

# Diagnosztikumfejlesztés a sertés parvovírus 27a törzse ellen

Tamás Vivien<sup>1\*</sup>, Kiss István<sup>2</sup>, Homonnay G. Zalán<sup>2</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>,  
Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>HUN-REN, Állatorvostudományi Kutatóintézet, Budapest, Magyarország

<sup>2</sup>CEVA-Phylaxia Zrt., Tudományos Támogató Igazgatóság, Budapest, Magyarország

\*Levelező szerző, e-mail: [tamas.vivien@vmri.hun-ren.hu](mailto:tamas.vivien@vmri.hun-ren.hu)

Bérekzett: 2023. december 1.; elfogadva: 2024. január 3.; online megjelent: 2024. május 7.

## Összefoglalás

A sertés parvovírus (PPV) súlyos szaporodási zavarokat okoz sertésekben. Az elmúlt két évtizedben egy sajátos, új genotípus jelent meg Európában (27a). Felvetődött, hogy a PPV1-27a klaszter tagjai hátrányosan befolyásolhatják a PPV1 elleni hatékony vakcinázást. 93 GenBankban található részleges vagy teljes PPV1 nukleotid- és fehérjeszekven-  
cia alapján megerősítettük, hogy a 27a klaszter valóban megkülönböztethető a faj más tagjaitól, és 5 jellemző pont-  
mutációt határoztunk meg. A genetikai különbségek alapján kifejlesztettünk egy kettős allélspecifikus polimeráz lán-  
creakciót a 27a klaszter tagjainak más PPV1 törzsektől való egyszerű és gyors megkülönböztetésére. Az érzékenyítés  
és a felhasználóbarátabbá tétel érdekében a módszert pedig továbbfejlesztettük qPCR alkalmazásra.

**Kulcsszavak:** PPV, PPV-27a, allélspecifikus PCR, sertésvírus

## Development a dual diagnostic PCR method against porcine parvovirus 27a

Vivien Tamás<sup>1</sup>, István Kiss<sup>2</sup>, Zalán Homonnay G.<sup>2</sup>, István Mészáros<sup>1</sup>,  
Ferenc Olasz<sup>1</sup>, Zoltán Zádori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>HUN-REN Veterinary Medical Research Institute, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Ceva-Phylaxia Zrt., Budapest, Hungary

## Summary

Porcine Parvovirus (PPV) is a significant infectious agent responsible for severe reproductive failure in pigs. Until the 2000s, there was limited systematic study of genetic changes in the PPV genome, as it was believed to be highly immunologically stable. Vaccines developed from “ancient” strains were thought to provide comprehensive protection against all PPV variants. However, in the past two decades, a novel genotype, PPV-27a, has emerged in Europe, becoming the prototype of a distinct genetic cluster. Concerns were raised that members of the PPV-27a cluster might negatively impact effective vaccination against PPV.

Accurate identification and quantification of 27a viruses are crucial for understanding the biological significance of these variants. To provide an updated and reliable definition of 27a, 93 databank-deposited nucleotide and protein sequences of the VP2 of various PPV isolates were aligned. It was confirmed that the 27a cluster could be distinguished from other species members, though some divergences were noted compared to earlier defined genetic markers. Phylogenetic analysis revealed that five closely linked point mutations (261C, 682G, 1240T, 1255C, and 1306A) differentiate cluster members from other PPV variants.

Based on these genetic differences, a dual allele-specific polymerase chain reaction (PCR) was developed to easily and quickly differentiate 27a cluster members from other PPV strains. Two of the defined point mutations (261C and 682G) were utilized to create an allele-specific primer set (PS1) for the development of a 27a-specific asPCR system. The dual PCR had a detection limit of  $<1.66 \times 10^4$  copies/reaction. To enhance sensitivity and user-friendliness, the method was adapted for quantitative PCR (qPCR) with fluorescent probes. The sensitivity improvement of the method was approximately two logs ( $<1.66 \times 10^4$  copies/reaction for dual PCR versus  $<2.40 \times 10^2$  copies/reaction for dual qPCR).

To validate the PCR method, clinical samples were collected from cases of reproductive failure involving various types of fetal losses, including mummified or aborted fetuses. Both the dual PCR and dual qPCR were used to dis-

tinguish 27a and non-27a PPV viruses in these field samples. Thirty-one samples were investigated and from these twenty-six were found to be 27a positive with at least one of the methods. Remarkably, in eight of the fourteen cases, 27a-type viruses were detected, indicating a significant presence of these viruses in the samples.

The use of allele-specific PCR primers allows for the rapid differentiation of 27a-type viruses from other PPV genotypes. Depending on user preference, any of the PCR methods developed based on these findings can be utilized as diagnostic tools in veterinary practice. Additionally, this versatile PCR system's application can facilitate field studies contributing to a clear assessment of virus prevalence and a better understanding of 27a biology.

**Keywords:** PPV, PPV-27a, allele-specific PCR, porcine viruses

## Előszó

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program (KDP) lehetőséget biztosít tehetséges doktori hallgatók számára, hogy vállalati együttműködés keretében kamatoztassák tudásukat innovációs területeken. A KDP ösztöndíj keretein belül jelentős gazdasági károkat okozó sertésvírusok ellen végeztünk diagnosztikumfejlesztést a Ceva-Phylaxia Zrt.-vel kooperálva. A kutatások eredményéből több magyar és nemzetközi tudományos publikáció is született, azonban a kutatások összetettsége és a korlátozott karakterszám miatt a *Scientia et Securitas* folyóirat KDP különszámában csak a sertés parvovírus 1-gyel kapcsolatos kutatásainkat mutatjuk be összefoglalva. A sertés parvovírus 1 jelenleg is az egyik legnagyobb állategészségügyi fenyegetést okozó vírus, amely a sertéságazatot érinti. Bár rendelkezünk hatékony vakcinával a kórokozó ellen, de a vírusvariánsok biológiai tulajdonságainak vizsgálata és evolúciójának nyomon követése elengedhetetlen a vírus elleni védekezést illetően. Tamás Vivien a KDP ösztöndíj keretein belül végzett kutatásai egy új PPV1 variáns gyors és pontos megkülönböztetését teszik lehetővé az állategészségügyi szakemberek számára.

