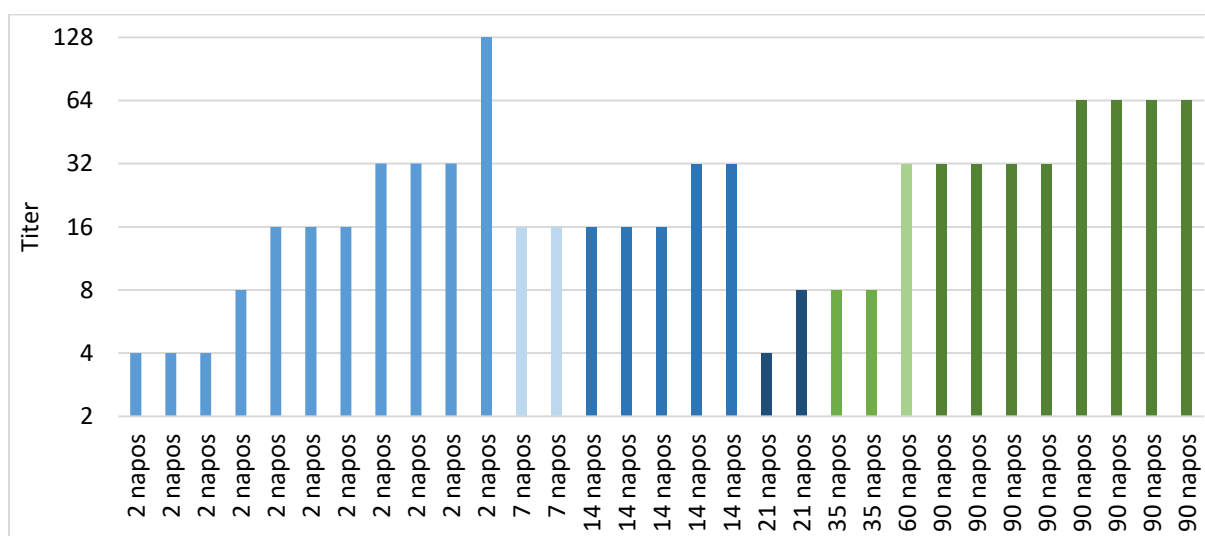
22. ábra: Anti-TGEV pozitív szérumminták száma telepenként. A zöld szín a PRCV, a piros a TGEV elleni antitesteket tartalmazó mintákat jelöli.

A több korcsoportot lefedő archív minták közül csak Füzesabony esetén találtunk pozitív mintákat előzetes vizsgálatunk során (22. ábra), ezért ennek a telepnek mind a 174 mintáját megvizsgáltuk, melyek közül 31 minta lett pozitív a szopós malacok korosztályának dominanciájával (6. táblázat).

6. táblázat: Füzesabonyból származó összes és TGEV IFT-vel pozitív szérumminta korcsoport szerinti megoszlásban.

Kor	Összes minta	TGEV IFT pozitív
2 napos	15	11
7 napos	15	2
14 napos	15	5
21 napos	15	2
28 napos	15	
koca	10	
35 napos	15	2
42 napos	15	
60 napos	15	1
90 napos	15	8
120 napos	14	
150 napos	15	
Összesen	174	31

A pozitív minták titere viszonylag alacsony, átlagosan 28,4 volt 1:4 és 1:128 közötti szélső értékekkel (23. ábra). A differenciáló ELISA mindegyik mintát PRCV pozitívnak mutatta.



23. ábra: A füzesabonyi sertéstelep szérummintáinak kvantitatív IFT eredménye. Az egyes korcsoportok pozitív mintái titer szerint emelkedő sorrendben, a szopós malacok mintái a kék, a választás utáni sertések a zöld szín árnyalataiban.

5.3. PEDV esetekhez kapcsolódó eredmények

5.3.1. PCR

5.3.1.1. PEDV eset 2016-ban

A 2016-os eset során gyűjtött 12 végbéltampon minta közül öt volt pozitív PEDV-re, melyet az elhullott malac vékonybeléből szintén kimutattunk. A vékonybélminta begyűjtése során végzett kórbonctani és kórszövettani vizsgálat alkalmával akut gastroenteritist és erőteljes kiszáradást figyeltünk meg a vékonybélbolyhok atrófiája és a Lieberkühn-kripták hiperpláziája mellett.

5.3.1.2. PEDV esetek 2018-ban

Az 'A' telepen a vérmintákat leszámítva összesen 85 mintát gyűjtöttünk, ebből 26 bizonyult PEDV pozitívnak a valós idejű PCR során, reprezentálva minden korosztályt. A bélsárminták közül 12, a végbél- és környezeti tamponminták közül pedig hét-hét volt pozitív. A felmérő vizsgálat során keresett vírusokra szintén vizsgált, összesen 30 db bélsárminta közül öt esetben találtunk kevert fertőzést PEDV-vel, míg tíz minta PEDV-re nem, csak egyéb vírusokra volt pozitív. Az 'A' telep PEDV-re és egyéb vírusokra végzett PCR, valamint ELISA vizsgálatainak eredményeit a 4. mellékletben foglaltuk össze.

A 'B' telepen gyűjtött 31 nyálminta negatív volt a helyszínen elvégzett WITNESS PED-TGE-Rota gyorseszttel és a 'B1' egységből származó minták PEDV PCR-rel is negatívak lettek, de a 'B2' egységben gyűjtött 25 nyálminta közül öt ezzel a módszerrel pozitívnak bizonyult. Ezen kívül a 'B2' egység mintáiból hét végbél- és 14 környezeti tamponminta is pozitív lett, érintve minden vizsgált kutricát. Az egyéb vírusokra is tesztelt 25 végbéltampon minta közül négy csak PEDV-re, három PEDV-re is, kilenc pedig csak más vizsgált vírusokra lett pozitív (7. táblázat).

A 'C' telepről származó hat hulla diagnosztikai célú boncolása során két tetemnél jegyezték fel nagymértékű vízszerű tartalmat az állatok vékonybelében, de az összes esetben egyéb kórképet (bronchopneumonia, endocarditis, kizáródott köldöksérv, bélcsavarodás, nyelőcső tájéki gyomorfekély) állapítottak meg az elhullás okaként. A kórbonctani vizsgálat során elvégzett WITNESS PED-TGE-Rota gyorseszttel öt állat esetén pozitív lett, melyet a PEDV PCR megerősített. Mind az öt vizsgált minta tartalmazott a PEDV-en kívül egyéb vírusokat is (7. táblázat).

7. táblázat: A 2018-as PEDV esetekben érintett 'B' farm végbéltampon- és 'C' farm bélsármintáinak vizsgálati eredményei darabszámokban.

	PEDV	Egyéb vírusok a PEDV mellett	Egyéb vírusok PEDV nélkül
B telep 25 minta	7	AstV (1) BoV3 (3)	AdV (2) BoV3 (7) CV (1) KV (2)
C telep 6 minta	5	KV (2) PCV2 (4) TTV1 (2) TTV2 (3)	-

A PEDV N génre irányuló PCR során a 2018-as esetekben érintett három telep mintái egymással és a 2016-ból származó vékonybél mintával összehasonlítva 99,4% és 99,7% közötti azonosságot mutattak.

5.3.2. Szerológia

Az 'A' telepen gyűjtött 40 vérminta közül 34 tartalmazott PEDV specifikus ellenanyagokat. A négy hetes malacok és a kocasüldők mindegyike pozitív volt, míg a kanok, kocák és egy hetes malacok korcsoportjain belül előfordult néhány negatív minta (4. melléklet).

A 'B' telepen gyűjtött 25 vérminta mindegyike pozitív lett a PEDV ellen termelt ellenanyagok detektálására irányuló ELISA során.

5.3.3. Vírusizolálás

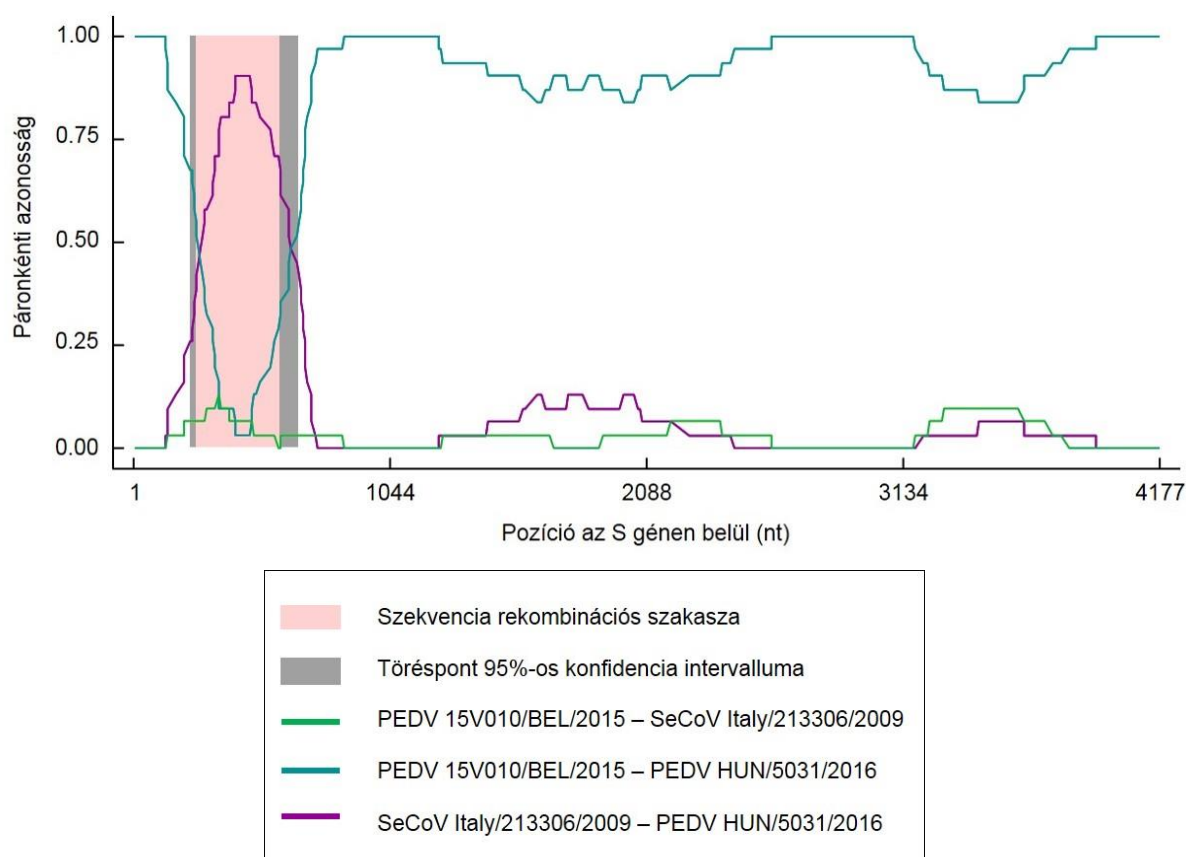
A 2016-os PEDV eset során gyűjtött vékonybél mintából kiindulva felállítottuk a sejteket sikeresen fertőző, egyúttal a vírus kinyerését is biztosító módszert (lásd 4.4.), melynek eredményeként a fertőzést követően legkorábban 48 óra múlva kezdtek láthatóvá válni a CPE első jelei. Kezdetben a sejtek lekerekedése és leválása volt jellemző, majd ezek arányának növekedésével párhuzamosan a sejtek összezsugorodása, óriássejtek kialakulása volt megfigyelhető.

A 2018-as esetekből kiválasztott, a valós idejű PCR során magasabb kópiaszámot mutató 16 különböző mintából csak a 'C' telep három mintája esetében volt sikeres a vírusizolálás, noha több esetben megfigyeltünk az előbbieken tárgyalt CPE-t, de a vírust nem sikerült kinyerni.

5.3.4. Szekvencia elemzés, filogenetika

A 2016-os PEDV esetet követően a vírusizolálás kezdeti nehézségei miatt a PCR fragmensekből történő teljes genom összeállítást a vékonybél mintából kiindulva hajtottuk végre. Az így kapott PEDV HUN/5031/2016 magas, 99% feletti nukleotid (nt) egyezést mutatott

2014-2015-ből származó európai vírusokkal. A legmagasabb, 99,6%-os hasonlóságot az akkor elérhető PEDV szekvenciák közül a franciaországi FR/001/2014 (Acc. No.: KR011756) vírussal mutatta, az eltérés az összes kódoló régiót tekintve 85 nt volt, ebből 54 az S génen belül fordult elő, mely a transzlációt követően 16 aminosavnyi (aa) különbséget okozott. Az S génen belüli eltérések egy nagyjából 400 nt hosszú szakaszon koncentráálódtak, mely 95-96%-os hasonlóságot mutatott SeCoV-okkal, míg az előbb említett európai PEDV-ek esetében ugyanez az arány 90% környékén mozgott. Annak érdekében, hogy megállapítsuk, történt-e rekombináció ezen a szakaszon az elérhető összes európai PEDV, három-három alacsony és magas patogenitású amerikai PEDV, három-három alacsony és magas patogenitású ázsiai PEDV, valamint az olasz- és németországi SeCoV S gén szekvenciáit illesztettük és teszteltük az RDP4 programmal. A kérdéses szakaszon a 248 és 640 nt pozíciók között az RDP4 szignifikáns ($p < 0.05$) rekombinációs eseményt mutatott ki a PEDV 15V010/BEL/2015 (major parent, Acc. No.: KR003452) és az SeCoV Italy/213306/2009 (minor parent, Acc. No.: KR061459) részvételével (23. ábra). A SimPlot program szintén jelezte, hogy lehetséges rekombinációs eseményre talált bizonyítékot, megerősítve az RDP4 eredményét.

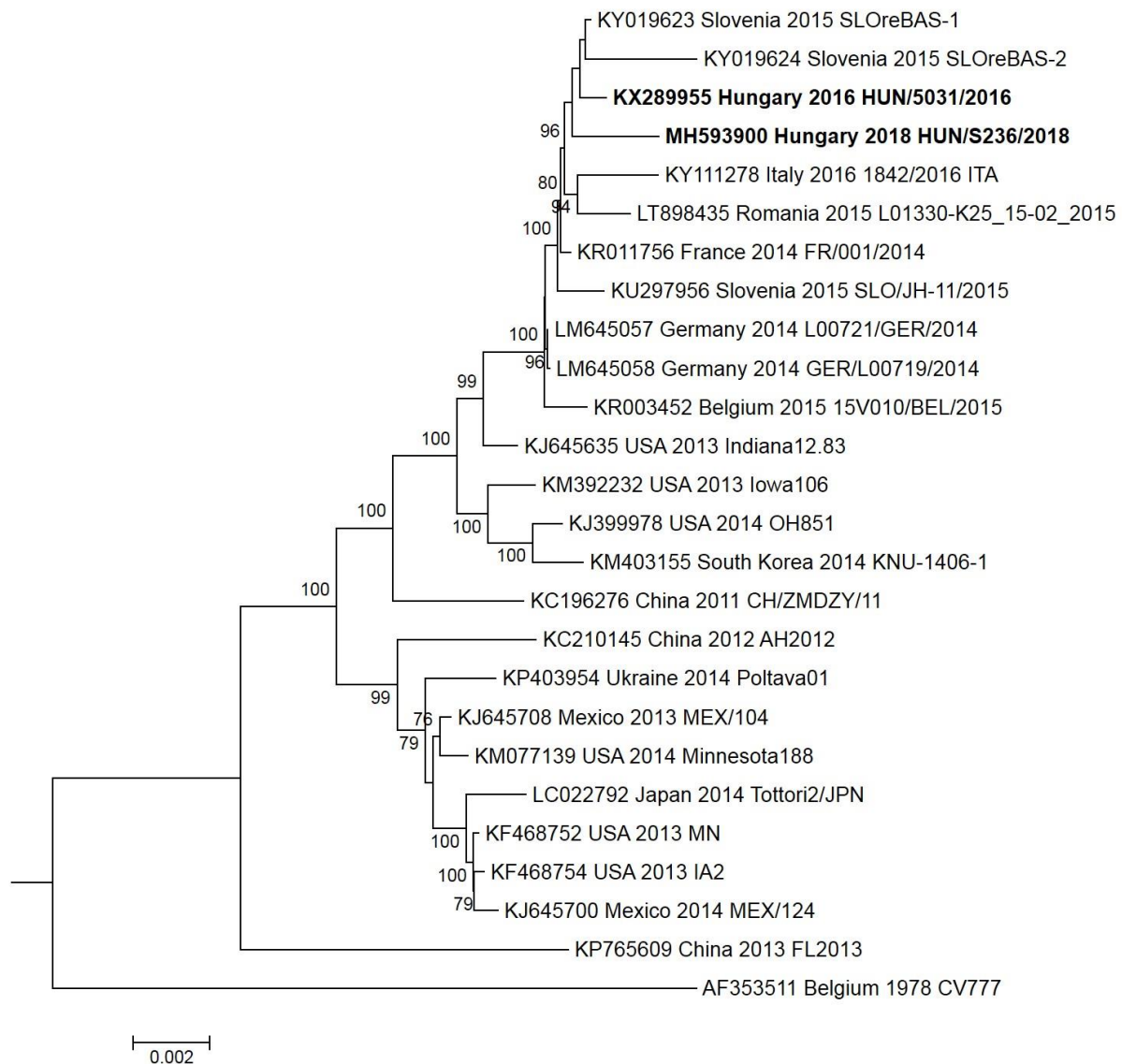


24. ábra: Detektált rekombináció a PEDV HUN/5031/2016 S génjében.

