

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA

Hungarian Veterinary Journal
Vol. 146. No. 10. – Budapest, October 2024
Established by Prof. B. Nádaskay, 1878

Natív kutyasperma fáziskontraszt-mikroszkóppal vizsgálva

SERTÉS

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* által okozott hirtelen elhullás és vetélés kocákban

KISÁLLAT

Kutyasperma mélyhűtése, fagyasztó-oldatokkal végzett összehasonlító vizsgálatok előzetes eredményei

Az rhG-CSF használata a macska panleukopeniájának kezelésében

VADON ÉLŐ ÁLLAT

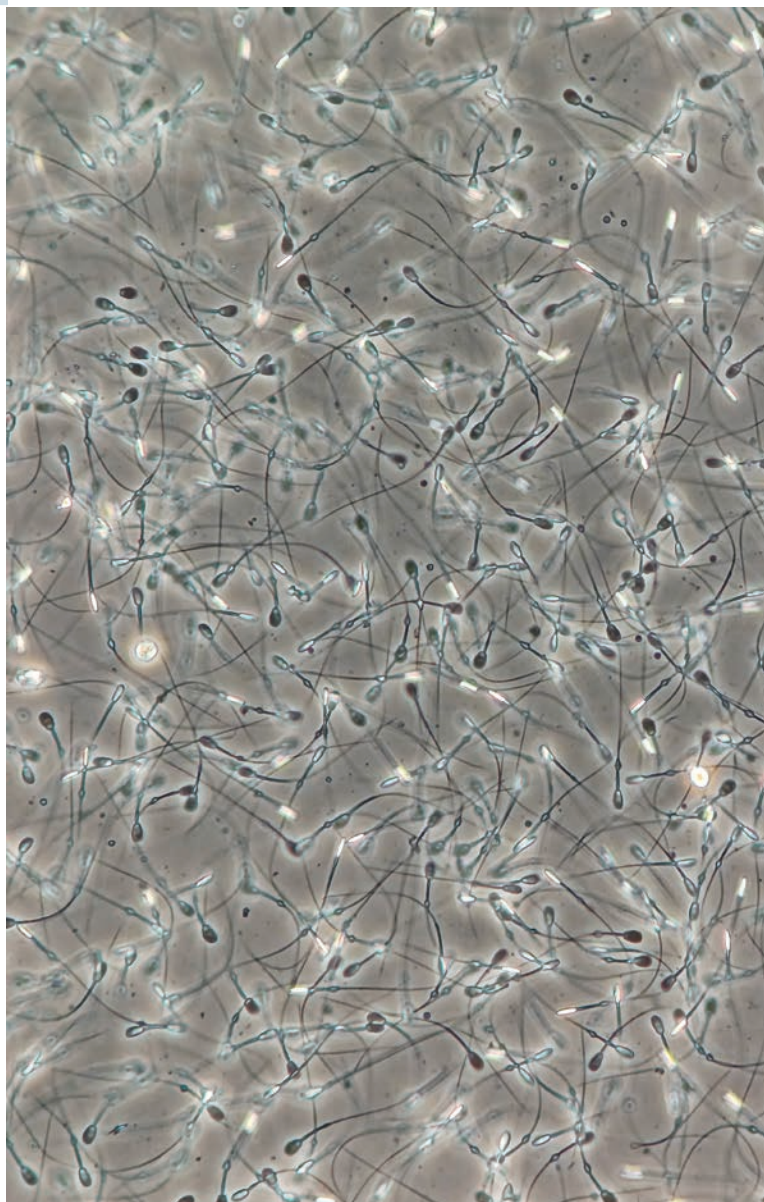
Sejtmagi és mitokondriális genetikai markerek tesztelése hazai muflonokban (*Ovis aries musimon*)

VIROLÓGIA

Nyugat-nílusi vírus fertőzésre adott immunválasz I. rész: Veleszületett és sejthez kötött immunválasz

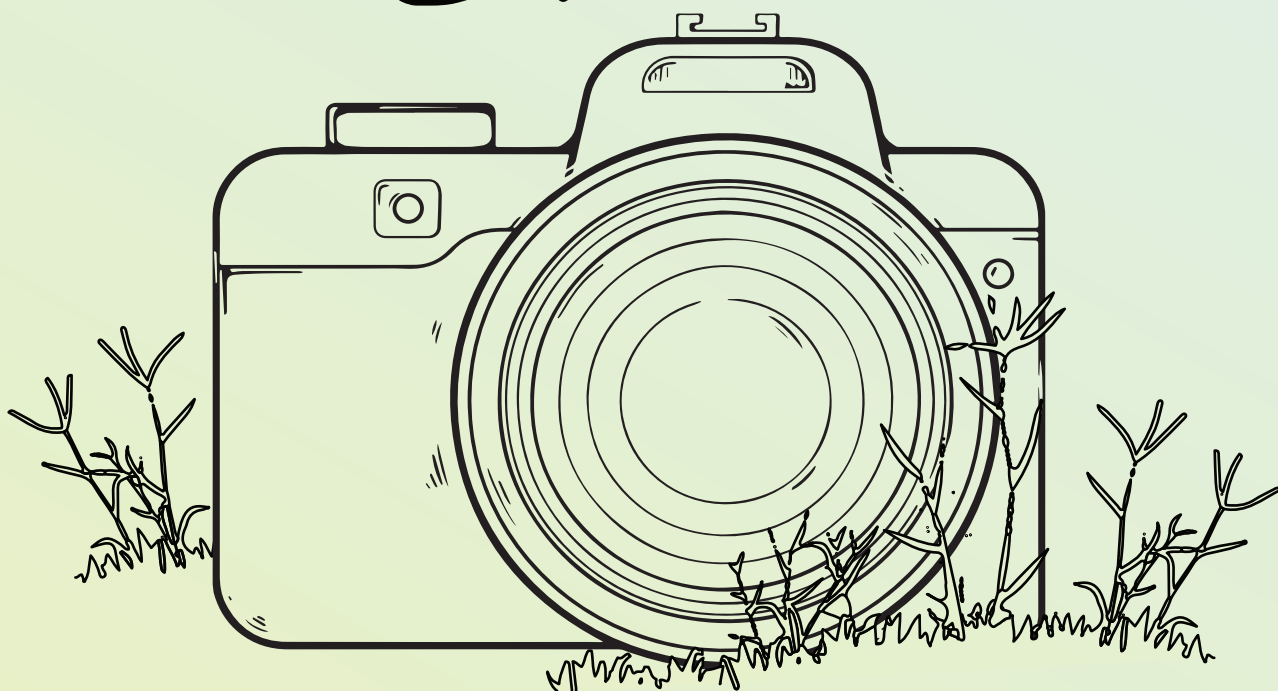
AKADÉMIAI BESZÁMOLÓK

Klinikumok





A GYEPEK TITKAI 5. FOTÓPÁLYÁZAT



BEKÜLDHETŐ: **2025.06.30.**

további információ:
www.grasslandlifeip.hu/a-gyepek-titkai

SERTÉS / PORCINE

579. Albert E., Kis I. E., Kiss K., K-Jánosi K., M. de Oliveira Costa, Tolnai Gy., Biksi I.: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* által okozott hirtelen elhullás és vetélés kocákban – az első dokumentált eset Magyarországon
Másodközlés
E. Albert, I. E. Kis, K. Kiss, K. K-Jánosi, M. de Oliveira Costa, Gy. Tolnai, I. Biksi: Abortion and lethal septicemia in sows caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

KISÁLLAT / SMALL ANIMALS

589. Bacsá M., Török D., Bakony M., Somoskői B., Müller L., Keresztes Zs., Bordás L., Cseh S.: Kutyasperma mélyhűtése, fagyasztóoldatokkal végzett összehasonlító vizsgálatok előzetes eredményei
M. Bacsá, D. Török, M. Bakony, B. Somoskői, L. Müller, Zs. Keresztes, L. Bordás, S. Cseh: Dog semen freezing: preliminary results of comparative studies with different freezing extenders

603. B. B. Erol, E. Gülersoy, E. Koral: Az rhG-CSF használatának a szerotoninkoncentrációra gyakorolt rövid távú hatásai a macska panleukopeniájának kezelésében
B. B. Erol, E. Gülersoy, E. Koral: Short-Term Effects of rhG-CSF Use on Serotonin Concentration in the Treatment of Feline Panleukopenia

VADON ÉLŐ ÁLLAT / WILD ANIMALS

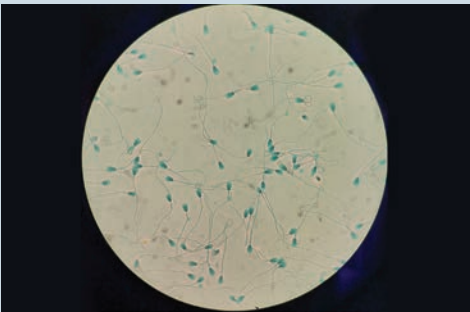
615. Zorkóczy O. K., Bujtor Zs., Wagenhoffer Zs., Lehotzky P., Zenke P.: Sejtmagi és mitokondriális genetikai markerek tesztelése hazai muflonokban (*Ovis aries musimon*)
O. K. Zorkóczy, Zs. Bujtor, Zs. Wagenhoffer, P. Lehotzky, P. Zenke: Examination of nuclear and mitochondrial genetic markers in mouflons (*Ovis aries musimon*) in Hungary

VIROLÓGIA / VIROLOGY

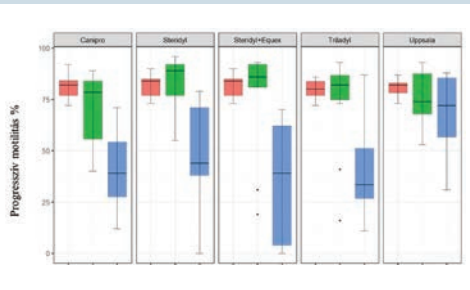
625. Tolnai Cs. H., Forgách P., Lőrincz M., Kutasi O.: Nyugat-nílusi vírus fertőzésre adott immunválasz I. rész: Velezületett és sejthez kötött immunválasz Irodalmi áttekintés
Cs. H. Tolnai, P. Forgách, M. Lőrincz, O. Kutasi: Immune response to West Nile virus infection Part I.: Innate- and cellular immune response
Literature review

AKADÉMIAI BESZÁMOLÓK

637. Klinikumok



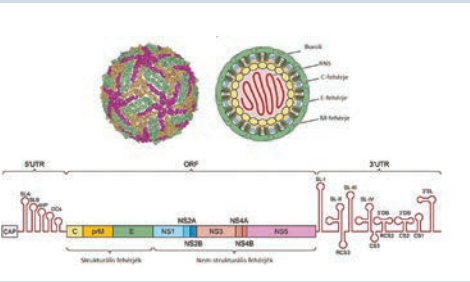
589. Kutyasperma Spermac-festéssel



595. Kutyasperma mélyhűtése



615. Muflon kos



628. A Nyugat-nílusi vírus szerkezete

A folyóiratot indexeli és referálja/The journal is indexed and abstracted by: CAB Abstracts (CABI), Science Citation Index Expanded, Zoological Record, BIOSIS previews (Thomson Reuters), Scopus (Elsevier).
Tartalom/Contents: Current Contents – Agriculture, Biology & Environmental Sciences (Thomson Reuters)

Ingyenes mutatószám kérhető a főszerkesztőtől/Free sample copies are available from the editor-in-chief: H-1078 Budapest, István utca 2. Hungary
Megrendelhető a fenti címen a szerkesztőségtől/
Subscription orders to the Editorial Office (address above)

*** Internet address
(English contents pages, subscription price, etc.)
<http://www.univet.hu/mal>



Születésének 140. évfordulója alkalmából dr. Berrár Mihályra emlékezünk

DR. BERRÁR MIHÁLY 1884-ben született Tiszaburán, ám középiskolás éveit már Aradon töltötte. Évfolyamának legjobb tanulói közé tartozott, amely jeles érettségi eredményében is megmutatkozott. Ezt követően, míg legtöbbször tisztviselői, ill. kereskedői pályát választottak, BERRÁR egyedülként az állatorvosit, így tehát 1902-ben beiratkozott az akkori nevén Magyar Királyi Állatorvosi Főiskolára.

Már a főiskolai évek alatt, hallgatóként is aktív résztvevője volt az ifjúsági életnek, így lehetett alelnöke az akkor alapított Ifjúsági Kórházegyesületnek, majd elnöke az Állatorvos-tan-hallgatók Körének, ill. társelnöke az Egyetemi és Főiskolai Diákszövetségnek.

1906-ban jeles értékeléssel kapta meg állatorvosi oklevelét, amely után DR. FARKAS GÉZA orvosdoktorának lett tanársegédje. 5 évvel később megszerezte az állatorvos-doktori fokozatot *summa cum laude* minősítéssel. Ezekben az években nemcsak szellemileg, de fizikailag is közel volt a főiskolához, mivel a korabeli lakásjegyzékekből kiderül, hogy a Rákóczi út 57/B szám alatt élt, néhány perc sétányira munkahelyétől.

Ismereteinek gyarapítása céljából 1909-1910-ben tanulmányutakat tett többek közt Németországba, Franciaországba, Egyiptomba, Indiába, Kínába, Japánba, Amerikába és Angliába is. Útjai során tanulmányozta a helyi állatorvosi intézeteket és azok gyakorlati munkáját. Hazatérve „életvegytani kutatásokat folytatott, vizsgálatainak eredményeit hazai és külföldi folyóiratokban megjelent munkáiban ismertette.” (MÁL, 1929)

Így megszerzett széles körű tudásának birtokában a sebészet területén tevékenykedett tovább, különös figyelmet szentelve az állatorvosi szemészetnek. Ebben a témában írt dolgozatai átfogó szaktudást mutatnak, vizsgálatainak eredményei számos kérdésre választ adtak. Állatorvosi ismereteit bővítette azon időszak is, amelyet az első világháborúban az egyik hadikórház állatorvos főnökeként töltött el.

1913-tól öt éven át volt a sebészeti klinikán tanársegéd DR. PLÓSZ BÉLA mellett, majd 1917-től segédtanárnak folytatta állatorvosi pályafutását, végül 1919-ben a szemvizsgálat módszerei tanszakra magántanári képesítést szerzett. 1922-ben rendkívüli tagja lett az Országos Egészségügyi Tanácsnak is, majd 1924-ben nyilvános rendes tanárrá nevezték ki.

„Széleskörű, alapos képzettségének, kiváló szakavatottságának, gazdag gyakorlati ismereteinek és gyakorlati érzékének bizonyítéka az állatorvosi sebészetet és szemészetet magában foglaló, két kötetre kiterjedő kiváló könyve.” (MÁL, 1929)

Élete utolsó pár évében is az egyetem fejlődésén fáradozott, hisz az akkor épülőfélben lévő sebészeti klinika tervezésének is aktív részese volt. Tartalmas életpályája azonban korai halála miatt (1929) sajnos derékba tört.

„Neve, szelleme munkáiban él...” (MÁL, 1929)

Osváth Emese

FŐSZERKESZTŐ / EDITOR-IN-CHIEF

Dr. BALKÁ Gyula

SZERKESZTŐBIZOTTSÁG / EDITORIAL BOARD

Dr. Abonyi Tamás
Dr. Balka Gyula (elnök), Dr. Bándy Pál
Dr. Bíró Ferenc, Dr. Bodó Gábor
Dr. Búza László, Dr. Dunay Miklós Pál
Dr. Farkas Róbert, Dr. Fekete Sándor György
Dr. Fodor László, Dr. Gál János
Dr. Gálfi Péter, Dr. Gönczi Gábor
Dr. Jakab Csaba, Dr. Jerzsele Ákos
Dr. Korzenszky Emőd, Dr. Laczay Péter
Dr. Magyar Tibor, Dr. Manczur Ferenc
Dr. Molnár Viktor, Dr. Nagy Béla
Dr. Nemes Imre, Dr. Németh Tibor
Dr. Ózsvári László, †Dr. Sályi Gábor
Dr. Seregi János, Dr. Solti László
Dr. Sótonyi Péter, Dr. Szieberth István
Dr. Tóth Balázs, †Dr. Tuboly Tamás
Dr. Varga János, †Dr. Vetési Ferenc
Dr. Visnyei László, Dr. Vörös Károly

SZERKESZTŐSÉGI TITKÁR

Tóth Zsuzsanna

SZERKESZTŐSÉG / EDITORIAL OFFICE

H-1078 Budapest, István u. 2. Hungary
Levélcím: 1400 Budapest 7. Pf. 2.
Telefon/fax: (36-1) 341-3023
Internet: <http://www.univet.hu/mal>
E-mail: mal@univet.hu

KIADÓ / PUBLISHER

Herman Ottó Intézet Nonprofit Kft.
H-1223 Budapest, Park u. 2.
Telefon: (36-1) 362-8130
Telefax: (36-1) 362-8104
Internet: www.agrarlapok.hu
E-mail: info@agrarlapok.hu
Felelős kiadó: Füredi Kornél ügyvezető

HIRDETÉSEK FELVÉTELE

Telefon: (36-70) 232-4231, (36-1) 362-8130
Telefax: (36-1) 470-0410
E-mail: info@agrarlapok.hu

Minden jog fenntartva. A lapból értesüléseket átvenni csak a Magyar Állatorvosok Lapjára való hivatkozással lehet. A hirdetések és egyéb reklámkiadványok tartalmáért a kiadó felelősséget nem vállal.

LAPTERV

made by zwoelf – www.zwoelf.hu

TERVEZŐSZERKESZTŐ

Kismaros Rika

NYOMDAI KIVITELEZÉS:

Séd Nyomda, Szekszárd

INDEX: 25531

HU ISSN 0025-004X (Nyomtatott)

HU 3003-9924 ISSN (Online)

A KIADÁST TÁMOGATJA (SPONSORED BY)

Agrárminisztérium
MTA Könyv- és Folyóiratkiadó Bizottsága

LAPTULAJDONOS



KIADÓ



Abortion and lethal septicaemia in sows caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

E. Albert^{1,2}

I. E. Kis¹

K. Kiss³

K. K-János^{1*}

M. de Oliveira Costa^{4,5}

Gy. Tolnai⁶

I. Biksi¹

1. Patológiai Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem, Haszonállat-diagnosztikai Központ, H-2225 Üllő, Dóra major

2. Metagenomikai Intézet, Debreceni Egyetem, Debrecen

3. SCG Diagnosztika Kft., Délegyháza

4. Department of Large Animal Clinical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada

5. Department of Population Health, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

6. Szabadhegyi Állategészségügyi Centrum, Győr

*e-mail: kincses-janos.katalin@univet.hu

***Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* által okozott hirtelen elhullás és vetélés kocákban – az első dokumentált eset Magyarországon**

Másodközlés – Transboundary and Emerging Infectious Diseases, Albert et al., 2024. First published: 23 July 2024 (<https://doi.org/10.1155/2024/4008946>)

Albert Ervin^{1,2}, Kis István Emil¹, Kiss Krisztián³, K-János Katalin^{1*}, Matheus de Oliveira Costa^{4,5}, Tolnai György⁶, Biksi Imre¹

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SEZ) kóroktanú járványok már az 1970-es évek óta súlyos károkat okoznak a délkelet-ázsiai és a kínai sertéságazatban. Az elmúlt évtizedben Észak-Amerikában is leírtak már a baktérium által okozott septicaemia miatti, jelentős mortalitással járó eseteket. Európában ez idáig mindössze két, hasonló tünetekkel járó SEZ oktanú járványkitörésről számoltak be. A szerzők esetleírásukban a kelet-közép-európai régió első dokumentált SEZ okozta járványkitörését ismertetik, amely során egy nyugat-magyarországi ökológiai gazdálkodású sertéstelepen kocák vetélését és hirtelen elhullását tapasztalták.

SUMMARY

Background: Outbreaks of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SEZ) – a zoonotic pathogen – have caused severe epidemics in the pig sector since the 1970s in South-Eastern Asia, especially in China and more recently in North America. Cases of high mortality caused by peracute septicaemia were all attributed to strains of a highly virulent clonal lineage belonging to the sequence type (ST) 194. In Europe, only two outbreaks have been reported with similar features, but caused by other sequence types.