Dr. Zádori Zoltán  
témacsoport-vezető

Funkcionális Virologia Témacsoport, HUN-REN  
Állatorvostudományi Kutatóintézet

## Vállalati szakértői előszó

A Ceva-Phylaxia szempontjából rendkívül fontos az új biológiai és szerológiai tulajdonsággal bíró vírustörzsek gyors azonosítása és az elterjedésük felmérése, emiatt Tamás Vivien KDP keretein belül végzett munkája kiemelt jelentőséggel bír. Az ösztöndíjas hallgató munkája során olyan diagnosztikai módszer fejlesztésében vett részt, mely lehetővé teszi egy reakción belül a PPV1 kimutatását és a 27a törzs elkülönítését is egyszerre. A módszer továbbfejleszthető kvantitatív meghatározásra is alkalmas qPCR rendszerré, amely alternatív lehetőséget nyújt a korszerű és felhasználóbarát alkalmazásra. A vállalat egyik fő terméke a sertéságazat tekintetében a sertés parvovírus 1 elleni vakcina, melyhez kapcsolódó terméktámogatási rendszer fontos elemei lesznek a kifejlesztett molekuláris eszközök.

Dr. Kiss István  
vállalati szakértő, laboratóriumvezető  
Ceva-Phylaxia Zrt. Tudományos Támogató Igazgatóság

## Bevezetés

A sertés parvovírus 1 (PPV1) a sertések SMEDI tünetegyüttesének okozója, mely halvaszületéssel, mumifikációval, embrionális halállal jár (*Cartwright-Lucas-Huck 1969; Cartwright-Huck 1967*). A PPV1 a Parvovirusok családjába, a Parvoviridae nemzetségbe tartozik, örökítőanyaga 5 kb hosszú, negatív polaritású DNS. A genom bal oldali része, az ORF1 és az ORF3, a 3 nem strukturális fehérjét (NS1, NS2, NS3), míg a genom jobb oldali fele a strukturális fehérjéket (VP1, VP2, VP3) kódolja (*Bergeron-Menezes-Tijssen 1993*).

A PPV1-fertőzés általában nem okoz klinikai tüneteket a nem vemhes felnőtt sertésekben és malacokban. Vemhes kocákban a PPV1-fertőzés kimenetele a vemhesség stádiumától, valamint a vírus virulenciájától és mennyiségétől függ (*Nielsen-Rønsholt-Sørensen 1991*). A törzs virulenciáját az általa okozott szaporodási zavar súlyossága határozza meg (*Mészáros et al. 2017a*).

A 2000-es évekig a PPV1 genomjának genetikai változásait nem vizsgálták szisztematikusan, mivel a PPV1-ről azt feltételezték, hogy immunológiai-  
lag nagyon stabil. A nem patogén „régibbi” törzsekből kifejlesztett kereskedelmi vakcinák teljes védelmet nyújtottak minden PPV1-variáns ellen (*Zeeuw et al. 2007*). Az elmúlt évtizedek későbbi, a házisertések (*Streck-Canal-Truyen 2015*) és vad-disznók (*Cadar et al. 2012*) VP-fehérjéinek genetikai változatosságára koncentrált vizsgálatai azonban a PPV1 genetikai variabilitásának szélesebb spektrumát tárták fel. A variánsokat legalább hét klaszterre osztották. Az európai törzsekben a C és D klaszterek tagjai domináltak (*Streck-Canal-Truyen 2015*). Egy új, PPV1-27a nevű változat, amely a D klaszter tagja, széles körben elterjedt a német sertéspopulációban. A 27a-t erősen virulensnek, immunológiai-  
lag eltérőnek találták az eddig ismert törzsektől. Néhány tanulmány azt mutatta, hogy sem homológ, sem heterológ szérumokkal nem semlegesíthető, ami miatt a kereskedelmi forgalomban kapható vakcinák nem biztos, hogy teljes mértékben védelmet nyújtanak ezzel a genotípussal szemben (*Streck-Canal-Truyen 2015; Streck et al. 2013; Zeeuw et al. 2007*). A további eredmények azonban nem tudták megerősí-

teni ezt az elképzelést (Józwiak et al. 2009; Kiss et al. 2020; Noguera et al. 2021; van den Born et al. 2020). A közelmúltban egy 27a-alapú rekombináns vakcina került forgalomba, amely teljes védelmet mutatott a „régébbi” PPV1-törzsekkel szemben (Garcia-Morante et al. 2020; Noguera et al. 2021), és a 27a és más PPV1-törzsek közötti szerológiai különbségeket poli- és monoklonális szérumokkal is ismét kimutatták (Streck–Canal–Truyen 2022). Ezek az ellentmondásos adatok alapot adnak arra, hogy a 27a-törzs vizsgálata a PPV1-kutatás élvonalában maradjon, illetve nem elhanyagolható szempont, hogy a 27a-szerű PPV1-törzsek gyors azonosításához tudományos érdekeken túl kereskedelmi érdekek egyaránt fűződnek.

A 27a-törzs egyik legkorábbi jellemzését Zimmermann és munkatársai (Zimmermann et al. 2006) végezték el 15 PPV1-izolátum VP1 szekvenciaillesztése alapján, és három 27a-ra jellemző aminosav-mintázatot ismertek fel (Zimmermann et al. 2006) (bár számozásuk nem volt helyes). Egy későbbi, 50 szekvenciát összehasonlító publikációban négy aminosav-mintázatot lehetett felismerni, bár explicit pozíciójukat nem tárgyalták megfelelően (Cadar et al. 2012).

A 27a-vírusok helyes azonosítása és mennyiségi meghatározása alapvető lépések e változatok biológiai jelentőségének megállapításában. Az itt bemutatott kutatás egyik fő célja a 27a klaszter meghatározásának aktualizálása volt az adatbázisban jelenleg rendelkezésre álló VP2 szekvenciák felhasználásával. A vizsgálat másik célja egy újra megbízható allélspecifikus polimeráz lánreakció (asPCR) (Ugozzoli–Wallace 1991) módszer kifejlesztése volt a PPV1 27a genetikai klaszter tagjainak specifikus kimutatására. A módszer a felhasználók igényeinek megfelelően kettős PCR vagy qPCR alkalmazásként is használható.

## Vizsgálati anyag és módszer

### Szekvenciaillesztések és filogenetikai fa

A nyilvánosan elérhető teljes PPV1 VP2 DNS-szekvenciákat a GenBankból töltöttük le, és a Multalin (Corpet 1988) segítségével végeztük el a szekvenciaillesztést. A filogenetikai fát a Clustal Omega programmal, a Neighbour-joining módszerrel (Siewers et al. 2011) szerkesztettük.