A teljes genom szekvenálás végrehajtásához kiindulási anyagként ideálisabb a mintához képest a vírusizolátum, mely egyéb mikroorganizmusok jelenléte nélkül nagy mennyiségben

tartalmazza a vírust, ezért a 2018-as eseteknél azt a vírust választottuk ki teljes genom szekvenálásra, amely a vírusizolálás eredményességét ellenőrző PEDV N gén PCR során a legerősebb pozitivitást mutatta. Az izolált PEDV HUN/S236/2018 a legmagasabb, 99,6%-os nt hasonlóságot a korábbi magyarországi PEDV HUN/5031/2016 törzzsel és a SLOreBAS-1/2015 (Acc. No.: KY019623) vírussal mutatta, némileg elkülönülve a többi európai S INDEL PEDV-től. Az S gén vizsgálatokor hasonló eredményre jutottunk, a legmagasabb, 99,5%-os egyezést ugyanezen vírusok esetében tapasztaltuk, míg más PEDV-ek esetében ez az érték nem érte el a 99%-ot. A különbség még kifejezettebb volt azon szakasz vizsgálatokor, amely a PEDV HUN/5031/2016 esetében rekombinánsnak bizonyult. Itt a PEDV HUN/S236/2018 99,1%-os azonosságot mutatott az előbbieken említett két vírussal, 98,8%-ot egy másik szlovéniai PEDV-vel (SLOreBAS-2/2015, Acc. No.: KY019624), 95%-ot olaszországi (Acc. No.: KR061459) és németországi (Acc. No.: LT545990) SeCoV-okkal, egyéb európai PEDV esetén pedig a hasonlóság nem érte el a 89%-ot. Ebben az esetben is végeztünk az S génre irányuló rekombináció analízist, melyhez a korábban illesztett szekvenciákat kiegészítettük az azóta megjelent európai, valamint a 2016-os magyarországi PEDV szekvenciákkal. Az elemzés során az RDP4 jelezte a rekombináció lehetőségét a PEDV HUN/S236/2018 esetében, de a 2016-os esettel szemben nem volt egyértelmű az eredmény, a program a szülő vírusok eredetét ismeretlenként jelölte meg. A SimPlot a 2016-os esettel megegyezően detektálta rekombinációs esemény lehetőségét.

A magyarországi PEDV törzsek világviszonylatban történő ábrázolásához filogenetikai törzsfát hoztunk létre a teljes genom alapján (25. ábra). Hasonló eljárással próbáltunk törzsfát felállítani az S gén alapján is, ebben az esetben azonban feltehetően a rekombináció torzító hatása miatt nem sikerült az egyes vírusok közti viszonyokat hűen tükröző fa generálása.



25. ábra: 26 reprezentatív PEDV teljes genom felhasználásával, a legnagyobb valószínűség („Maximum likelihood”) módszere szerint készült távolság alapú („Neighbor joining”) filogenetikai fa. A fa elágazásain az ún. „bootstrap” eljárás során alkalmazott 1000 ismétlés értékei (>70) láthatók. Az egyes szekvenciákat a vírus neve, származásának országa és évszáma, valamint a génbanki hozzáférhetőség száma jelzi. A két magyarországi vírus félkövér betűtípussal kiemelve.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A sertés enterális megbetegedésével összefüggő vírusok prevalenciája

Két év leforgása alatt összesen 384 bélsármintát gyűjtöttünk Magyarország 17 sertéstelepéről, hogy meghatározhassuk sertésekben a hasmenéssel összefüggő vírusok előfordulásának gyakoriságát. Korábbi tanulmányokban jellemzően magas arányban mutatták ki vírusok jelenlétét az enterális kórképek hátterében, bár a vizsgált vírusok köre eltér az egyes beszámolókból. Egy 985 hasmenéses malac vizsgálatán alapuló felmérés a minták 96,2%-ában talált legalább egy vírust és 75,1% volt a kevert fertőzés aránya, a 324 egészséges állatból származó mintának pedig 63,6%-a volt fertőzött (Zhang *et al.*, 2013). Más, metagenomikai módszeren alapuló vizsgálat mind a 24 egészséges és 12 hasmenéses sertés mintából mutatott ki valamilyen vírust és csak öt egészséges állatban volt egyféle vírus okozta fertőzés (Shan *et al.*, 2011). Ezzel szemben a mi felmérésünkben nem volt kifejezett a vírusok dominanciája, hiszen a hasmenéses állatokból származó minták 52,3%-a és a tünetmentes sertések mintáinak 49%-a tartalmazott legalább egy vizsgált vírust. Az ellentmondás egyik lehetséges magyarázata az egyes vírusokra nem kellően specifikus primerek használata, melyet azonban cáfol, hogy a szakirodalmi adatok alapján kellő gondossággal kiválasztott primerek megfelelő működését szekvenálással igazoltuk. Ez alól kivételt képez a PRVB, melyet egyetlen mintából sem mutattunk ki, így pozitív kontroll hiányában nem tudtuk megerősíteni a primer működését sem. Az így kapott eredményt mégis érvényesnek tekintjük arra alapozva, hogy a PRVB meghatározásához forrásként használt publikáció (Gouvea *et al.*, 1991) tartalmazza a PRVC kimutatására irányuló leírást is, mely megfelelően működött. A szakirodalmi adatokkal ellentmondó eredmény másik oka lehet a víruspaletta megválasztása is, melynek a bővítésével, például a vizsgálat kiterjesztésével enterovírusokra bizonyára emelkedést tapasztalnánk a prevalencia arányában. Ezen kívül felmerülhet az alacsonyabb vírusterheltség okaként a bélsárminták nem megfelelő szállítása vagy feldolgozásig történő tárolása is. Ugyanakkor, nem találtunk lényeges különbséget az egyes telepek között olyan szempontból, hogy mennyi vírust mutattunk ki telepenként (19. ábra), illetve mennyi idő telt el a minta beérkezése és feldolgozása között. Ez jellemzően a felmérés kezdetén vett igénybe több időt, de például a másodikként vizsgált telep 10 mintájának mindegyikéből mutattunk ki legalább egy vírust. Mindezt figyelembe véve a felmérés végén kapott, a korábbi tanulmányokhoz képest alacsonyabb vírus prevalencia inkább helyi sajátosságnak tekinthető, melyet nagyobb mintaszám tesztelése, illetve több vírusra kiterjedő vagy más módszerrel végzett vizsgálat erősíthetne meg.

Érdekes módon a felmérő vizsgálatra érkezett bélsárminták egyikében sem mutattunk ki koronavírusokat. Ez különösen a PEDV esetében okozott meglepetést számunkra, hiszen a

mintavételt megelőzően fordult elő az utóbbi évek első hazai PEDV járványkitörése, a 2018-as esetek pedig az utolsó mintavételekkel nagyjából egy időben zajlottak. Emiatt számítottunk a vírus felbukkanására a nem kifejezetten diagnosztikai célú mintagyűjtésünkben is, de úgy tűnik, hogy a PEDV növekvő esetszámának ellenére nem terjedt el széleskörűen az országon belül, illetve annak környékén sem, melyet egy 2013 és 2016 között 160 végbéltampon PEDV és TGEV (Salamunova *et al.*, 2018), valamint 2015 és 2017 között 150 végbéltampon PEDV és SeCoV (Mandelik *et al.*, 2018) kimutatására irányuló és negatív eredménnyel végződő szlovákiai tanulmány is alátámaszt. A TGEV klinikai tünetekben is megnyilvánuló utolsó ismert hazai előfordulását 2013-ban jegyezték le (Lőrincz *et al.*, 2014), hiánya jelen vizsgálatunkban felvetette az ellene nyújtott védelmet adó ellenanyagok jelenlétének nagymértékű elterjedtségét, ezért terveztünk e vonatkozásban szerológiai vizsgálatokat, melynek eredményét a 6.2. részben tárgyaljuk részletesen. Az utolsóként vizsgált koronavírus, a PDCoV még nem fordult elő Európában és a mi felmérésünk során sem találtuk meg, noha az USA-ban, Kanadában és számos ázsiai országban is kimutatták már (Mai *et al.*, 2017).

Az összesen 196 pozitív minta 64%-ában fordult elő egyféle vírus okozta fertőzés, mely ismét ellentmondást jelent egyes szakirodalmi adatoknak (Katsuda *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013) és egyúttal annak a hipotézisünknek, hogy a kevert fertőzések prevalenciája magasabb. A jelenség magyarázataként ugyanazon szempontok merülnek fel, mint az alacsonyabb vírusterheltség esetében, felvetve egyéb, például metagenomikai módszerek felhasználásával végzett vizsgálatok kivitelezését a kérdés tisztázására.

A legnagyobb gyakorisággal detektált kobuvírusok az összes pozitív mintát tekintve 55%-ban fordultak elő, amely arány megközelítve korábbi beszámolók eredményeit, egy kínai felmérés 63,3%-os (Yang *et al.*, 2014) és egy szlovák vizsgálat 45%-os (Jackova *et al.*, 2017) gyakorisági adatai közé helyezhető. Egy öt európai országot lefedő prevalencia vizsgálat (Zhou *et al.*, 2016) során 13 egészséges és 37 hasmenéses állatból származó magyarországi mintát is vizsgáltak, melyek 54,5% illetve 92,3%-a volt PKV pozitív, egyenként. Ehhez képest esetünkben 145 tünetmentes állatból származó minta 33,8%-ában, a hasmenéses állatokból vett 239 mintának pedig a 24,7%-ában mutattunk ki PKV-t. Így a felmérő vizsgálatunk eredményeként szám szerint több, de arányaiban tulajdonképpen kevesebb PKV-t mutattunk ki hasmenés tüneteit mutató sertésekből, míg a korábbi magyar felmérés a kis mintaszám ellenére szignifikáns különbséget talált a két különböző egészségügyi státuszú csoport között. A prevalencia adatok viszont nem feltétlenül elegendők a vírus patogenitásának a megállapításához, hiszen a PKV első, szintén magyar vonatkozású leírása is egészséges sertések mintáinak vizsgálatából származott (Reuter *et al.*, 2008), egy cseh tanulmány pedig egészséges állatokból származó 145 bélsár és 51 béltartalom minta vizsgálata során 87,3%-os PKV pozitivitást talált (Dufkova *et al.*, 2013). Ugyanakkor tíz napos malacok kísérleti fertőzését követően megfigyeltek hasmenést, mely bizonyítani látszik a PKV gyulladáskeltő

hatásán keresztül a gastroenteritis kialakításában játszott szerepét (Yang *et al.*, 2015). Felmérő vizsgálatunk során a detektált 108 PKV közül 99 a szopós malacok korcsoportjaiban fordult elő, szignifikáns különbséget mutatva a többi vizsgált korcsoporthoz képest. Így esetenként hozzájárulhatott ezen igazoltan fogékony korosztály megbetegedéséhez, míg a PKV-pozitív, de tünetmentes állatokban a magasabb szintű maternális immunitás nyújthatott védelmet.

A második leggyakrabban, a pozitív minták 33,2%-ában kimutatott vírusok a PBoV-ok voltak, melyeket összesen 65 mintában detektáltunk, ebből 25 esetben (19 hasmenéses, 6 kontroll) PBoV1-2, 40 alkalommal pedig PBoV3-4 (23 hasmenéses, 17 kontroll) pozitivitást mutattunk ki. Ezen prevalencia adatok némileg elmaradnak egy kínai felméréstől (Zhai *et al.*, 2010), melyben 191 klinikai minta 38,7%-a volt PBoV pozitív, ezen belül viszont a leggyakoribb előfordulást légzőszervi tünetekkel érintett választott malacok csoportjában tapasztalták, mely esetünkben a hasmenés vonatkozásában hasonló kor szerinti megoszlást mutatott.

Az enteropatogén rotavírusok előfordulása egy nagyszabású, 7508 hasmenéses mintát vizsgáló amerikai tanulmány során 83% volt (Marthaler *et al.*, 2014a), melyhez képest lényegesen elmarad az esetünkben tapasztalt 13,4%-os arány 239 hasmenéses mintából. Ugyanakkor, a 145 kontroll minta 6,2%-os pozitivitása mégis szignifikáns ($p=0,0275$) különbséget jelentett a két különböző egészségügyi státuszú csoport között, a kapott eredmények pedig összhangban vannak egy másik közép-európai felméréssel, mely során 163 hasmenéses minta 17,2%-a, illetve 251 egészséges állatból származó minta 6,8%-a bizonyult PRVA pozitívnak (Jackova *et al.*, 2017). A pozitív minták között az egyes vírusok gyakorisága a szakirodalmi adatoknak megfelelően alakult, a legtöbb esetben, összesen 34 mintában (27 hasmenéses és 7 kontroll) PRVA-t detektáltunk, míg PRVC vonatkozásában csak hét minta (5 hasmenéses és 2 kontroll) lett pozitív, a legritkább PRVB pedig nem fordult elő.

A többi vizsgált vírus előfordulási aránya a teljes mintaszámhoz viszonyítva nem érte el a 10%-ot sem (PAdV – 7.3%, PAstV – 7.0%, PCV2 – 2.9%, CV – 3.9%, TTSuV1 – 0.5%, TTSuV2 – 0.5%), mely általában elmarad a szakirodalmi adatoktól, egyúttal akadályozza a statisztikai számítások elvégzését és a részletes elemzést. Az adott vírusra pozitív minták gyűjteménye viszont hasznosnak bizonyulhat az intézményben végezhető új, például a kérdéses patogenitású vírusok kórtani szerepének meghatározására irányuló kutatások tervezésekor.

A pozitív esetek elemzését nem a detektált vírus, hanem a vizsgált korosztály felől közelítve megállapítottuk, hogy nem volt jelentős különbség a pozitív minták számában az egyes korcsoportok között, a fertőzések összetettségét illetően viszont már szignifikáns eltérést ($p<0,0001$) tapasztaltunk az összes csoport együttes vizsgálatakor, valamint az egyes csoportok egymáshoz való viszonyítása során a kéthetes és a három-négy hetes malacok

kivételével (20. ábra). A legtöbb, összesen 108 vírust, azaz az összes detektált vírus 36%-át a választott malacok csoportjának 46 mintájából mutattuk ki, vagyis ebben a korosztályban nagy számban fordult elő ko-infekció, ezért feltételezzük, hogy a kevert fertőzések magasabb arányának hipotézise kortól is függhet. Ugyanis a szopós malacok esetében az egyféle vírus okozta fertőzések domináltak, a leginkább jellegzetes módon a kéthetes malacok csoportjában, ahol összesen 58 vírust mutattunk ki 41 egyféle vírus okozta és 8 kevert esetből. A legalacsonyabb pozitív mintaszámok kocák esetében fordultak elő, mely jelzi, hogy a hozzájuk tartozó malacok fertőzöttségének ellenére ritkán alakult ki a kocákban olyan szintű vírushatás, amely detektálható mértékű vírusürítéssel járt volna.

Állategészségügyi szempontból megvizsgálva az eredményeket az összes hasmenéses, illetve kontroll mintához viszonyítva a kategóriáknak megfelelő pozitív esetek aránya 52,3% és 49% körül alakul, egyenként, mely nem jelent lényeges eltérést. Az egyes vírusok előfordulásának gyakoriságát tekintve pedig a rotavírusok kivételével nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a pozitív hasmenéses minták javára a kontrollhoz képest, bár a PKV és a TTSuV1 kivételével magasabb arányt mutattak (19. ábra). Ugyanakkor, a pozitív kontroll minták jellemzően ugyanabból az állatcsoportból kerültek detektálásra, amelyben pozitív hasmenéses mintákat is azonosítottunk, utalva arra, hogy a vírushatás és a vírus ürítése fennmaradhatott a klinikai tünetek megszűnését követően is. Mindezek tükrében a prevalencia felmérés eredményei nem adhatnak egyértelmű választ a sertések enterális megbetegedésével összefüggésben előforduló vírusok patogenitásáról, de fontos támpontként szolgálhatnak az ellenük való védekezés irányának meghatározásához, melyhez természetesen elengedhetetlen az adott sertéstelep sajátosságainak (higiénia menedzsment, takarmányozás stb.) ismerete.