Case description: In August 2023 afebrile disease with abortion and subsequent deaths were observed among sows kept on a small-scale organic pig farm in West Hungary.

Materials and Methods: Serum samples from affected sows were serologically tested and microagglutination tests as well as real-time PCR tests were carried out to exclude common infectious agents causing abortion and sudden death. Organs collected from selected animals were examined with the routine bacteriology as well as with the routine abortion panel of the Production Animal Diagnostic Centre (Üllő, Hungary). Two selected strains were whole genome sequenced and tested for antibiotic susceptibility against 19 antimicrobial agents.

Results and Discussion: Clinical signs, pathological lesions, and microbiological findings were suggestive of septicaemia of bacterial origin caused by SEZ. According to the results of the routine laboratory testing no other relevant infectious agents than SEZ were involved. Whole genome sequence analysis assigned the examined strains, unrelated to any of the European isolates. A sudden weather change and subsequent extremely high average daily temperature before the outbreak could be identified as the only predisposing factor. The abrupt antibiotic treatment and applied biosecurity measures can help to restrict and terminate the outbreak. To our knowledge, this is the first report on abortion and lethal septicaemia in sows from the Eastern part of Central Europe, especially Hungary. The results call attention to the potential of non-ST194 SEZ strains to cause outbreaks on pig farms.

SERTÉS

A *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SEZ) egy Gram-pozitív, β -hemolizáló, szerológiailag a Lancefield C csoportba tartozó baktérium, amely a legtöbb melegvérű emlősfajban – köztük az emberben is – a nyálkahártyák kommenzalistájaként lehet jelen [1]. A baktérium széles gazdaspektrummal rendelkező opportunist kórokozónak tekinthető, amely elsősorban lovakban okozhat orrgyulladást, tüdő- és mellhártyagyulladást, valamint placentitist, továbbá csikók septicaemiájának és ízületgyulladásának kóroktanában is előfordulhat [2, 3]. Ezenkívül a kórokozót izolálták már kutyák elhullással járó, heveny vérzéses tüdőgyulladásából [4], valamint macskák, tengerimalacok és lámák véráramfertőzéséből is [5–7].

**A SEZ egy széles
gazdaspektrumú,
zoonotikus,
opportunist kórokozó**

**A sertések
nyálkahártyáin
előforduló normál
mikrobióta
részét képezi**

A SEZ emellett jelentős zoonotikus potenciállal is rendelkezik, az elmúlt évtizedben jelentősen emelkedett a dokumentált humán esetek száma [8, 9].

A SEZ a sertések nyálkahártyáin előforduló normál mikrobióta részét képezi [1], azonban bizonyos törzsei jelentős elhullással járó járványokat is okozhatnak [10]. Kína Szecsuan tartományában 1977-ben dokumentálták az első, virulens SEZ-törzs által okozott járványkitörést, amely során több, mint 300 000 sertés hullott el [11]. A kórokozó azóta is jelen van a délkelet-ázsiai régióban [12], ugyanakkor 2019-ben már Kanadában és az USA-ban is dokumentáltak jelentős gazdasági károkkal járó SEZ okozta járványkitöréseket [10, 13].

A jelentős mortalitással járó járványkitörések esetén a hirtelen elhullást általában nem előzték meg klinikai tünetek [10, 13]. Az érintett állatok legyengültek, esetenként ataxiás tüneteket mutattak, elfeküdtek, majd nehezített légzés mellett elhullottak. Ugyanezek a tünetek néhány koca esetében a vetélést követték [10, 13, 14]. Sertések kísérleti SEZ-fertőzése során levertséget, emelkedett légzésszámot, valamint nehéz légzést és lázat figyeltek meg [15, 16].

**Esetenként jelentős
elhullással járó
járványokat okozhat**

A természetes fertőzés következtében elhullott állatok boncolása során rendszerint szepszisre utaló elváltozásokat állapítottak meg [13]. A leggyakoribb elváltozások a nyirokcsomók megnagyobbodása és vörösesbarna elszíneződése, a vérzéses nyirokér-gyulladás [13] és a lépmeagnagyobbodás voltak [17]. Gyakran egy vagy több savóshártyára kiterjedő fibrines gyulladást, orrgyulladást, tüdő- és epehólyagfal-vizenyőt, sokízületi gyulladást, tüdő- és hörgőgyulladást, szívbelhártya- és lágyagyburok-gyulladást írtak le [10, 12, 13, 18, 19].

A bakteriális eredetű járványkitörések vizsgálata során a kórokozó evolúciós eredetének és terjedésének nyomon követése gyakran genomikai módszerekkel, pl. a multilókusz szekvencia-tipizálással (MLST) történik. Az MLST-adatbázis alapján, az izolátumok ugyanazon szekvenciatípushoz történő hozzárendelése alátámaszthatja azok szoros evolúciós kapcsolatát, ezek mellett utalhat a gazdaállat vagy a fertőzési hely preferenciáira is [20].

A nagyarányú elhullással járó észak-amerikai és kínai esetekből izolált SEZ-törzsek mindegyike a 194-es szekvenciatípusba (ST) tartozott [13, 17]. A szekvenciatípus extrém virulenciáját kísérleti fertőzésekkel is igazolták [16], valamint genomanalízis segítségével egy M-szerű fehérje jelenlétét és bizonyos genomszigetek egyedi kombinációját mutatták ki [17, 21]. Ugyanakkor a nem-ST194 törzsek is képesek súlyos megbetegedést előidézni sertésekben sporadikus esetek, ill. izolált járványkitörések formájában [14, 17, 19]. SEZ okozta járványkitöréseket Európában is leírtak az elmúlt években, azonban egyik kitörésből izolált törzs sem tartozott a magas patogenitású 194-es szekvenciatípusba [19, 22].

A szerzők jelen esetleírásban elsőként ismertetnek Kelet-Közép-Európában kocák vetélésével és hirtelen elhullásával járó SEZ okozta járványkitörést egy nyugat-magyarországi ökológiai gazdálkodású sertéstelepen.

SAJÁT VIZSGÁLAT – ESETLEÍRÁS

2023 augusztusában egy nyugat-magyarországi organikus sertéstelepen egyes kocák lázas megbetegedését, vetélését és/vagy elhullását észlelték. Az ökológiai minősítésének megfelelően a sertéstelepen kombinált tartást alkalmaztak, ahol

Egy organikus
sertésstelepen
egyes kocák lázas
megbetegedését,
vetélését és/vagy
elhullását észlelték

minden állatcsoportot fedetlen kifutóban és szalmával almoltt, fedett kutricában helyeztek el. A fialástól a befejezésig minden kor- és termelési csoportot ugyanabban a gazdaságban neveltek, beleértve a kocákat ($n = 184$), a kanokat ($n = 4$), a kocasüldőket ($n = 15$) és a karanténba érkezett tenyészsüldőket ($n = 83$) is. A vemhes kocákat egy istállóban, 12 csoportban tartották, kutricánként legfeljebb 16 állatot helyeztek el. A lefialt kocákat utódaikkal együtt négy hétig két különálló, 32 fős fiasztatóban tartották. Ezt követően a kocákat és utódaikat a nevelőbe helyezték át, ahol csoportonként 4–5 kocát tartottak, amíg a malacokat 7 hetes korban el nem választották. Az elválasztás után a hizlaldába kerültek az állatok, ahol nagyjából az 50 kg-os testtömeg eléréséig maradtak, mielőtt Ausztriába szállították őket végső hizlálásra. Az állatok mozgatása folyamatos volt a különböző részlegek között. A telepen évente átlagosan 4–5 (~2,5%) koca vetélt és 5–6 (~3%) koca hullott el.

A szopós malacok kivételével minden termelési csoportot *Erysipelothrix rhusiopathiae* (ER, sertésorbánc) elleni vakcinázásban részesítettek: a kocákat minden laktáció során, egy héttel a választás előtt, a kocasüldőket 6 héttel és 2 héttel az első termékenyítésük előtt, a kanokat félévente, a növendék malacokat pedig életük 8–10. hetében. A sertés-parvovírus (PPV1) elleni vakcinát a kocáknak és kocasüldőknek az orbánc vakcinával kombinálva adták. A malacokat *Mycoplasma hyopneumoniae*, sertés-circovírus (PCV2) és *Lawsonia intracellularis* ellen is vakcinázták életük első négy hetében. Az F4⁺ és F18⁺ *Escherichia coli* elleni vakcinát 5–7 nappal az választás előtt adták a malacoknak.

A telepen organikus igazolással rendelkező takarmányt etettek, ill. a jogszabályi kereteknek megfelelő gyógyszereket (2018/848/EPR), valamint tisztító- és fertőtlenítőszereket alkalmaztak (2021/1165/EC) [23, 24].

A lehetséges hajlamosító tényezők keresése érdekében adatokat gyűjtöttünk a hirtelen változásokról, az új állatok bevezetéséről és az esetleges időszakosan előforduló betegségek előzményeiről. A takarmányozás, a vízellátás vagy más releváns tartástechnológiai paraméterek változásait és a szélsőséges időjárási körülményeket mind potenciális stressztényezőként vettük figyelembe. Az időjárási adatokat a Magyar Meteorológiai Szolgálat adatbázisából kértük le (<https://odp.met.hu/climate/observations.hungary>, utoljára megtekintve: 2024. február 22.).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az érintett kocákból származó szérumminták vizsgálatát a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának (Budapest) laboratóriumában végezték. A szérumminták ELISA-vizsgálata sertés-herpeszvírus 1 (SuHV-1, Aujeszky-betegség vírusa), *Brucella suis*, valamint a sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírus (PRRSV) elleni antitestek jelenlétének kimutatására irányult, emellett mikroagglutinációs teszttel (MAT) *Leptospira*-fajok elleni antitestek jelenlétét vizsgálták. Ezeken túl PCR-teszteket is végeztek a PRRSV, az afrikai sertéspestis vírusa és a sertés-teschovírus (fertőző sertésbénulás vírusa) kimutatására.

A szerzők egy
elhullott koca
szervkollekciónak,
ill. egy másik koca
két vetélt magzatát
vizsgálták

Egy kiválasztott koca szervkollekciónak (hasúri és mellkasi szervek), valamint egy másik koca két vetélt magzatának kórbonctani és rutin mikrobiológiai vizsgálatát az Állatorvostudományi Egyetem, Haszonállat-Diagnosztikai Központjában (Üllő, Dóra major) végeztük el. A koca szervkollekciónak és a vetélt magzatok összevont mintáit valós idejű PCR-teszttel vizsgáltuk PRRSV, PCV-2, PCV-3, *Leptospira*-fajok, SuHV-1, PPV1, *Glässerella parasuis* és *Brucella suis* jelenlétére.

A rutin aerob bakteriológiai vizsgálat során izolált baktériumtörzsek fajszintű meghatározása az alap biokémiai vizsgálatokat és a Gram-festést követően API 20 Strep (bioMérieux, Belgium) teszt segítségével történt. Végül a

Baktérium-
tenyésztéses és
PCR-vizsgálatokat
végeztek

Streptococcus equi két alfaját, a subsp. *zooepidemicus* (SEZ) és a subsp. *equi* (SEE) egy PCR-vizsgálattal különítettük el [25].

Ezekon kívül az *szM* gén variánsának kimutatására irányuló valós idejű PCR-vizsgálatot is elvégeztünk, amely gén a sertésekből izolált rendkívül virulens SEZ ST194-törzsekre jellemző [26].

Két reprezentatív izolátum (S23-21852 és S23-21854) antibiotikumérzékenységi vizsgálatát és teljesgenomszekvencia-analízisét is elvégeztük (1. táblázat). Az antibiotikumérzékenységi vizsgálatot 19 antimikrobiális szer esetében vizsgáltuk kereskedelmi forgalomban kapható, leves-mikrohígításos rendszer (AST-MIC; Merlin Diagnostika GmbH, Berlin, Németország) segítségével. A vizsgált antibiotikumok és az eredmények teljes listája a 2. táblázatban található.

1. TÁBLÁZAT. A sertés eredetű mintákból izolált *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*-törzseken végzett vizsgálatok összefoglalása

TABLE 1. Summary of findings from ancillary tests following post-mortem sampling

Törzs száma	Eredet	Kataláz teszt	Hemolízis	API 20 Strep	SEZ-SEE mPCR	AST	WGS
S23-21851	magzati tüdő	negatív	β	SEZ	SEZ	nem	nem
S23-21852	magzati tüdő	negatív	β	SEZ	SEZ	igen	igen
S23-21853	koca, máj	negatív	β	SEZ	SEZ	nem	nem
S23-21854	koca, lép	negatív	β	SEZ	SEZ	igen	igen

SEZ – *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*; AST – antibiotikum érzékenység vizsgálat;

SEE – *Streptococcus equi* subsp. *equi*; WGS – teljesgenom szekvenciaanalízis

2. TÁBLÁZAT. Az antibiotikumérzékenységi vizsgálatok összefoglaló eredményei

TABLE 2. Summarized results of antibiotic susceptibility testing

Antibiotikum	S23-21852	S23-21854	Antibiotikum	S23-21852	S23-21854
Ampicillin	É	É	Gentamicin	É	É
Cefquinom	É	É	Gentamicin (nagy dózis)	É	É
Ceftiofur	É	É	Neomicin	I	I
Cefazolin	É	É	Nitrofurantoin	É	É
Klindamicin	É	É	Oxacillin	É	É
Cefoxitin	É	É	Penicillin G	É	É
Doxiciklin	É	É	Rifampicin	É	É
Enrofloxacin	R	I	Trimetoprim/sulfmetoxazol	É	É
Eritromicin	É	É	Tetraciklin	I	I
Florfenicol	É	É	Vankomicin	É	É

É – érzékeny; I – közepesen rezisztens; R – rezisztens.

A két kiválasztott SEZ-izolátum (S23-21852 és S23-21854) teljesgenomszekvencia-analízisét a Biomi Kft. végezte (Gödöllő, Magyarország) [27]. A nyers adatokat egy online platform segítségével elemeztük és törzsfát készítettünk [28]. A törzsfá készítésébe bevontuk a nyilvánosan elérhető genomokat ($n = 34$), valamint egy korábbi kanadai tanulmányból származó törzsek ($n = 2$) [13], ill. a

Meghatározták az izolált baktérium-törzsek teljes genomszekvenciáját

közelmúltban kitört hollandiai járvány során izolált ($n = 1$) SEZ-törzs genomjait is [22]. A filogenetikai fát az iTOL-ban [29] vizualizáltunk és annotáltunk. A teljes genomok multilokusz-szekvenciatisztázását és a korábban leírt 14 feltételezett virulencia-determináns [30–32] keresését nukleotid BLAST segítségével végeztük el [28]. A kiválasztott genompárok átlagos nukleotid azonosságát (Average Nucleotide Identity – ANI) az OrthoANI Calculator segítségével számítottuk ki [33]. A lehetséges rezisztencia determinánsok jelenlétét a ResFinder 4.5 webes eszközzel vizsgáltuk [34].

EREDMÉNYEK

KLINIKAI TÜNETEK

A járvány során 5 koca elvetélt, 8 elhullott

A járvány 2023 augusztusának második felében zajlott. A kitörés két hete alatt a kocákon kívül egyetlen más termelési csoport sem volt érintett. A beteg kocák lázasak ($> 40^\circ\text{C}$) voltak, a hátsó testfél gyengesége és bénulás, vetélés, valamint légzési zavarok, továbbá teljes elfekvés volt megfigyelhető az elhullás előtt. A járvány kitörése során összesen 5 (2,7%) koca vetélt el és 8 (4,3%) koca hullott el, ami megegyezett az állományra jellemző átlagos éves vetelési aránnyal, ill. meghaladta az éves átlagos elhullási arányt.

GYÓGYKEZELÉS ÉS JÁRVÁNYVÉDELEM

A beteg állatokat azonnal elkülönítették és 5 napon át egyedileg minden kocának 20 mg/ttkg adagban amoxicillin-trihidrátot adtak szájon át (Amoxide 800 mg/g AUV por, Dunavet-B, Dunaföldvár, Hungary). A teljes tenyészállomány kezelést kapott. Szükség esetén parenteralisan ugyanezt a hatóanyagot adták a nem táplálkozó állatoknak (Veyxyl LA 200 inj., Veyx-Pharma, Schwarzenborn, Németország), szintén 5 napig. Közvetlenül a betegség kitörése után a gazdaságban a dolgozók, a telepre belépő látogatók és a járművek fokozott fertőtlenítést, valamint a forgalom korlátozását és ellenőrzését is bevezették. A dolgozók és látogatók kézhygiéniáját etanol alapú kézfertőtlenítőkkel és germicid szappanokkal fokozták, továbbá fertőtlenítő szőnyeget helyeztek el minden átjáróban. A járművek fertőtlenítése kerékmosók és fertőtlenítő kapuk segítségével történt, amelyekben kvaterner ammóniumsókat és glutáraldehidet tartalmazó készítményt (Perfect Kombicid, Alpha-Vet Állatgyógyászati Kft., Székesfehérvár, Magyarország) használtak. Ugyanezt a készítményt alkalmazták az istállók és más helyiségek felületeinek fertőtlenítésére, nagynyomású mosóval történő tisztítás után. Valamennyi járványügyi intézkedést fenntartottak a mikrobiológiai vizsgálatok negatív eredményéig.

PATOLÓGIAI VIZSGÁLAT

Súlyos fokú, diffúz, fibrines has- és mellhártyagyulladást, lépmegnagyobbodást, kruppos bronchopneumoniát figyeltek meg

A nyolc elhullott koca közül öt állatot a gazdaságban boncoltak fel. A vemhes kocák méhében a vemhesség késői fázisában elhullott magzatokat találtak, továbbá néhány esetben a tüdőállomány tömörségét írták le. Egy állatban súlyos mell- és hashártyagyulladás volt tapasztalható. Ez utóbbi állat szerveit a Haszonállat-Diagnosztikai Központba (Üllő, Dóra major) küldték további makroszkópos vizsgálatra, amelynek során súlyos fokú, diffúz, fibrines has- és mellhártyagyulladást, lépmegnagyobbodást, kruppos bronchopneumoniát tapasztaltunk. A szervgyűjteményhez küldött két magzatban csak bronchopneumoniára utaló elváltozások voltak. A többi elhullott állaton nem végeztek további diagnosztikai vizsgálatokat, mivel az öt elhullott vemhes koca közül négynek a kórbonctani lelete negatív volt.

LABORATÓRIUMI EREDMÉNYEK

A szerológiai (SuHV-1, brucellosis, PRRS, leptospirosis) és a PCR (PRRSV, afrikai sertéspestis vírus és sertés teschovirus) vizsgálatok negatív eredménnyel zárultak mindegyik esetben. A vetélt magzatok összevont mintájának valós idejű

A vizsgálatok során
Streptococcus equi
subsp. zooepidemicus
törzseket azonosítottak

PCR-vizsgálatainak eredményei szintén negatív eredményt hoztak PRRSV, PCV-2, PCV-3, *Leptospira*-fajok, Aujeszky-betegség vírusa, PPV1, *Glässerella parasuis* és *Brucella suis* tekintetében.

A rutin bakteriológiai tenyésztés során négy mintából (kocalép és -máj, két vetélt magzat tüdeje) apró, kerek, szürkésfehér és nyálkás, β -hemolizáló baktériumtelepek nőttek színtenyészetben. A rutin biokémiai vizsgálatok és Gram-festés alapján az izolált baktériumtörzsek a *Streptococcus* nemzetségbe tartoztak. Az API 20 Strep biokémiai kittel és a SEZ-SEE PCR-rendszerrel végzett vizsgálatok alapján mind a négy izolátum *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*-nak bizonyult (1. Táblázat).

A két vizsgált törzs érzékeny volt a legtöbb antibiotikumra, beleértve a béta-laktámokat is. Neomicinnel és tetraciklinnel szemben közepes rezisztenciát tapasztaltunk mindkét esetben, míg enrofloxacinra az egyik törzs mérsékelten érzékeny, a másik pedig teljes rezisztenciát mutatott a hatóanyaggal szemben (2. Táblázat), annak ellenére, hogy a genomokban nem azonosítottunk a rezisztenciáért felelős ismert génszakaszokat.