### PPV1 kópiaszám-meghatározás

A vírus DNS-eket a High Pure Viral Nucleic Acid KIT (Roche, Basel, Switzerland) segítségével tisztítottuk a gyártó protokollja szerint. A qPCR reakcióoldat (25 µl) 16 µl vizet, 2,5 µl 10× DreamTaq puffert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 2 µl dNTP-keveréket (egyenként 2,5 mM), 1 µl templát DNS-t, 0,2 µl DreamTaq DNS-polimerázt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 1,25

µl 20× EvaGreen™ festéket (Biotium, Fremont, Kalifornia, USA), 1 µl forward (PPVIF: 5'-CTTTAG-CCTTGGAGCCCCGTGGA-3') és 1 µl reverse (PPVIR: 5'-AACTACCCTTACCTCTTGCTCTT-3') primereket (mindkét koncentráció 6,5 µM) tartalmazott (Mészáros et al. 2017b).

A PCR reakció egy 5 percre tartó, 95 °C-on végzett elődenaturációs lépéssel kezdődött, amelyet 35 ciklus követett (95 °C-on 30 mp, 62 °C 30 mp, 72 °C-on 35 mp), és egy 5 percre tartó 72 °C-on végzett posztelónogációs lépéssel zárult. A qPCR specificitását olvadási görbe-elemzéssel ellenőriztük. A víruskópiaszámokat standard görbe segítségével számoltuk ki, amelyhez a tisztított amplikont 10-szeres hígításban használtuk templátként. A PCR-terméket a NucleoSpin® PCR clean-up Gel extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével izoláltuk 1%-os agarózgélből a gyártó protokollját követve. A DNS-ek mennyiségét Nanodrop 2000 készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mértük, és a mért koncentrációból kiszámítottuk az izolált fragmentum kópiaszámát.

### Gradiens PCR a 27a allélspecifikus primerpárok kiválasztásához

A PS1 (T261CF: 5'-GAAACATACACAAAAGAATACATGTAATAAAAC-3'; C682GR: 5'-CTGTTGTATTGAGTCTGTTATTTTTGTTTC-3') és PS2 (C682GF: 5'-ACCAACATATACACTGGACAATCAG-3'; G1240TR: 5'-TTTGTATTTTGTAGGTTTAGTGTGGTGA-3') primereket az IDT (Coralville, Iowa, USA) szintetizálta. Minden 27a-specifikus primert PAGE-tisztítással tisztítottunk, hogy biztosítsuk a primer homogenitását és a végső 3'-végű nukleotid jelenlétét, ami az asPCR szempontjából kiemelkedően fontos. A PCR-eket DreamTaq enzimmal végeztük, amely nem rendelkezik 3'-5' proofreading exonukleáz aktivitással, így nem tudja megemészteni a primerek végén lévő 3' nukleotidot, de rendelkezik 5'-3' exonukleáz aktivitással, így képes megemészteni a fluoreszcens szondákat. A reakció standard DreamTaq pufferrel történt, 25 µl térfogatban, különböző Mg<sup>2+</sup> ionkoncentrációt alkalmazva. Mivel a DreamTaq puffer 2 mM Mg<sup>2+</sup>-t tartalmaz, EDTA-t (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) adtunk hozzá különböző koncentrációban az effektív Mg<sup>2+</sup> koncentráció csökkentése érdekében. A következő ciklusidőket alkalmaztuk 0,4 µM primer, 0,4 mM dNTP és 2,5 U DreamTaq polimeráz felhasználásával: 95 °C 5 perc, 95 °C 30 mp, 55–72 °C 30 mp, 72 °C 35 mp 35 ciklusban és ezekhez az elegyekhez adtunk különböző mennyiségű Mg<sup>2+</sup> ionokat (1, 0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5 és 3 mM Mg<sup>2+</sup>), EDTA-t (1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,4, 0,2 mM), illetve 0,5 és 1 mM MgCl<sub>2</sub>-t (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

### PPV1-specifikus PCR

A PPV1SP1F (5'-CTGCCAAAAAAGAGCAAGAGA-GAGGTAAG-3') és PPV1SP1R1 (5'-CCGTAG-TCTTTTGCCTGTGTTTC-3') PPV1SP1-specifikus primereket 0,1, 0,2 vagy 0,4 µM végkoncentrációban használtuk önmagában vagy 0,4 µM PS1 primer készlettel együtt a fent leírtakkal azonos PCR körülmények között, 1,4 mM Mg<sup>2+</sup> koncentrációval és a következő hőprofil mellett: 95 °C 5 p, 95 °C 30 mp, 61 °C 30 mp, 72 °C 50 mp, 35 ciklusban.

### 27a allélspecifikus kettős qPCR-ek

A fluoreszcens szondákat (27a-specifikus FAM-jelölt (Probe1 (/56-FAM/TCAGCAACC/ZEN/TCACCA-CCAACCA/3IABkFQ) és Probe2 (/56-FAM/TGG-TACAAG/ZEN/ACGATGCACACACACACA/3IABkFQ) és PPV1 ampikon-specifikus HEX-jelölt (Probe3 (/5HEX/AGAACACACGA/ZEN/CGAAG-CCTACGACAA/3IABkFQ) és Probe4 (/5HEX/TAATCCATC/ZEN/AGACGCCGCAGCA/3IABkFQ)), ZEN-Iowa quencherrel az Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) gyártotta. A gradiens kettős qPCR-eket a következő primerkombinációk és feltételek alkalmazásával végeztük 27a és nem-27a PPV1 DNS-ekkel: 2,5 µl DreamTaq puffer, 2 µl 2,5 uM dNTP, 1 µl primerkeverék: (PS1), 5 µM PPV1-specifikus primerek (PPV1SP1F + PPV1SP1R1), 5 µM A (1., 3. szonda) vagy B (2., 4. szonda) szondákból, 6 µl 2,5 mM EDTA, 0,2 µl DreamTaq Hot Start DNS-polimeráz (5U), 12,3 µl víz, 1 µl templát. A hőprofil a következő volt: 95 °C 5 p, 95 °C 30 mp, 55–70 °C 30 mp, 72 °C 35 mp, 35 ciklusban.