6.2. A TGEV szerológiai felmérése

A TGEV által okozott kórkép az 1990-es években a PRCV megjelenésével párhuzamosan jelentősen visszaszorult, de sporadikusan azóta is előfordul (Laude *et al.*, 1993). Utolsó magyarországi leírása 2013-ból származik, amikor egy járványkitörést követően 14 sertéstelepre kiterjesztett vizsgálat során az eredeti eseten kívül még hét telepen találtak TGEV és PRCV pozitív mintákat (Lőrincz *et al.*, 2014). Ehhez képest az általunk vizsgált 17 sertéstelep egyikén sem detektáltunk TGEV-t, az általunk használt valós idejű PCR viszont a PRCV-t nem mutatja ki. A TGEV detektálásának hiányában azt feltételeztük, hogy hazánkat nagyfokú szerológiai áthangoltság jellemzi akár TGEV, akár PRCV elleni ellenanyagok jelenlétével, melyek védelmet nyújthatnak a hasmenés kialakulásával szemben. Ezt a hipotézist cáfolta, hogy az IFT eredményeként a vizsgált 908 mintának csupán 15,4%-a volt szeropozitív, mely figyelembe véve a vírus kimutatásának hiányát is, nem erősíti meg a TGEV endémiás előfordulását Magyarországon. Ez az alacsony szeroprevalencia összhangban van

egy japán felméréssel, mely során 2703 szérumminta 14,4%-ában találtak vírusneutralizáló ellenanyagokat, melyek közül 78,3% csak PRCV ellen képződött (Miyazaki *et al.*, 2010). Esetünkben szintén a PRCV elleni antitestek domináltak, az IFT-vel pozitív minták közül csupán egyetlen szérumban mutattunk ki anti-TGEV ellenanyagokat (21. ábra). A TGEV-pozitív mintát egy olyan telepen találtuk, ahol öt másik minta PRCV-pozitív lett, így ebben az esetben előfordulhatott, hogy a PRCV ellen képződött protektív ellenanyagok miatt csak egy inapparens TGEV fertőzés alakult ki az állatokban. A több korcsoport vizsgálatának céljával a felmérésbe bevont füzesabonyi telep esetén az országos átlaghoz hasonló eredményre jutottunk, a 174 minta 17,8%-a lett pozitív minden esetben a PRCV elleni antitestek kimutatásával. Érdekes módon a kocák mintáiban nem találtunk ellenanyagokat, bár fontos megjegyeznünk, hogy a szopós malacok és a kocák mintái között nem volt összefüggés, ugyanis a kocák mintái sajnálatos módon később kerültek begyűjtésre. A 31 pozitív minta IFT titere meglehetősen alacsony volt, csupán egy esetben érte el az 1:128 értéket (22. ábra). Ugyanakkor, ez az alacsony érték nem feltétlenül jelenti a TGEV elleni hatékony védekezés hiányát, melyet alapvetően a nyálkahártyákon található sIgA biztosít (Laude *et al.*, 1993). Az IFT-vel pozitív, de ELISA-val vizsgálva először negatív minták magyarázataként szintén az ellenanyagok alacsony relatív mennyisége szolgálhat, mely nem volt elegendő a kit küszöbértékének átlépéséhez. Ezen okból kifolyólag is úgy véljük, hogy a régi és időigényes, de gazdaságosabb IFT módszere alkalmas nagyobb mintaszámok vizsgálatára, melyet a TGEV és PRCV differenciálása érdekében végzett, rövid időn belül eredményt adó, de kevésbé költséghatékony ELISA jól kiegészít.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a TGEV szeroprevalenciája alacsony Magyarországon, ráadásul a viszonylag kevés szeropozitív mintát 41 sertéstelepen találtuk, vagyis sok esetben csak néhány pozitív minta fordult elő egy-egy telepen, melyek esetében nem kizárható akár epidémiás TGE előfordulása, ahogyan az egy japán farmon is történt néhány hónappal a szerológiai felmérést követően (Miyazaki *et al.*, 2010). Ugyanakkor, bár a TGEV okozta járványkitörések világszerte nagyon ritkának számítanak, előfordulásuk valószínűsége viszonylag csekély, de tekintettel arra, hogy a magyar sertésállományok többsége nem rendelkezik a betegség ellen hatékonyan védekezni képes ellenanyagok mennyiségével, fontosnak tartjuk, hogy a hasmenés diagnosztikai palettájából ne hagyjuk ki ezeket a koronavírusokat sem.

6.3. PEDV esetek

6.3.1 Járványügyi nyomozás

A 2016-os PEDV eset egy 60 kocát számláló sertéstelepen zajlott, melyet nem volt alkalmunk részletes járványügyi nyomozásnak alávetni tekintettel arra, hogy a kezdeti diagnózis után a

telep tulajdonosa nem volt hajlandó további együttműködésre, a klinikai tünetek megszűnése után pedig beszüntette tevékenységét. Ezt követően két éven keresztül nem fordult elő újabb eset és a célzott felmérő vizsgálatunk ellenére sem mutattuk ki a vírust, míg újra elő nem bukkant 2018 elején. Az új esetek forrása a 2016-ban felszámolásra került telep nem lehetett, ezért más fertőzési útvonalakat kerestünk. Az 'A' sertéstelep esetében felmerült a néhány héttel a klinikai tünetek megjelenése előtt Dániából importált kanok behozatala, mint lehetséges fertőzési forrás, hiszen ezek az állatok a klasszikus oro-fekális módon kívül a spermával is terjeszthetik a vírust (Gallien *et al.*, 2018). A kanokat exportáló dán sertéstelepen viszont nem fordult elő PEDV, a magyar 'A' telep PEDV pozitív mintáinak N gén vizsgálata pedig nem támasztotta alá a vírus nyugat-európai eredetét. Az 'A' és 'B' telepek között egy vágóhíd jelenti a kapcsolatot, melyre mindkét telepről szállítanak állatokat. A szállító járművek közvetítő szerepét nem lehet kizárni, mégis kevésbé valószínű, hogy a vágóhíd lett volna a fertőzés gócpontja, hiszen az azzal kapcsolatban lévő egyéb telepekről nem jelentettek megbetegedést. A 'C' sertéstelephez viszont nem köthető egyik érintett telep és a vágóhíd sem, viszont ebben az esetben a tulajdonosok hozzájárulásának hiányában nem volt módunk további járványügyi nyomozásra. Végeredményben a világszerte előforduló legtöbb PEDV esethez hasonlóan nem sikerült megállapítani a vírus egyes sertéstelepekre történő bejutásának pontos módját.

6.3.2. Különböző minták molekuláris biológiai és szerológiai vizsgálata

A 2016-os eset végbéltampon mintáinak közel fele pozitív lett PEDV PCR során, de az eljárás után fennmaradó mennyiség nem volt elegendő további vizsgálatok elvégzésére, melyekhez így az elhullott állatból vett vékonybél mintát használtuk.

A 2018-as esetek során az 'A' és 'B' sertéstelepekről volt lehetőségünk különböző típusú minták begyűjtésére, melyek az 'A' telep esetén korosztály szerint is eltértek. Az 'A' telepen ugyanazon állatoktól bélsár- és végbéltampon mintákat is gyűjtöttünk, melyeket összehasonlítva a bélsár minták között több lett a pozitív, ezen belül pedig a vírus magasabb kópiaszámban volt megtalálható. Így a végbéltampon kiáztatása után kapott, kevés vizsgálatra elegendő mennyiség mellett még fontosabb szempont ezen mintatípus választása ellen, hogy használatával kevésbé lehet megtalálni a vírusürítő állatokat. A 'B' telepen nyálmintákat is gyűjtöttünk, melyek közül PCR segítségével mutattunk ki néhány pozitív mintát, de a WITNESS PED-TGE-Rota gyorseszteszt ezeket is negatívnak mutatta, mert feltehetően nem volt a mintában a teszt kimutathatósági határértékét meghaladó mennyiségű vírus. Mindezeket figyelembe véve a PEDV diagnosztikájához a bélsárminták gyűjtését és vizsgálatát javasoljuk. Az 'A' telepen, a kocák kivételével, minden korcsoportban találtunk pozitív bélsármintákat amellet, hogy az állatok többségének a szérummintája is pozitív volt (4. melléklet). Ez azt jelenti, hogy hiába telt el négy hét az első klinikai tünetek megjelenése óta, mely idő alatt az

állatok többsége protektív ellenanyagokat is elkezdett termelni, még mindig maradtak a fertőzés fenntartásáért felelős vírusürítő egyedek. A 'B' telep szerológiai vizsgálata hasonló eredményre vezetett, minden vizsgált állat esetén végbement a szerológiai áthangelódás, mégis találtunk vírusürítő malacokat minden kutricában. Ehhez kapcsolható a környezeti tamponminták vizsgálatának eredménye, mely során az 'A' telepen 47%-os gyakorisággal az egy hetes malacok kivételével minden korcsoportban, a 'B' telepen pedig 70%-os gyakorisággal az összes kutricában előfordultak pozitív esetek. Mindez rávilágít az alapos tisztítás és fertőtlenítés fontosságára, mely a környezeti vírusterhelés csökkentésével hozzájárulhat a betegség hosszának lerövidítéséhez és az újrafertőződés megakadályozásával a vírusürítő állatok számának redukálásához. Ily módon a környezeti tamponminták gyűjtése segíthet a higiéniai rendelkezések betartásának ellenőrzésével a bántalom végleges felszámolásában.

Mindhárom telep esetében megpróbáltunk detektálni a PEDV-en kívül egyéb vírusokat is a felmérő vizsgálattal történő összehasonlítás érdekében, ezért erre a célra elsősorban bélsármintákat használtunk ('A' telep 30, 'C' telep 5 minta), vagy végbéltampon mintákat ('B' telep 25 minta), amennyiben bélsárminta nem állt rendelkezésre. Mindhárom vizsgált telep mintáiból kimutattunk a PEDV mellett vagy anélkül egyéb vírusokat is, de nem találtunk korrelációt az egyes vírusok előfordulása és az állatok egészségügyi állapota között, a felmérő vizsgálattal történő összehasonlításhoz pedig nem volt elegendő a mintaszám. Ugyanakkor a PEDV önmagában olyan jelentős szereppel bír, hogy kapcsolatát más kórokozókval kevésbé vizsgálták, így nem tisztázott, hogy az egyéb, hasmenéssel összefüggésben leírt vírusok hajlamosító tényezőként játszhatnak közre a PED kialakulásában vagy a betegség lefolyásának hosszában van szerepük (Chen *et al.*, 2018).

6.3.3. Vírusizolálás

A PEDV izolálása nem tartozik a könnyen megvalósítható feladatok közé (Chen *et al.*, 2014), melyet saját próbálkozásaink száma is hűen tükröz. A szakirodalomban elérhető módszertani leírások pontos betartása nem hozott eredményt, mely adódhat az egyes vírusok eltéréseiből, valamint a laboratóriumokban rendelkezésre álló eszközök és körülmények különbségéből is. Ezért kisebb módosításokat alkalmaztunk, melyek közül a legfontosabb a fertőzött sejtek inkubálási idejét követően a palackok nem egy, hanem három alkalommal történő fagyasztása és felengedése volt, így sikerült a sejtek roncsolásával kiszabadítani belőlük a vírust. Az eljárást a 2016-os esetet követően a vékonybél mintából kiindulva dolgoztuk ki, mert a kiáztatott végbéltamponok PCR vizsgálatát követően nem maradt kellő mennyiségű minta a további kísérletezéshez. A 2018-as eseteknél már a felállított módszer alapján dolgoztunk, de az erre a célra kiválasztott 16 minta közül így is csak három esetben tudtuk igazolni a vírusizolálás eredményességét. A három sikeres eseten kívül is megfigyeltünk kisebb mértékű

CPE-t egyes fertőzött sejtenyészeteken a negatív kontrollhoz képest, de az inkubációs idő vagy a fagyasztások és felengedések számának változtatásával sem értünk el kimutatható mértékű vírusreplikációt. Emiatt feltételezzük, hogy ezekben az esetekben a látható elváltozásokat a mintában lévő egyéb anyagok okozták.

Tudomásunk szerint az utóbbi években előfordult európai esetek közül csak Németországban (Hanke *et al.*, 2015) végezték el a PEDV izolálást rajtunk kívül. Tény, hogy ez a hosszadalmas és bonyolult módszer nem diagnosztikára alkalmas, és kevésbé illeszkedik a jelenkor genetikai alapokra helyezett megközelítéséhez. Viszont a gének szintjén az egyes vírusok között megállapított eltérések hatással lehetnek a betegség klinikai megjelenésére, ezek kifejeződésének vizsgálatához pedig elengedhetetlenek az izolált vírussal végzett kutatások. Ezen kívül a vírusizolálás a vakcina fejlesztés alapjaként is szolgálhat, mely érdekében kapcsolatfelvételre került sor egy oltóanyagtermelő céggel.

6.3.4. Szekvencia elemzés

A teljes genom meghatározása a 2016-os esetből közvetlenül a vékonybél mintából kiindulva történt a vírusizolálás elhúzódó kísérletei miatt. Az ily módon meghatározott PEDV HUN/5031/2016 legalább 99%-os azonosságot mutatott az előző években leírt európai vírusokkal, az a néhány nukleotidra szorítkozó, főleg az S gént érintő eltérés viszont mégis jelentősnek bizonyult, mert rekombinációs jelenséget tudtunk kimutatni benne. A PEDV HUN/5031/2016 teljes genom az akkor elérhető PEDV szekvenciák közül az FR/001/2014 (Acc. No: KR011756) vírussal mutatta a legnagyobb hasonlóságot, az S génben talált rekombinációban mégis a 15V010/BEL/2015 (Acc. No.: KR003452) szerepelt az eleve rekombináns, vagyis a TGEV gerinccel, de PEDV-ből származó S génnel rendelkező SeCoV Italy/213306/2009 (Acc. No.: KR061459) vírussal együtt. A 2018-as eseteket követően a sikeresen izolált PEDV HUN/S236/2018 törzsből szintén összeállítottuk a teljes genomot, mely a legnagyobb hasonlóságot az SLOreBAS-1/2015 (Acc. No.: KY019623) és a HUN/5031/2016 vírussal mutatta. A PEDV teljes genom szekvenciák filogenetikai elemzéssel G1 és G2 genocsoportba sorolhatók, az európai és amerikai S INDEL vírusok pedig egy elkülönülő alcsoportot alkotnak a G2-n belül (Pizzurro *et al.*, 2018). A magyarországi törzsek ebben az alcsoportban helyezkednek el legközelebb a szintén rekombináns SLOreBAS-1/2015 (Acc. No.: KY019623) és SLOreBAS-2/2015 (Acc. No.: KY019624) vírusokhoz. A rekombináció miatt ezek a szekvenciák torzíthatják a filogenetikai fákat, ezért lehetséges, hogy új alcsoportként kellene elkülöníteni őket.

A két magyarországi PEDV nagyfokú hasonlósága miatt feltételezzük, hogy a 2016-os eset során érintett telep felszámolása ellenére az itt detektált rekombináns vírus tovább cirkulált az országban. Valószínűleg a határainkon túli térségekben is ilyen variánsok jellemzők, hiszen 2016 végén Szlovéniából két, hasmenéssel kapcsolatban kimutatott rekombináns PEDV

szekvenciát (Acc. No.: KY019623, KY019624) helyeztek el a génbankban, de publikáció még nem jelent meg a két vírus detektálásának körülményeiről. Így az is elképzelhető, hogy ezek a szlovéniai vírusok jutottak el hozzánk vagy közös az eredete a két országban előfordult rekombináns vírusoknak, melyek tovább terjedhettek Nyugat-Európa felé. Ezt támasztja alá egy újonnan megjelent, 2015 és 2017 közötti időszakot lefedő széleskörű olaszországi felmérés, mely az S gén vizsgálata alapján a magyarországi és szlovéniai vírusokhoz hasonló, majd 2017 elejére dominánssá váló rekombináns vírusok jelenlétét mutatta ki, egyúttal kiemelte a betegség terjesztésében a szállító járművek szerepét (Boniotti *et al.*, 2018).