A S23-21852 és S23-21854 SEZ-izolátumok párban végzett teljesgenom-összehasonlítása során 100%-os átlagos nukleotidazonossági (ANI) pontszámot mutattak, és mindkettő az MLST 138-as szekvenciatípusba tartozott. A filogenetikai elemzés egyértelműen elkülönítette ezeket a törzseket más sertésizolátumoktól (Ábra), ideértve a délkelet-ázsiai és észak-amerikai epizootikus járványkiterőseket okozó ST194-törzsek erősen klonális alpopulációját. Ezt az ANI pontszámok is megerősítették: a járványkiterőse során izolált törzsek csak 97,01%-os homológiát mutattak az ATCC 35246 (ST194) típustörzsszel. A szekvenciaanalízis során vizsgált izolátumok nyers adatai elérhetők az NCBI Sequence Read Archive adatbázisban a PRJNA1086057 projektszám alatt.

A 14 feltételezett virulenciagén közül, amelyek vélhetően az ST194-törzsek kiemelkedő virulenciájában szerepet játszanak, néhány hiányzott a vizsgált SEZ-izolátumokból, ill. egyes esetekben más variáns volt kimutatható. Ez összhangban volt az ST194 típusú szM PCR-negatív eredményével, amely módszert korábban a rendkívül virulens SEZ kimutatására javasolták sertésekben [26].

A rendelkezésre álló SEZ-törzsek teljes genomjainak filogenetikai analízise alapján készített törzsfán a vizsgált izolátumok egyértelműen elkülönültek a többi sertéseredetű izolátumtól, beleértve az erősen patogén 194-es szekvenciatípusú, a dél-kelet ázsiai és észak-amerikai endémiás járványkiterősekből izolált törzseket is (Ábra).

MEGVITATÁS

A *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SEZ) elsősorban a lovak, kutyák és macskák kórokozójaként ismert. A baktérium előfordulhat sertések mandulájában és nyálkahártyáin is, hordozásának mértéke azonban nem ismert, és az általa okozott klinikai megbetegedés is ritkának tekinthető.

A jelentős mortalitással járó epizootiás járványokat minden esetben a 194-es szekvenciatípusba tartozó SEZ-törzsek okozták, azonban ezt a variánst Európában még nem azonosították. A két európai járványkiterőse során izolált törzsek ettől eltérő, távoli szekvenciatípusokhoz tartoztak [19, 22]. A magyarországi járvány során izolált törzsek genomikai elemzése megerősítette, hogy a kórokozó egy nem-ST194-es típusú SEZ-törzs.

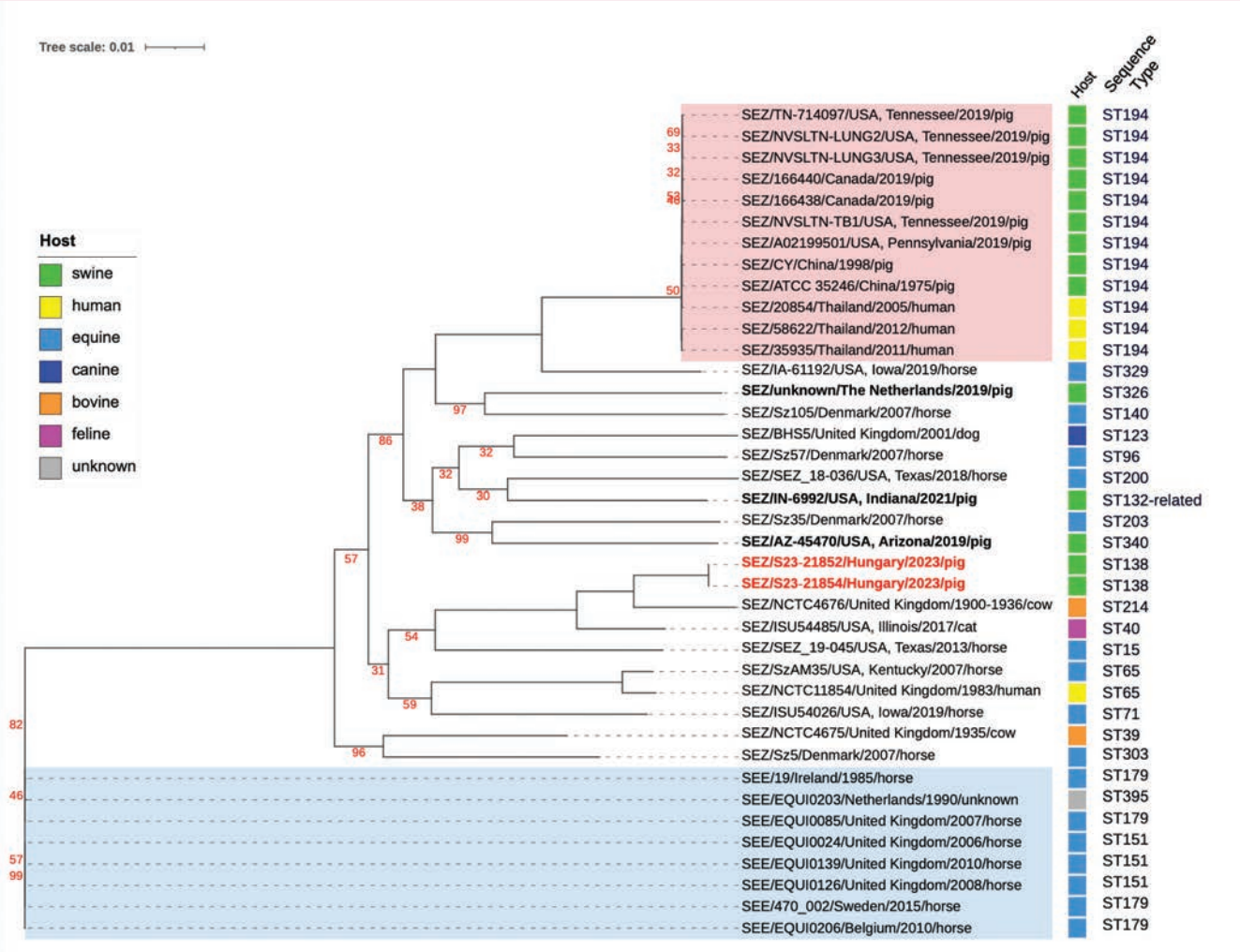
Az említettek miatt rendkívül fontosnak tartottuk, hogy részletesebben megvizsgáljuk ezt a nyugat-magyarországi, organikus sertésfarmon történt, vetéléssel és hirtelen elhullással járó kisebb járványkiterőse, hogy hozzájáruljunk ezzel egy újonnan megjelenő sertéspatogén jobb megismeréséhez. Tudomásuk szerint ez az első, sertések SEZ-fertőzésével kapcsolatos esetleírás Kelet-Közép-Európában.

A jelen járvány során megfigyelt klinikai tünetek és a betegség lefolyása megegyeztek az erősen virulens SEZ-törzsek által okozott megbetegedésekkel kapcsolatban leírtakkal: az érintett állatok általános állapotának gyors romlása, láz, étvágytalanság,

A vizsgált törzsek
nem-194-es
szekvenciatípusúak
voltak és elkülönültek
az eddigi izolátumoktól

ÁBRA. A magyarországi járványkitörés során izolált és nyilvános adatbázisokból elérhető SEZ- és SEE-törzsek teljes genomszekvenciájának filogenetikai összehasonlítása

FIGURE. Phylogenetic comparison of SEZ whole genome sequences obtained from the outbreak described in this study and other SEZ and SEE isolates from public databases



Csak a 100-nál kisebb bootstrap (megbízhatósági) értékeket tüntettük fel
Színek: saját izolátumaink; nem-ST194 típusú, sertés eredetű törzsek; SEZ ST194; SEE.

légzési zavar, ataxia és elfekvés, egyes esetekben vetélés, majd a megbetegedett kocák hirtelen elhullása [11, 13, 15]. Természetesen ezek más lényeges kórképek (pl. klasszikus és afrikai sertéspestis, PRRSV, Aujeszky-betegség, egyéb eredetű septicaemiák stb.) esetén is kialakulhatnak. Ugyanakkor ezek a kórokozók hajlamosító tényezőként is szerepelhetnek a korábban leírt aspecifikus klinikai kép kialakításában. Jelen esetben az elvégzett laboratóriumi vizsgálatok kizárták az előbbieken felsorolt kórokozók jelenlétét, ill. a vetélésekben rendszerint szerepet játszó egyéb patogének előfordulását. A helyszíni boncolások kevésbé körjelző értékű leletei összhangban voltak mind a rendkívül virulens 194-es szekvenciatípusú észak-amerikai törzsek és az ezekkel nem rokon (nem-ST194-es) európai SEZ-törzsek által okozott járványok során tapasztaltakkal is, és összességében szepszisre utaltak [14, 19, 22].

A járvány során izolált törzsek genomikai elemzése megerősítette, hogy a legtöbb SEZ-izolátummal összevetve a vizsgált kórokozó nem-ST194 típusú volt és csupán néhány általános virulenciamárkerral rendelkezett [6, 17].

A járvány időszakában
a rendkívül meleg
időjárás hajlamosító
tényező lehetett

A SEZ okozta fertőzések kialakulásában és súlyosságában jelentős szerepe van a külső stresszfactoroknak (pl.: a hőstressz, a szállítás [2]) vagy más hajlamosító tényezőknél (pl.: a vízellátás akár rövid ideig tartó zavara). A járvány 2023. augusztus 15-e és 31-e között zajlott. Ebben az időszakban egy erős melegfront után, több egymást követő napon az átlaghőmérséklet 25°C felett volt, valamint a maximum hőmérséklet is meghaladta a 30 °C-ot. Az ilyen mértékű hirtelen időjárásváltozás és az azt követő tartós hőstressz a járvány kitörésének kulcsfontosságú hajlamosító tényezőjének tekinthető, mivel más stressztényezőt nem lehetett azonosítani. Hasonló hajlamosító tényezőt azonosítottak a németországi járvány hátterében is, ahol a szellőzés nem biztosíthatta a megfelelő légcserét a forró nyári körülmények között [19].

A fertőzés forrását ebben a járványban nem vizsgáltuk, mivel a SEZ opportunistá patogénként is jelen lehet a sertések nyálkahártyáinak normál flórájában. Ugyanakkor a kórokozót a sajátos tartási körülmények miatt más gazdafajok, pl. kutya, macskák és rágcsálók is behurcolhatták az állományba.

Az érintett állatok azonnali elkülönítése alapvető fontosságú a SEZ-járványok megfékezésében, mivel a klinikai vizsgálatok alapján a kórokozó átviteléhez közvetlen érintkezés szükséges [15]. Az azonnali izoláció hatékonyságát alátámasztotta a beteg állatok kis száma a járvány során. A másik kulcsfontosságú tényező a járvány korlátozásában a megfelelő antimikrobiális terápia késlekedés nélküli alkalmazása. Az amoxicillin-trihidrát alkalmasságát a későbbi gyógyszerérzékenységi vizsgálatok is alátámasztották. SEZ-fertőzés esetén a penicillin-származékok és a cefalosporinok is használhatók, mivel az izolátumok érzékenyek bizonyultak ezekre a szerekre is, valamint korábbi járványkitörések során is sikerrel alkalmazták ezeket a hatóanyagokat [10, 13, 19]. A megbetegedési és elhullási arány csökkentése mellett a helyesen megválasztott antimikrobiális terápia segíti az állomány szerokonverzióját, ezáltal a kezelt állatok nem jelentenek veszélyt a naiv, egészséges állatokra [35]. Az alkalmazott amoxicillines kezelés hatására és a járványügyi intézkedések következtében a járvány gyorsan véget ért és azóta nem észleltek további megbetegedést.

A járvány
megfékezésében
fontos a beteg
állatok azonnali
elkülönítése
és a célzott
antibiotikumkezelés
gyors megkezdése

ADATOK ELÉRHETŐSÉGE

A tanulmány eredményeit alátámasztó adatok az alábbi linken érhetők el: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2024/4008946> (Supporting Information). A magyarországi járványkitörés során izolált *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* törzsek szekvencia adatai az NCBI Sequence Read Archive adatbázisában a PRJNA1086057 hozzáférési számmal érhetők el.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki Csuka Editnek és Vu Ágnesnek a kiváló technikai segítségért, valamint Dr. Julia Gilbertnek a kézirat angolnyelvű változatának nyelvi lektorálásáért. A tanulmányt az Állatorvostudományi Egyetem, Stratégiai Kutatási Alapja támogatta (támogatási szám: SRF-001)

IRODALOM

1. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ (2011) Veterinary Microbiology and Microbial Disease, 2nd ed. Wiley-Blackwell
2. Timoney JF (2004) The pathogenic equine streptococci. Vet Res 35:397-409. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004025>
3. Lakritz J, Wilson WD, Berry CR, Schrenzel MD, Carlson GP, Madigan JE (1993) Bronchointerstitial pneumonia and respiratory distress in young horses: clinical, clinicopathologic, radiographic, and pathological findings in 23 cases (1984-1989). J Vet Intern Med 7:277-288. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1993.tb01020.x>
4. Pesavento PA, Hurley KF, Bannasch MJ, Artiushin S, Timoney JF (2008) A clonal outbreak of acute fatal hemorrhagic pneumonia in intensively housed (shelter) dogs caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Vet Pathol 45:51-53. <https://doi.org/10.1354/vp.45-1-51>
5. Wasissa M, Lestari FB, Salasia SIO (2021) *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* finding in confirmed feline infectious peritonitis cat patient. Heliyon 7:e07268. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07268>

6. Jara LM, Angulo-Tisoc J, Giménez-Lirola LG, Li G, Andrade R, Mamani J (2023) Outbreak of Pathogenic *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in Guinea Pigs Farms of The Andean Region. *Pathogens* 12:445. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030445>
7. Cebra CK, Heidel JR, Cebra ML, Tornquist SJ, Smith BB (2000) Pathogenesis of *Streptococcus zooepidemicus* infection after intratracheal inoculation in llamas. *Am J Vet Res* 61:1525–1529. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.1525>
8. Argirova P, Kalchev Y, Baltadzhiev I, Stoycheva M, Murdjeva M (2023) *Streptococcus zooepidemicus* Meningitis in an HIV-Positive Horse Breeder Patient: A Case Study and Literature Review. *Infect Dis Rep* 15:527–534. <https://doi.org/10.3390/idr15050052>
9. Pelkonen S, Lindahl SB, Suomala P, Karhukorpi J, Vuorinen S, Koivula I, Väisänen T, Pentikäinen J, Autio T, Tuuminen T (2013) Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans. *Emerg Infect Dis* 19:1041–1048. <https://doi.org/10.3201/eid1907.121365>
10. Sitthicharoenchai P, Derscheid R, Schwartz K, Macedo N, Sahin O, Chen X, Li G, Main R, Burrough E (2020) Cases of high mortality in cull sows and feeder pigs associated with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* septicemia. *J Vet Diagn Invest* 32:565–571. <https://doi.org/10.1177/1040638720927669>
11. Feng ZG, Hu JS (1977) Outbreak of swine streptococcosis in Sichan province and identification of pathogen. *Anim Husbandry Vet Med Lett* 2:7–12
12. Salasia SIO, Wibawan IWT, Pasaribu FH, Abdulmawjood A, Lammler C (2004) Persistent occurrence of a single *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia. *J Vet Sci* 5:263–265. <https://doi.org/10.4142/jvs.2004.5.3.263>
13. Costa M de O, Lage B (2020) *Streptococcus equi* Subspecies *zooepidemicus* and Sudden Deaths in Swine, Canada. *Emerg Infect Dis* 26:2522–2524. <https://doi.org/10.3201/eid2610.191485>
14. Chen X, Mou K, Lu W, Schumacher L, Resende-De-Macedo N, Sitthicharoenchai P, Derscheid R, Burrough E, Li G (2023) Genomic characterization of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* from a 2021 outbreak in Indiana with increased sow mortality. *mSphere* e0040423. <https://doi.org/10.1128/msphere.00404-23>
15. Costa M de O, Harding JCS, Huang Y, Nosach R (2022) *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection of pigs leads to shedding in faeces and a carrier state. *Transbound Emerg Dis* 69:e1503–e1509. <https://doi.org/10.1111/tbed.14481>
16. Hau SJ, Lantz K, Stuart KL, Sitthicharoenchai P, Macedo N, Derscheid RJ, Burrough E R, Robbe-Austerman S, Brockmeier SL (2022) Replication of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection in swine. *Vet Microbiol* 264:109271. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109271>
17. Chen X, Resende-De-Macedo N, Sitthicharoenchai P, Sahin O, Burrough E, Clavijo M, Derscheid R, Schwartz K, Lantz K, Robbe-Austerman S, Main R, Li G (2020) Genetic characterization of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* associated with high swine mortality in the United States. *Transbound Emerg Dis* 67:2797–2808. <https://doi.org/10.1111/tbed.13645>
18. Soedarmanto I, Pasaribu FH, Wibawan IW, Lämmler C (1996) Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia. *J Clin Microbiol* 34:2201–2204. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2201-2204.1996>
19. Geiping L, Detlefsen H, Trittmacher S, Baums CG, Bergmann R, Henig-Pauka I (2023) *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* – a case report of sudden death in a German sow farm. *Porcine Health Manag* 9:48. <https://doi.org/10.1186/s40813-023-00344-8>
20. Webb K, Jolley KA, Mitchell Z, Robinson C, Newton JR, Maiden MCJ, Waller A (2008) Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology (Reading)* 154:3016–3024. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018911-0>
21. Ma Z, Geng J, Zhang H, Yu H, Yi L, Lei M, Lu C, Fan H, Hu S (2011) Complete Genome Sequence of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Strain ATCC 35246. *J Bacteriol* 193:5583–5584. <https://doi.org/10.1128/jb.05700-11>
22. Houben M, Peters L, Geudeke T, van Helmond J, Kwinten E (2021) *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, an emerging pig pathogen? *Proc ESPHM* 379
23. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/1165 of 15 July 2021 authorising certain products and substances for use in organic production and establishing their lists
24. Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91
25. Morris ERA, Schroeder ME, Ferro PJ, Waller AS, McGlennon AA, Bustos CP, Gressler LT, Wu J, Lawhon SD, Boyle AG, Lingsweiler S, Paul N, Dimitrov K, Swinford AK, Bordin AI, Cohen ND (2023) Development of a novel real-time PCR multiplex assay for detection of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*. *Vet Microbiol* 284:109797. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109797>
26. Kuchipudi SV, Surendran Nair M, Yon M, Gontu A, Nissly RH, Barry R, Greenawalt D, Pierre T, Li L, Thirumalapura N, Tewari D, Jayarao B (2021) A Novel Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection of Virulent *Streptococcus equi* Subspecies *zooepidemicus*—An Emerging Pathogen of Swine. *Front Vet Sci* 8:604675. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.604675>
27. Németh Z, Albert E, Dán Á, Balka G, Szenes Á, Sipos R, Bódizs S, Biksi I (2020) Genomic Analysis of *Staphylococcus aureus* Strains Originating from Hungarian Rabbit Farms Reinforce the Clonal Origin of Various Virulence Types. *Animals* 10:1128. <https://doi.org/10.3390/ani10071128>
28. Olson RD, Assaf R, Brettin T, et al (2023) Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res* 51:D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
29. Letunic I, Bork P (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 49:W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
30. Ma Z, Geng J, Yi L, Xu B, Jia R, Li Y, Meng Q, Fan H, Hu S (2013) Insight into the specific virulence related genes and toxin-antitoxin virulent pathogenicity islands in swine streptococcosis pathogen *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* strain ATCC35246. *BMC Genomics* 14:377. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-377>
31. Holden MTG, Heather Z, Paillot R, Steward KF, Webb K, Ainslie F, Jourdan T, Bason N C, Holroyd NE, Mungall K, Quail MA, Sanders M, Simmonds M, Willey D, Brooks K, Aanensen DM, Spratt BG, Jolley KA, Maiden MCJ, Kehoe M, Chanter N, Bentley SD, Robinson C, Maskell DJ, Parkhill J, Waller AS (2009) Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathog* 5:e1000346. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000346>
32. Paillot R, Darby AC, Robinson C, Wright NL, Steward KF, Anderson E, Webb K, Holden MTG, Efstratiou A, Broughton K, Jolley KA, Priestnall SL, Marotti Campi MC, Hughes MA, Radford A, Erles K, Waller AS (2010) Identification of three novel superantigen-encoding genes in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *szef*, *szen*, and *szep*. *Infect Immun* 78:4817–4827. <https://doi.org/10.1128/IAI.00751-10>
33. Lee I, Ouk Kim Y, Park S-C, Chun J (2016) OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
34. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, et al (2020) ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 75:3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
35. Hau SJ (2022) Rapid application of long-acting ceftiofur can prevent death losses associated with *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in pigs. *JSHAP* 30:292–297

Közlésre érck.: 2024. szept. 18.