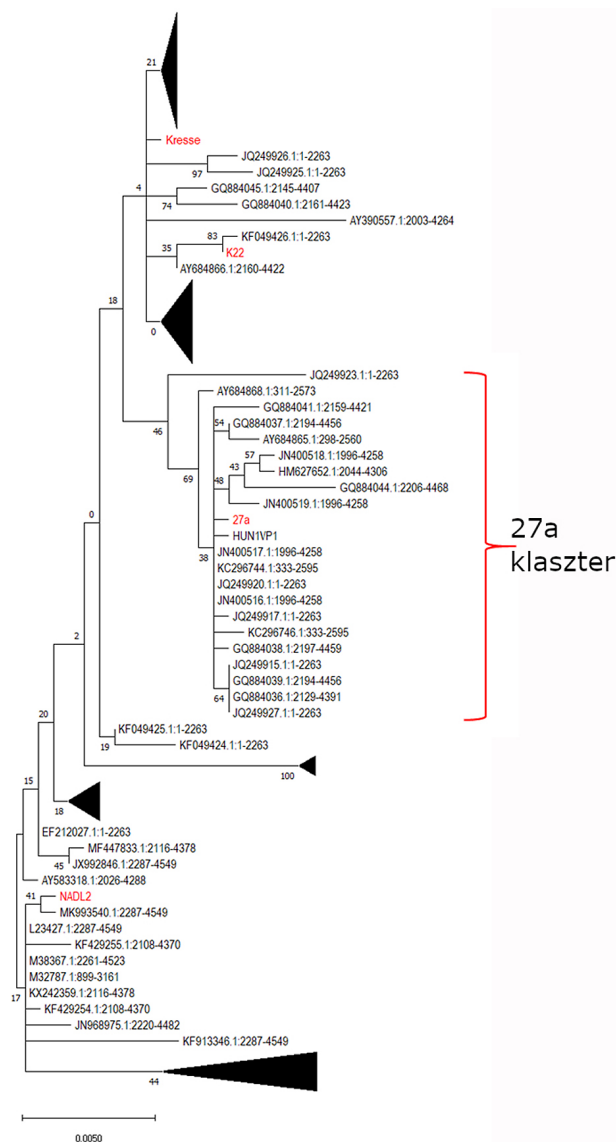
### Allélvalidáló PCR

A VP2 gén részleges amplifikációját az F3570 (5'-CTAC-CACACAGAAGGAGACACCAA-3') és az R4498 (5'-ATTGAAGTATACACAATGATAGTAGT-3') primerekkel végeztük *Cadar és munkatársai* 2012-ben publikált módszere szerint. A PCR-t 50 µl-es PCR-reakciókban végeztük, amelyek 5 µl Dream Taq pufferekből, 1-1 µl primerből (10 pmol), 1 U Dream Taq DNS-polimerázból, 1,5 µl dNTP-ből (egyenként 2,5 mM, Promega, Madison, Wisconsin, USA), 1 µl MgCl<sub>2</sub>-oldatból (25 mM, Promega, Madison, Wisconsin, USA), 5 µl DNS-templátból és 50 µl ddH<sub>2</sub>O-ból álltak. A PCR kondíciói a következők voltak: 94 °C 5 p, majd 35 ciklus 94 °C 30 mp, 58 °C 30 mp, 72 °C 2 p, és egy utolsó elongációs lépés 72 °C-on 7 p.

### Vizsgálati eredmények

#### A 27a klaszter meghatározása

A megbízható definíció érdekében összeillesztettük a különböző PPV1 izolátumok VP2-jének 93, a GenBank

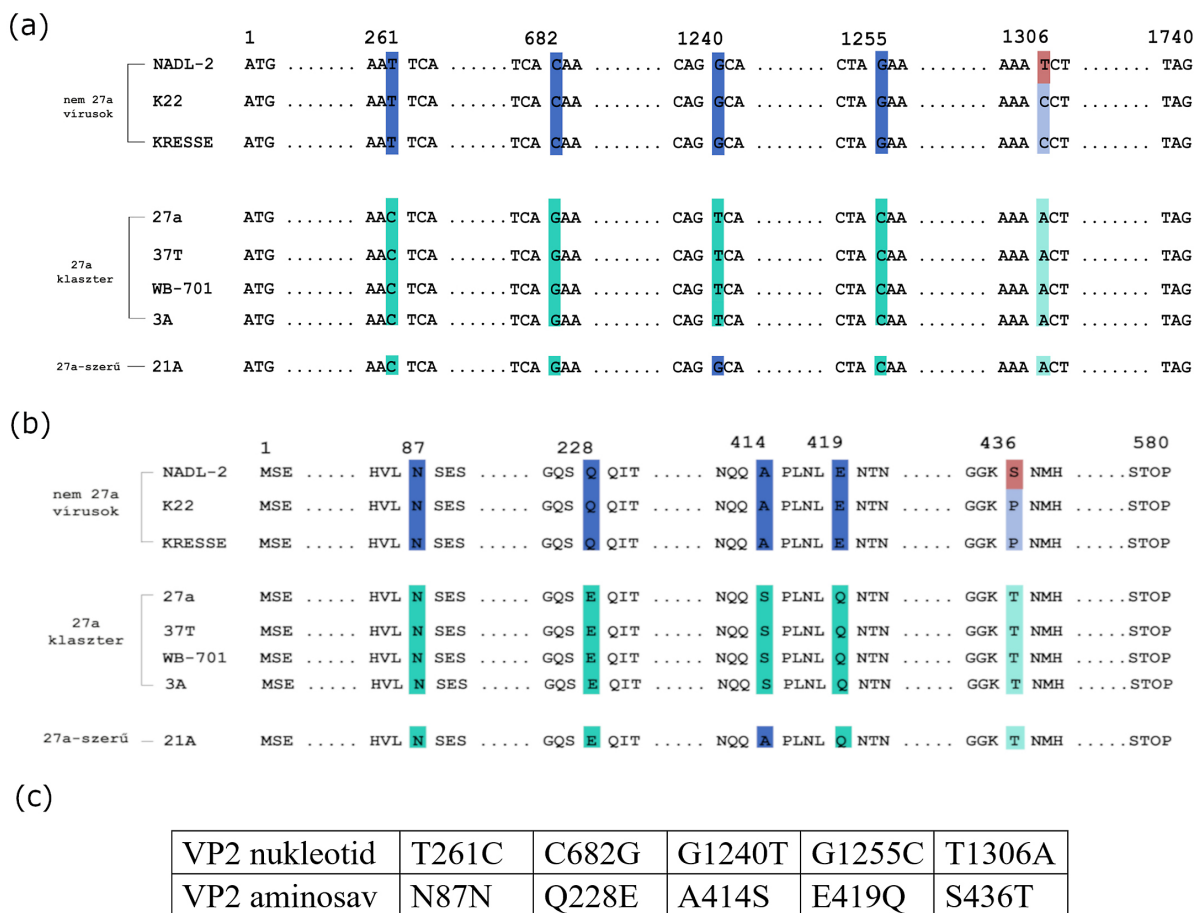


1. ábra A Clustal Omega programmal 93 parvovírus-izolátum VP2 génjének teljes hosszúságú fehérjeszekvenciája (579aa) alapján készített filogenetikai fa. A fa nem releváns részei a jobb láthatóság érdekében összecukásra kerültek. Piros szín mutatja a cikk szempontjából releváns törzseket