A coronavírusok RNS vírusok lévén meglehetősen hajlamosak mutációkra és rekombinációra (Su *et al.*, 2016), ezért várható a különböző genetikai változatok megjelenése, mely a vírus által okozott megbetegedés súlyosságára is hatással lehet. Esetünkben a rekombinációs PEDV előfordulása nem járt magas mortalitású járvánnyal, a sejthez való kapcsolódásért felelős S protein változása viszont összefüggésben lehet a patogenitás változásával. Emiatt fontosnak tartjuk a jövőben is a sertések hasmenésének gondos monitorozását számítva újabb variáns PEDV megjelenésére, az S génben bekövetkezett változások és a sejtfelszíni receptorhoz való kötődés kapcsolata pedig új kutatás tárgyát képezhetné.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Magyarországon elsőként határoztuk meg egy felmérő vizsgálaton belül az adeno-, astro-, boca-, calici-, corona-, kobu-, rota- és Torque teno vírusok gyakoriságának előfordulását sertésállományokban.
2. A TGEV szerológiai vizsgálatával megállapítottuk, hogy a szeropozitivitás mértéke alacsony Magyarországon, ezért felmerül a kórokozó újbóli felbukkanásának lehetősége.
3. Magyarországon elsőként izoláltunk PEDV törzseket, egyúttal elsőként izoláltunk sikeresen rekombináns PEDV törzseket.
4. Elsőként határoztuk meg két magyarországi PEDV törzs teljes genom szekvenciáját.

8. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

- AKIMKIN, V., M. BEER, S. BLOME, D. HANKE, D. HÖPER, M. JENCKEL & A. POHLMANN 2016. New Chimeric Porcine Coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 22 (7): 1314–1315.
- ALLANDER, T., M.T. TAMMI, M. ERIKSSON, A. BJERKNER, A. TIVELJUNG-LINDELL & B. ANDERSSON 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (36): 12891–12896.
- ALONSO, C., D.P. GOEDE, R.B. MORRISON, P.R. DAVIES, A. ROVIRA, D.G. MARTHALER & M. TORREMORELL 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary Research* 45 (1): 73–77.
- AMIMO, J.O., J.O. JUNG, W.O. OGARA, A.N. VLASOVA, M.N. NJAHIRA, S. MAINA, E.A. OKOTH, R.P. BISHOP, L.J. SAIF & A. DJIKENG 2015. Detection and genetic characterization of porcine group A rotaviruses in asymptomatic pigs in smallholder farms in East Africa: Predominance of P[8] genotype resembling human strains. *Veterinary Microbiology* 175 (2–4): 195–210.
- DE ARRUDA LEME, R., E. LORENZETTI, A.F. ALFIERI & A.A. ALFIERI 2014. Detection of Torque teno sus virus in diarrheic piglet fecal samples positive or negative for porcine group A rotavirus. *Journal of Swine Health and Production* 22 (6): 287–290.
- BALLESTEROS, M.L., C.M. SÁNCHEZ & L. ENJUANES 1997. Two Amino Acid Changes at the N-Terminus of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Spike Protein Result in the Loss of Enteric Tropism. *Virology* 227 (2): 378–388.
- BÁNYAI, K., G. KEMENESI, I. BUDINSKI, F. FÖLDES, B. ZANA, S. MARTON, R. VARGA-KUGLER, M. OLDAL, K. KURUCZ & F. JAKAB 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution* 48: 19–26.
- BAO, F., S. MI, Q. LUO, H. GUO, C. TU, G. ZHU & W. GONG 2018. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. *Transboundary and Emerging Diseases* 65 (2): 432–440.
- BELSHAM, G.J., T.B. RASMUSSEN, P. NORMANN, P. VACLAVEK, B. STRANDBYGAARD & A. BØTNER 2016. Characterization of a Novel Chimeric Swine Enteric Coronavirus

- from Diseased Pigs in Central Eastern Europe in 2016. *Transboundary and Emerging Diseases* 63 (6): 595–601.
- BENFIELD, D.A. & R.A. HESSE 2012. Porcine Adenoviruses. In: *Diseases of Swine*. J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, and G. W. Stevenson (eds.): 1422–1435. Wiley-Blackwell. USA.
- BENYEDA, J., G. DRÁVAI, G. GAJDÁCS & I. LÁZÁR 1977. TGE-szerű megbetegedés előfordulása sertésállományainkban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 32: 99–100.
- BENYEDA, J. & E. MOCSÁRI 1973. A malacok vírusos hasmenésének (TGE) immunológiája, különös tekintettel az aktív immunizálás lehetőségére. *Magyar Állatorvosok Lapja* 28: 409–411.
- BERGELAND, M.E., J.P. MCADARAGH & I. STOTZ 1977. Rotaviral enteritis in turkey poult. In: *Proceedings - Western Poultry Disease Conference (USA)*.
- BERTASIO, C., E. GIACOMINI, M. LAZZARO, S. PERULLI, A. PAPETTI, A. LAVAZZA, D. LELLI, G. ALBORALI & M.B. BONIOTTI 2016. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Shedding and Antibody Response in Swine Farms: A Longitudinal Study. *Frontiers in Microbiology* 7: 2009–2017.
- BIAGINI, P., D. TODD, M. BENDINELLI, S. HINO, A. MANKERTZ, S. MISHIRO, C. NIEL, H. OKAMOTO, S. RAIDAL, B.W. RITCHIE & G.C. TEO 2005. Anellovirus. In: *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (eds.): 335–341. Academic Press. London, UK.
- BINN, L.N., E.C. LAZAR, G.A. EDDY & M. KAJIMA 1970. Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines. *Infection and Immunity* 1 (5): 503–508.
- BISHOP, R., G.P. DAVIDSON, I.H. HOLMES & B.J. RUCK 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet* 302 (7841): 1281–1283.
- BLOMSTRÖM, A.-L., S. BELÁK, C. FOSSUM, J. MCKILLEN, G. ALLAN, P. WALLGREN & M. BERG 2009. Detection of a novel porcine bocavirus-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Research* 146 (1–2): 125–129.

- BOHL, E.H., L.J. SAIF, K.V. THEIL, A.G. AGNES & R.F. CROSS 1982. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 15 (2): 312–319.
- BONIOTTI, M.B., A. PAPETTI, C. BERTASIO, E. GIACOMINI, M. LAZZARO, M. CERIOLI, S. FACCINI, P. BONILAURO, F. VEZZOLI, A. LAVAZZA & G.L. ALBORALI 2018. Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in Italy: Disease spread and the role of transportation. *Transboundary and Emerging Diseases* 65 (6): 1935–1942.
- BONIOTTI, M.B., A. PAPETTI, A. LAVAZZA, G. ALBORALI, E. SOZZI, C. CHIAPPONI, S. FACCINI, P. BONILAURO, P. CORDIOLI & D. MARTHALER 2016. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerging Infectious Diseases* 22 (1): 83–87.
- BOROS, Á., M. ALBERT, P. PANKOVICS, H. BÍRÓ, P.A. PESAVENTO, T.G. PHAN, E. DELWART & G. REUTER 2017. Outbreaks of Neuroinvasive Astrovirus Associated with Encephalomyelitis, Weakness, and Paralysis among Weaned Pigs, Hungary. *Emerging Infectious Diseases* 23 (12): 1982–1993.
- BRIDGER, J.C. 1980. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Veterinary Record* 107 (23): 532–533.
- BURBELO, P.D., J.A. RAGHEB, A. KAPOOR & Y. ZHANG 2013. The serological evidence in humans supports a negligible risk of zoonotic infection from porcine circovirus type 2. *Biologicals* 41 (6): 430–434.
- CARMAN, S., G. JOSEPHSON, B. MCEWEN, G. MAXIE, M. ANTOCHI, K. EERNISSE, G. NAYAR, P. HALBUR, G. ERICKSON & E. NILSSON 2002. Field Validation of a Commercial Blocking ELISA to Differentiate Antibody to Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) and Porcine Respiratory Coronavirus and to Identify TGEV-Infected Swine Herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14 (2): 97–105.
- CARVAJAL, A., H. ARGÜELLO, F.J. MARTÍNEZ-LOBO, S. COSTILLAS, R. MIRANDA, P.J. G. DE NOVA & P. RUBIO 2015. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management* 1 (1): 1–12.
- CHASEY, D., J.C. BRIDGER & M.A. MCCRAE 1986. A new type of atypical rotavirus in pigs. *Archives of Virology* 89 (1–4): 235–243.

- CHEETHAM, S., M. SOUZA, T. MEULIA, S. GRIMES, M.G. HAN & L.J. SAIF 2006. Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. *Journal of Virology* 80 (21): 10372–10381.
- CHEN, J., C. WANG, H. SHI, H. QIU, S. LIU, X. CHEN, Z. ZHANG & L. FENG 2010. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Archives of Virology* 155 (9): 1471–1476.
- CHEN, K.C., B.C. SHULL, E.A. MOSES, M. LEDERMAN, E.R. STOUT & R.C. BATES 1986. Complete Nucleotide Sequence and Genome Organization of Bovine Parvovirus. *Journal of Virology* 60 (3): 1085–1097.
- CHEN, Q., G. LI, J. STASKO, J.T. THOMAS, W.R. STENSLAND, A.E. PILLATZKI, P.C. GAUGER, K.J. SCHWARTZ, D. MADSON, K.-J. YOON, G.W. STEVENSON, E.R. BURROUGH, K.M. HARMON, R.G. MAIN & J. ZHANG 2014. Isolation and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Associated with the 2013 Disease Outbreak among Swine in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 52 (1): 234–243.
- CHEN, Q., L. WANG, Y. ZHENG, J. ZHANG, B. GUO, K.-J. YOON, P.C. GAUGER, K.M. HARMON, R.G. MAIN & G. LI 2018. Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. *Virology Journal* 15 (1): 95–103.
- CHIBA, S., Y. SAKUMA, R. KOGASAKA, M. AKIHARA, K. HORINO, T. NAKAO & S. FUKUI 1979. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *Journal of Medical Virology* 4 (4): 249–254.
- COOPER, V.L. 2000. Diagnosis of Neonatal Pig Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 16 (1): 117–133.
- CORNELISSEN-KEIJSERS, V., A. JIMÉNEZ-MELSIÓ, D. SONNEMANS, M. CORTEY, J. SEGALÉS, E. VAN DEN BORN & T. KEKARAINEN 2012. Discovery of a novel Torque teno sus virus species: genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. *Journal of General Virology* 93 (12): 2682–2691.
- COTMORE, S.F., M. AGBANDJE-MCKENNA, J.A. CHIORINI, D.V. MUKHA, D.J. PINTEL, J. QIU, M. SODERLUND-VENERMO, P. TATTERSALL, P. TIJSSEN, D. GATHERER & A.J. DAVISON 2014. The family Parvoviridae. *Archives of Virology* 159 (5): 1239–1247.

- COUSSEMENT, W., R. DUCATELLE, G. CHARLIER & J. HOORENS 1981. Adenovirus enteritis in pigs. *American Journal of Veterinary Research* 42 (11): 1905–1911.
- CSÁGOLA, A., S. KECSKEMÉTI, G. KARDOS, I. KISS & T. TUBOLY 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Archives of Virology* 151 (3): 495–507.
- CSÁGOLA, A., M. LŐRINCZ, D. CADAR, K. TOMBÁ CZ, I. BIKSI & T. TUBOLY 2012. Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Archives of Virology* 157 (6): 1003–1010.
- CSONTOS, L., T. SZENT-IVÁNYI & J. BENYEDA 1973. Vakcinázási kísérletek a sertés vírusos hasmenése (TGE) ellen. III. *Magyar Állatorvosok Lapja* 28: 22–26.
- DASTJERDI, A., J. CARR, R.J. ELLIS, F. STEINBACH & S. WILLIAMSON 2015. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerging Infectious Diseases* 21 (12): 2235–2237.
- DE BENEDICTIS, P., S. SCHULTZ-CHERRY, A. BURNHAM & G. CATTOLI 2011. Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution* 11 (7): 1529–1544.
- DEBOUCK, P. & M. PENSAERT 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *American Journal of Veterinary Research* 41 (2): 219–223.
- DEBOUCK, P., M. PENSAERT & W. COUSSEMENT 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Veterinary Microbiology* 6 (2): 157–165.
- DI MARTINO, B., V. MARTELLA, F. DI PROFIO, C. CECI & F. MARSILIO 2011. Detection of St-Valerien-like viruses in swine, Italy. *Veterinary Microbiology* 149 (1): 221–224.
- DONG, J., L. DONG, E. MÉNDEZ & Y. TAO 2011. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (31): 12681–12686.
- DOYLE, L.P. & L.M. HUTCHINGS 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 108: 257-259.

- DUFKOVA, L., I. SCIGALKOVA, R. MOUTELIKOVA, H. MALENOVSKA & J. PRODELALOVA 2013. Genetic diversity of porcine sapoviruses, kobuviruses, and astroviruses in asymptomatic pigs: an emerging new sapovirus GIII genotype. *Archives of Virology* 158 (3): 549–558.
- DUIZER, E., K.J. SCHWAB, F.H. NEILL, R.L. ATMAR, M.P.G. KOOPMANS & M.K. ESTES 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology* 85 (1): 79–87.
- ELLIS, J.A., G. ALLAN & S. KRAKOWKA 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2– associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinary Research* 69 (12): 1608–1614.
- ELSCHNER, M., J. PRUDLO, H. HOTZEL, P. OTTO & K. SACHSE 2002. Nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for the Detection of Group A Rotaviruses. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 49 (2): 77–81.
- ESTES, M.K., J.M. BALL, R.A. GUERRERO, A.R. OPEKUN, M.A. GILGER, S.S. PACHECO & D.Y. GRAHAM 2000. Norwalk Virus Vaccines: Challenges and Progress. *The Journal of Infectious Diseases* 181 (Supplement_2): S367–S373.
- ESTES, M.K. & J. COHEN 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiological Reviews* 53: 410–449.
- ESTES, M.K. & H.B. GREENBERG 2013. Rotaviruses. In: *Fields Virology*. D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and V. R. Racaniello (eds.): 1347–1395. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- FLYNN, W.T. & L.J. SAIF 1988. Serial Propagation of Porcine Enteric Calicivirus-Like Virus in Primary Porcine Kidney Cell Culture. *Journal of Clinical Microbiology* 26 (2): 7.
- FRANZO, G., M. LEGNARDI, C.M. TUCCIARONE, M. DRIGO, F. KLAUMANN, M. SOHRMANN & J. SEGALÉS 2018. Porcine circovirus type 3: a threat to the pig industry? *Veterinary Record* 182 (3): 83–83.
- FU, X., B. FANG, Y. LIU, M. CAI, J. JUN, J. MA, D. BU, L. WANG, P. ZHOU, H. WANG & G. ZHANG 2018. Newly emerged porcine enteric alphacoronavirus in southern China: Identification, origin and evolutionary history analysis. *Infection, Genetics and Evolution* 62: 179–187.