Pronefra®



Sokoldalú eszköz a krónikus veseelégtelenséggel szemben

Egyedülálló **négy az egyben** innováció



1. Limitálja a foszfor felszívódását
2. Megköti az urémiás toxinokat
3. Segít megőrizni a normál veseszerkezetet
4. Hozzájárul a kiegyensúlyozott vérnyomás fenntartásához

Ízesített belsőleges szuszpenzió

Virbac

Shaping the future of animal health

(70) 776-15-74 • (70) 365-75-48 • (70) 776-10-55 • virbac.hu

**Dog semen freezing:
preliminary results of
comparative studies
with different freezing
extenders**

M. Bacsa^{1*}
D. Török¹
M. Bakony²
B. Somoskői¹
L. Müller¹
Zs. Keresztes¹
L. Bordás¹
S. Cseh¹

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Szülészeti Tanszék
és Haszonállat-gyógyászati
Klinika

2. Állatorvostudományi Egyetem,
Biostatistika Tanszék

*e-mail: Bacsa.Monika@univet.hu

Kutyasperma mélyhűtése, fagyasztóoldatokkal végzett összehasonlító vizsgálatok előzetes eredményei

**Bacsa Mónika^{1*}, Török Dóra¹, Bakony Mikolt², Somoskői Bence¹,
Müller Linda¹, Keresztes Zsuzsanna¹, Bordás Lilla¹, Cseh Sándor¹**

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők beagle kutyáktól gyűjtött ejakulátumok mélyhűtés előtti és utáni progresszív motilitási adatait dolgozták fel, amelyeket különböző hígítókkal fagyasztottak le. Vizsgálták, hogy van-e hatása a különböző készítményeknek a felolvasztás utáni sperma minőségre, ill. arra is keresték a választ, hogy a sperma minták progresszív motilitásának melyik hűtési fázisban van prediktív értéke a felolvasztás utáni minőség tekintetében. Eredményeik alapján a CaniRep Uppsala Equex II. készítménnyel lehetett a legjobb felolvasztás utáni motilitási értékeket elérni. A hűtött fázis értékei mutattak nagyobb korrelációt a felolvasztás utáni eredményekkel.

SUMMARY

Background: Semen freezing in many animal species, as well as in humans, has become a successful assisted reproductive technique in recent decades. Canine semen freezing and the use of artificial insemination with frozen-thawed semen have become popular tools among breeders.

Objectives: Our aim was to evaluate five freezing mediums based on post-thaw progressive motility parameters. We intended to find relationship between the motility results of fresh, chilled, and frozen-thawed semen to evaluate the prognostic value of the fresh semen's progressive motility on the post-thaw quality of dog semen.

Materials and Methods: Seven clinically healthy Beagle dogs were used and five semen freezing mediums (Steridyl, Triladyl, Steridyl + Equex paste, CaniRep Uppsala Equex II, CaniPro Freeze A & B) were examined in this experimental design. The 2nd fraction of the ejaculates was collected by digital manipulation. The assessment was based on volume, color, morphology, and motility (CASA system) parameters. Fifty-eight dog semen samples were frozen and evaluated in this study.

Results and Discussion: The mean progressive motility values were similar among the fresh semen groups based on extenders (79.6 to 81.7%). After freezing and thawing, we observed significantly higher mean progressive motility results with CaniRep extender (66.8%) compared to Triladyl (39.6%), Steridyl + Equex paste (37.0%), and CaniPro Freeze (40.0%) ($p = 0.0316$). However, the difference between the CaniRep and Steridyl groups' post-thaw progressive motility parameters was not statistically significant (66.8 vs. 48.9%). The highest progressive motility result was achieved with CaniRep freezing medium (66.8%). With this extender, 80% of the post-thaw samples were of good quality ($\geq 50\%$ progressive motility). The post-thaw quality of canine semen can be better predicted from the motility results of chilled semen than from the fresh semen. The motility of post-thaw samples was significantly dependent on the extender used ($p = 0.0316$).

KISÁLLAT

A spermafagyasztás számos állatfajban és az emberben is ma már napi szinten gyakorolt és sikeresen alkalmazott asszisztált reprodukciós eljárás. A gyakorlati állattenyésztésben, összehasonlítva a különböző állatfajok adatait; leggyakrabban a bikasperma fagyasztására kerül sor. A tejelő szarvasmarha tenyésztésében a világon szinte kizárólag fagyasztott bikaspermával végzik a mesterséges termékenyítést. Lényegesen kevésbé elterjedt a gyakorlatban a mélyhűtött spermának az alkalmazása lóban és kiskérődzőkben. Ezekben a fajokban a fagyasztott sperma esetében a mesterséges termékenyítés pontos időzítése és az alkalmazandó technika kivitelezésével kapcsolatban jelentkező nehézségekkel magyarázható, hogy a mélyhűtött termékenyítő anyag használata kevésbé elterjedt.

*A tejelő szarvasmarha
tenyésztésée
a világon szinte
kizárólag fagyasztott
bikaspermával történik*

Kancánál, ha fagyasztott spermával inszeminálnak, a termékenyítést az ovulációhoz minél közelebbi időpontban (néhány órával az ovuláció előtt vagy után; kb. 6 óra) kell elvégezni, hogy maximális esélyt biztosítsunk a termékenyüléshez. Juhban a fagyasztott spermás termékenyítésnél az ondót közvetlenül a méhbe kell bejuttatni (ún. intrauterin termékenyítés), amihez laparoszkópos technikát kell alkalmazni. Ennek a nyakcsatorna zárt anatómiai struktúrája az oka, ami nem teszi lehetővé juhban – még ivarzáskor sem – a katéter transzcervikális bevezetését. Kecskében nyitottabb a nyakcsatorna, így jó eséllyel alkalmazható az ún. transzcervikális technika.

Kutyák esetében az ondó mélyhűtése és felolvasztása, majd mesterséges termékenyítésre való felhasználása az elmúlt évtizedekben intenzíven kutatott területté vált, ami több okra vezethető vissza. Egyrészt a tenyésztők és a szakemberek felismerték a fagyasztott sperma alkalmazásában rejlő, a genetikai előrehaladást, a tenyésztést segítő lehetőségeket. Másrészt ma már rendelkezésünkre áll az ún. endoszkópos transzcervikális intrauterin inszeminálási technika (Transcervical Insemination, TCI), amivel a fagyasztott/felolvasztott ondót közvetlenül a szuka méhében tudjuk bejuttatni. A TCI eljárásnál endoszkóp segítségével egy speciális, vékony katétert vezetünk – a nyakcsatornán keresztül – a méhbe, majd ezen keresztül befecskendezzük a felolvasztott ondót a méhbe. Az intrauterin spermabevitelnek köszönhetően jelentősen javulnak a vemhesülési eredmények a fagyasztott spermás termékenyítéseknél. Ez a technika ma már a rendelkezésünkre áll, így a tenyésztők és hobbi kutyatartók részéről megérett a kíváncsiság az érdeklődés a mélyhűtött termékenyítő anyag felhasználása iránt. Ennek köszönhető, hogy az elmúlt évtizedekben egy intenzíven kutatott területté vált a kutyasperma mélyhűtése és tartós tárolása, valamint a fagyasztott ondónak a gyakorlatban való alkalmazása. Mélyhűtött spermának hagyományos technikával (intravaginális inszeminálás) történő felhasználásakor gyenge vemhesülési eredmények érhetők el kutyában (hasonlóan a juhban tapasztaltakhoz), ami nyilván nem segítette a módszer terjedését [1, 2]. Az elmúlt két évtized intenzív fejlesztőmunkája eredményeként több olyan fagyasztóoldat jelent meg a piacon, amelyeket kimondottan kutyasperma mélyhűtésére ajánlanak. Ugyanakkor, más fajokban sikeresen alkalmazott mélyhűtőoldatokkal is történtek/történnek ígéretes próbálkozások (pl. bika) [3, 4].

A kutyák hímvarsejtjei általában jól fagyaszthatóak, köszönhetően a spermiumok sejthártya-tulajdonságainak, ugyanis nagy bennük a koleszterin/foszfolipid aránya és a többszörösen telítetlen zsírsavak (polyunsaturated fatty acid, PUFA) aránya [5, 6]. A hímvarsejt több szempontból is a szervezet különleges sejtjei. Mozgáskéességük révén önálló helyváltoztatásra képesek, minimális citoplazmatartalommal rendelkeznek, mivel annak nagy részét fejlődésük (spermatogenesis) során elveszítik. A sejthártyájuk a különböző feladatok ellátása érdekében – elhelyezkedéstől függően – különleges tulajdonságokat szerez meg (specializálódik), hogy a termékenyülés sikeres legyen (kapacitáció, hiperaktív motilitási képesség megszerzése, akroszóma reakció).

*A kutyák
hímvarsejtjei
általában jól
fagyaszthatóak*

Fagyasztás során sok negatív hatás éri az ondósejteket, ilyen az ozmotikus stressz, a hidegsokk, a jégkristályok által okozott fizikai sérülések, ill. az oxidatív stressz [7, 8]. Annak érdekében, hogy minél több spermium túlélje a fagyasztás/felolvasztás folyamatát, valamint a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolást, védőanyaggal kiegészített fagyasztóoldatot kell használni a mélyhűtésnél. A spermiumok mélyhűtésére használt oldatok általában glicerint tartalmaznak védőanyagként. Más anyagok is megtalálhatók bennük, mint pl. puffer a megfelelő pH biztosításához, cukrok, aminosavak, lipidek a spermiumok táplálásához, antibiotikumok, antioxidánsok. Ki kell emelni a membránvédő anyagok jelenlétét (pl. lipoproteinek), hiszen a spermiumok esetében a plazmamembrán védelme a termékenyítőképesség megőrzése szempontjából kiemelt jelentőséggel bír. A spermafagyasztó-oldatok leggyakrabban tojássárgáját tartalmaznak (20%), aminek köztudottan nagy a lipoprotein-tartalma és mellette más, a sejtek védelme és táplálása szempontjából hasznos anyagokat is tartalmaz [9].

Mindegyik faj esetében megfigyelhető, hogy kb. 10–20%-ban előfordulnak olyan egyedek, amelyek spermája nem megfelelő hatékonysággal fagyasztható, aminek a hátterében egyedi érzékenység állhat [7, 9, 10]. Az egyes állatfajokra kifejlesztett hígítók sokszor nem csak az adott fajknál használhatóak sikerrel, hanem más állatfajnál is. Több munkacsoport, közöttük Szász és mtsai (2005) is sikeresen fagyasztottak kutyaspermát bikára törzskönyvezett készítménnyel, a Triladylal [11–13]. A bikára törzskönyvezett készítmények, pl Triladyl, Steridyl használhatóak más kérődző fajok, és egyéb állatfajok spermájának fagyasztásához is, pl dromedár, zsiráf, vízi bivaly, gazella [14–17], vagy akár lóhoz [18] is. Vadon élő állatok, pl vörös farkas vagy barna medve szaporítóanyagát is lehet mélyhűteni kutyáknak gyártott készítménnyel [19, 20], ill. Steridyllel sikeresen mélyhűtötték a jávai leopárd spermáját is [21]. Azt fontos megjegyezni, hogy mélyhűtés előtt mindig meg kell vizsgálni az adott mintát annak érdekében, hogy tisztában legyünk annak minőségével és megállapítsuk, hogy alkalmas-e fagyasztásra [22–27].

Vizsgálataink célja volt, hogy a fagyasztási/felolvasztási folyamat során több alkalommal meghatározva a kutyaspermiumok progresszív motilitási értékeit, összehasonlítsuk több, kereskedelmi forgalomban elérhető spermafagyasztó-oldat hatékonyságát.

Emellett vizsgáltuk, hogy a mélyhűtési folyamat melyik pontján mért motilitási értékek (friss/natív vagy $3\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött) korrelálnak legjobban a felolvasztás utáni eredményekkel, azaz bírnak leginkább jelentőséggel a fagyasztás/felolvasztás utáni eredmény előrejelzése szempontjából.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A SPERMAGYŰJTÉSRE HASZNÁLT ÁLLATOK

A vizsgálatban hét, 4–6 év közötti beagle fajtájú kan kutya vett részt. A spermadonor kutyák az Állatorvostudományi Egyetem gyakorlati oktatási célból tartott állatai voltak. Engedélyszám: PE/EA/1331-7/2019. A kutyák a vizsgálatok idején egészségesek voltak. Egyedi kifutós kennelben voltak tartva, zárt épületbe való bejutási lehetőséggel, napi többszöri séta biztosítva volt nekik. Napi $2\times$ kaptak eleséget és a vízhez *ad libitum* hozzáfértek.

SPERMAGYŰJTÉS

A spermavétel kézi stimulációval történt KUTZLER és ROBERT munkáit figyelembe véve [28, 29], amelynek során a spermiumokban gazdag második frakciót gyűjtöttük. A spermavétel után a gyűjtött minták minőségének ellenőrzését és feldolgozását 1 órán belül elvégeztük. A gyűjtött spermát folyamatosan $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten tartottuk.

**Kereskedelmi
forgalomban elérhető
sperma-fagyasztó-
oldatok hatékonyságát
vizsgálták
kutyaspermán**

**Meghatározták
az ejakulátumban
található progresszív,
előrehaladó mozgást
végző spermiumoknak
az arányát**

A SPERMA MINŐSÉGÉNEK ELLENŐRZÉSE ÉS A SPERMA FELDOLGOZÁSA

A gyűjtött spermaminták minőségének értékelésénél először az ondó színét, konzisztenciáját és térfogatát ellenőriztük. A normális, opálos, szürkés-fehér színű és 0,5 ml-nél nagyobb térfogatú minták kerültek további feldolgozásra. Első lépésként CASA-rendszerrel vizsgáltuk a friss mintában a spermiumok mozgását (CASA-1 vizsgálat). A CASA-rendszer magában foglal egy fáziskontaszt mikroszkópot, valamint egy speciális szoftvert, ami képes objektíven elemezni a mozgó objektumok, esetünkben a spermiumok mozgását, értékelni/jellemezni a mozgási tulajdonságokat. A CASA-programmal határoztuk meg az ejakulátumban található progresszív, előrehaladó mozgást végző spermiumoknak az arányát. A WHO spermiummotilitási minősítési előírásait követve az ondósejtek a VAP (Velocity along the Average Path, átlagos pálya mentén mért sebesség) érték alapján kerültek besorolásra az alábbi négy kategóriába.

- gyors progresszív: $> 25 \mu\text{m/s}$,
- lassú progresszív: $5\text{--}25 \mu\text{m/s}$,
- nem progresszív: $< 5 \mu\text{m/s}$,
- immotilis: egyhelyben álló.

A VAP-érték a sebességen kívül figyelembe veszi a mozgás mintázatát és az egységnyi időn belül megtett útvonalat is [30]. Ha a mintában a spermiumok száma nagy volt (a minta túl sűrűnek bizonyult a CASA vizsgálathoz), 1:4 arányban hígítottuk és utána végeztük el a motilitás vizsgálatot. A spermiumok mozgásának értékelése után a natív mintából kenetet készítettünk, Spermac® (FertiPro, Beernem, Belgium) festékkel megfestettük és ezután bíraltuk a spermiumok morfológiáját. Csak azokat a mintákat fagyasztottuk, amelyekben a progresszív motilitással bíró spermiumok aránya minimum 70% volt, továbbá a normális morfológiájú ondósejtek aránya 80 % fölött volt.

A megfelelőnek ítélt minták ($n = 58$) fagyasztásra történő előkészítése és mélyhűtése, valamint felolvasztása az adott fagyasztómédium használati utasítása szerint történt. A tesztelt, kereskedelmi forgalomban kapható készítmények a következők voltak:

- CaniPro Freeze A&B (Minitube, Tiefenbach, Németország)
- Steridyl (Minitube)
- Steridyl (Minitube) + Equex paszta (Minitube)
- Triladyl (Minitube)
- CaniRep Uppsala Equex II (CaniRep HB, Uppsala, Svédország)

A fagyasztómédiumok tulajdonságait az **1. táblázat**ban foglaltuk össze.

A tesztelt készítmények között található kankutyára és bikára törzskönyvezett készítmény, ill. 1 (Steridyl, Triladyl) és 2 lépéses (CaniPro, CaniRep) fagyasztási protokollal használandó médium egyaránt. Minden készítmény közös tulajdonsága, hogy krioprotektív anyagként glicerint tartalmaz.

A FAGYASZTÓOLDATOK ELKÉSZÍTÉSE

A Triladylt 1:3 arányban adagoltuk a desztillált vízhez, majd 20% tojássárgáját adtuk hozzá. A gyártó előírása szerint a Steridyl esetében 1:1,5 arányban szükséges desztillált vízzel feloldani a készítményt, ami már tartalmazza a sterilizált tojássárgáját, aminek a koncentrációját a forgalmazó nem adja meg. A Steridyl+Equex paszta csoportnál 16 μL pasztakiegészítést adagoltunk a mintákhoz. CaniPro-nál 20% tojássárgája-kiegészítést kell alkalmazni, mindkét oldathoz (A&B) hozzá kell keverni a meghatározott mennyiségű tojássárgáját. CaniRep esetében nincs előkészítő munka, az oldatok felhasználásra készen kaphatóak, csak melegíteni szükséges azokat.

1. TÁBLÁZAT. Az általunk felhasznált fagyasztómédiumok tulajdonságait szemlélteti az alapján, hogy mely állatfajra törzskönyvezték, hány lépésből áll a fagyasztási protokoll, tartalmaz-e tojássárgáját és milyen krioprotektív anyag van benne. A Steridylnél a gyártó nem adja meg a tojássárgája koncentrációját, ill. a glicerinkoncentráció egyedül a CaniRep esetében nyilvános

TABLE 1. The characteristics of the used extenders according to animal species, steps of cryopreservation protocol, egg yolk content and the type of cryoprotective agent

Fagyasztóoldat	Állatfaj	Fagyasztás lépései	Tartalmaz-e tojássárgáját?	Krioprotektív anyag
CaniPro Freeze A&B	kutya	2	igen, 20%	glicerin a B oldatban
Steridyl	szarvasmarha	1	igen	glicerin
Steridyl+ Equex paszta	szarvasmarha	1	igen	glicerin
Triladyl	szarvasmarha	1	igen, 20%	glicerin
CaniRep Uppsala Equex II	kutya	2	igen, 20%	glicerin A (3%), B (7%)

A mélyhűtőoldatos
kezelés és a felolvasztás
után is végezték
motilitásvizsgálatot

A mintákat
folyékony nitrogénben
-196 °C-on tárolták

A FAGYASZTÁS LÉPÉSEI

A gyűjtött ún. friss spermamintában, az előzetes minőség ellenőrzés után azonnal elvégeztük a CASA motilitásvizsgálatot (CASA-1), valamint meghatároztuk a spermiumok koncentrációját. Az ondósejtek száma alapján megtörtént a minta fagyasztóoldattal való hígítása, majd 4–5 °C-os hűtőpultba helyezve a mintákat megkezdődött azok hűtése. A védőoldattal való kezelés (ekvilibráció) idejének letelte után ismételt CASA motilitásvizsgálatot végeztünk (CASA-2). Ezután az ondómintákat az azonos hőfokon tárolt 0,5 ml-es műszalmákba felszívtuk és a műszalmákat ultrahangos hegesztővel lezártuk. A spermát tartalmazó műszalmákat előzőleg megjelöltük a megbízható beazonosíthatóság céljából. A 2 lépéses hígítók esetében a 2. oldat hozzáadását egy második ekvilibrációs szakasz követte a hűtőpultban, aminek a végén ismét elvégeztük a spermiumok mozgásának értékelését. A 2 lépéses hígítók esetében a 2. ekvilibrációs szakasz végén mért értéket vettük alapul az értékelésnél. Végül a spermát betöltöttük a 0,5 ml-es műszalmákba.