Forrás: Tamás et al. 2022 alapján

adatbázisban tárolt részleges vagy teljes nukleotid- és fehérjeszekvenciáját. Ezután a VP2 teljes hosszúságú fehérjeszekvenciájának fehérje-összehasonlítása alapján létrehoztunk egy filogenetikai fát (1. ábra). A 27a klaszter valóban meg lehetett különböztetni a faj többi tagjától, de a korábban (Zimmermann et al. 2006) leírt három mellett további két genetikai markert is azonosítottunk.

Vizsgálataink szerint a 27a klaszter a VP2 fehérjét kódoló génben genetikai markerként öt előforduló pontmutáció (T261C C682G G1240T G1255C T1306A) jelenléte határozza meg (2. ábra). Továbbá az A447G helyen lévő néma mutáció (V149V) is jelen van a 27a klaszter tagjainak többségében. Az öt egynukleotidos



2. ábra

A 27a klaszter tagjait meghatározó VP2 fehérjék mutációi. Nukleotid (a) és aminosav (b) különbségek a 27a klaszter tagjai és a PPV1 fajok más reprezentatív tagjai között. A 27a klaszter tagjaira jellemző aminosavak és nukleotidok kék színűek, a 27a tagokra jellemző, de a 27a klaszteren kívüli tagokban alkalmanként előforduló aminosavak és nukleotidok halványkék színűek. A nem-27a tagokra jellemző aminosavak és nukleotidok lila és barna színűek. Az a PPV1 izolátum (AY684868.1 törzs), amely csak négy 27a jellegzetes mutációt tartalmaz, 27a-szerű vírusként van jelölve. (c) A 27a vírusokra jellemző nukleotid- és aminosav-mutációk

Forrás: Tamás et al. 2022 alapján

mutáció előfordulása összefüggőnek tűnik, ritkán fordulnak elő önmagukban. Csak egy olyan izolátumot találtunk, amely nem teljes 27a-szerű mintázatot mutat (AY684868.1), ez a kapcsolódó öt nukleotidmutációból csak négyet tartalmaz. Ezenfelül egyet találtunk (AY684864.1), amely a kapcsolódó négy aminosav-mutációból csak hármat tartalmaz. Ezeknek a kivételeknek a jelentősége egyelőre nem tisztázott. A négy aminosav-(228E, 414S, 419Q, 436T) mutáció erős kapcsoltsága a kódoló nukleotidok és/vagy az általuk kódolt aminosavak szerkezeti/funkcionális együttműködésére utalhat. Mind a négy aminosav a kapszid felszínén található (Kiss et al. 2020; Ren et al. 2013). Mivel széles körben dokumentáltak, hogy a kapszid felszínén található nagyon kevés aminosav-változtatás képes megváltoztatni a parvovírusok biológiai tulajdonságait (pl. gazdaspecificitás, szövetspecificitás, virulencia) (Bergeron–Menezes–Tijssen 1993; Li–Samulski 2020; Llamas-Saiz et al. 1996; Lorenz 2012; Simpson et al. 2002), feltételezhető, hogy ezek a mutációk szerepet játszanak a klaszter feltételezett virulensebb jellegének kialakulásában.

### Dual allélspecifikus PCR kifejlesztése

Jól ismert, hogy az egyponos nukleotid-polimorfizmus-sal rendelkező minták megkülönböztethetők allélspecifikus PCR reakció segítségével, olyan PCR-primerek használatával, amelyek a végső 3' pozíciójukban eltéréseket tartalmaznak (Ugozzoli–Wallace 1991). Az ilyen PCR hatékonysága és megkülönböztető képessége számos tényezőtől függ, többek között a mismatch jellegétől (a helyettesített és a helyettesítő nukleotidoktól), a különböző reakciókomponensek asszociációjának és diszszociációjának kinetikájától, valamint a mismatch hatásától a primer és a templát kölcsönhatásában kialakuló duplex DNS stabilitására (hőmérséklet, anellációs és elongációs idő, a primerek mérete és olvadási hőmérséklete, Mg<sup>2+</sup>-koncentráció, a polimeráz fajtája) (Lorenz 2012).

A 27a klaszter esetében a megkülönböztető mutációk és a környező szekvenciák távolsága és jellege határozza meg és korlátozza a megfelelő primerpárok tervezését a 27a-specifikus PCR kialakításához. Figyelembe véve

**PS1**

232 261  
 PPV Kresse 5'-3' ... CACGAAACATACAAAAGAATACATGTACTAAATCA...//  
 PPV 27a 5'-3' ... CACGAAACATACAAAAGAATACATGTACTAAACTCA...//  
 Primer T261CF GAAACATACAAAAGAATACATGTACTAAAC

682 709  
 CTTGTTTATTGCTCTGAGTTATGTTTGTG Primer C682GR  
 //...AGTCTTGTGTTTATTGCTCTGAGTTATGTTTGTCTG... PPV 27a 3'-5'  
 //...AGTCTTGTGTTTATTGCTCTGAGTTATGTTTGTCTG... PPV Kresse 3'-5'

**PS2**

660 682  
 PPV Kresse 5'-3' ...TCCACCAACATACACTGGACAATCACAAC...//  
 PPV 27a 5'-3' ...TCCACCAACATACACTGGACAATCACAAC...//  
 Primer C682GF ACCAACATACACTGGACAATCAG

1240 1265  
 AGTGGTGATTGGATCTTTTATGTTT Primer G1240TR  
 //...GTCAGTGGTGATTGGATCTTTTATGTTTATT... PPV 27a 3'-5'  
 //...GTCAGTGGTGATTGGATCTTTTATGTTTATT... PPV Kresse 3'-5'