- GALLIEN, S., A. MORO, G. LEDIGUERHER, V. CATINOT, F. PABOEUF, L. BIGAULT, M. BERRI, P.C. GAUGER, N. POZZI, E. AUTHIÉ, N. ROSE & B. GRASLAND 2018. Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. *Veterinary Research* 49 (1): 7–16.
- GERBER, P.F., Q. GONG, Y.-W. HUANG, C. WANG, D. HOLTKAMP & T. OPRIESSNIG 2014. Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA. *The Veterinary Journal* 202 (1): 33–36.
- GERDTS, V. & A. ZAKHARTCHOUK 2017. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses. *Veterinary Microbiology* 206: 45–51.
- GOEDE, D., M.P. MURTAUGH, J. NEREM, P. YESKE, K. ROSSOW & R. MORRISON 2015. Previous infection of sows with a ‘mild’ strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a ‘severe’ strain. *Veterinary Microbiology* 176 (1–2): 161–164.
- GOLDSMITH, C.S. 2014. Morphologic Differentiation of Viruses beyond the Family Level. *Viruses* 6 (12): 4902–4913.
- GONG, L., J. LI, Q. ZHOU, Z. XU, L. CHEN, Y. ZHANG, C. XUE, Z. WEN & Y. CAO 2017. A New Bat-HKU2–like Coronavirus in Swine, China, 2017. *Emerging Infectious Diseases* 23 (9): 1607–1609.
- GOUVEA, V., J.R. ALLEN, R.I. GLASS, Z.-Y. FANG, M. BREMONT, J. COHEN, M.A. MCCRAE, S.L.J. SAIF, P. SINARACHATANANT & E.O. CAUL 1991. Detection of Group B and C Rotaviruses by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (3): 519–523.
- GRASLAND, B., L. BIGAULT, C. BERNARD, H. QUENAULT, O. TOULOUSE, C. FABLET, N. ROSE, F. TOUZAIN & Y. BLANCHARD 2015. Complete Genome Sequence of a Porcine Epidemic Diarrhea S Gene Indel Strain Isolated in France in December 2014. *Genome Announcements* 3 (3): e00535-15.
- GU, J.P., X.W. YUE, R. XING, C.Y. LI & Z.B. YANG 2012. Progress in genetically engineered vaccines for porcine transmissible gastroenteritis virus. *Revue de Medecine Veterinaire* 163 (3): 107–111.
- GUO, M., J. HAYES, K.O. CHO, A.V. PARWANI, L.M. LUCAS & L.J. SAIF 2001. Comparative Pathogenesis of Tissue Culture-Adapted and Wild-Type Cowden Porcine Enteric

- Calicivirus (PEC) in Gnotobiotic Pigs and Induction of Diarrhea by Intravenous Inoculation of Wild-Type PEC. *Journal of Virology* 75 (19): 9239–9251.
- HAIG, D.A., M.G. CLARKE & M.S. PEREIRA 1964. Isolation of an Adenovirus from a Pig. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 74: 81–84.
- HAMMOND, J., R.J. MCCOY, E.S. JANSEN, C.J. MORRISSY, A.L.M. HODGSON & M.A. JOHNSON 2000. Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine* 18 (11–12): 1040–1050.
- HANKE, D., M. JENCKEL, A. PETROV, M. RITZMANN, J. STADLER, V. AKIMKIN, S. BLOME, A. POHLMANN, H. SCHIRRMEIER, M. BEER & D. HÖPER 2015. Comparison of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases* 21 (3): 493–496.
- HARRACH, B. 2008. Adenoviruses: General features. In: *Encyclopedia of Virology*. B. W. J. Mahy and M. H. V. van Regenmortel (eds.): 1–9. Elsevier. Oxford.
- HE, J., J. CAO, N. ZHOU, Y. JIN, J. WU & J. ZHOU 2013. Identification and Functional Analysis of the Novel ORF4 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. *Journal of Virology* 87 (3): 1420–1429.
- HIRAHARA, T., H. YASUHARA, O. MATSUI, M. YAMANAKA, M. TANAKA, S. FUKUYAMA, A. IZUMIDA, K. YOSHIKI, K. KODAMA, M. NAKAI & N. SASAKI 1990. Isolation of Porcine Adenovirus from the Respiratory Tract of Pigs in Japan. *The Japanese Journal of Veterinary Science* 52 (2): 407–409.
- HOFMANN, M. & R. WYLER 1988. Propagation of the Virus of Porcine Epidemic Diarrhea in Cell Culture. *Journal of Clinical Microbiology* 26 (11): 2235–2239.
- HOLLAND, R.E. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews* 3 (4): 345–375.
- HOLTKAMP, D., H. ROTTO & R. GARCIA 2007. Economic Cost of Major Health Challenges in Large US Swine Production Systems. *Swine News* 30: 85–89.
- HU, H., K. JUNG, A.N. VLASOVA, J. CHEPNGENO, Z. LU, Q. WANG & L.J. SAIF 2015. Isolation and Characterization of Porcine Deltacoronavirus from Pigs with Diarrhea in

- the United States B. W. Fenwick (ed.). *Journal of Clinical Microbiology* 53 (5): 1537–1548.
- HU, H., K. JUNG, Q. WANG, L.J. SAIF & A.N. VLASOVA 2018. Development of a one-step RT-PCR assay for detection of pancoronaviruses (α -, β -, γ -, and δ -coronaviruses) using newly designed degenerate primers for porcine and avian fecal samples. *Journal of Virological Methods* 256: 116–122.
- HUANG, Y.-W., A.W. DICKERMAN, P. PINEYRO, L. LI, L. FANG, R. KIEHNE, T. OPRIESSNIG & X.-J. MENG 2013. Origin, Evolution, and Genotyping of Emergent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains in the United States. *MBio* 4 (5): e00737-13.
- JACKOVA, A., I. SLIZ, R. MANDELIK, S. SALAMUNOVA, J. NOVOTNY, M. KOLESAROVA, M. VLASAKOVA & S. VILCEK 2017. Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A. *Infection, Genetics and Evolution* 49: 73–77.
- JACKWOOD, D.J., I. BAE, R.J. JACKWOOD & L.J. SAIF 1994. Transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Respiratory Coronavirus: Molecular Characterization of the S Gene Using cDNA Probes and Nucleotide Sequence Analysis. In: *Coronaviruses. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 43–48. Springer, Boston, MA.
- JANETANAKIT, T., M. LUMYAI, N. BUNPAPONG, S. BOONYAPISITSOPA, S. CHAIYAWONG, N. NONTABENJAWAN, S. KESDAENGSAKONWUT & A. AMONSIN 2016. Porcine Deltacoronavirus, Thailand, 2015. *Emerging Infectious Diseases* 22 (4): 757–759.
- JAROSOVA, V., R. POGRANICHNIY & V. CELER 2011. Prevalence and age distribution of porcine torque teno sus virus (TTSuV) in the Czech Republic. *Folia Microbiologica* 56 (2): 90–94.
- JI, C.-M., B. WANG, J. ZHOU & Y.-W. HUANG 2018. Aminopeptidase-N-independent entry of porcine epidemic diarrhea virus into Vero or porcine small intestine epithelial cells. *Virology* 517: 16–23.
- JIMÉNEZ-MELSIÓ, A., F. RODRIGUEZ, A. DARJI, J. SEGALÉS, V. CORNELISSEN-KEIJERS, E. VAN DEN BORN & T. KEKARAINEN 2015. Vaccination of pigs reduces Torque teno sus virus viremia during natural infection. *Vaccine* 33 (30): 3497–3503.

- JOACHIM, A. & A. DAUGSCHIES 2000. Endoparasites in swine in different age groups and management systems. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 113 (4): 129–133.
- JUNG, K., H. HU, B. EYERLY, Z. LU, J. CHEPNGENO & L.J. SAIF 2015. Pathogenicity of 2 Porcine Deltacoronavirus Strains in Gnotobiotic Pigs. *Emerging Infectious Diseases* 21 (4): 650–654.
- KALYANARAMAN, N. 2018. In silico prediction of potential vaccine candidates on capsid protein of human bocavirus 1. *Molecular Immunology* 93: 193–205.
- KAPIKIAN, A.Z., R.G. WYATT, R. DOLIN, T.S. THORNHILL, A.R. KALICA & R.M. CHANOCK 1972. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Part'icle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *Journal of Virology* 10 (5): 1075–1081.
- KAPOOR, A., P. SIMMONDS, E. SLIKAS, L. LI, L. BODHIDATTA, O. SETHABUTR, H. TRIKI, O. BAHRI, B.S. ODERINDE, M.M. BABA, D.N. BUKBUK, J. BESSER, J. BARTKUS & E. DELWART 2010. Human Bocaviruses Are Highly Diverse, Dispersed, Recombination Prone, and Prevalent in Enteric Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 201 (11): 1633–1643.
- KARST, S.M., C.E. WOBUS, M. LAY, J. DAVIDSON & H.W. VIRGIN 2003. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science* 299 (5612): 1575–1578.
- KASZA, L. 1966. Isolation of an adenovirus from the brain of a pig. *American Journal of Veterinary Research* 27 (118): 751–751.
- KATSUDA, K., M. KOHMOTO, K. KAWASHIMA & H. TSUNEMITSU 2006. Frequency of Enteropathogen Detection in Suckling and Weaned Pigs with Diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18 (4): 350–354.
- KEKARAINEN, T. & J. SEGALÉS 2012. Torque Teno Sus Virus in Pigs: an Emerging Pathogen? *Transboundary and Emerging Diseases* 59: 103–108.
- KEKARAINEN, T., M. SIBILA & J. SEGALÉS 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *Journal of General Virology* 87 (4): 833–837.

- KHATRI, M. 2015. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication in Duck Intestinal Cell Line. *Emerging Infectious Diseases* 21 (3): 549–550.
- KIM, J., Y. HA, K. JUNG, C. CHOI & C. CHAE 2004. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68 (3): 218–221.
- KIM, S.-H., I.-J. KIM, H.-M. PYO, D.-S. TARK, J.-Y. SONG & B.-H. HYUN 2007. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *Journal of Virological Methods* 146 (1): 172–177.
- KIM, S.Y., D.S. SONG & B.K. PARK 2001. Differential Detection of Transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Epidemic Diarrhea Virus by Duplex RT-PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13 (6): 516–520.
- KIM, Y.K., S.-I. LIM, I.-S. CHO, K.-M. CHEONG, E.-J. LEE, S.-O. LEE, J.-B. KIM, J.-H. KIM, D.-S. JEONG, B.-H. AN & D.-J. AN 2015. A novel diagnostic approach to detecting porcine epidemic diarrhea virus: The lateral immunochromatography assay. *Journal of Virological Methods* 225: 4–8.
- KISS, I., K. MATIZ, A. ALLARD, G. WADELL & M. BENKŐ 1996. Detection of homologous DNA sequences in animal adenoviruses by polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Hungarica* 44 (2): 243–251.
- KNOWLES, N.J. & G. REUTER 2012. Porcine Caliciviruses. In: *Diseases of Swine*. J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, and G. W. Stevenson (eds.): Wiley-Blackwell. USA.
- KOCI, M.D. & S. SCHULTZ-CHERRY 2002. Avian astroviruses. *Avian Pathology* 31 (3): 213–227.
- KRAKOWKA, S. & J.A. ELLIS 2008. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *American Journal of Veterinary Research* 69 (12): 1623–1629.
- KRAKOWKA, S., J.A. ELLIS, B. MEEHAN, S. KENNEDY, F. MCNEILLY & G. ALLAN 2000. Viral Wasting Syndrome of Swine: Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Gnotobiotic Swine by Coinfection with Porcine Circovirus 2 and Porcine Parvovirus. *Veterinary Pathology* 37 (3): 254–263.

- KRIMMLING, T., A. BEINEKE & C. SCHWEGMANN-WEßELS 2017. Infection of porcine precision cut intestinal slices by transmissible gastroenteritis coronavirus demonstrates the importance of the spike protein for enterotropism of different virus strains. *Veterinary Microbiology* 205: 1–5.
- KUMTHIP, K., P. KHAMRIN, W. SAIKRUANG, A. KONGKAEW, R. VACHIRACHEWIN, H. USHIJIMA & N. MANEEKARN 2018. Detection and genetic characterization of porcine astroviruses in piglets with and without diarrhea in Thailand. *Archives of Virology* 163: 1823–1829.
- KWEON, C., B. KWON, S. WOO, J. KIM, G. WOO, D. SON, W. HUR & Y. LEE 2001. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (Ig Y) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *Journal of Veterinary Medical Science* 62 (9): 961–964.
- LANGEL, S.N., F.C. PAIM, K.M. LAGER, A.N. VLASOVA & L.J. SAIF 2016. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Research* 226: 93–107.
- LAU, S.K.P., P.C.Y. WOO, K.S.M. LI, Y. HUANG, M. WANG, C.S.F. LAM, H. XU, R. GUO, K. CHAN, B. ZHENG & K. YUEN 2007. Complete genome sequence of bat coronavirus HKU2 from Chinese horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome. *Virology* 367 (2): 428–439.
- LAU, S.K.P., H.C. YEUNG, K.S.M. LI, C.S.F. LAM, J.-P. CAI, M.-C. YUEN, M. WANG, B.-J. ZHENG, P.C.Y. WOO & K.-Y. YUEN 2017. Identification and genomic characterization of a novel rat bocavirus from brown rats in China. *Infection, Genetics and Evolution* 47: 68–76.
- LAUDE, H., K. VAN REETH & M. PENSAERT 1993. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Veterinary Research* 24 (2): 125–150.
- LE, V.P., S. SONG, B.-H. AN, G.-N. PARK, N.T. PHAM, D.Q. LE, V.T. NGUYEN, T.T.H. VU, K.-S. KIM, S. CHOE & D.-J. AN 2018. A novel strain of porcine deltacoronavirus in Vietnam. *Archives of Virology* 163 (1): 203–207.
- LEE, S. & C. LEE 2014. Complete Genome Characterization of Korean Porcine Deltacoronavirus Strain KOR/KNU14-04/2014. *Genome Announcements* 2 (6): e01191-14.

- L'HOMME, Y., R. SANSREGRET, É. PLANTE-FORTIER, A.-M. LAMONTAGNE, M. OUARDANI, G. LACROIX & C. SIMARD 2009. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* 39 (1): 66–75.
- LI, J., Q. SHEN, W. ZHANG, T. ZHAO, Y. LI, J. JIANG, X. YU, Z. GUO, L. CUI & X. HUA 2017. Genomic organization and recombination analysis of a porcine sapovirus identified from a piglet with diarrhea in China. *Virology Journal* 14 (1): 57–64.
- LI, J., W. ZHANG, L. CUI, Q. SHEN & X. HUA 2018a. Metagenomic identification, genetic characterization and genotyping of porcine sapoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 62: 244–252.
- LI, L., A. KAPOOR, B. SLIKAS, O.S. BAMIDELE, C. WANG, S. SHAUKAT, M.A. MASROOR, M.L. WILSON, J.-B.N. NDJANGO, M. PEETERS, N.D. GROSS-CAMP, M.N. MULLER, B.H. HAHN, N.D. WOLFE, H. TRIKI, J. BARTKUS, S.Z. ZAIDI & E. DELWART 2010. Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. *Journal of Virology* 84 (4): 1674–1682.
- LI, R., X. TIAN, Y. YU, S. QIAO, Z. WANG & J. MA 2018b. Development of a rapid immunochromatographic assay for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 21 (1): 139–147.
- LI, W., H. LI, Y. LIU, Y. PAN, F. DENG, Y. SONG, X. TANG & Q. HE 2012. New Variants of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 18 (8): 1350–1353.
- LI, X., K. KANTOLA, L. HEDMAN, B. ARKU, K. HEDMAN & M. SÖDERLUND-VENERMO 2015. Original antigenic sin with human bocaviruses 1–4. *Journal of General Virology* 96 (10): 3099–3108.
- LI, Z., F. CHEN, Y. YUAN, X. ZENG, Z. WEI, L. ZHU, B. SUN, Q. XIE, Y. CAO, C. XUE, J. MA & Y. BEE 2013. Sequence and phylogenetic analysis of nucleocapsid genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in China. *Archives of Virology* 158 (6): 1267–1273.
- LIN, C.-M., X. GAO, T. OKA, A.N. VLASOVA, M.A. ESSEILI, Q. WANG & L.J. SAIF 2015. Antigenic Relationships among Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Transmissible Gastroenteritis Virus Strains. *Journal of Virology* 89 (6): 3332–3342.

- LIU, C., J. TANG, Y. MA, X. LIANG, Y. YANG, G. PENG, Q. QI, S. JIANG, J. LI, L. DU & F. LI 2015. Receptor Usage and Cell Entry of Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus. *Journal of Virology* 89 (11): 6121–6125.
- LOLE, K.S., R.C. BOLLINGER, R.S. PARANJAPPE, D. GADKARI, S.S. KULKARNI, N.G. NOVAK, R. INGERSOLL, H.W. SHEPPARD & S.C. RAY 1999. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. *Journal of Virology* 73 (1): 152–160.
- LORENZETTI, E., D.T. STIPP, F. POSSATTI, J.E.T. CAMPANHA, A.F. ALFIERI & A.A. ALFIERI 2014. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34 (5): 391–397.
- LŐRINCZ, M., I. BIKSI, S. ANDERSSON, A. CSÁGOLA & T. TUBOLY 2014. Sporadic re-emergence of enzootic porcine transmissible gastroenteritis in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 62 (1): 125–133.
- LŐRINCZ, M., A. CSÁGOLA, S.L. FARKAS, C. SZÉKELY & T. TUBOLY 2011. First detection and analysis of a fish circovirus. *Journal of General Virology* 92 (8): 1817–1821.
- LORSIRIGOOL, A., K. SAENG-CHUTO, G. TEMEEYASEN, A. MADAPONG, T. TRIPIPAT, M. WEGNER, A. TUNTITUVANONT, M. INTRAKAMHAENG & D. NILUBOL 2016. The first detection and full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus isolated in Lao PDR. *Archives of Virology* 161 (10): 2909–2911.
- LUNDGREN, O. & L. SVENSSON 2001. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection* 3 (13): 1145–1156.
- LUO, Z., S. ROI, M. DASTOR, E. GALLICE, M.-A. LAURIN & Y. L'HOMME 2011. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Veterinary Microbiology* 149 (3–4): 316–323.
- MADELEY, C.R. & B.P. COSGROVE 1975a. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *The Lancet* 306 (7932): 451–452.
- MADELEY, C.R. & B.P. COSGROVE 1975b. Viruses in infantile gastroenteritis. *The Lancet* 306 (7925): 124–124.