A mélyhűtés megkezdésekor a műszalmák egy fémrácsra kerültek, ami egy folyékony nitrogénnel megtöltött hungarocell dobozban volt elhelyezve. A rács 4 cm-rel a folyékony nitrogén szintje felett tartotta a műszalmákat, így a minták a folyékony nitrogén gőzben voltak kb. -140–150 °C-on, ahol a használati utasítás szerinti időt töltötték (10–20 perc). Ezt követte a minták folyékony nitrogénbe helyezése és tárolása -196 °C-on.

Felolvasztáskor a fagyasztott szalmákat a használati utasítás szerint, vízfürdőben (37–38 °C) melegítettük fel (0,5–1,5 perc) és azonnal elvégeztük a CASA motilitásvizsgálatot (CASA-3). A CaniRep médium esetén az előírásnak megfelelően használtunk ún. felolvasztó folyadékot (thawing medium, TM) is és azzal együtt is megmértük a spermiumok motilitását. A többi termék mellé nem kapható felolvasztómédium.

Az általunk használt protokollok összefoglalását a 2. táblázat szemlélteti:

STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az exploratív elemzéshez leíró statisztikákat és ábrákat készítettünk. A minták átlagos progresszív motilitási adatait lineáris kevert modell illesztésével hasonlítottuk össze az egyes hígítók szerint, amelyben a hígító szerepelt magyarázó változóként, a kutya egyedi azonosítója pedig random hatásként. Ez a módszer

2. TÁBLÁZAT. *Fagyasztás- felolvasztás protokollok hígítók, equilibrációs idő, N₂-gőzben töltött idő és felolvasztási hőmérséklet és idő szerint. LN₂ – Folyékony nitrogén*

TABLE 2. *Freezing-thawing protocols according to extenders, the duration of equilibration, the duration of being in nitrogen vapour and the thawing rules*

Fagyasztás- felolvasztás protokollok			
Hígító neve	Equilibrációs idő 3-5 °C-on	LN ₂ -gőzben töltött idő	Felolvasztás
Canipro Freeze A&B	A-oldat: 120 perc B-oldat: 60 perc	20 perc	38 °C, 1 perc
Steridyl	60 perc	20 perc	37 °C, 1,5 perc
Steridyl+ Equex	60 perc	20 perc	37 °C, 1,5 perc
Triladyl	120 perc	10 perc	37 °C, 0,5 perc
Canirep Uppsala Equex II.	A-oldat: 75-90 perc B-oldat: „pár perc”	10 perc	37 °C, 0,5-1 perc

figyelembe veszi az egyeden végzett többszöri mérések közötti korreláltságot. A többszörös összehasonlítások során a p-értékeket Tukey módszerével korrigáltuk. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -nél határoztuk meg. Az elemzéseket az R statisztikai szoftver segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK

Az általunk elemzett minták térfogata 0,75-1,5 ml között alakult. A mélyhűtésre felhasznált mintákat ($n = 58$) fagyasztómédium szerinti bontásban a kiindulási motilitási értékekkel és a mintaelemszámmal a 3. táblázat szemlélteti.

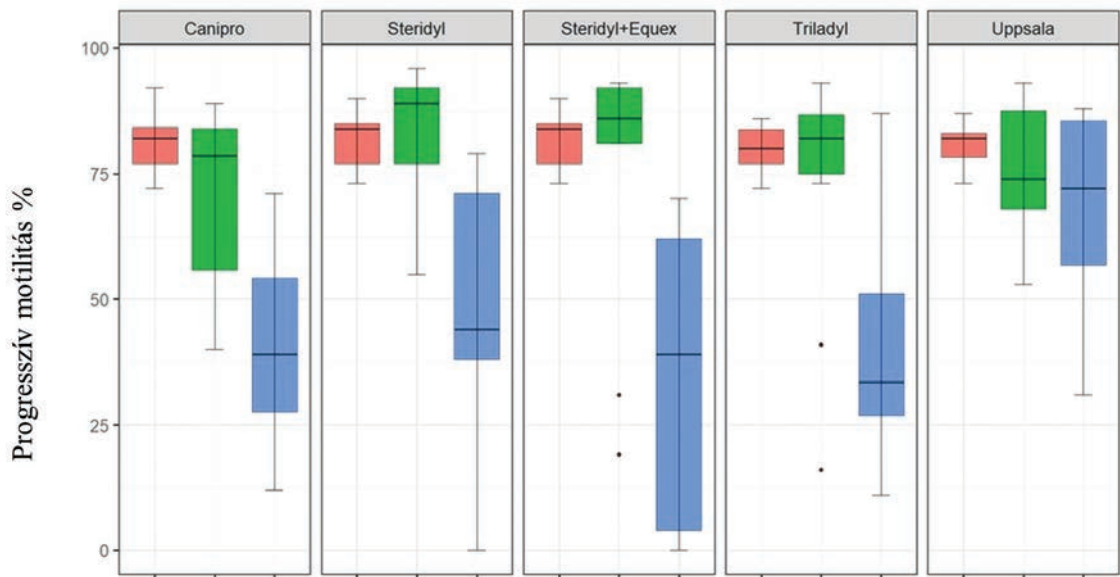
3. TÁBLÁZAT. *Kiindulási progresszív motilitási értékek (átlag % ± SE), ill. a mintaelemszám hígítónként csoportosítva. Canirep Uppsala = Canirep Uppsala Equex II.-t jelöli*

TABLE 3. *Progressive motility results (mean % ± SE) of fresh semen grouped by extenders and the number of samples*

Hígító	Canipro Freeze A&B	Steridyl	Steridyl + Equex	Triladyl	Canirep Uppsala
Átlag % ± Standard hiba	80,8 ± 1,5%	81,5 ± 2,0%	81,7 ± 2,1%	79,6 ± 1,3%	80,8 ± 1,5%
Mintaelemszám	16	9	9	14	10

A Canirep Uppsala + TM fagyasztóoldattal kapták a legjobb motilitási adatokat a fagyasztás/ felolvasztást követően

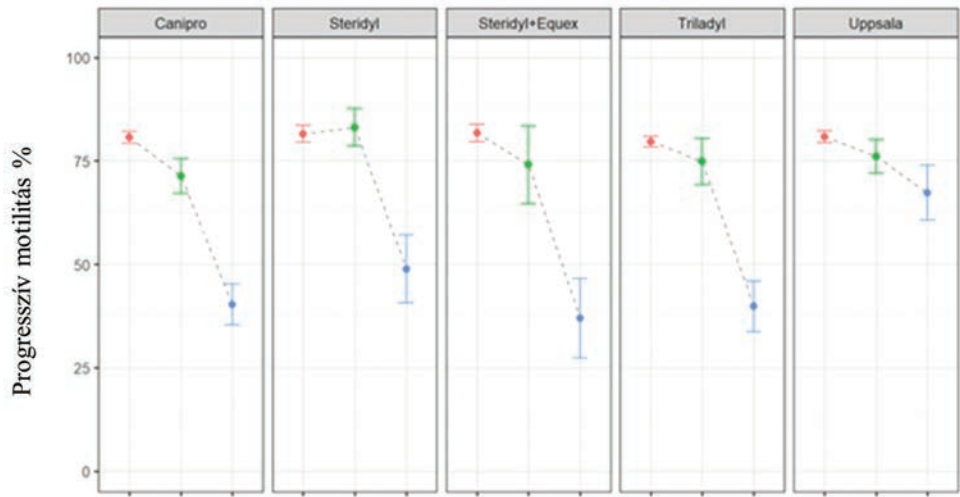
Látható, hogy minden csoport közel azonos kiindulási motilitási értékkel bírt. A mintákban a spermiumok progresszív motilitási értékei a mélyhűtés és felolvasztás után lecsökkentek és a csökkenés mértékében a fagyasztóoldatok szerint eltéréseket tapasztaltunk. A különböző oldatok esetében a friss, hűtött és fagyasztott/felolvasztott mintákban mért progresszív motilitási értékeket (piros = friss, zöld = hűtött, kék = fagyasztott/felolvasztott minták értékei) az 1. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy a Canirep Uppsala + TM fagyasztóoldattal kaptuk a legjobb motilitási adatokat a fagyasztás/felolvasztást követően.



1. ÁBRA. Hígítónként csoportosítva, hűtési fázisonként szemlélítve a motilitásadatokat. Piros: friss, zöld: hűtött, kék: felolvasztás után mért motilitási értékek. Canipro = CaniPro Freeze A&B, Uppsala = CaniRep Uppsala Equex II. + TM jelöli. TM = felolvasztó médium

FIGURE 1. Progressive motility results grouped by extenders. Red fresh semen, green chilled semen, blue= frozen-thawed semen. Uppsala means CaniRep Uppsala Equex II. with thawing medium. CaniPro means CaniPro Freeze A&B

A 2. ábra mutatja a különböző kezelési csoportokban a mélyhűtési és felolvasztási technológia eltérő fázisaiban mért progresszív motilitási értékek átlagait és az azokhoz tartozó szórásokat ($\pm$ SE):



2. ÁBRA. Hígítónként csoportosítva, hűtési fázisonként szemlélítve a motilitásátlagok és a szórás. Piros = friss, zöld = hűtött, kék = felolvasztás után. Canipro = CaniPro Freeze A&B, Uppsala = CaniRep Uppsala Equex II. + TM jelöli. TM = felolvasztó médium

FIGURE 2. Progressive motility results and SD grouped by extenders. Red fresh semen, green chilled semen, blue = frozen-thawed semen. canipro means CaniPro Freeze A&B extender, Uppsala means CaniRep Uppsala Equex II with thawing mediumTM

Látható, hogy a mélyhűtési/felolvasztási folyamat során a mintákban csökkent a spermiumok mozgása és ennek megfelelően a kiindulási értékhez képest gyengébb motilitási eredményeket kaptunk a mélyhűtés különböző fázisaiban, így a hűtött, ill. a fagyasztott-felolvasztott mintákban. Hűtött fázisban egyedül a Steridyl hígító esetén figyelhető meg a motilitási értékek átlagának növekedése, míg a fagyasztott/felolvasztott stádiumban minden hígító tekintetében csökkent értékeket kaptunk. Jól látszik, hogy a fagyasztott/felolvasztott motilitás a CaniRep Uppsala + TM esetében a legnagyobb, vagyis ez áll a legközelebb a kiindulási, friss értékekhez. Felolvasztás utáni értékek tekintetében a statisztikai elemzésből becsült átlagos és standard hiba (SE) az alábbi táblázatokban láthatók. Az egyik A) verzióban a CaniRep Uppsala médium esetén a felolvasztó folyadék nélkül mért (4. táblázat), a B) verzióban a felolvasztó folyadékkal mért értékek láthatók (5. táblázat).

4. TÁBLÁZAT. Hígítónként csoportosítva felolvasztás után mért adatokból kapott motilitás átlag és $\pm$ SE. CaniRep Uppsala médium esetén itt a felolvasztó folyadék nélküli értékekből becsült átlag látható. Canipro = CaniPro Freeze A&B TM = felolvasztó médium

TABLE 4. Progressive motility results (mean $\pm$ SE) after thawing grouped by extenders. CaniRep Uppsala result without thawing medium (TM) is figured. Canipro = CaniPro Freeze A&B.

Hígító	CaniPro	Steridyl	Steridyl + Equex	Triladyl	CaniRep Uppsala (TM nélkül)	p(Hígító)
Becsült átlag $\pm$ (SE)	40,0 $\pm$ 5,9%	48,9 $\pm$ 7,7%	37,0 $\pm$ 7,7%	39,6 $\pm$ 6,3%	55,7 $\pm$ 7,4%	0,3453

5. TÁBLÁZAT. Hígítónként csoportosítva a felolvasztás utáni adatokból kapott motilitásátlag $\pm$ SE. A CaniRep Uppsala médium esetén itt a felolvasztó folyadékkal mért értékekből becsült átlag $\pm$ SE látható. Canipro = CaniPro Freeze A&B, TM = felolvasztómédium

TABLE 5. Progressive motility results (mean $\pm$ SE) after thawing grouped by extenders. the result of CaniRep Uppsala is figured with thawing medium (TM). Canipro = CaniPro Freeze A&B.

Hígító	CaniPro	Steridyl	Steridyl + Equex	Triladyl	CaniRep Uppsala (TM)	p(Hígító)
Becsült átlag $\pm$ SE	40,0 $\pm$ 5,9% ^a	48,9 $\pm$ 7,7% ^{ab}	37,0 $\pm$ 7,7% ^a	39,6 $\pm$ 6,3% ^a	66,8 $\pm$ 7,4% ^b	0,0316

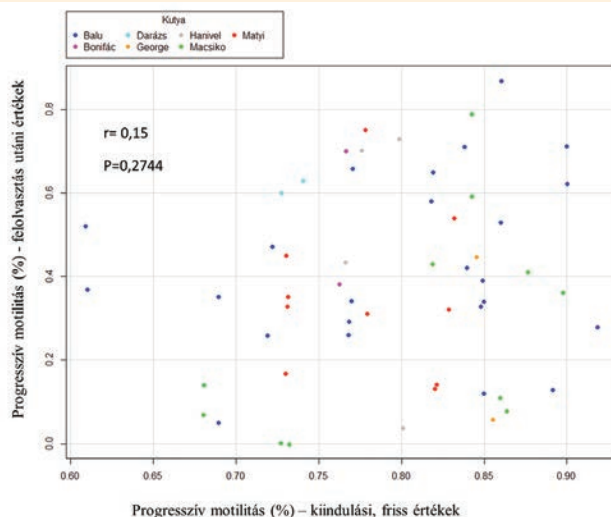
A CaniRep hígító kombinálva a felolvasztómédiummal biztosította a legjobb progresszív motilitást

A verzió
Amikor a CaniRep Uppsala médium – felmelegítőfolyadék nélküli alkalmazásával elért – eredményeit összehasonlítottuk a többi fagyasztóoldattal kapott eredményekkel, nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző hígítókkal mért motilitási átlagok között ($p = 0,3453$).

B verzió
Amikor azonban a CaniRep Uppsala médium használata társítva volt a felmelegítő oldat (TM) alkalmazásával a felolvasztott minták motilitásának átlaga szignifikánsan függött a hígítótól ($p = 0,0316$). Ahogy az a táblázat adataiból leolvasható a CaniRep Uppsala + TM hígítóval kapott motilitási átlag szignifikánsan nagyobb volt a többi oldat eredményénél (CaniPro Freeze A&B- vel, Steridyl-Equex kombináció, ill. a Triladyl). A CaniRep Uppsala hígító és a Steridyl között nem bizonyult szignifikánsnak a különbség a statisztikai analízis során, de közel 20%-kal jobb eredményt figyeltünk meg a CaniRep Uppsala médium használatával. A CaniRep hígító kombinálva a felolvasztómédiummal biztosította a legjobb progresszív motilitást. Érdekes, hogy a felolvasztott minták motilitásának tekintetében a CaniRep Uppsala felolvasztófolyadékkal

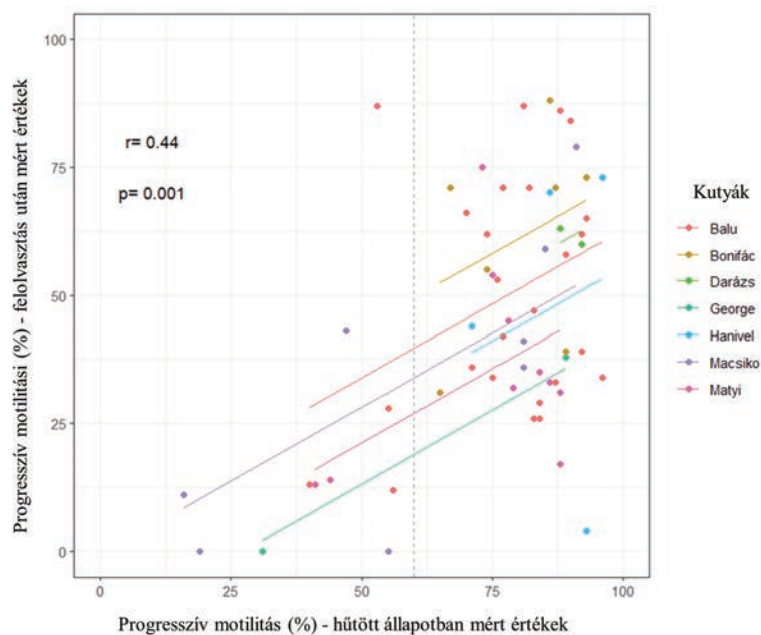
($66,8 \pm 7,4\%$) és anélkül ($55,7 \pm 7,4\%$) mért értékei között is szignifikáns különbség ($p = 0,0112$) volt mérhető.

Vizsgálataink során kíváncsiak voltunk arra is, hogy a friss, ill. a hűtött minták motilitásából következtetni lehet-e a felolvasztás utáni minőségre, így korrelációszámítást végeztünk az összes oldattal kapott motilitási értékek tekintetében az egyes fázisok között (3. és 4. ábra).



3. ÁBRA. Korreláció vizsgálat friss és felolvasztás után mért motilitásértékek esetén. A CaniRep Uppsala Equex II. hígító felolvasztás utáni értékeinél a felolvasztó médiummal (TM) mért értékeket vettük figyelembe, $n = 58$

FIGURE 3. Correlation study between progressive motility results of fresh semen samples and frozen-thawed samples $n = 58$



4. ÁBRA. Korreláció vizsgálat a hűtött és felolvasztás után mért motilitásértékek esetén. A CaniRep Uppsala Equex II. hígító felolvasztás utáni értékeinél a felolvasztó médiummal (TM) mért értékeket vettük figyelembe, $n = 58$

FIGURE 4. Correlation study between progressive motility results of chilled semen and frozen-thawed semen, $n = 58$

A hűtött és felolvasztott motilitási értékek között szignifikáns korrelációt tapasztaltak az adott minták esetében

FRISS ÉS FELOLVASZTOTT MINTÁK MOTILITÁSA KÖZÖTTI KORRELÁCIÓ

A 3. ábrán látható korreláció a friss és a felolvasztott értékek között nem szignifikáns ($p = 0,2744$) és $r = 0,15$. Tehát a friss minták progresszív motilitási értékeinek nincs prognosztikai jelentősége abban a tekintetben, hogy milyen motilitást tapasztalunk a fagyasztás/felolvasztás után.

HŰTÖTT ÉS FELOLVASZTOTT MINTÁK MOTILITÁSA KÖZÖTTI KORRELÁCIÓ

A 4. ábrán látható hűtött és felolvasztott értékek közötti korreláció szignifikáns ($p = 0,001$) a korrelációs együttható értéke $r = 0,44$. Ez alapján megállapítható, hogy a hűtött értékekből jobban következtethetünk a fagyasztás/felolvasztás után mért/mérhető motilitási eredményre, mint a friss minta értékéből, tehát nagyobb prognosztikai erővel bír a felolvasztás utáni minőség tekintetében. A 4. ábrán látható függőleges szaggatott vonal azt szemlélteti, hogy a hűtött állapotban 60% alatti motilitást mutató minták nagy valószínűséggel felolvasztás után is alacsony értékeket mutatnak. Ennek pontosítására további vizsgálatok szükségesek.