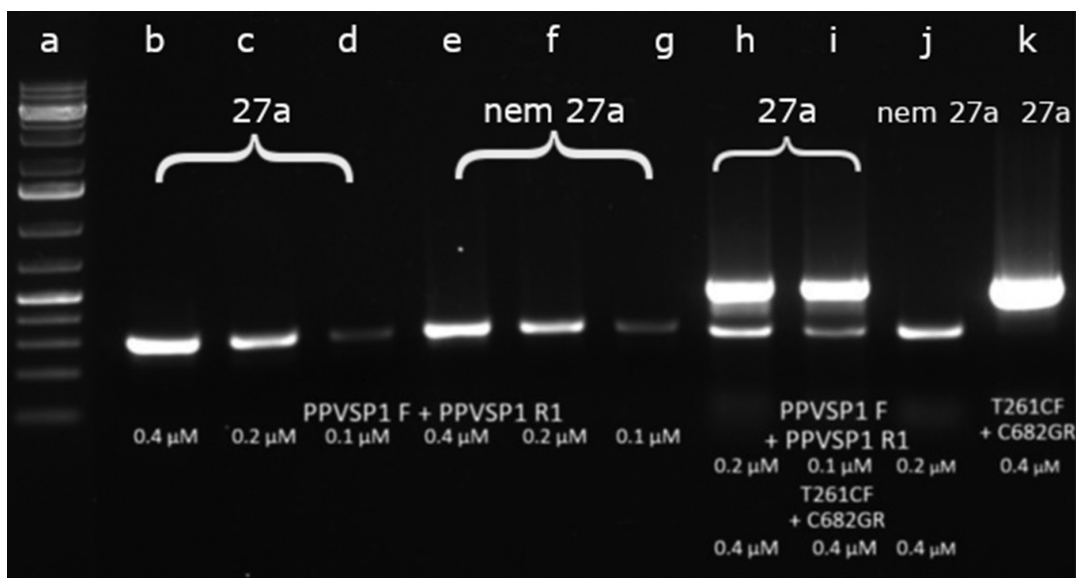
3. ábra | A 27a-specifikus asPCR-primerpárok kiválasztásának tervezési folyamata. A PS1 és PS2 primerpárok a megfelelő 27a és Kresse (nem-27a) szekvenciákkal láthatóak, a 27a-specifikus nukleotidok piros színnel vannak jelölve  
 Forrás: Tamás et al. 2022 alapján

a fent említett, az asPCR-reakció hatékonyságát befolyásoló tényezőket, két primerpárt, a PS1 és PS2-t (a 3' T261C, C682G és C682G, G1240T mutációk alapján) választottuk ki a 27a-specifikus PCR megvalósíthatóságának demonstrálására (3. ábra).

A két primerpár teljesítményének összehasonlítása érdekében gradiens PCR-eket (55–72 °C) végeztünk Hun1 (27a pozitív) és Kresse (27a negatív) templatokkal különböző Mg<sup>2+</sup> (1–3 mM) koncentrációk mellett. A PS1 primerpár a 27a esetében mind a termék mennyisége, mind a specificitás tekintetében jobbnak bizonyult

a PS2-nél (3. ábra), ezért a további munkához 1,4 mM Mg<sup>2+</sup> ion (0,6 mM EDTA) és 61 °C-os anellációs hőmérséklet mellett használtuk.

Mivel a projekt végső célja egy egy reakcióban elvégezhető kettős PCR (27a- és PPV1-specifikus) kifejlesztése volt, egy PPV1-specifikus primer készletet (Psp) (PPV1SP1F és PPV1SP1R1) is teszteltünk a kiválasztott körülmények között. Az ilyen rendszer előnye, hogy belső kontrollt biztosít a PPV1 DNS jelenlétére a mintákban. Ha sem a PPV1-specifikus, sem a 27a-specifikus sáv nem mutatható ki, akkor vagy nincs PPV1 DNS a mintá-



4. ábra | PPV1 és 27a-specifikus primer készletek kombinációja kettős PCR-ben. Sáv a, GeneRuler 1 kb Plus létra; Sáv b–g, Psp (PPV1SP1F + PPV1SP1R1) primerek önmagában különböző koncentrációkban 27a és K22 (nem-27a) templatokkal; Sáv h–j, kettős PCR a Psp és PS1 primer készletek kombinálásával 27a és K22 (nem-27a) templatokkal. Sáv k, PS1 primer készlet 27a templatokkal. A templatok és a primerkoncentrációk az egyéni sávok fölött vannak feltüntetve  
 Forrás: Tamás et al. 2022 alapján

ban, vagy az a kimutatási határ alatt van, vagy a PCR-reakcióval van probléma.

A kettős PCR megfelelő kondíciójának megállapítása érdekében a Psp-s hatékonyságát önmagában és a PSI 27a-specifikus primer készlettel (0,4  $\mu\text{M}$ ) kombinálva különböző hígításokban (0,1, 0,2, 0,4  $\mu\text{M}$ ) is teszteltük. A Psp-s koncentrációjának csökkenése jelentősen befolyásolta a PCR hatékonyságát, amikor önmagában használtuk a PPV1 kimutatására, azonban a PPV1-specifikus sávok még mindig kimutathatók voltak, amikor a Psp-s-t (0,1, 0,2  $\mu\text{M}$ ) a PSI-gyel kombinálva alkalmaztuk. Amikor a 27a DNS-t nagyobb koncentrációban alkalmaztuk, a 27a-specifikus sáv intenzitása némileg csökkent azokban a reakciókban (4. ábra h + i sáv), amelyekben a PSI-et Psp-s-szel kombinálva használtuk, mint amikor egyedül került alkalmazásra (4. ábra k sáv). Ez vagy a GelRed festék koncentrációjának csökkenésének lehetett a következménye a gélben lévő alacsonyabb PPV-specifikus DNS-sávhoz való kötődés miatt, vagy a PCR-reakció komponenseiért való versengés következménye a PCR csőben. A legjobb 27a érzékenységet és az elfogadható PPV1 érzékenységet figyelembe véve a további munkákhoz 0,4  $\mu\text{M}$  koncentrációban használtuk a 27a-specifikus primereket és 0,2  $\mu\text{M}$  PPV1-specifikus primereket. A kettős PCR a 27a DNS kimutatására optimalizált, ezért a PPV1-specifikus primerek alulteljesítenek a szándékosan alkalmazott alacsony primer koncentrációnál, hogy minimálisan zavarják a 27a-specifikus reakciót. A gyakorlatban a PPV1-et általában fertőzött magzatokból vagy más klinikai mintákból nagy érzékenységgű PPV1-specifikus diagnosztikai PCR-rel mutatják ki, így a kettős PCR csökkent PPV1-specifikus érzékenysége általában nem okoz problémát. A PPV1-specifikus primerek fő funkciója a kettős PCR-ben a belső kontroll biztosítása és a nem-27a PPV1 DNS jelenlétének megerősítése. A rendszer PPV1 és 27a érzékenysége egyaránt nagymértékben függ a két primer készlet mennyiségétől és arányától a reakcióban, ezért erősen ajánlott egy mester mix elkészítése. Különösen nagy gondot kell fordítani az új primer tételek használatára, mivel a primerek tényleges mennyisége vagy koncentrációja jelentősen eltérhet a gyárilag megadott adatoktól. Ilyen esetekben a mester-mixben lévő primerkészletek újrakalibrálása elengedhetetlen az optimális teljesítmény és a maximális reprodukálhatóság biztosítása érdekében.