- MAI, K., J. FENG, G. CHEN, D. LI, L. ZHOU, Y. BAI, Q. WU & J. MA 2017. The detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus from Guangdong Province in Southern China. *Transboundary and Emerging Diseases* 65 (1): 166–173.
- MANDELIK, R., M. SARVAS, A. JACKOVA, S. SALAMUNOVA, J. NOVOTNY & S. VILCEK 2018. First outbreak with chimeric swine enteric coronavirus (SeCoV) on pig farms in Slovakia – lessons to learn. *Acta Veterinaria Hungarica* 66 (3): 488–492.
- MANKERTZ, A. 2008. Circoviruses. In: *Encyclopedia of Virology*. B. W. J. Mahy and M. H. V. van Regenmortel (eds.): 513–519. Elsevier. Oxford.
- MARTELLI, P., A. LAVAZZA, A.D. NIGRELLI, G. MERIALDI, L.G. ALBORALI & M.B. PENSAERT 2008. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Record* 162 (10): 307–310.
- MARTHALER, D., N. HOMWONG, K. ROSSOW, M. CULHANE, S. GOYAL, J. COLLINS, J. MATTHIJNSSENS & M. CIARLET 2014a. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *Journal of Virological Methods* 209: 30–34.
- MARTHALER, D., L. RAYMOND, Y. JIANG, J. COLLINS, K. ROSSOW & A. ROVIRA 2014b. Rapid Detection, Complete Genome Sequencing, and Phylogenetic Analysis of Porcine Deltacoronavirus. *Emerging Infectious Diseases* 20 (8): 1347–1350.
- MARTIN, D.P., B. MURRELL, M. GOLDEN, A. KHOOSAL & B. MUHIRE 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1 (1): vev003.
- MARTÍNEZ, M.A., A.C. ALCALÁ, G. CARRUYO, L. BOTERO, F. LIPRANDI & J.E. LUDERT 2006. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Veterinary Microbiology* 116 (1–3): 77–84.
- MATHIJS, E., A. STALS, L. BAERT, N. BOTTELDOORN, S. DENAYER, A. MAUROY, A. SCIPIONI, G. DAUBE, K. DIERICK, L. HERMAN, E. VAN COILLIE, M. UYTENDAELE & E. THIRY 2012. A Review of Known and Hypothetical Transmission Routes for Noroviruses. *Food and Environmental Virology* 4 (4): 131–152.
- MATTHIJNSSENS, J., M. CIARLET, S.M. MCDONALD, H. ATTOUI, K. BÁNYAI, J.R. BRISTER, J. BUESA, M.D. ESONA, M.K. ESTES, J.R. GENTSCH, M. ITURRIZA-GÓMARA, R. JOHNE, C.D. KIRKWOOD, V. MARTELLA, P.P.C. MERTENS, O.

- NAKAGOMI, V. PARREÑO, M. RAHMAN, F.M. RUGGERI, L.J. SAIF, N. SANTOS, A. STEYER, K. TANIGUCHI, J.T. PATTON, U. DESSELBERGER & M. VAN RANST 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology* 156 (8): 1397–1413.
- MATTHIJNSSENS, J., P.H. OTTO, M. CIARLET, U. DESSELBERGER, M. VAN RANST & R. JOHNE 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology* 157 (6): 1177–1182.
- MCKILLEN, J., F. MCNEILLY, C. DUFFY, M. MCMENAMY, I. MCNAIR, B. HJERTNER, A. MILLAR, K. MCKAY, P. LAGAN, B. ADAIR & G. ALLAN 2011. Isolation in cell cultures and initial characterisation of two novel bocavirus species from swine in Northern Ireland. *Veterinary Microbiology* 152 (1): 39–45.
- MEBUS, C.A., N.R. UNDERDAHL, M.B. RHODES & M.J. TWIEHAUS 1969. Calf Diarrhea (Scours): Reproduced with a Virus from a Field Outbreak. *Bulletins of the Nebraska Agricultural Experiment Station* 233: 1–16.
- MEEHAN, B.M., F. MCNEILLY, D. TODD, S. KENNEDY, V.A. JEWHRST, J.A. ELLIS, L.E. HASSARD, E.G. CLARK, D.M. HAINES & G.M. ALLAN 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology* 79 (9): 2171–2179.
- MESQUITA, J.R., R.H. der HONING, A. ALMEIDA, M. LOURENÇO, W.H.M. van der POEL & M.S.J. NASCIMENTO 2015. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transboundary and Emerging Diseases* 62 (6): 586–588.
- MIYAZAKI, A., M. FUKUDA, K. KUGA, M. TAKAGI & H. TSUNEMITSU 2010. Prevalence of Antibodies against Transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Respiratory Coronavirus among Pigs in Six Regions in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 72 (7): 943–946.
- MOCSÁRI, E. 1977. A sertés TGE-szerű betegsége. *Magyar Állatorvosok Lapja* 32: 508–511.
- MOLINARI, B.L.D., F. POSSATTI, E. LORENZETTI, A.F. ALFIERI & A.A. ALFIERI 2016. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Veterinary Microbiology* 193: 125–132.

- MOR, S.K., Y. CHANDER, D. MARTHALER, D.P. PATNAYAK & S.M. GOYAL 2012. Detection and molecular characterization of Porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24 (6): 1064–1067.
- MORIN, M., D. TURGEON, J. JOLETTE, Y. ROBINSON, J.B. PHANEUF, R. SAUVAGEAU, M. BEAUREGARD, E. TEUSCHER, R. HIGGINS & S. LARIVIÈRE 1983. Neonatal Diarrhea of Pigs in Quebec: Infectious Causes of Significant Outbreaks. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47 (1): 11–17.
- MOXLEY, R.A. & G.E. DUHAMEL 1999. Comparative Pathology of Bacterial Enteric Diseases of Swine. In: *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases* 2. 83–101. Springer.
- MUSHAHWAR, I.K., J.C. ERKER, A.S. MUERHOFF, T.P. LEARY, J.N. SIMONS, L.G. BIRKENMEYER, M.L. CHALMERS, T.J. PILOT-MATIAS & S.M. DEXAI 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (6): 3177–3182.
- NAGY, B., G. NAGY, M. MEDER & E. MOCSÁRI 1996. Enterotoxigenic Escherichia coli, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 44 (1): 9–19.
- NDZE, V.N., D. CADAR, A. CSÁGOLA, P. KISFALI, E. KOVÁCS, S. FARKAS, A.F. NGU, M.D. ESONA, Á. DÁN, T. TUBOLY & K. BÁNYAI 2013. Detection of novel porcine bocaviruses in fecal samples of asymptomatic pigs in Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution* 17: 277–282.
- NIETFELD, J.C. & P. LESLIE-STEEN 1993. Interstitial Nephritis in Pigs with Adenovirus Infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5 (2): 269–273.
- NISHIZAWA, T., H. OKAMOTO, K. KONISHI, H. YOSHIZAWA, Y. MIYAKAWA & M. MAYUMI 1997. A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241 (1): 92–97.
- OHBA, M., T. OKA, T. ANDO, S. ARAHATA, A. IKEGAYA, H. TAKAGI, N. OGO, C. ZHU, K. OWADA, F. KAWAMORI, Q. WANG, L.J. SAIF & A. ASAI 2017. Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses. *The Journal of Antibiotics* 70 (4): 443–447.

- OLANRATMANEE, E., A. KUNAVONGKRIT & P. TUMMARUK 2010. Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Animal Reproduction Science* 122 (1–2): 42–51.
- PAARLBERG, P.L. 2014. Updated Estimated Economic Welfare Impacts of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV). *Purdue University, Department of Agricultural Economics, Working Papers* 14 (4): 1–38.
- PADMANABHAN, A. & B.M. HAUSE 2016. Detection and characterization of a novel genotype of porcine astrovirus 4 from nasal swabs from pigs with acute respiratory disease. *Archives of Virology* 161 (9): 2575–2579.
- PALINSKI, R., P. PIÑEYRO, P. SHANG, F. YUAN, R. GUO, Y. FANG, E. BYERS & B.M. HAUSE 2016. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *Journal of Virology*: JVI.01879-16.
- PAN, Y., X. TIAN, P. QIN, B. WANG, P. ZHAO, Y.-L. YANG, L. WANG, D. WANG, Y. SONG, X. ZHANG & Y.-W. HUANG 2017. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Veterinary Microbiology* 211: 15–21.
- PENSAERT, M., P. CALLEBAUT & J. VERGOTE 1986. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Veterinary Quarterly* 8 (3): 257–261.
- PENSAERT, M.B. & P. DE BOUCK 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of Virology* 58 (3): 243–247.
- PENSAERT, M.B. & P. MARTELLI 2016. Porcine epidemic diarrhea: A retrospect from Europe and matters of debate. *Virus Research* 226: 1–6.
- PHAN, T.G., F. GIANNITTI, S. ROSSOW, D. MARTHALER, T.P. KNUTSON, L. LI, X. DENG, T. RESENDE, F. VANNUCCI & E. DELWART 2016. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology Journal* 13 (1): 184.
- PIJPERS, A., A.N. VAN, C. TERPSTRA & J.H. VERHEIJDEN 1993. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *The Veterinary record* 132 (6): 129–131.

- PIZZURRO, F., F. CITO, G. ZACCARIA, M. SPEDICATO, A. CERELLA, M. ORSINI, M. FORZAN, N. D'ALTERIO, A. LORUSSO & M. MARCACCI 2018. Outbreak of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in Abruzzi region, central-Italy. *Veterinary Medicine and Science* 4 (2): 73–79.
- PRITCHARD, C., D.J. PATON, G. WIBBERLEY & G. IBATA 1999. Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain. *Veterinary Record* 144: 616–618.
- PRODANOV-RADULOVIĆ, J., T. PETROVIĆ, D. LUPULOVIĆ, D. MARČIĆ, J. PETROVIĆ, Ž. GRGIĆ & S. LAZIĆ 2017. First Detection and Clinical Presentation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (Pedv) in Serbia. *Acta Veterinaria-Beograd* 67 (3): 383–396.
- RAMAKRISHNAN, M.A. 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology* 5 (2): 85–86.
- REUTER, G., H. BÍRÓ & G. SZŰCS 2007. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Archives of Virology* 152 (3): 611–614.
- REUTER, G., Á. BOLDIZSÁR, I. KISS & P. PANKOVICS 2008. Candidate New Species of Kobuvirus in Porcine Hosts. *Emerging Infectious Diseases* 14 (12): 1968–1970.
- REUTER, G., Á. BOLDIZSÁR & P. PANKOVICS 2009. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. *Archives of Virology* 154 (1): 101–108.
- REUTER, G., Á. BOROS & P. PANKOVICS 2011a. Kobuviruses - a comprehensive review. *Reviews in Medical Virology* 21 (1): 32–41.
- REUTER, G., C. NEMES, Á. BOROS, B. KAPUSINSZKY, E. DELWART & P. PANKOVICS 2012. Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary. *Archives of Virology* 157 (6): 1143–1147.
- REUTER, G., P. PANKOVICS & Á. BOROS 2011b. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Archives of Virology* 156 (1): 125–128.
- RODGER, S.M., J.A. CRAVEN & I. WILLIAMS 1975. Demonstration of reovirus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhea. *Australian Veterinary Journal* 51: 536–536.

- SAIF, L.J. 1999. Comparative Pathogenesis of Enteric Viral Infections of Swine. In: *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2*. 47–59. Springer.
- SAIF, L.J., E.H. BOHL, K.W. THEIL, R.F. CROSS & J.A. HOUSE 1980. Rotavirus-Like, Calicivirus-Like, and 23-nm Virus-Like Particles Associated with Diarrhea in Young Pigst. *Journal of Clinical Microbiology* 12 (1): 105–111.
- SAIF, L.J. & F.M. FERNANDEZ 1996. Group A Rotavirus Veterinary Vaccines. *Journal of Infectious Diseases* 174 (Supplement 1): S98–S106.
- SAIF, L.J., M.P. PENSART, K. SESTAK, S. YEO & K. JUNG 2012. Coronaviruses. In: *Diseases of Swine*. J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, and G. W. Stevenson (eds.): 1821–1914. Wiley-Blackwell. USA.
- SALAMUNOVA, S., A. JACKOVA, R. MANDELIK, J. NOVOTNY, M. VLASAKOVA & S. VILCEK 2018. Molecular detection of enteric viruses and the genetic characterization of porcine astroviruses and sapoviruses in domestic pigs from Slovakian farms. *BMC Veterinary Research* 14 (1): 313–321.
- SANFORD, S.E. & D.M. HOOVER 1983. Enteric adenovirus infection in pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47 (4): 396–400.
- SEGALÉS, J. 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research* 164 (1–2): 10–19.
- SEGALÉS, J., L. MARTÍNEZ-GUÍNO, M. CORTEY, N. NAVARRO, E. HUERTA, M. SIBILA, J. PUJOLS & T. KEKARAINEN 2009. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Veterinary Microbiology* 134 (3–4): 199–207.
- SHAN, T., L. LI, P. SIMMONDS, C. WANG, A. MOESER & E. DELWART 2011. The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. *Journal of Virology* 85 (22): 11697–11708.
- SHARPE, H.B.A. & D.M. JESSETT 1967. Experimental infection of pigs with 2 strains of porcine adenovirus. *Journal of Comparative Pathology* 77 (1): 45–50.
- SHIBATA, I., T. TSUDA, M. MORI, M. ONO, M. SUEYOSHI & K. URUNO 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Veterinary Microbiology* 72 (3): 173–182.

- SHIMIZU, M. & J. SHIRAI 1990. Cytopathic Astrovirus Isolated from Porcine Acute Gastroenteritis in an Established Cell Line Derived from Porcine Embryonic Kidney. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 201–206.
- SHIRATO, K., M. MAEJIMA, M.T. ISLAM, A. MIYAZAKI, M. KAWASE, S. MATSUYAMA & F. TAGUCHI 2016. Porcine aminopeptidase N is not a cellular receptor of porcine epidemic diarrhea virus, but promotes its infectivity via aminopeptidase activity. *Journal of General Virology* 97 (10): 2528–2539.
- ŠMÍD, B., L. VALÍČEK, L. RODÁK & J. KUDRNA 1993. Electron microscopic demonstration of porcine epidemic diarrhea virus in the Czech Republic. *Veterinární Medicína* 38: 333–341.
- SONG, D., D. HUANG, Q. PENG, T. HUANG, Y. CHEN, T. ZHANG, X. NIE, H. HE, P. WANG, Q. LIU & Y. TANG 2015a. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Associated with Outbreaks of Severe Diarrhea in Piglets in Jiangxi, China 2013 Q. Zhang (ed.). *PloS one* 10 (3): e0120310.
- SONG, D., X. ZHOU, Q. PENG, Y. CHEN, F. ZHANG, T. HUANG, T. ZHANG, A. LI, D. HUANG, Q. WU, H. HE & Y. TANG 2015b. Newly Emerged Porcine Deltacoronavirus Associated With Diarrhoea in Swine in China: Identification, Prevalence and Full-Length Genome Sequence Analysis. *Transboundary and Emerging Diseases* 62 (6): 575–580.
- SOSNOVTSEV, S.V., G. BELLIO, K.-O. CHANG, V.G. PRIKHODKO, L.B. THACKRAY, C.E. WOBUS, S.M. KARST, H.W. VIRGIN & K.Y. GREEN 2006. Cleavage Map and Proteolytic Processing of the Murine Norovirus Nonstructural Polyprotein in Infected Cells. *Journal of Virology* 80 (16): 7816–7831.
- STADLER, J., S. ZOELS, R. FUX, D. HANKE, A. POHLMANN, S. BLOME, H. WEISSENBOCK, C. WEISSENBACHER-LANG, M. RITZMANN & A. LADINIG 2015. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Veterinary Research* 11 (1): 142–149.
- STEINRIGL, A., S. REVILLA FERNÁNDEZ, F. STOIBER, J. PIKALO, T. SATTLER & F. SCHMOLL 2015. First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Veterinary Research* 11 (1): 310–314.