A 6. táblázat azt szemlélteti, hogy az egyes hígítókkal milyen arányban sikerült felolvasztás után jó minőségű, vagyis 50%-nál nagyobb motilitási értéket mutató mintát kapni [31]. Ugyan nem volt olyan hígító, amivel mindig „jó” vagy mindig „rossz” eredményeket kaptunk volna, viszont a valószínűség/gyakoriság

6. TÁBLÁZAT. Felolvasztás utáni jó minőségű minták százalékos megoszlását mutatja hígítók szerint. „Jó” minőség: 50%-nál nagyobb progresszív motilitási értéket mutató minták. TM = felolvasztó médium

TABLE 6. The percentages of good quality samples after thawing, grouped by extenders. Good quality means 50% $\leq$ progressive motility. TM = thawing medium

Hígító neve	„Jó” minőségű felolvasztás utáni minták százalékos megoszlása (%)
Canipro Freeze A&B	31,25
Steridyl	44,44
Steridyl + Equex	44,44
Triladyl	28,57
Canirep Equex II + TM (Uppsala)	80,00

szempontjából különbség van a hígítók között. Canirep Uppsala hígító + TM esetén 80%-ban jó minőségű, vagyis 50% fölötti lett a felolvasztás utáni motilitás, míg Triladyl esetén 28,57%-ban, Steridyllel és Steridyl+Equex kombinációval 44,4 %-ban, Canipro-val 31,25%-ban kaptunk jó minőségű spermát felolvasztás után.

MEGVITÁTÁS

Vizsgálataink során a fő szempont a spermiumok progresszív motilitásának értékelése volt fagyasztott/felolvasztott kutya ondó mintákban. A kapott eredmények alapján összehasonlítottuk a mélyhűtéshez alkalmazott különböző fagyasztóoldatok hatékonyságát. A spermiumok motilitásának vizsgálatához CASA rendszert használtunk, ami objektív vizsgálati módszernek minősül. [32].

Vizsgálataink révén nyert adatokból az alábbi következtetéseket vonhatjuk le: A fagyasztás/felolvasztás során a mélyhűtés okozta stressz és mechanikai sérülések következtében a spermiumok motilitása csökken, azonban a csökkenés mértéke eltérő lehet az alkalmazott, különböző fagyasztómédiumtól/oldattól függően. Ezért nagy jelentősége van annak, hogy melyik fagyasztó/felolvasztóoldatot

**A legjobb
eredményt adó
fagyasztási
protokoll két
lépésből állt**

használjuk. Sikeres spermafagyasztási programnál – gondolva az egyedek közötti különbségekre – ajánlatos több hígítóval ún. teszt fagyasztásokat végezni ahhoz, hogy ki tudjuk választani az adott egyed esetében legjobban „működő” fagyasztó/felolvasztómédium kombinációt.

Vizsgálataink során a CaniRep Uppsala Equex II. hígítóval kaptuk a legnagyobb felolvasztás utáni progresszív motilitási eredményeket ($66,8 \pm 7,4\%$). Tapasztalataink szerint ennek a hígítónak a használatával a legnagyobb annak a valószínűsége, hogy felolvasztás után jó minőségű/motilitású mintát kapunk. Mivel a spermiumok mozgása a fertilitással szorosan összefüggő minőségi mutató, ezért fontos, hogy ez az érték minél nagyobb maradjon. Az Uppsala protokoll ugyan két fázisú hígítást használ, ami munka- és időigényesebb, mint az egy lépéses protokollok, azonban ezt a többletmunkát és időt érdemes belefektetni, főleg, hogy nincs szükség hígításra, tojássárgája hozzáadásra sem, mivel a termék használatra kész formában kapható. További érv lehet a két fázisú hígítás mellett, hogy Peña és mtsai (2000) szerint is – a plazmamembrán integritását és az akroszóma állapotát vizsgálták – jobb a kétlépéses hígítást alkalmazni, mint az egylépéses, a fagyasztás/felolvasztás során [33].

Az Uppsalában kifejlesztett hígító (CaniRep) összetevői között megtalálható az Equex, ami egy vízzoldékony detergens anyag (Na-lauril-szulfát) és hozzájárul ahhoz, hogy a spermiumok jobban ellenálljanak a fagyasztás okozta károsodásoknak, megőrizték sejthártyájuk intaktságát, épségét és a felolvasztás utáni motilitásuk se csökkenjen nagyobb mértékben, ill. a mozgási mintázat megőrzésében is szerepet játszik. Használatával a hiperaktív mozgás kialakulása megelőzhető [33–36]. Az általunk használt többi készítmény tudomásunk szerint nem tartalmaz ilyen anyagot. Az Equex tartalmú készítménnyel jobb minőségűek lettek felolvasztás után a mintáink: $66,8 \pm 7,4\%$ (CaniRep) vs $40,0 \pm 5,9\%$ (CaniPro), $48,9 \pm 7,7\%$ (Steridyl), $39,6 \pm 6,3\%$ (Triladyl), habár amikor mi adagoltuk külön az Equex pasztát, nem kaptunk olyan jó eredményeket, mint amikor a termékbe már a gyártás során belekerült ($66,8 \pm 7,4\%$ (CaniRep) vs $37,0 \pm 7,7\%$ (Steridyl + Equex)). Ezt a paszta halmazállapótól eredő nehéz adagolhatósággal és kezelhetőséggel magyarázzuk, továbbá a CaniRep médiumban található paszta más forrásból származik [37].

A tojássárgája régóta használt védőanyag a hígítókbán. A LINDE-FORSBERG és mtsai által összeállított CaniRep médium 20% tojássárgáját használ, ugyanúgy, mint a Triladyl és a CaniPro. A Steridyl-nél nem nyilvános a koncentrációra vonatkozó adat. A tojássárgája a sejtvédő hatásán kívül táplálja is a spermiumokat, mivel glükózt is tartalmaz, amiből a hímivarsejtek energiához tudnak jutni [38]. A tojássárgája hidegsokk elleni védelmének hátterében az LDL (low-density-lipoprotein) és foszfolipid (lecitin) frakció áll [39]. Az LDL hozzátapad a sejthártyához és egy felületi filmréteget képez rajta, ezzel védve a fagyasztás okozta károsodástól. Ezen kívül az LDL segíti a foszfolipidek és koleszterin beépülését a sejthártyába még hűtés során is, ill. az ondóplazma fehérjével olyan komplexeket képez, amik nem engedik ezeket a fehérjéket „működni”, így gátolva a lipidkiáramlást a sejthártyából [40, 41].

**A kutyasperma-
fagyasztáshoz
használt médiumok
nagy része glicerint
tartalmaz 1–6%-ban**

Krioprotektív anyagként glicerint találhatók a hígítókbán, amelyet 2 lépésben, emelkedő koncentrációban adunk a CaniRep esetén a spermamintákhoz, a végső koncentráció 5%. A kutyasperma-fagyasztáshoz használt médiumok nagy része glicerint tartalmaz 1–6%-ban, mivel kezdetben a bikaprotokollokat használták náluk is, innen eredeztethető, hogy a glicerint lett a legszélesebb körben használt krioprotektáns a spermafagyasztásnál kutya esetében is [42, 43]. Sajnos a többi készítménynél csak az tudható, hogy szintén glicerint tartalmaznak, azonban nem nyilvános adat annak koncentrációja. A glicerint a koncentrációtól és a hőmérséklettől függően toxikus a sejtekre, ezért általában 3–7%-ban tartalmazzák a különböző médiumok [34, 44, 45], ill. nagyobb koncentrációban csak hűtve adják a spermiumokhoz.

Többben is összehasonlították az egy, ill. két lépéses fagyasztási protokollokat, PENA és mtsai vizsgálataiból az derült ki, hogy jobb motilitási értékeket kap-

tak, ha a kétlépéses hígítási protokollt alkalmazták Equex jelenlétében, mint az egy lépéses protokoll esetén [33] (lásd korábban). BRITO és mtsai ugyanakkor nem találtak különbséget a fagyasztott/felolvasztott minták vizsgálata során motilitás, plazmamembrán-integritás, mitokondriális aktivitás és egyéb vizsgált paraméterek esetében [46]. A mi kísérleti körülményeink között szintén az Equex tartalmú, kétlépéses protokollnál kaptuk a legjobb fagyasztás utáni motilitási értékeket ($66,8 \pm 7,4\%$).

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a friss, natív spermaminták motilitási értékeinek nincs prognosztikai értéke abban a tekintetben, hogy milyen minőségű lesz a sperma felolvasztás után. Viszont a $3-5^\circ\text{C}$ -ra való hűtést követő mérések már erősebb kapcsolatot mutatnak a fagyasztás/felolvasztás után kapott eredményekkel. Tehát érdemes egy próbahűtést végezni, annak érdekében, hogy képet kapjunk az adott kan kutya spermájának hűtési toleranciájáról. Több munkacsoport is foglalkozott azzal, hogy a kezdeti, friss állapotban mért minőségi mutatók és a fagyaszthatóság (kriotolerancia) között összefüggéseket találjanak, de egyelőre nem állnak rendelkezésre megfelelően megbízható kísérleti adatok [5, 47]. Ugyanakkor HIDALGO és mtsai hasonló tapasztalatokról számoltak be, mint mi. Ők úgy fogalmazták meg, hogy „ha a hűtött sperma minták megőrzik a jó minőségüket fagyasztás előtt, akkor a mélyhűtésnek kisebb mértékben lesz negatív hatása a sejtekre” [48].

Több cikkben CaniPro Freeze esetén felolvasztás után jobb progresszív motilitást mértek, mint amit mi kaptunk a motilitásvizsgálat során. Ennek oka az lehet, hogy azokban a vizsgálatokban centrifugálták a spermamintákat fagyasztás előtt, és ezzel eltávolították a spermiumokra káros hatásúnak vélt ondóplazmát a spermiumoktól [48, 49]. Amikor nem centrifugálták le és 24 órás tárolás után fagyasztották le a mintát, felolvasztás után $34,8 \pm 11\%$ -os progresszív motilitást mértek, ami már közelebb áll a mi általunk mért értékhez [48]. Ugyanakkor ma már megoszlanak a vélemények abban a tekintetben, hogy jó-e a centrifugálás, szükséges lépése-e valóban a fagyasztási protokolloknak, mivel az ondóplazmában nagyon sok olyan összetevő van, ami pozitív hatással van az embriók egészségére és magára a termékenyülésre is [50–52]. Triladyl esetében több cikk foglalkozik kutya sperma fagyasztással, SZÁSZ és mtsainak eredményeihez hasonló értékeket kaptunk mi is felolvasztás után progresszív motilitás tekintetében: $39,6 \pm 6,3\%$ vs 35% [11], viszont a mi értékeink jobbak lettek mint DOBRINSKI és mtsaié $39,6 \pm 6,3\%$ vs $23,8 \pm 1,5\%$ [12]. Steridyl hígítóval mélyhűtött kutyaspermával kapcsolatos cikket nem találtunk, így az eredményeinket nem tudjuk összevetni mások kutatásaival. A Steridyl ugyan nem kutyákra törzskönyvezett készítmény, mégis a mi körülményeink között hatékony fagyasztómédiumnak bizonyult kutyasperma-fagyasztás esetén $48,9 \pm 7,7\%$ átlag felolvasztás után mért progresszív motilitási értékével, olyannyira, hogy a legjobb eredményt elért CaniRep hígítótól még a felolvasztómédiummal kezelt mintákhoz képest sincs köztük szignifikáns különbség. A szakirodalomban fellelt adatok alapján jávai leopárd, ló és vadon élő kerdőzök spermáját is sikerült ezzel a hígítóval mélyhűteni [14, 15, 18, 21]. Ezek alapján kimondhatjuk, hogy a Steridyl alkalmas hígítónak mutatkozik kutyaspermaminták mélyhűtésére is.

A CaniRep médium használatával kapcsolatban sok publikáció látott már napvilágot [2, 34, 47, 53]. Az Uppsalában kifejlesztett hígító esetén az általunk kapott motilitási értékek egyeznek a szakirodalomban található fagyasztás/felolvasztás után mért motilitási értékekkel [34]. Mi is a legjobb motilitási eredményeket ennek a hígítónak a használatával kaptuk, tehát ez médium bizonyult a legjobbnak a kutyasperma mélyhűtésével kapcsolatos összehasonlító vizsgálataink során.

**A CaniRep
médiumot találták
a legjobbnak a
kutyasperma
mélyhűtésére**

IRODALOM

1. Linde Forsberg C, Forsberg M (1993) Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J reprod fertil Suppl* 47:313–323
2. Hollinshead FK, Hanlon DW (2017) Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 101:62–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.021>
3. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF (2016) Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* 169:2–5. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>
4. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J (2017) Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 6:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
5. Schäfer-Somi S, Colombo M, Luvoni GC (2022) Canine Spermatozoa–Predictability of Cryotolerance. *Animals* 12:733. <https://doi.org/10.3390/ani12060733>
6. Gautier C, Aurich C (2021) “Fine feathers make fine birds” – The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Anim Reprod Sci* 106884. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106884>
7. Holt W (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
8. Lucio C de F, Brito MM, Vannucchi CI (2017) Oxidative stress challenges during the sperm cryopreservation in dogs. 7
9. Farstad W (2009) Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges. *Reprod Domest Anim* 44:336–341. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01418.x>
10. Rota A, Rota A, Martini M, Milani C, Romagnoli S (2005) Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev* 45:29–37. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005002>
11. Szász F, Gábor G, Solti L (2005) Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Vet Hung* 48:325–333. <https://doi.org/10.1556/avet.48.2000.3.9>
12. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K (1993) Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil Suppl* 47:291–296
13. Silva M, Pereira R, Araujo G, Jorge Neto PN, Deco-Souza T (2018) Comparison of three commercial dilutors in the freezing of dog semen: sperm motility in the equilibrium period.
14. Rahman S, Rk B, Mane MA (2023) Using Commercial Cryopreservation of Dromedary Camel Semen Using Tris-Based Extenders (T-BE), Free-From and Enriched With Egg Yolks. *Revista Electronica de Veterinaria* 24:256–267
15. Hermes R, Lecu A, Potier R, Goeritz F, Rickard JP, Bohner J, Wedlarski R, Hruby J, Hildebrandt TB (2022) Cryopreservation of Giraffe Epididymal Spermatozoa Using Different Extenders and Cryoprotectants. *Animals* 12:857. <https://doi.org/10.3390/ani12070857>
16. Naz S, Umair M, Iqbal S (2018) Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia* 50:e13063. <https://doi.org/10.1111/and.13063>
17. Garde J, Soler A, Cassinello J, Crespo C, Malo A, Espeso G, Gomen-dio M, Roldan E (2003) Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorri*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol reprod* 69:602–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012914>
18. Nikitkina E, Musidray A, Krutikova A, Anipchenko P, Plemys-hov K, Shiryayev G (2020) Efficiency of Tris-Based Extender Steridyl for Semen Cryopreservation in Stallions. *Animals* 10:1801. <https://doi.org/10.3390/ani10101801>
19. Lockyear KM, Goodrowe KL, Waddell WT, MacDonald SE (2009) Comparison of different osmolalities and egg-yolk composition in processing media for the cryopreservation of red wolf (*Canis rufus*) sperm. *Theriogenology* 71:469–479. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.030>
20. Gomes-Alves S, Alvarez M, Nicolas M, Lopez -Urueña E, Martínez-Rodríguez C, Borragan S, de Paz P, Anel L (2014) Use of commercial extenders and alternatives to prevent sperm agglutination for cryopreservation of brown bear semen. *Theriogenology* 82:469–474. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.015>
21. Mulia BH, Widiyanti A, Manansang J, Setiadi DR, Yoelinda VT, Nugraha TP, Karja NWK, Arifiantini RI (2021) Establishment of semen collection technique using electroejaculator and semen cryopreservation of Javan leopard (*Panthera pardus melas* Cuvier, 1809). *Vet World* 14:3156–3163. <https://doi.org/10.14202/vet-world.2021.3156-3163>
22. Root Kustritz MV (2007) The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology* 68:329–337. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.017>
23. Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love CC, Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D (2016) Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* 85:1507–1527. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002>
24. Hesser A, Darr C, Gonzales K, Power H, Scanlan T, Thompson J, Love C, Christensen B, Meyers S (2017) Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. *Theriogenology* 87:115–123. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.012>
25. Graham JK, Mocé E (2005) Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64:492–504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.006>
26. Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A (2005) New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 64:706–719. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.021>
27. Larsson B, Rodríguez-Martínez H (2000) Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci* 60–61:327–336. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00089-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00089-0)
28. Kutzler MA (2005) Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64:747–754. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.023>
29. Robert MA, Jayaprakash G, Pawshe M, Tamilmani T, Sathiyabarithi M (2016) Collection and evaluation of canine semen—a review. *International Journal of Science, Environment and Technology* 1586–1595
30. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240030787>. Accessed 11 May 2023

31. Tichy A, Schäfer-Somi S (2019) Canine post-thaw sperm quality can be predicted by using CASA, and classification and regression tree (CART)-analysis. *Polish J Vet Sci* 22:51–59
32. Günzel-Apel AR, Günther C, Terhaer P, Bader H (1993) Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 47:271–278
33. Peña A, Linde-Forsberg C (2000) Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54:859–875. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00397-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00397-6)
34. Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (1997) Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 °C. *Theriogenology* 47:1093–1101. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00066-6)
35. Peña AI, Lugalde LL, Barrio M, Herradón PG, Quintela LA (2003) Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59:1725–1739. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01233-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01233-5)
36. Schäfer-Somi S, Binder C, Burak J, Papadopoulos N, Ilas J, Boersma A, Aurich C (2021) Using egg yolk in a TRIS-Equex STM paste extender for freezing of dog semen is superior to egg yolk plasma, also after addition of lecithin and catalase. *Cryobiology* 100:63–71. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.03.009>
37. Recent Advances in Small Animal Reproduction. <https://www.canirep.com/recent-advances-in-small-animal-reproduction/>. Accessed 13 Oct 2023
38. Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C (2004) Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62:1498–1517. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.014>
39. Trout SW (2013) Evaluation of Different Concentrations of Egg Yolk in Canine Frozen Semen Extender. Thesis, Virginia Tech
40. Bergeron A, Crête M-H, Brindle Y, Manjunath P (2004) Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane¹. *Biol Reprod* 70:708–717. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022996>
41. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M (2002) Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk¹. *Biol Reprod* 67:1250–1258. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1250>
42. Futino D, Mendes M, Matos W, Mondadori R, Lucci C (2010) Glycerol, Methyl-Formamide and Dimethyl-Formamide in Canine Semen Cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 45:214–220. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01208.x>
43. Silva AR, de Cássia Soares Cardoso R, Uchoa DC, MacHado da Silva LD (2002) Effect of Tris-Buffer, Egg Yolk and Glycerol on Canine Semen Freezing. *Vet J* 164:244–246. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0704>
44. Cseh S (2020) Állatorvosi andrológia. Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
45. Peña A, Johannisson A, Linde-Forsberg (1999) Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52:965–980. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00186-7)
46. Brito MM, Lúcio CF, Angrimani DSR, Losano JDA, Dalmazzo A, Nichi M, Vannucchi CI (2017) Comparison of Cryopreservation Protocols (Single and Two-steps) and Thawing (Fast and Slow) for Canine Sperm. *Animal Biotechnology* 28:67–73. <https://doi.org/10.1080/10495398.2016.1203797>
47. Schäfer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C (2006) Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66:173–182. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.022>
48. Hidalgo M, Portero JM, Demyda-Peyrás S, Ortiz I, Dorado J (2014) Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. *Vet Rec* 175:20–20. <https://doi.org/10.1136/vr.102010>
49. Karger S, Geiser B, Grau M, Burfeind O, Heuwieser W, Arlt SP (2016) Prognostic value of a pre-freeze hypo-osmotic swelling test on the post-thaw quality of dog semen. *Anim Reprod Sci* 166:141–147. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.015>
50. Bromfield JJ (2014) Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet* 31:627–636. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0243-y>
51. Schjenken JE, Robertson SA (2020) The Female Response to Seminal Fluid. *Physiol Rev* 100:1077–1117. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2018>
52. Gilbert RO, Suarez SS (2013) Canine seminal plasma: Transport medium or signaling agent? *Vet J* 195:131–132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.009>
53. Colombo M, Morselli MG, Franchi G, Schäfer-Somi S, Luvoni GC (2022) Freezability of Dog Semen after Collection in Field Conditions and Cooled Transport. *Animals (Basel)* 12:816. <https://doi.org/10.3390/ani12070816>

Közlésre érkező: 2024. aug. 23.