### qPCR fejlesztés

A módszer érzékenyítése és felhasználóbarátabbá tétele érdekében a módszert továbbfejlesztettük qPCR-alkalmazásra. Két belső szondát terveztünk a 27a (szonda 1-2) és a PPV1-specifikus ampliconokhoz (szonda 3-4) ZEN-Iowa fekete kettős quencherrel és 5' FAM, illetve 5' HEX fluoreszcens kromofórral. A szonda és a hőmérsékletprofil kiválasztásához kétféle gradiens kettős qPCR-t (A párosítás, 1. és 3. szonda; és B párosítás, 2. és

4. szonda) végeztünk 27a és NADL2 (nem 27a) DNS-sel 55–70 °C-os anellálási hőmérséklet között.

A további munkához az A kombinációt választottuk ki, mivel a 27a DNS-sel közel optimális (56–60,9 °C) anellálási hőmérsékleten jobb teljesítményt nyújtott. Figyelembe véve a PCR-gépek közötti lehetséges hőmérséklet-eltéréseket, a további munkához az 58 °C-ot választottuk az optimális hőmérséklet-tartomány mediánjaként. A kiválasztott feltétel működését egy 27a és egy ismert koncentrációjú K22 (nem-27a) DNS-mintával vizsgáltuk tovább. Mivel a kettős qPCR-t 27a DNS kimutatására optimalizáltuk, és a PPV1-specifikus primereket szándékosan alacsonyabb koncentrációban alkalmaztuk, hogy ne zavarják a 27a-specifikus reakciót, így a PPV1-specifikus PCR itt is alulteljesít 27a pozitív mintákban. A kettős qPCR érzékenysége a 27a DNS esetében < 240 kópia/reakciónak bizonyult, míg a PPV1 DNS esetében 27a és nem-27a templátok esetén < 2400, illetve < 1700 kópia/reakció volt. A 27a kettős PCR-ek kimutatási határát összehasonlítva (<  $1,66 \times 10^4$  kópia/reakció) a kettős PCR-ben versus < 240 kópia/reakció) a kettős qPCR-ben körülbelül 2 nagyságrendnyi javulást állapítottunk meg.

### Klinikai minták vizsgálata 27a-specifikus PCR-rel

A módszer alkalmazhatóságának tesztelésére szövetmintát gyűjtöttünk olyan klinikai esetekből, ahol bármilyen magzati veszteség volt megfigyelhető, beleértve a mumi-fikálódott vagy abortált magzatokat is. A diagnosztikai PCR segítségével PPV1 pozitívnak talált nyugat- és közép-európai mintákat tovább vizsgáltuk a 27a törzs jelenlétére. Mind a kettős PCR, mind a kettős qPCR alkalmazhatóságát teszteltük a 27a és a nem-27a PPV1 vírusok megkülönböztetésére ezekben a terepi mintákban. Az összesen 32 vizsgált minta közül 26-ot legalább az egyik módszerrel 27a-pozitívnak találtuk. Az azonos esetekből származó minták genotípusuk (27a vagy nem-27a) tekintetében egységesnek bizonyultak, ami közvetve megerősíti a kettős PCR megbízhatóságát. A módszerek konzisztenciájának további vizsgálata érdekében 20 mintán végeztünk PCR-t, és az így kapott ampliconokat (921 bp amplicon) szekvenáltuk, hogy kimutassák a 27a három jellegzetes mutációjának (G1240T, G1255C, T1306A) jelenlétét. Mind a 15 minta, amelyről korábban a kettős PCR-rel bizonyítottuk, hogy 27a, az 1240T, 1255C, 1306A mutációt tartalmazta, míg a 6 nem 27a minta 1240G, 1255G, 1306T nukleotidokat hordozott, ami megerősíti a módszer nagy fokú megbízhatóságát. Három 27a izolátum teljes genom szekvenciáját is meghatároztuk, ami ismét igazolta a 27a genom jellemzőit. Érdekes módon a tizennégy esetből nyolcban 27a típusú vírusokat mutattak ki, ami arra utal, hogy a vizsgált mintákban erősen jelen vannak ezek a típusok. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy mintáink nem tekinthetők az

európai sertés- vagy PPV1-populáció reprezentatív képviselőinek, vizsgálatunk elsődleges célja a PCR-módszereink klinikai mintákon történő validálása volt.

## Vizsgálati eredmények értékelése, megvitatása, összefoglalása és következtetések levonása

A 27a típusú vírusok immunológiai jellemzőiről és állategészségügyi jelentőségéről ellentmondásos adatok találhatóak a szakirodalomban. Ezért e vírusok biológiájára iránt folyamatos tudományos és kereskedelmi érdeklődés mutatkozik. Először is a 27a klasztert megkülönböztető genetikai jellemzőket határoztuk meg szekvenciaillesztések és a filogenetikai elemzés alapján, amely kimutatta, hogy öt, együttesen előforduló, szorosan összefüggő pontmutáció (261C, 682G, 1240T, 1255C, 1306A) különbözteti meg a klaszter tagjait a többi PPV1-variáns-tól. A jellemző pontmutációk közül kettő (261C és 682G) kihasználása lehetővé tette egy allélspecifikus primer készlet (PS1) felhasználását egy 27a-specifikus asPCR-rendszer kifejlesztéséhez. Az allélspecifikus primerpár 27a-specifikus érzékenysége  $< 1,7 \times 10^4$  kópia/reakció volt mind a szimpla, mind a kettős PCR esetében. A fluoreszcens szondák alkalmazása a kettős qPCR-ben mintegy két nagyságrenddel növelte a módszer érzékenységét a 27a DNS-re ( $< 240$  kópia/reakció). A 27a-specifikus kettős PCR-t és qPCR-t klinikai mintákon validáltuk részleges VP2 és teljes genomszekvenálással, és 100%-ban megbízhatónak találtuk.