- STEVENSON, G.W., H. HOANG, K.J. SCHWARTZ, E.R. BURROUGH, D. SUN, D. MADSON, V.L. COOPER, A. PILLATZKI, P. GAUGER, B.J. SCHMITT, L.G. KOSTER, M.L. KILLIAN & K.J. YOON 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25 (5): 649–654.
- STUDDERT, M.J. & S.J. SYMES 2008. Caliciviruses. In: *Encyclopedia of Virology*. B. W. J. Mahy and M. H. V. van Regenmortel (eds.): 410–419. Elsevier. Oxford.
- SU, S., G. WONG, W. SHI, J. LIU, A.C.K. LAI, J. ZHOU, W. LIU, Y. BI & G.F. GAO 2016. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology* 24 (6): 490–502.
- SUZUKI, T., T. SHIBAHARA, N. IMAI, T. YAMAMOTO & S. OHASHI 2018. Genetic characterization and pathogenicity of Japanese porcine deltacoronavirus. *Infection, Genetics and Evolution* 61: 176–182.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI & S. KUMAR 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725–2729.
- THACHIL, A., P.F. GERBER, C.-T. XIAO, Y.-W. HUANG & T. OPRIESSNIG 2015. Development and Application of an ELISA for the Detection of Porcine Deltacoronavirus IgG Antibodies. *PLOS ONE* 10 (4): e0124363.
- THEUNS, S., N. CONCEIÇÃO-NETO, I. CHRISTIAENS, M. ZELLER, L.M.B. DESMARETS, I.D.M. ROUKAERTS, D.D. ACAR, E. HEYLEN, J. MATTHIJNSSENS & H.J. NAUWYNCK 2015. Complete Genome Sequence of a Porcine Epidemic Diarrhea Virus from a Novel Outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announcements* 3 (3): e00506-15.
- TIJSEN, P., M. AGBANDJE-MCKENNA, J.M. ALMENDRAL, M. BERGOIN, T.W. FLEGEL, K. HEDMAN, J. KLEINSCHMIDT, Y. LI, D.J. PINTEL & P. TATTERSALL 2011. Family Parvoviridae. In: *Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz (eds.): 405–425. Academic Press. London, UK.
- TISCHER, I., H. GELDERBLOM, W. VETTERMANN & M.A. KOCH 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295 (5844): 64–66.

- TISCHER, I., R. RASCH & G. TOCHTERMANN 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt Für Bakteriologie* 226 (2): 153–167.
- TOPLAK, I., M. IPAVEC, U. KUCHAR, D. KUŠAR, B. PAPIĆ, S. KOREN & N. TOPLAK 2016. Complete Genome Sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announcements* 4 (2): e01725-15.
- TUBOLY, T. 1996. Újabb ismeretek a sertések enterális koronavírusairól. *Magyar Állatorvosok Lapja* 51: 361–365.
- TUBOLY, T. & É. NAGY 2001. Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. *Journal of General Virology* 82 (1): 183–190.
- VAN, K.R. & M. PENSAERT 1994. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *The Veterinary Record* 135 (25): 594–597.
- VIJGEN, L., E. KEYAERTS, P. LEMEY, P. MAES, K.V. REETH, H. NAUWYNCK, M. PENSAERT & M.V. RANST 2006. Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43. *Journal of Virology* 80 (14): 7270–7274.
- VINJÉ, J. 2015. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 53 (2): 373–381.
- VLASOVA, A.N., J.O. AMIMO & L.J. SAIF 2017. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses* 9 (3): 48.
- VLASOVA, A.N., D. MARTHALER, Q. WANG, M.R. CULHANE, K.D. ROSSOW, A. ROVIRA, J. COLLINS & L.J. SAIF 2014. Distinct Characteristics and Complex Evolution of PEDV Strains, North America, May 2013–February 2014. *Emerging Infectious Diseases* 20 (10): 1620–1628.
- WANG, J., P. ZHAO, L. GUO, Y. LIU, Y. DU, S. REN, J. LI, Y. ZHANG, Y. FAN, B. HUANG, S. LIU & J. WU 2013. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Variants with High Pathogenicity, China. *Emerging Infectious Diseases* 19 (12): 2048–2049.

- WANG, L., B. BYRUM & Y. ZHANG 2014a. Detection and Genetic Characterization of Deltacoronavirus in Pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases* 20 (7).
- WANG, L., B. BYRUM & Y. ZHANG 2014b. New Variant of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases* 20 (5): 917–919.
- WANG, Q.-H., K.-O. CHANG, M.G. HAN, S. SREEVATSAN & L.J. SAIF 2006a. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* 132 (1–2): 135–145.
- WANG, Q.-H., M.G. HAN, S. CHEETHAM, M. SOUZA, J.A. FUNK & L.J. SAIF 2005a. Porcine Noroviruses Related to Human Noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* 11 (12): 1874–1881.
- WANG, Q.-H., M.G. HAN, J.A. FUNK, G. BOWMAN, D.A. JANIES & L.J. SAIF 2005b. Genetic Diversity and Recombination of Porcine Sapoviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12): 5963–5972.
- WANG, Q.-H., M. SOUZA, J.A. FUNK, W. ZHANG & L.J. SAIF 2006b. Prevalence of Noroviruses and Sapoviruses in Swine of Various Ages Determined by Reverse Transcription-PCR and Microwell Hybridization Assays. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (6): 2057–2062.
- WICHT, O., W. LI, L. WILLEMS, T.J. MEULEMAN, R.W. WUBBOLTS, F.J.M. VAN KUPPEVELD, P.J.M. ROTTIER & B.J. BOSCH 2014. Proteolytic Activation of the Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Spike Fusion Protein by Trypsin in Cell Culture S. Perlman (ed.). *Journal of Virology* 88 (14): 7952–7961.
- WOBUS, C.E., S.M. KARST, L.B. THACKRAY, K.-O. CHANG, S.V. SOSNOVTSEV, G. BELLLOT, A. KRUG, J.M. MACKENZIE, K.Y. GREEN & H.W.V. IV 2004. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biology* 2 (12): e432.
- WOO, P.C.Y., Y. HUANG, S.K.P. LAU & K.-Y. YUEN 2010. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses* 2 (8): 1804–1820.
- WOO, P.C.Y., S.K.P. LAU, C.S.F. LAM, K.K.Y. LAI, Y. HUANG, P. LEE, G.S.M. LUK, K.C. DYRTING, K.-H. CHAN & K.-Y. YUEN 2009. Comparative Analysis of Complete

- Genome Sequences of Three Avian Coronaviruses Reveals a Novel Group 3c Coronavirus. *Journal of Virology* 83 (2): 908–917.
- WOO, P.C.Y., S.K.P. LAU, C.S.F. LAM, C.C.Y. LAU, A.K.L. TSANG, J.H.N. LAU, R. BAI, J.L.L. TENG, C.C.C. TSANG, M. WANG, B.-J. ZHENG, K.-H. CHAN & K.-Y. YUEN 2012. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology* 86 (7): 3995–4008.
- WOOD, E.N. 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *The Veterinary Record* 100 (12): 243–244.
- WRAY, C., I.M. MCLAREN & P.J. CARROLL 1993. Escherichia coli isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *The Veterinary Record* 133 (18): 439–442.
- YAMASHITA, T., S. KOBAYASHI, K. SAKAC, S. NAKATA, S. CHIBA, Y. ISHIHARA & S. ISOMURA 1991. Isolation of Cytopathic Small Round Viruses with BS-C-1 Cells from Patients with Gastroenteritis. *The Journal of Infectious Diseases* 164 (5): 954–957.
- YAMASHITA, T., M. SUGIYAMA, H. TSUZUKI, K. SAKAE, Y. SUZUKI & Y. MIYAZAKI 2000. Application of a Reverse Transcription-PCR for Identification and Differentiation of Aichi Virus, a New Member of the Picornavirus Family Associated with Gastroenteritis in Humans. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (8): 2955–2961.
- YANG, B., B. YANG, X. SHAN, B. LI, X. MA, X. YIN, Y. ZHANG, Y. LIU & X. LAN 2018. Short communication: Immune responses in sows induced by porcine sapovirus virus-like particles reduce viral shedding in suckled piglets. *Research in Veterinary Science* 117: 196–199.
- YANG, F., X. LIU, Y. ZHOU, W. LYU, S. XU, Z. XU & L. ZHU 2015. Histopathology of Porcine kobuvirus in Chinese piglets. *Virologica Sinica* 30 (5): 396–399.
- YANG, Z., W. JIN, Z. ZHAO, W. LIN, D. ZHANG, E. YU, A. QIN & H. YANG 2014. Genetic characterization of porcine kobuvirus and detection of coinfecting pathogens in diarrheic pigs in Jiangsu Province, China. *Archives of Virology* 159 (12): 3407–3412.

- YE, X., M. BERG, C. FOSSUM, P. WALLGREN & A.-L. BLOMSTRÖM 2018. Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. *Virus Genes* 54 (3): 466–469.
- ZENG, Q., M.A. LANGEREIS, A.L.W. van VLIET, E.G. HUIZINGA & R.J. de GROOT 2008. Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (26): 9065–9069.
- ZHAI, S., C. YUE, Z. WEI, J. LONG, D. RAN, T. LIN, Y. DENG, L. HUANG, L. SUN, H. ZHENG, F. GAO, H. ZHENG, S. CHEN & S. YUAN 2010. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Archives of Virology* 155 (8): 1313–1317.
- ZHAI, S.-L., X. ZHOU, H. ZHANG, B.M. HAUSE, T. LIN, R. LIU, Q.-L. CHEN, W.-K. WEI, D.-H. LV, X.-H. WEN, F. LI & D. WANG 2017. Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. *Virology Journal* 14 (1): 222–227.
- ZHANG, Q., R. HU, X. TANG, C. WU, Q. HE, Z. ZHAO, H. CHEN & B. WU 2013. Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China. *Archives of Virology* 158 (8): 1631–1636.
- ZHANG, X., M. HASOKSUZ, D. SPIRO, R. HALPIN, S. WANG, S. STOLLAR, D. JANIES, N. HADYA, Y. TANG, E. GHEDIN & L. SAIF 2007. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology* 358 (2): 424–435.
- ZHANG, X., Y. ZHU, X. ZHU, H. SHI, J. CHEN, D. SHI, J. YUAN, L. CAO, J. LIU, H. DONG, Z. JING, J. ZHANG, X. WANG & L. FENG 2017. Identification of a natural recombinant transmissible gastroenteritis virus between Purdue and Miller clusters in China. *Emerging Microbes & Infections* 6 (8): e74.
- ZHANG, Z., Z. ZHENG, H. LUO, J. MENG, H. LI, Q. LI, X. ZHANG, X. KE, B. BAI, P. MAO, Q. HU & H. WANG 2012. Human Bocavirus NP1 Inhibits IFN- Production by Blocking Association of IFN Regulatory Factor 3 with IFNB Promoter. *The Journal of Immunology* 189 (3): 1144–1153.

- ZHENG, D.-P., T. ANDO, R.L. FANKHAUSER, R.S. BEARD, R.I. GLASS & S.S. MONROE 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346 (2): 312–323.
- ZHOU, F., H. SUN & Y. WANG 2014. Porcine Bocavirus: Achievements in the Past Five Years. *Viruses* 6 (12): 4946–4960.
- ZHOU, P., H. FAN, T. LAN, X.-L. YANG, W.-F. SHI, W. ZHANG, Y. ZHU, Y.-W. ZHANG, Q.-M. XIE, S. MANI, X.-S. ZHENG, B. LI, J.-M. LI, H. GUO, G.-Q. PEI, X.-P. AN, J.-W. CHEN, L. ZHOU, K.-J. MAI, Z.-X. WU, D. LI, D.E. ANDERSON, L.-B. ZHANG, S.-Y. LI, Z.-Q. MI, T.-T. HE, F. CONG, P.-J. GUO, R. HUANG, Y. LUO, X.-L. LIU, J. CHEN, Y. HUANG, Q. SUN, X.-L.-L. ZHANG, Y.-Y. WANG, S.-Z. XING, Y.-S. CHEN, Y. SUN, J. LI, P. DASZAK, L.-F. WANG, Z.-L. SHI, Y.-G. TONG & J.-Y. MA 2018. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* 556 (7700): 255–258.
- ZHOU, W., K. ULLMAN, V. CHOWDRY, M. REINING, Z. BENYEDA, C. BAULE, M. JUREMALM, P. WALLGREN, L. SCHWARZ, E. ZHOU, S.P. PEDRERO, I. HENNIG-PAUKA, J. SEGALÉS & L. LIU 2016. Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries. *Veterinary Microbiology* 182: 75–81.
- ZHU, X., S. LIU, X. WANG, Z. LUO, Y. SHI, D. WANG, G. PENG, H. CHEN, L. FANG & S. XIAO 2018. Contribution of porcine aminopeptidase N to porcine deltacoronavirus infection. *Emerging Microbes & Infections* 7 (1): 65–77.

9. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

9.1. A doktori kutatás témájához kapcsolódó, lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

VALKÓ, A., BIKSI, I., CSÁGOLA, A., TUBOLY, T.[†], KISS, K., URSU, K. & Á. DÁN 2017. Porcine epidemic diarrhoea virus with a recombinant S gene detected in Hungary, 2016. *Acta Veterinaria Hungarica* 65 (2): 253-261.

VALKÓ, A., TUBOLY, T.[†] & A. CSÁGOLA 2018. A sertések enterális koronavírussai – Irodalmi összefoglaló. *Magyar Állatorvosok Lapja* 140 (4): 207-216.

VALKÓ, A., MAROSI, A., CSÁGOLA, A., FARKAS, R., RÓNAI, ZS. & Á. DÁN 2019. Frequency of diarrhoea-associated viruses in swine of various ages in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 67 (1): 140-150.

VALKÓ, A., ALBERT, E., CSÁGOLA, A., VARGA, T., KISS, K., FARKAS, R., RÓNAI, ZS., BIKSI, I. & Á. DÁN 2019. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 67 (2): [közlésre javasolt]

9.2. Lektorált, impakt faktorral nem bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

VALKÓ, A., BÁLINT, Á., BOZSA, Á. & A. CSÁGOLA 2019. Prevalence of antibodies against transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in Hungary. *Veterinary and Animal Science* 7:100042.

9.3. A doktori kutatás témájához kapcsolódó konferencia prezentációk

VALKÓ, A., CSÁGOLA, A., TUBOLY, T.[†], DÁN, Á., URSU, K., BIKSI, I. & K. KISS. A sertések enterális megbetegedéseiben szerepet játszó vírusok kimutatása és elterjedtségük felmérése Magyarországon. Akadémiai Beszámolók – előadás, 2017.

VALKÓ, A., TUBOLY, T.[†], DÁN, Á., URSU, K., BÁLINT, Á. & A. CSÁGOLA. A transzmisszibilis gastroenteritis szerológiai felmérése Magyarországon. Akadémiai Beszámolók – előadás, 2018.

VALKÓ, A. Vírusok a sertések hasmenésének hátterében. Köves napok – előadás, 2019.

9.4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó konferencia prezentációk

VALKÓ, A., RÓNAI, ZS. & SZ. JÁNOSI. Corynebacterinae alrendbe tartozó
tőgygyulladás-kórokozó baktériumok diagnosztikai vizsgálatai. Akadémiai Beszámolók –
előadás, 2014.

10. MELLÉKLETEK

1. melléklet: A felmérő vizsgálatban részt vevő sertéstelepek bélsármintáira vonatkozó adatok a minták beérkezésének sorrendjében.

A mintaszámok csoportonkénti bontásban feltüntetve, melyben 1 – szopós malac 1-7 napos korig, 2 – szopós malac 8-14 napos korig, 3 – szopós malac 15 napos kortól a választásig, 4 – koca minden szopós malac korcsoportnak megfelelően, 5 – növendék a választást követő négy héten belül. H: hasmenéses állatból származó minta, K: kontroll, azaz tünetmentes állatból származó minta, NA: nincs adat.