**Short-Term Effects
of rhG-CSF Use on
Serotonin Concentration
in the Treatment of
Feline Panleukopenia**

B. B. EROL¹
E. GÜLERSOY^{2*}
E. KORAL³

1. Selçuk University, Faculty of
Veterinary Medicine, Department
of Internal Medicine,
42250 Konya, Törökország

2. Harran University, Faculty of
Veterinary Medicine, Department
of Internal Medicine,
63200 Şanlıurfa, Törökország

3. Petcode Animal Hospital,
İstanbul, Törökország

*e-mail: egulersoy@harran.edu.tr

Az rhG-CSF használatának a szerotoninkoncentrációra gyakorolt rövid távú hatásai a macska panleukopeniájának kezelésében

Büşra Burcu EROL¹, Erdem GÜLERSOY^{2*}, Erman KORAL³

ÖSSZEFOGLALÁS

A macskák panleukopeniája jelentős, főként fiatal és nem oltott macskáknál jelentkező fertőző megbetegedés. A hagyományos kezelések sikerességi aránya kevesebb mint 50%. A vírus a csontvelői progenitorsejteket támadja meg, és kifejezett hatással van az összes myeloid sejtvonalra, ami panleukopeniát eredményez. A kezelés egyik alappillére az immunstimuláció. Jelen tanulmányban a szerzők célja az volt, hogy megvizsgálják a rekombináns humán granulocytakolónia-stimuláló faktor (rhG-CSF, filgrasztim) használatának rövid távú hatásait panleukopenia esetén, a szérum szerotoninkoncentrációjának értékelésén keresztül. 28 macskát vontak be a vizsgálatba, ebből 14-en kaptak normál kezelést, míg a többiek a normál kezelés mellett naponta kétszer 5 µg/ttkg adag filgrasztimot is. 24 óra elteltével kiértékeltek a klinikai és vérvizsgálati paramétereket, valamint a szérum szerotoninkoncentrációját. A filgrasztimmal kezelt csoportban a kapilláris-újratelődési idő hosszabb volt ($p < 0,0001$), ill. a granulocytaszám és a szérum szerotoninszintje magasabb volt, mind az első vizsgálathoz, mind a normál kezelési csoporthoz képest ($p < 0,05$). Ebből következtetve megállapították, hogy a filgrasztim beadása serkenti a csontvelő progenitorsejtjeit, enyhítve az immunszuppressziót és megemelve a szérum szerotoninszintjét. A szerotonin szintek kiértékelése betekintést nyújthat a szervezet gyulladásos állapotába, és prognosztikai indikátorként szolgálhat a kezelésre adott válasz monitorozásában.

SUMMARY

Feline panleukopenia (FP) is a highly contagious disease in cats, particularly affecting young and unvaccinated ones. Conventional treatments have a success rate below 50%. FPV severely impacts progenitor cells and all myeloid populations, leading to panleukopenia, making immune stimulation vital for treatment. This study aimed to evaluate the short-term effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF, filgrastim) on FP and update treatment protocols by assessing serum serotonin concentrations. 28 cats were treated: 14 with standard treatment and 14 with standard treatment plus filgrastim at 5 mcg/kg twice daily. After 24 hours, granulocyte and serum serotonin concentrations in the Filgrastim group were higher than those in both the first admission and Standard treatment groups ($p < 0.05$). It was concluded that the administration of filgrastim stimulates blood progenitor cells, alleviates immunosuppression, and increases serum serotonin concentrations. Assessing serotonin concentrations may provide insights into inflammation and serves as a prognostic indicator for treatment response.

KISÁLLAT

A macskákat érintő jelentős megbetegedés, a macska panleukopenia (feline panleukopenia, FP), világszerte dokumentált. A macskapanleukopenia-vírus (FPV) egy burok nélküli, egyszálú DNS örökítőanyagot tartalmazó vírus [1]. Az FP valószínűleg az egy évnél fiatalabb macskákat érinti leginkább, de bármilyen életkorban előfordulhat nem megfelelően oltott vagy oltatlan egyedekben [2]. Fiatal, oltott macskákat tartó háztartásokban is jelentettek elhullást, valószínűleg nagy mennyiségű vírusnak való kitettség miatt. A beteg macskák 30–50%-a intenzív kezelés esetén is elpusztul [3]. A kezelés célja az immunrendszer stimulálása és az aktív immunitás elősegítése [4]. A kezelés első öt napját túlélő, FP-val kezelt macskák, általában felépülnek, bár a gyógyulás gyakran hosszabb ideig tart, mint a kutyák esetében a parvovírusos enteritis esetén [5]. Egy 244 FP-s macskával végzett vizsgálatban 51,1%-os túlélési arányról számoltak be [2]. Csak kevés tanulmány számol be rekombináns humán granulocytakolónia-stimuláló faktor (rhG-CSF) alkalmazásáról macskáknál. A filgrasztim egy rhG-CSF, amely elősegíti a leukocyták korai felszabadulását. E tanulmányok eredményei ellentmondásosak voltak, de arról számoltak be, hogy a filgrasztim növeli a leukocytaszámot különféle macskamegbetegedések esetén. Az egyik tanulmány arról adott számot, hogy a filgrasztim egészséges és neutropeniás macskáknál való alkalmazása esetén az egészséges macskák leukocytaszám-növekedése nagyobb volt, mint a neutropeniás macskáké, és a 10 neutropeniás macskából csak 1 pusztult el [6]. Egy másik tanulmány jelentős növekedést mutatott a leukocytaszámokban a filgrasztim használata után FP-s macskáknál az egészséges macskákhoz képest [7]. Egy 876 macskán végzett friss tanulmányban az áll, hogy az FP-s macskák túlélési aránya nem nőtt a filgrasztim használatával [3].

A biomarkerek felfedezése olyan hatékony jelöltek azonosítását eredményezheti, amelyek előrejelzőként szolgálhatnak betegségek és egészségügyi állapotok esetében, meghatározhatják a terápiás paramétereket, és számos más alkalmazási lehetőséget találhatnak az orvostudományban [8]. A szerotonin egy, különböző állatfajoknál megtalálható neuromodulátor, ám pontos funkciója még nem teljesen ismert [9]. A szerotonint a keringő vérlemezkék és a belek enterochromaffin sejtjei szabadítják fel [10], és nemrégiben pro-inflammatorikus mediátorként azonosították; azonban a szerotonin szerepe a vírusreplikációban vagy vírusos betegségekben még nem tisztázott [11].

Bár megbízható tanulmányok vannak az FP diagnózisának optimalizálásáról, specifikus gyógyszereket az FPV kezelésére még nem fejlesztettek ki [12]. Figyelembevétel az FP-ben megfigyelt bélkárosodást és akut gyulladást [13], a szérumserotonin-szintek értékelése értékes betekintést nyújthat az akut gyulladásos álla-

A significant disease that affects cats, Feline Panleukopenia (FP) has been documented all over the world. Feline Panleukopenia Virus (FPV) is a non-enveloped, single-stranded DNA virus that is the causative agent [1]. FP most likely affects cats younger than 1 year of age, but it can occur in inappropriately vaccinated or unvaccinated cats of all ages [2]. Also, deaths among kittens have been reported in households of fully vaccinated kittens, possibly due to exposure to large amounts of virus. It was reported that despite intensive treatment, 30–50 % of diseased cats die [3]. The goal of the treatment is to stimulate the immune system and facilitate active immunity [4]. Cats with FP that survive the first five days of treatment generally recover, although recovery is often more prolonged than it is for dogs with parvoviral enteritis [5]. In a study with 244 cats with FP, it was reported that the survival rate was 51.1% [2]. Limited number of studies has reported using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in feline patients. Filgrastim is a rhG-CSF the induces early release of leukocytes. The results of these studies were controversial, but filgrastim has been reported to increase leukocyte count in a variety of feline diseases. In a study, it was reported that as a result of filgrastim use in healthy and neutropenic cats, the increase in leukocyte count was higher in healthy cats than the cats with neutropenia and only 1 out of 10 neutropenic cats died [6]. Another study reported a significant increase in leukocyte counts following the use of filgrastim in cats with FP compared to healthy cats [7]. In a more recent study conducted on 876 cats, it was reported that the survival rate in cats with FP did not increase with the use of filgrastim [3].

The discovery of biomarkers can result in the identification of effective candidates that may serve as predictors of diseases, medical conditions, define therapeutic parameters, and find various other applications in medicine [8]. Serotonin serves as a neuromodulator found across various animal phyla, yet its precise function is not fully understood [9]. Serotonin is released from circulating platelets and enterochromaffin cells of the intestines [10], and it has recently been associated as a pro-inflammatory mediator; however, the role of serotonin in viral replication or in viral diseases has not been adequately discussed [11].

Although, there are reliable studies on the optimization of FP diagnosis, specific drugs to treat FPV have not been developed yet [12]. Given the intestinal damage and acute inflammation observed in FP [13], evaluating serum serotonin levels may offer valuable insights into the acute inflammatory state, immune response, and the extent of intestinal damage. Considering the controversial results of studies using rhG-CSF in cats and

potba, az immunválaszba és a bélkárosodás mértékébe. Mivel macskáknál a rhG-CSF használatával kapcsolatos tanulmányok ellentmondásos eredményeket hoztak, de az immunstimuláció fontossága a kezelésben ismert, e tanulmány célja az volt, hogy a szérumserotonin-szintek változásainak értékelésével megvizsgálja a rhG-CSF használatának rövid távú hatásait FP esetén. Ezenkívül a vizsgálat célja volt a követési és kezelési protokollok átdolgozása, valamint a filgrasztim FPV által indukált immunszuppresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálata.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A tanulmány protokollját a Selçuk Egyetem Állatorvosi Karának Helyi Etikai Bizottsága hagyta jóvá (jóváhagyási szám: 2020/41). Az állatok kezelési eljárásait az Helyi Állatkísérleti Etikai Bizottság ajánlásai szerint végezték. Ezenkívül a tanulmányba bevont összes macska tulajdonosa tájékoztatás után beleegyezését adta, a szükséges engedélyeket beszerezték.

VIZSGÁLT ÁLLATOK

A vizsgált populáció összesen 28, főként keverék macskából állt (16 nőstény, 12 hím), amelyek 2-6 hónaposak voltak, és akiknél olyan klinikai tünetek fordultak elő mint az étvágytalanság, gyengeség, hányás, hasmenés, láz és kiszáradás, amelyek FP jelenlétére utalhattak. Mindegyiket a Selçuk Egyetem Állatorvosi Karának Állatkórházába vittük diagnózis és kezelés céljából. Az összes macska klinikai vizsgálatát és vérvizsgálati elemzését elvégeztük. A klinikai vizsgálatok megkezdése előtt, a stressz elkerülése érdekében minden macska körülbelül 15 percet kapott, hogy megszokja a klinikai környezetet. Ezenkívül a macskák vizsgálatának környezetében a stresszt kiváltó egyéb macska- vagy kutyailat elkerülése végett a vizsgálóasztalt és a felszereléseket fertőtlenítettük.

FIZIKAI VIZSGÁLATOK ÉS VÉRVÉTEL

A légzési és pulzusszámot, a testhőmérsékletet és a kapilláris-újratelődési időt (capillary refill time, CRT) mértük, valamint a szív és a tüdő hallgatózását és a tapintható nyirokcsomók értékelését végeztük el. Vénás vérmintákat vettünk (1-3 ml K₃EDTA-val ellátott csövekben vérvizsgálati elemzéshez és antikoaguláns nélküli szérumcsövekben szérumserotonin mérésekhez) minden macskától a *vena cephalica* vénapunkcióval. Az összegyűjtött vérminták egy részét vérvizsgálati elemzésre használtuk. A többit centrifugáltuk (5000 × g, 5 percig), a szérumot kivontuk és Eppendorf-csövekbe helyeztük a szerotonin méréséhez, amit -20 °C-on tároltunk a mérés napjáig (körülbelül 5 nappal a mintavétel után). A tanulmány keretében a vérmintákat az első vizsgálatkor és a kezelési protokoll után 24 órával vettük.

recognizing immune stimulation as pivotal in treatment, this study aimed to investigate the short-term effects of rhG-CSF use in FP by evaluating alterations in serum serotonin concentration. Additionally, the investigation included updating follow-up and treatment protocols, and examining the impacts of filgrastim use on FPV-induced immunosuppression.

MATERIAL AND METHODS

The study protocol was approved by the Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University Local Ethics Committee (Approval number: 2020/41). All of the animal handling procedures were performed following the recommendations of the Local Ethics Committee on Animal. Also, informed consent was given to the owners of all the cats enrolled in the study and permissions were obtained.

ANIMAL MATERIAL

The animal material consisted of a total of 28 cats (16 females, 12 males), mostly of mixed breed, aged 2-6 months, with clinical findings such as anorexia, weakness, vomiting, diarrhea, fever and dehydration that would make one suspect the presence of FP. All were admitted to Selçuk University Animal Hospital of Veterinary Faculty for diagnosis and treatment purposes. Clinical examinations and hemogram analyses of all the cats were performed. Before the onset of clinical examinations, approximately 15 minutes were given to all the cats to get acquainted with the clinical environment in order to avoid stress. Also, in order to avoid any other cat or dog odor that could trigger stress in the environment where the cats were examined, the examination table and equipments were disinfected.

PHYSICAL EXAMINATIONS AND BLOOD SAMPLING

Respiratory and pulse rates, body temperature and gingival capillary refill time (CRT) measurements, along with heart and lung auscultations and palpable lymph node evaluation were performed. Venous blood samples (1-3 mL, using tubes with K₃EDTA for hemogram analysis and serum tubes without anticoagulant for serum serotonin measurements) were obtained from all the cats via *vena cephalica* venepuncture, in a time not exceeding 20 minutes. A portion of the collected blood samples were used for hemogram analysis. The rest was centrifuged at 5000×g for 5 mins, the serum was extracted and transferred to Eppendorf tubes for serotonin measurement, and stored at -20 °C until the day of measurement (approx. 5 days following sampling). Within the scope of the study, blood samples were taken at the first admission and 24 hours after the treatment protocol. Hemogram analysis included leukocyte (WBC), monocyte, granulocyte, lymphocyte,

A poch-100i hematológiai analizátorral (Sysmex, Japán) végzett vérvizsgálati elemzés kitért az összfehérvérsejtszám, monocyta, granulocyta, lymphocyta, vörösvérsejt (RBC), átlagos vörösvértest-térfogat (MCV), hematokrit (Hct), átlagos vörösvértest-hemoglobin (MCH), hemoglobin (Hb) és vérelemzke (PLT) mérésekre.

GYORSTESZTEK HASZNÁLATA

A klinikai vizsgálatok és vérvizsgálati elemzés alapján FP-gyanús macskáktól vattapálcával anális vagy rektális bélsármintákat vettünk. A vattapálcákat először steril izotóniás oldattal nedvesítettük meg. Az olyan esetekben, amikor nem volt bélsár az anusban és a perineumban, a mintát rektálisan vettük. A diagnózishoz gyenge-közepes érzékenysége (50–80%) és jó-kiváló specificitása (94,2–100%) miatt az IDEXX SNAP Parvo (IDEXX Westbrook, ME, USA) tesztet használtunk [14].

BEVONÁSI/KIZÁRÁSI KRITÉRIUMOK

Az FP gyanújának bevonási kritériumai a klinikailag jellemző tünetek jelenléte (letargia, hasmenés, hányás és láz hiánya kölyökmacskáknál; étvágytalanság, letargia, hypoerxia, hányás és hasmenés idősebb macskáknál) és a laboratóriumi eredmények megváltozása (anaemia, leukopenia, thrombocytopenia), valamint IDEXX SNAP® Parvo tesztrel kapott pozitív bélsáreredmény volt [15]. Az összes vizsgálatba bevont macskát teszteltük FeLV és FIV fertőzésekre (IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo Test, IDEXX Laboratories) gyors diagnosztikai tesztkészletek használatával, amelyek a FeLV p27 antigént (98,6%-os érzékenység és 98,2%-os specificitás) és a FIV-ellenanyagokat (93,5%-os érzékenység és 100%-os specificitás) mérték. Az összes macskát egyszer teszteltük, és a negatív/gyanús FP-eredményeket mutató, valamint a FeLV- vagy FIV-pozitív macskákat kizártuk a vizsgálatból. Ezenkívül az összes macska mikroszkópos bélsárvizsgálatát elvégeztük, és nem találtunk parazitákat és/vagy petéket.

SZÉRUM SZEROTONINKONCENTRÁCIÓ MÉRÉSE

A szérumból történő szerotoninmérést a gyártók utasításai szerint végeztük macskaspecifikus kereskedelmi enzimhez kötött immunszorbens vizsgálati (ELISA) készlet használatával (Elabscience, Texas, USA). A szerotonin intra- és interassay variációs együtthatóját (CV) 8%-nak és $\leq 10\%$ -nak jelentették, és a minimális kimutatható koncentráció (MDC) 9,38 ng/mL volt. A detektálási tartomány 15,63–1000 ng/mL volt.

KEZELÉSI PROTOKOLLOK

Az összes macska Ringer-laktátot (Polifleks, Polifarma, Törökország) kapott 30–40 ml/ttkg iv. dózisban folyadékterápiaként, aminosav-kiegészítést 10 ml/kg IV (Duphalyte, Zoetis, Spanyolország) parenteralis táplálás részeként, antibiotikumokat (amoxicillin/klavulánsav

erythrocyte (RBC), mean corpuscular volume (MCV), haematocrit (Hct), mean corpuscular haemoglobin (MCH), hemoglobin (Hb) and platelet (PLT) measurements using poch-100i hematology analyser (Sysmex, Japan).

APPLICATION OF RAPID TESTS

Fecal samples were obtained with anal or rectal swabs from cats suspected of FP as a result of clinical examinations and hemogram analysis. At first, swabs were wetted with sterile isotonic solution and the sample was taken rectally in cases where there was no feces in the anus and perineum. Due to its low-to-moderate sensitivity (50–80%) and good-to-excellent specificity (94.2–100%), the IDEXX SNAP Parvo test was used for diagnosis [14].

INCLUSION/EXCLUSION CRITERIA

Inclusion criteria to suspect FP were the presence of clinically coherent findings (lethargy, absence of diarrhea, vomiting and fever in kittens; presence of anorexia, lethargy, hyporexia, vomiting and diarrhea in older cats) and altered laboratory findings (anemia, leukopenia, thrombocytopenia) along with positive fecal IDEXX SNAP® Parvo test result [15]. All cats included in the study were examined for FeLV and FIV (IDEXX SNAP FIV/FeLV Combo Test, IDEXX Laboratories) using rapid diagnostic test kits measuring p27 antigen for FeLV (sensitivity of 98.6% and specificity of 98.2%) and antibodies for FIV (sensitivity of 93.5% and specificity of 100%). All cats were tested once and cats with insufficient/suspicious results were excluded. Also, the cats that tested positive for FeLV or FIV were excluded from the study. Moreover, microscopic fecal examinations of all the cats were performed and no parasites and/or eggs were found.

SERUM SEROTONIN CONCENTRATION MEASUREMENT

Serotonin measurement from serum supernatants was made according to the manufacturers' instructions using feline specific commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based test kit (Elabscience, Texas, USA). The reported intra-assay and inter-assay coefficient of variation (CV) for serotonin was 8% and $\leq 10\%$, respectively, and the minimum detectable concentration (MDC) was 9.38 ng/mL. The detection range was 15.63 ng/mL–1000 ng/mL.