Az allélspecifikus PCR-primerek használata lehetővé teszi a 27a típusú vírusok gyors megkülönböztetését a többi PPV1 genotípustól. A felhasználók preferenciája szerint az ezek alapján kifejlesztett PCR-ek bármelyike használható diagnosztikai eszközként az állatorvosi gyakorlatban. Ezen túlmenően e sokoldalú PCR-rendszer alkalmazása megkönnyítheti a terepi vizsgálatokat, amelyek hozzájárulhatnak a vírus előfordulási gyakoriságának egyértelmű felméréséhez és a 27a biológiájának jobb megértéséhez.

## Köszönetnyilvánítás

A projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával valósult meg.



## Irodalomjegyzék

- Bergeron, J., Menezes, J., & Tijssen, P. (1993) Genomic Organization and Mapping of Transcription and Translation Products of the NADL-2 Strain of Porcine Parvovirus. *Virology*, Vol. 197. No. 1. pp. 86–98. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1569>
- Cadar, D., Dán, Á., Tombácz, K., Lőrincz, M., Kiss, T., Becskei, Z., ... Cságola, A. (2012) Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 12. pp. 1163–1171. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.020>
- Cartwright, S. F., & Huck, R. A. (1967) Viruses isolated in association with herd infertility abortions and stillbirths in pigs. *Veterinary Record*, Vol. 81. pp. 196–197.
- Cartwright, S. F., Lucas, M., & Huck, R. A. (1969) A small haemagglutinating porcine DNA virus. *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 79. No. 3. pp. 371–377. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(69\)90053-X](https://doi.org/10.1016/0021-9975(69)90053-X)
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, Vol. 16. No. 22. pp. 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- García-Morante, B., Noguera, M., Klocke, S., Sommer, K., & Bridger, P. (2020) Duration of immunity against heterologous porcine parvovirus 1 challenge in gilts immunized with a novel subunit vaccine based on the viral protein 2. *BMC Veterinary Research*, Vol. 16. Article No. 184. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02394-4>
- GenBank [WWW Document] (n. d.) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Józwik, A., Manteufel, J., Selbitz, H.-J., & Truyen, U. (2009) Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. *Journal of General Virology*, Vol. 90. No. 10. pp. 2437–2441. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012054-0>
- Kiss, I., Kovács, E., Zádori, Z., Mészáros, I., Cságola, A., Bajnóczi, P., ... Palya, V. (2020) Vaccine Protection Against Experimental Challenge Infection with a PPV-27a Genotype Virus in Pregnant Gilts. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, Vol. 11. pp. 17–24. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S236912>
- Li, C., & Samulski, R. J. (2020) Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 21. pp. 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>
- Llamas-Saiz, A. L., Agbandje-McKenna, M., Parker, J. S., Wahid, A. T., Parrish, C. R., & Rossmann, M. G. (1996) Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which controls antigenicity and host range. *Virology*, Vol. 225. No. 1. pp. 65–71. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0575>
- Lorenz, T. C. (2012) Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Mészáros, I., Olasz, F., Cságola, A., Tijssen, P., & Zádori, Z. (2017a) Biology of Porcine Parvovirus (Ungulate parvovirus 1). *Viruses*, 9. No. 12. E393. <https://doi.org/10.3390/v9120393>
- Mészáros, I., Tóth, R., Olasz, F., Tijssen, P., & Zádori, Z. (2017b) The SAT Protein of Porcine Parvovirus Accelerates Viral Spreading through Induction of Irreversible Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Virology*, Vol. 91. No. 16. e00627-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00627-17>
- Multalin [WWW Document] (n. d.) <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- Nielsen, J., Rønsholt, L., & Sørensen, K. J. (1991) Experimental in utero infection of pig fetuses with porcine parvovirus (PPV). *Veterinary Microbiology*, Vol. 28. No. 1. pp. 1–11. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90095-w](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90095-w)
- Noguera, M., Vela, A., Kraft, C., Chevalier, M., Goutebroze, S., de Paz, X., ... García-Morante, B. (2021) Effects of three commercial vaccines against porcine parvovirus 1 in pregnant gilts. *Vaccine*, Vol. 39. No. 29. pp. 3997–4005. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.05.042>



- Ren, X., Tao, Y., Cui, J., Suo, S., Cong, Y., & Tijssen, P. (2013) Phylogeny and evolution of porcine parvovirus. *Virus Research*, Vol. 178. No. 2. pp. 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.014>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, Vol. 7. 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Simpson, A. A., Hébert, B., Sullivan, G. M., Parrish, C. R., Zádori, Z., Tijssen, P., & Rossmann, M. G. (2002) The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 315. No. 5. pp. 1189–1198. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5319>
- Streck, A. F., Canal, C. W., & Truyen, U. (2015) Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 36. pp. 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.007>
- Streck, A. F., Canal, C. W., & Truyen, U. (2022) Viral Fitness and Antigenic Determinants of Porcine Parvovirus at the Amino Acid Level of the Capsid Protein. *Journal of Virology*, Vol. 96. No. 2. e0119821. <https://doi.org/10.1128/JVI.01198-21>
- Streck, A. F., Homeier, T., Foerster, T., & Truyen, U. (2013) Population dynamics and in vitro antibody pressure of porcine parvovirus indicate a decrease in variability. *Journal of General Virology*, Vol. 94. No. 9. pp. 2050–2055. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052555-0>
- Tamás, V., Mészáros, I., Olasz, F., Kiss, I., Homonnay, Z. G., Mortensen, P., & Zádori, Z. (2022) Allele-Specific Dual PCRs to Identify Members of the 27a Cluster of PPV. *Viruses*, Vol. 14. No. 7. 1500. <https://doi.org/10.3390/v14071500>
- Ugozzoli, L., & Wallace, R. (1991) Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*, Vol. 2. No. 1. pp. 42–48. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(05\)80124-0](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(05)80124-0)
- van den Born, E., van den Elzen, P. P. M., van Kilsdonk, E., Hoeijmakers, M. J. H., & Segers, R. P. A. M. (2020) An octavalent vaccine provides pregnant gilts protection against a highly virulent porcine parvovirus strain. *BMC Veterinary Research*, Vol. 16. Article No. 55. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2272-3>
- Zeeuw, E. J. L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H.-J., & Truyen, U. (2007) Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*, Vol. 88. No. 2. pp. 420–427. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82302-0>
- Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H.-J., Heinritz, K., & Truyen, U. (2006) VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *Journal of General Virology*, Vol. 87. No. 2. pp. 295–301. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81086-0>

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID\_1)