Sorszám	Származási hely	Kocák létszáma	Mintavétel dátuma	Mintaszámok										
				1/H	1/K	2/H	2/K	3/H	3/K	4/H	4/K	5/H	5/K	Összesen
1	Hajdúnánás	NA	2016	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6
2	Pásztó	1000	2016. 05. 17.	0	0	0	0	2	2	0	0	4	2	10
3	Szarvas	794	2016. 05. 17.	2	1	1	1	2	1	1	6	0	0	15
			2016. 06. 06.	2	1	1	1	2	1	0	0	4	2	14
4	Óalmás	500	2016. 05. 23.	3	2	2	2	3	1	3	3	4	2	25
5	Csönge	909	2016. 05. 23.	3	2	4	1	4	2	3	3	4	2	28
6	Somogyszob	5000	2016. 05. 11.	4	2	4	2	4	2	3	3	4	2	30
7	Pusztacsó	1000	2016. 05. 23.	4	2	4	2	4	2	3	2	4	2	29
8	Kéleshalom	1100	2016. 05. 26.	3	2	0	0	0	0	3	2	0	0	10
9	Kunhegyes	NA	2016	3	2	3	2	0	0	2	1	2	2	17
10	Hegyszentmárton	750	2016. 06. 02.	4	2	4	2	4	2	3	3	4	2	30
11	Nemesnádudvar	1700	2016. 06. 21.	4	2	4	2	1	1	3	3	1	1	22
12	Cibakháza	2800	2016. 08. 29.	4	2	4	2	4	2	3	3	4	2	30
13	Magyarhomorog	1100	2016. 09. 05.	4	2	4	2	4	2	3	3	4	2	30
14	Csemő	1600	2017. 11. 06.	2	1	2	2	3	2	3	0	0	0	15
15	Somogytarnóca	2300	2018. 01. 25.	4	2	4	2	4	2	3	3	4	2	30
16	Derecske	2200	2018. 01. 30.	4	2	4	2	0	0	2	2	0	0	16
17	Borota	850	2018. 02. 05.	4	2	4	2	4	2	2	1	4	2	27
Összesen				58	31	49	27	45	24	40	38	47	25	384

2. melléklet: Szérumminták származási helye megye szerint sorba rendezve a mintabeküldés időpontjával és az összes, valamint a TGEV elleni antitesteket tartalmazó minták számával.

TGEV: transzmisszibilis gastroenteritis vírus, IFT: immunfluoreszcencia teszt.

Megye	Település	Beküldés időpontja	Összes	TGEV IFT pozitív
Bács-Kiskun	Bácsbokod	2015.12.11	10	5
Bács-Kiskun	Borota	2015.12.15	9	4
Bács-Kiskun	Dávod	2015.12.01	10	
Bács-Kiskun	Harta	2015.12.01	10	
Bács-Kiskun	Katymár	2015.10.08	10	
Bács-Kiskun	Kecskemét	2015.12.10	10	
Bács-Kiskun	Mélykút	2015.10.12	10	3
Bács-Kiskun	Tataháza	2015.12.15	10	1
Baranya	Bóly	2016.01.25	10	7
Baranya	Gerde	2016.02.17	10	
Baranya	Kétújfalu	2016.02.18	10	
Baranya	Márfa	2016.02.02	10	
Baranya	Mohács - Újmohács	2016.02.24	10	3
Baranya	Nagypeterd	2016.03.02	10	
Baranya	Palotabozsok	2015.12.16	10	3
Baranya	Szabadszentkirály	2016.02.02	10	
Baranya	Töttös	2016.03.17	10	3
Békés	Békéscsaba	2015.12.16	10	2
Békés	Dombegyház	2015.12.11	10	
Békés	Újkígyós	2015.12.13	10	6
Borsod-Abaúj-Zemplén	Sajószöged	2015.12.07	10	
Csongrád	Eperjes	2015.12.18	10	
Csongrád	Fábiánsebestyén	2015.12.13	10	
Csongrád	Földeák	2017	10	1
Csongrád	Szentés	2015.12.12	10	
Fejér	Aba	2015.12.10	10	
Fejér	Baracska	2015.12.07	10	3
Fejér	Igar	2015.12.03	10	4
Fejér	Lajoskomárom	2015.12.12	10	2
Fejér	Mátyásdomb	2015.12.12	10	3
Fejér	Nagyvenyim	2015.12.10	9	
Fejér	Sárbogárd	2015.12.10	10	1
Fejér	Sárszentágota	2015.12.16	10	6
Győr-Moson-Sopron	Bágyogszovát	2015.10.08	10	
Győr-Moson-Sopron	Kóny	2015.12.12	10	1
Győr-Moson-Sopron	Markotabödöge	2015.12.16	10	
Győr-Moson-Sopron	Mosonmagyaróvár	2015.12.04	10	
Győr-Moson-Sopron	Nyalka	2015.12.10	10	

Megye	Település	Beküldés időpontja	Összes	TGEV IFT pozitív
Győr-Moson-Sopron	Páli	2015.12.18	10	1
Győr-Moson-Sopron	Rábaszentmihály	2015.12.14	10	3
Győr-Moson-Sopron	Rajka	2015.12.03	10	
Győr-Moson-Sopron	Sopronhorpács	2016.01.28	10	
Győr-Moson-Sopron	Táp	2015.12.10	10	8
Győr-Moson-Sopron	Töltéstava	2015.12.10	10	
Hajdú-Bihar	Derecske	2015.12.09	10	10
Hajdú-Bihar	Hajdúdorog	2015.12.22	10	
Hajdú-Bihar	Hajdúnánás	2015.12.10	10	2
Hajdú-Bihar	Hajdúszoboszló	2017	10	8
Hajdú-Bihar	Nádudvar	2015.12.12	10	
Hajdú-Bihar	Tiszacsege	2017	10	
Heves	Poroszló	2015.10.19	10	
Jász-Nagykun-Szolnok	Jászberény	2015.10.12	10	1
Jász-Nagykun-Szolnok	Tiszatenyő	2017	10	
Komárom-Esztergom	Ács	2015.12.04	10	1
Komárom-Esztergom	Bábolna	2015.12.12	10	2
Komárom-Esztergom	Bakonyszombathely	2015.12.10	10	
Komárom-Esztergom	Bana	2015.12.11	10	
Komárom-Esztergom	Kerézteleki	2015.12.02	10	
Komárom-Esztergom	Kisbér	2015.10.20	10	2
Komárom-Esztergom	Kisigmánd	2015.12.12	10	5
Komárom-Esztergom	Komárom-Szőny	2015.12.10	10	
Komárom-Esztergom	Mocsa	2015.12.03	10	1
Komárom-Esztergom	Naszály	2015.12.16	10	4
Komárom-Esztergom	Tata	2015.10.09	10	
Nógrád	Bátonyterenye	2015.10.08	4	
Nógrád	Pásztó	2015.10.21	10	
Pest	Áporka	2015.12.08	10	
Pest	Dabas	2015.12.07	10	
Pest	Ócsa	2015.12.10	10	7
Pest	Pusztavacs	2015.12.12	10	
Pest	Tatárszentgyörgy	2015.12.12	10	
Pest	Verseg	2015.12.15	10	
Somogy	Somogysárd	2016.03.17	10	
Tolna	Báta	2016.02.24	10	6
Tolna	Dalmand	2015.12.02	10	3
Tolna	Decs	2015.10.29	8	3
Tolna	Dombóvár	2015.12.08	10	1
Tolna	Iregszemcse	2016.01.20	10	
Tolna	Kakasd	2016.02.03	5	

Megye	Település	Beküldés időpontja	Összes	TGEV IFT pozitív
Tolna	Kurd	2015.12.14	10	1
Tolna	Nak	2016.02.01	5	
Tolna	Németkér	2015.11.06	10	9
Tolna	Pincehely	2016.01.20	10	
Tolna	Regöly	2016.03.17	10	
Tolna	Sárszentlőrinc	2016.02.02	10	
Tolna	Tolnanémedi	2015.12.11	10	1
Veszprém	Adorjánháza	2015.12.12	8	2
Veszprém	Csehbánya	2015.11.05	10	
Veszprém	Káptalantóti	2015.11.05	10	1
Veszprém	Lovászipatona	2016.03.16	10	
Veszprém	Nyárád	2015.11.12	10	
Veszprém	Sümeg	2015.12.03	10	
Veszprém	Zalaerdőd	2015.12.02	10	
Összesen	93	-	908	140

3. melléklet: Felmérő vizsgálat eredménye telepi bontásban. A minta pozitivitását a vizsgált vírusra „x” jelzi.

A korcsoportok esetén a számozás magyarázata: 1 – szopós malac 1-7 napos korig, 2 – szopós malac 8-14 napos korig, 3 – szopós malac 15 napos kortól a választásig, 4 – koca minden szopós malac korcsoportnak megfelelően, 5 – növendék a választást követő négy héten belül.

PAdV: sertés adenovírus, PAsTV: sertés astrovírus, PBoV: sertés bocavírus, CV: calicivírus, PKV: sertés kobuvírus, PCV2: kettes típusú sertés circovírus, PRVA: sertés rotavírus A, PRVC: sertés rotavírus C, TTV: sertés Torque teno vírus, H: hasmenéses állatból származó minta, K: kontroll, azaz tünetmentes állatból származó minta.

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAsTV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Hajdúnánás	1	H									x		
	1	H									x		
	1	H						x			x		
	1	K						x			x		
Pásztó	3	H	x	x									
	3	H							x				
	3	K		x		x			x				
	3	K				x		x					
	5	H		x	x	x	x						
	5	H		x	x	x	x						
	5	H		x	x	x	x						
	5	H		x		x	x						
	5	K		x	x		x						
	5	K	x	x	x		x						
Szarvas	2	H								x			
	2	H							x				
	2	K								x			

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Szarvas (folytatás)	2	K								x			
	3	H						x					
	3	H						x					
	3	H						x		x			
	3	H	x					x		x			
	3	K						x					
	5	H		x	x			x		x			
	5	H		x	x			x		x			
	5	H								x			
	5	K	x				x						
Óalmás	1	H								x			
	1	H						x		x			
	1	H								x			
	1	K						x		x			
	1	K								x			
	2	H						x					
	2	H						x					
	2	K				x		x		x			
	2	K						x		x			
	3	H	x					x					
	3	H					x						
	3	K				x							

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Óalmás (folytatás)	4	H				x							
	4	H				x							
	4	K				x							
	5	H		x			x			x			
	5	H		x						x			
	5	H		x			x			x			
Csönge	1	H						x			x		
	1	H									x		
	1	K						x			x		
	1	K		x				x					
	2	H						x					
	2	H						x					
	3	H						x					
	3	H		x				x					
	3	H		x				x					
	3	H						x					
	3	K						x					
	3	K						x					
	4	K				x							
	5	H		x		x							
	5	H				x							
Somogyszob	2	H						x					

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Somogyszob (folytatás)	2	H	x										
	2	K						x					
	3	H						x					
	4	K				x							
	5	H				x							
Pusztacsó	2	H						x					
	2	H						x					
	2	H						x					
	2	K						x					
	2	K						x					
	3	H						x					
	3	K						x					
	3	K						x					
	5	H		x		x							
	5	H				x	x	x					
	5	H			x	x		x					
	5	K			x	x							
Kéleshalom	1	H								x			
	4	H			x								
Kunhegyes	2	H						x					
	2	H						x					
	2	K						x					

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Kunhegyes (folytatás)	4	H							x				
	5	H				x							
	5	K				x		x					
	5	K				x		x					
Hegyszentmárton	1	H						x					
	1	H						x					
	1	H						x					
	1	K					x	x					
	2	H					x						
	2	H			x								
	2	K						x					
	3	H						x					
	3	H	x							x			
	3	K						x					
	3	K						x					
	4	H				x							
	5	H			x					x			
	5	H			x		x						
	5	H			x					x			
	5	K			x	x		x					
Nemesnádudvar	1	H						x					
	1	K						x					

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Nemesnádudvar (folytatás)	2	H						x					
	2	H						x		x			
	2	K						x					
	2	K						x		x			
	3	H						x					
	3	K						x				x	
	4	H				x							
	4	K				x							
	5	H			x								
Cibakháza	1	H						x					
	1	H						x					
	1	H	x					x					
	1	K	x			x		x					
	1	K						x					
	2	K						x					
	3	H				x							
	3	K						x					
	3	K						x					
	4	H				x							
	4	H				x							
	4	K	x		x	x							
	4	K	x		x								

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Cibakháza (folytatás)	5	H				x			x				
	5	H	x			x			x				
	5	H	x			x			x				x
	5	H	x						x				x
	5	K				x			x				
	5	K	x			x			x				
Magyarhomorog	2	H						x					
	2	K						x				x	
	3	H						x					
	3	H						x					
	3	H						x					
	3	H	x					x					
	3	K						x					
	3	K						x					
	4	K				x							
	5	H	x	x									
	5	H	x	x		x							
	5	H		x		x							
	5	H		x									
	5	K		x									
Csemő	2	H						x					
	2	K		x				x					

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Csemő (folytatás)	2	K						x					
	3	H						x	x	x			
	3	H	x				x						
	3	H					x	x					
	3	K		x									
	3	K						x					
Somogytarnóca	1	H								x			
	1	K						x					
	2	H								x			
	2	H								x			
	2	H								x			
	2	H								x			
	2	K						x					
	2	K						x					
	3	H								x			
	3	H								x			
	3	K		x									
	4	H			x								
	4	K		x									
	5	H			x			x					
	5	H			x			x					
Derecske	1	H						x					

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Derecske (folytatás)	1	H						x					
	1	H						x		x			
	1	H						x		x			
	1	K						x					
	1	K						x					
	2	H						x					
	2	H						x					
	2	H	x										
	2	K	x					x					
	2	K						x					
Borota	1	H						x					
	1	K						x					
	1	K						x					
	2	H	x										
	2	H			x			x					
	2	H						x					
	2	H						x					
	3	H						x					
	3	H	x										
	3	K						x					
	5	H	x		x								
	5	H	x		x								

Telep	Korcsoport	Állapot	PAdV	PAstV	PBoV1-2	PBoV3-4	CV	PKV	PCV2	PRVA	PRVC	TTV1	TTV2
Borota (folytatás)	5	H	x										
	5	H	x		x			x					
	5	K	x					x					

4. melléklet: Az 'A' telep különböző mintáinak PCR és ELISA eredményei a különböző korosztályokban. A környezeti tamponminták esetében I=falak, II=rácsok, III=repedések, az arab számok ugyanazon állat sorszámát jelölik.

PAdV: sertés adenovírus, PAsV: sertés astrovírus, PBoV: sertés bocavírus, CV: calicivírus, PEDV: sertések járványos hasmenésének vírusa, PKV: sertés kobuvírus, TTsuv: sertés Torque teno vírus.

Korcsoport	PEDV PCR környezeti tamponmintákból		ELISA		PEDV PCR végbéltamponmintákból		PEDV PCR bélsármintákból		PCR egyéb vírusokra bélsármintákból
	Pozitív	Negatív	Pozitív	Negatív	Pozitív	Negatív	Pozitív	Negatív	
Kanok	II	I, III	1,2,4,5,6,8	3,7	-	1-8	1-5,8	6,7	PAdV (6) PAsV (6,7) CV (8)
Kocák	I, III	II	3-6,8	1,2,7	-	1-8	-	1-5	-
Kocasüldők	I, III	II	1-8	-	-	1-8	2	1,3-7	PAdV (1) PBoV3 (1,2) CV (1,3,4,5,7)
Négy hetes malacok	II, III	I	1-8	-	-	1-8	1,3	2,4,5	PAdV (2,3,4) PAsV (3) PKV (1) TTsuv1 (4)
Egy hetes malacok	-	I-III	1-3, 5-8	4	2-8	1	1,4,5	2,3,6,7,8	-

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Tuboly Tamásnak, hogy meglátta bennem a lehetőséget és elindította számomra ezt a PhD kutatást.

Köszönettel tartozom dr. Cságola Attilának, aki vállalta a témavezetés folytatását, és a munkám során mindvégig biztosított türelméről és támogatásáról.

Köszönöm dr. Dán Ádámnak a koronavírusok molekuláris biológiai vizsgálataiban és a PEDV esetek publikációiban nyújtott segítségét, ami nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönet illeti a NÉBIH ÁDI Molekuláris Biológiai Laboratórium dolgozóit a mintáim rendszerezésében és feldolgozásában való segítségnyújtásukért.

Köszönettel tartozom dr. Biksi Imrének, valamint a Haszonállat-gyógyászati Tanszék és Klinika munkatársainak a PEDV esetek során nyújtott segítségükért.

Köszönöm dr. Bálint Ádámnak, a NÉBIH ÁDI Baromfi és Sertés Virologiai Laboratórium dolgozóinak, valamint a NÉBIH ÁDI debreceni és kaposvári intézetek munkatársainak a szérumminták gyűjtésében és a TGEV szerológiai vizsgálatokban való közreműködésüket.

Köszönetet szeretnék mondani a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak a munkám során nyújtott segítségükért, különösen közvetlen kollégáimnak, dr. Lőrincz Mártának, dr. Bartsik Ágnesnek és Herbák Józsefné Irénnek.

Köszönöm dr. Rónai Zsuzsannának a szakmai segítséget, a lektorálást és a baráti támogatást.

Köszönettel tartozom minden állatorvos kollégának és a vizsgálatokban részt vevő sertéstelepek dolgozóinak a közreműködésükért.

Köszönöm barátaimnak és családomnak a biztatását, türelmét és támogatását.

Külön köszönöm édesanyámnak, hogy minden írásom nyelvi lektorálását rábízhattam és mindig hitt bennem.