TREATMENT PROTOCOLS

All cats received Lactated Ringer (Polifleks, Polifarma, Türkiye) 30–40 ml/kg IV as part of fluid therapy, amino acid supplementation 10 ml/kg IV (Duphalyte, Zoetis, Spain) as part of parenteral nutrition, antibiotics (amoxicillin/clavulanic acid 10 mg/kg IM once a day

10 mg/ttkg im. naponta egyszer (Synulox, Zoetis, Spanyolország) ceftriaxonnal kombinálva (25 mg/ttkg iv. naponta kétszer (Unacefin, Yavuz İlaç, Törökország)), antiemetikumot (maropitant 1 mg/ttkg sc. naponta egyszer (Cerenia, Zoetis, Spanyolország)), H₂ receptor antagonistát (ranitidin 3 mg/ttkg iv. naponta kétszer (Ulcuran, ABFAR, Törökország)) és B-vitamint (1–2 ml iv. naponta egyszer (Nervit, Vetaş, Törökország)) a kórházi kezelés első 24 órájában [16]. Ezen kezelési protokoll mellett az 5 µg/ttkg sc. rhG-CSF-t (Neupogen, Amgen Inc., USA) a *Filgrasztim* csoportnak naponta kétszer adtuk be [17].

ALCSOPORTOK KIALAKÍTÁSA

A torzítás csökkentése érdekében a felvétel randomizált, kettős vak módszerrel történt. A kezelési protokollok alapján a normál kezelést kapó macskákat *Normál* kezelési csoportnak ($n = 14$), a kezelés mellett filgrasztimot is kapó macskákat *Filgrasztim* csoportnak ($n = 14$) neveztük el. A kórházba való első vizsgálatot 0. óraként határoztuk meg.

STATISZTIKAI ELEMZÉSEK

A statisztikai elemzéseket statisztikai szoftverrel (SPSS 25.00 for Windows, USA) végezték. Az adatok eloszlási mintájának vizsgálatához az egy mintás Kolmogorov–Smirnov-tesztet használtak. A nem-paraméteres adatokat medián és tartomány formájában mutattuk be. Az adatok elemzését a csoportok között egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) vagy Kruskal–Wallis-teszttel végeztük, az eloszlási mintától függően. Minden elemzésnél a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

ANAMNESZTIKUS ADATOK

Az anamnesztikus adatok szerint az összes vizsgált egyed kereskedelmi forgalomban lévő száraz macskaeledellel táplált benti macska volt. Néhány egyed (a 28-ból 13) menhelyről került örökbefogadásra. A 28 macskából 4-et csak egyszer oltottak be, 12 macskát féregtelenítettek. Az FP-s macskák átlagos testtömege 1,15 (0,65–1,5) kg, a tünetek átlagos időtartama pedig 3 (2–5) nap volt.

FIZIKAI VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK

A fogínyen mért CRT hosszabb volt a *Filgrasztim* csoportban, mint a 0. órában, mint a *Normál* kezelési csoportban ($p < 0,0001$). A csoportok között más fizikai vizsgálati paraméterekben nem mutatkozott különbség ($p > 0,05$). A fizikai vizsgálat eredményei az [1. táblázatban](#) láthatók.

VÉRVIZSGÁLATI EREDMÉNYEK

Az első vizsgálat (0. óra) eredményeihez képest a *Filgrasztim* csoport fehérvérsejtszám-, lymphocyta-

(Synulox, Zoetis, Spain) in combination with ceftriaxone 25 mg/kg IV twice a day (Unacefin, Yavuz İlaç, Türkiye)), antiemetic (maropitant 1 mg/kg SC once a day (Cerenia, Zoetis, Spain)), H₂ receptor antagonist (ranitidine 3 mg/kg IV twice a day (Ulcuran, ABFAR, Türkiye) and vitamin B (1–2 ml IV once a day (Nervit, Vetaş, Türkiye)) within the first 24 hours of hospitalization [16]. In addition to this treatment protocol, 5 mcg/kg SC rhG-CSF (Neupogen, Amgen Inc., USA) was administered to the Filgrastim group twice a day [17].

FORMING SUBGROUPS

To reduce bias, enrollment was done in a randomized double-blinded manner. Based on treatment protocols, the cats receiving standard treatment were defined as Standard treatment group ($n = 14$) and the cats receiving filgrastim in addition to standard treatment were defined as Filgrastim group ($n = 14$). The first admission to the hospital was defined as 0th hour.

STATISTICAL ANALYSES

Statistical analysis was performed using statistical software (SPSS 25.00 for Windows, USA). One sample Kolmogorov–Smirnov test was utilized to examine the distribution pattern of data. Non-parametric data were presented as median and range. Data analysis of the groups was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis test depending on the distribution pattern. A $p < 0.05$ was considered significant in all analyses.

RESULTS

ANAMNESTIC DATA

Anamnestic data revealed that all of the investigated cats were indoor cats and fed commercial dry cat food. Some of the cats (13 out of 28) were adopted from a shelter. 4 out of 28 cats had been vaccinated only once and 12 cats had been dewormed. The mean body weight of cats with FP was determined as 1.15 (0.65–1.5) kg and the average duration of symptoms was 3 (2–5) days.

PHYSICAL EXAMINATION FINDINGS

Gingival CRT was longer in the Filgrastim group than in the 0th hour and Standard treatment group ($p < 0.0001$). No difference was determined between other physical examination parameters among the groups ($p > 0.05$). Physical examination findings are presented in [Table 1](#).

HEMOGRAM FINDINGS

Compared to the results of the first admission (0th hour), WBC, lymphocyte and MCV levels of the Filgrastim group were statistically different and higher ($p < 0.016$, $p < 0.035$ and $p < 0.025$, respectively). The granulocyte

1. TÁBLÁZAT. Fizikai vizsgálati eredmények

TABLE 1. Physical examination findings

Paraméterek	0. óra n = 28 medián (min-max)	Normál kezelési csoport n = 14 medián (min-max)	Filgrasztim csoport n = 14 medián (min-max)	p-érték
Légzésszám (lélegzetvétel/perc)	66 (48-80)	67 (46-84)	71 (40-88)	0,786
Pulzusszám (szívverés/perc)	143 (136-158)	136 (100-160)	130 (96-160)	0,061
Testhőmérséklet (°C)	39,7 (39,2-40,1)	39,4 (37,5-40,2)	39 (37,8-40,5)	0,103
CRT (mp)	1 (1-2) ^b	2 (1-4) ^b	3 (2-4) ^a	0,0001

CRT: kapillárisújratelődési idő. a, b: tesztet használtak a két adatcsoport közötti kapcsolat vizsgálatára. Statisztikai különbség volt megfigyelhető a és b között, de nem volt különbség a és ab, valamint b és ab között ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-teszt)

CRT: Capillary refill time. a, b: ab test was used to explore the relationship between two datasets. Statistical difference was observed between a and b but there was no difference between a and ab and b and ab ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis test)

és vörösvértest-térfogat- (MCV) szintje szignifikánsan nagyobb volt (rendre $p < 0,016$, $p < 0,035$ és $p < 0,025$). A Filgrasztim csoport granulocyta-szintje szignifikánsan nagyobb volt, mint a 0. órában és mint a Normál kezelési csoportban ($p < 0,005$). A vérvizsgálati eredmények a következő a 2. táblázatban láthatók.

A SZEROTONINSZINT ÖSSZEHASONLÍTÁSÁNAK EREDMÉNYEI

A Filgrasztim csoport szérumszerotonin-koncentrációja statisztikailag szignifikánsan nagyobb volt, mint a 0. órai és a Normál kezelési csoporté ($p < 0,001$). Nem volt statisztikai különbség a Normál kezelési és a 0. órai koncentrációk összehasonlításakor. A szérumszerotonin-szinteket a 3. táblázat mutatja be.

MEGVITATÁS

A vírusos betegségek különösen jelentősek macskák-nál [18]. A macskák vírusos megbetegedései közül az FP egy újra megjelenő kórokozónak tekinthető [13]. Mivel az FP kezelésére még nem fejlesztettek ki specifikus gyógyszereket, a kezelés az egyes macskák betegségének súlyosságához igazított támogató kezelésen alapul [12]. A jelen tanulmányban a naponta kétszer, 5 µg/ttkg-os dózisban adott filgrasztim 24 órás hatásait vizsgáltuk fizikális vizsgálati paraméterekre, vérvizsgálati elemzésre és a szérumszerotonin-koncentrációkra a normál kezelés mellett. Ennek eredményeként megfigyeltük, hogy az 5 µg/ttkg sc. BID

level of the Filgrastim group was statistically different and higher than both the 0th hour and Standard treatment groups ($p < 0.005$). Hemogram findings are presented in Table 2.

RESULTS OF SEROTONIN LEVEL COMPARISON

The serum serotonin concentration of the Filgrastim group was statistically different and higher than the 0th hour and Standard treatment groups ($p < 0.001$). No statistical difference was detected when comparing the Standard treatment and 0th hour concentrations. Serum serotonin levels are presented in Table 3.

DISCUSSION

Viral diseases are particularly significant in feline medicine [18]. Among the viral feline diseases, FP is a re-emerging pathogen [13]. Since specific drugs have not been developed yet to treat FP, treatment is based on supportive measures tailored to the severity of the disease in each cat [12]. In the present study, the 24-hour effects of filgrastim administration at a dose of 5 mcg/kg twice a day in addition to standard treatment on physical examination parameters, hemogram analytes and serum serotonin concentrations were investigated. As a result, it was observed that 5 mcg/kg SC BID filgrastim use mobilizes haematopoietic precursors. High serotonin levels are associated with the recruitment of innate immune cells, such as neutrophils, to injured or inflamed tissue. Considering the low platelet count,

2. TÁBLÁZAT. Vérvizsgálati eredmények

TABLE 2. Hemogram findings

Paraméterek	0. óra n = 28 medián (min-max)	Normál kezelési csoport n = 14 medián (min-max)	Filgrasztim csoport n = 14 medián (min-max)	p-érték
Fehérvérsejtszám (× 10 ⁹ /L)	0,8 (0,33–6,07) ^b	2,9 (1,19–5,94) ^{ab}	5,02 (0,43–9,3) ^a	0,016
Lymphocyta (× 10 ⁹ /L)	0,46 (0,26–2,48) ^b	2,12 (0,41–3,34) ^{ab}	2,18 (0,34–4,64) ^a	0,035
Monocyta (× 10 ⁹ /L)	0,03 (0,02–2,44)	2,12 (0,41–3,34)	2,18 (0,34–4,64)	0,760
Granulocyta (× 10 ⁹ /L)	0,29 (0,05–1,49) ^b	0,92 (0,2–2,16) ^b	2,18 (0,07–6,43) ^a	0,005
RBC (× 10 ¹² /L)	6,69 (3,75–11,66)	8,85 (3,67–12,83)	8,77 (4,54–12,52)	0,416
MCV (fl)	39,9 (30–48,4) ^b	45,45 (36–52,9) ^{ab}	47,55 (41,3–56,4) ^a	0,025
Hct (%)	28,1 (17,1–52)	43,55 (15,4–64,2)	40,95 (19,1–70,6)	0,186
MCH (pg)	13,55 (10,1–16,9)	11,9 (9,6–15,4)	12,35 (7,2–16,9)	0,332
Hb (g/dL)	9,6 (3,8–16)	12,75 (4–17,4)	11,25 (6,2–15,9)	0,556
PLT (m/mm ³)	97,5 (14–143)	81 (42–273)	58,5 (18–185)	0,322

Fehérvérsejtszám: Leukocyta, RBC: vörösvérsejt, MCV: átlagos sejttérfogat, Hct: Hematokrit, MCH: Átlagos sejthemoglobin-tartalom, Hb: Hemoglobin, PLT: Thrombocyta; a, b: az ab tesztet használták a két adatkészlet közötti kapcsolat vizsgálatára. Statisztikai különbség volt megfigyelhető a és b között, de nem volt különbség a és ab, valamint b és ab között ($p < 0,05$; Kruskal–Wallis-teszt)

WBC: Leukocyte, RBC: Erythrocyte, MCV: Mean corpuscular volume, Hct: Hematocrit, MCH: Mean corpuscular haemoglobin, Hb: Hemoglobin, PLT: Platelet. a, b: ab test was used to explore the relationship between two datasets. Statistical difference was observed between a and b there was but no difference between a and ab and b and ab ($p < 0.05$; Kruskal–Wallis test)

filgrasztim használata mobilizálja a hematopoietikus prekurzorokat.

A magas szerotoninszint összefügg az olyan veleszületett immunsejtek, mint a neutrophilek sérült vagy gyulladt szövetbe történő kivándorlásával. Figyelembe véve az alacsony thrombocytaszámot, az FP esetekben a szerotonin eredete valószínűleg inkább enterochromaffin sejtekből származik [19]. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a filgrasztim alkalmazása az FP kezelésében immunstimulációt okoz, amely javíthatja a túlélési arányt, így a szérumszerotoninkoncentrációjának

the origin of serotonin in FP cases may be enterochromaffin cells rather than platelets [19]. It was concluded that the administration of filgrastim in the treatment of FP causes immune stimulation, which may improve survival rate, resulting in elevation of serum serotonin concentration and thus, evaluation of serotonin may have prognostic value in monitoring the response to treatment.

FPV is transmitted via the faecal–oral route, initially replicates in tissues of the oropharynx and is then distributed via a cell free viraemia to virtually all tissues

3. TÁBLÁZAT. Szérum szerotonin szint

TABLE 3. Serum serotonin levels

Paraméter	0. óra n = 28 medián (min-max)	Normál kezelési csoport n = 14 medián (min-max)	Filgrasztim csoport n = 14 medián (min-max)	p-érték
Szérum szerotonin (ng/mL)	166,88 (13,1–495,51) ^b	271,27 (132,3–386,75) ^b	484,79 (160–996,81) ^a	0,001

a, b: az ab tesztet használták a két adatkészlet közötti kapcsolat vizsgálatára. Statisztikai különbség volt megfigyelhető a és b között, de nem volt különbség a és ab, valamint b és ab között ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-teszt)

a, b: ab test was used to explore the relationship between two datasets. Statistical difference was observed between a and b but there was no difference between a and ab and b and ab ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis test).

emelkedését eredményezi, következésképp a szerotonin értékelése prognosztikai értékkel bírhat a kezelésre adott válasz nyomon követésében.

Az FPV nyállal és bélsárral terjed, kezdetben a toroktájék nyálkahártyájában szaporodik el, majd sejthez nem kötött viraemiával szisztémás fertőzést okozva gyakorlatilag minden szövetbe eljut [20]. Az FP során láz, anorexia, gyengeség, dehidratáció és depresszió léphet fel [20]. A hányás a legtöbb esetben megfigyelhető, de gyakran előfordulhat, hogy nem jelentkezik hasmenés [22]. Bár az FP klinikai megnyilvánulásai széles skálán mozognak, a rutinszerű klinikai vizsgálatok és a vérvizsgálati elemzés megkönnyíthetik a szövődmények, pl. a betegséghez kapcsolódó szervi elégtelenség diagnózisát, és előre jelezhetik a halálozást és a kórházi tartózkodás időtartamát [23]. A jelen tanulmányban statisztikai különbséget találtak a CRT-értékek között a Filgrasztim csoport és a Normál kezelési csoport között az első felvételt követő 24 órás összehasonlításban ($p < 0,0001$). A panleukopeniás macskák rövidült CRT-je az első vizsgálatkor összefügghet az FP-vel kapcsolatos szepszissel és az ezt követő perifériás vazodilatációval, amely hyperaemiás nyálkahártyához, majd vasoconstrícióhoz vezet [13]. Ezenkívül az 1 másodpercnél rövidebb CRT hyperdinamikus állapotra utalhat, amely összefüggésben lehet a szisztémás gyulladással, sokkal, hőgutával vagy hyperthermiával. A jelen tanulmányban megfigyelt meghosszabbodott CRT a filgrasztim alkalmazása által okozott immunaktivációra vezethető vissza. Ez az immunaktiváció csökkent perifériás perfúzióval jár, ami a proinflammatorikus citokinek és catecholaminok szintjének növekedéséhez vezet. Ezek a tényezők hozzájárulnak a hemodinamikai változók rendellenességeihez és a folyamatban lévő szisztémás gyulladáshoz [24].

Az rhG-CSF serkenti a neutrophil prekursorok és az érett neutrophilek túlélését, differenciálódását, proliferációját és funkcióját. Kimutatták, hogy az rhG-CSF hatékony a súlyos idült humán neutropenia kezelésében [27]. A jelen tanulmányban az FP-ben szenvedő

causing a systemic infection [20]. During the course of FP; fever, anorexia, weakness, dehydration and depression can be present [20]. Vomiting manifests most of the time. However, most cases may not show diarrhea [22]. Even though FP has wide variety of clinical manifestations, routine clinical examinations, along with hemogram analysis, can facilitate the diagnosis of complications such as disease-related organ failure and predict mortality and duration of hospitalization [23]. In the present study, a statistical difference in CRT value was determined between the Filgrastim group and the Standard treatment group in the comparison 24 hours after the first admission ($p < 0.0001$). Shortened CRT of the panleukopenic cats at first admission may be related with septicemia associated with FP and the subsequent peripheral vasodilatation leading to hyperaemic mucosa followed by vasoconstriction [13]. In addition, a CRT of less than 1 second is suggestive of a hyperdynamic state which can be associated with systemic inflammation, distributive shock, and heat stroke or hyperthermia. The prolonged CRT observed in the present study may be attributed to immune activation caused by filgrastim administration. This immune activation is associated with low peripheral perfusion, leading to increased levels of proinflammatory cytokines and catecholamines. These factors contribute to abnormalities in hemodynamic variables and ongoing systemic inflammation [24].

Filgrastim or rhG-CSF is a glycoprotein that stimulates bone marrow production of granulocytes and stem cells and releases them into circulation [25]. As a therapeutic tool, rhG-CSF exogenously stimulates haematopoietic precursors to increase the number of circulating neutrophils [26]. rhG-CSF stimulates the survival, differentiation, proliferation and function of neutrophil precursors and mature neutrophils. rhG-CSF has been shown to be effective for the treatment of severe chronic neutropenia in human [27]. Filgrastim administration to cats with FP in the present study resulted in a numerical increase in total WBC count compared to standard treatment and

macskákánál a filgrasztim alkalmazása a teljes fehérvérsejtszám növekedését eredményezte a normál kezeléshez képest, és statisztikailag szignifikáns növekedést a granulocytaszámban ($p < 0,035$). Ezekkel az adatokkal összhangban a *Filgrasztim* csoport megnövekedett granulocytaszáma magyarázható az rhG-CSF azon képességével, hogy 24 órával a beadás után mobilizálja a hematopoietikus őssejteket. Ezek az eredmények összhangban voltak a korábbi tanulmányok adataival, amelyek szerint az rhG-CSF 24 órával a beadás után serkenti a funkcionális neutrophilek termelődését és felszabadulását a csontvelőben [28]. Az olyan értékek, mint az MCH, MCV és MCHC klinikai jelentősége abban rejlik, hogy ezek használhatók az anaemia osztályozására és a sejtmorfológia értékelésére, különösen a hematopoietikus válasz értékelésében az FPV affinitás kontextusában. Az olyan értékek, mint az MCH, MCV és MCHC klinikai jelentősége az anaemia osztályozására és a sejtmorfológia értékelésére való használhatóságukban rejlik, különösen a hematopoietikus válasz értékelésében az FPV-affinitás kontextusában. A jelen tanulmány *Filgrasztim* csoportjának magasabb MCV-szintje összefügghet a hematopoietikus progenitorsejtek perifériás vérbe történő mobilizálásával [29]. Ezért bár a filgrasztim FP-ben szenvedő macskákánál immunstimulációval való túlélésre gyakorolt hatása ellentmondásos, a filgrasztim alkalmazása az FP eseteknél csökkentheti a DNS-vírusok nem citopatogén vagy gyengén citopatogén hatásait a véresejt progenitorokra, valamint a neutrophil granulocytá őssejtek pusztulását [30].

A szerotonin pontos működése még mindig nem teljesen ismert [9]. Bár a test szerotoninjának nagy részét a bél enterochromaffin sejtjei termelik [31], a vérlemezkék képesek szerotonint felszabadítani a sérülések és gyulladások helyén [32]. Az utóbbi időben a szerotonin és a stressz, valamint az immunrendszer közötti kapcsolatot vizsgálták, és jól ismert tény, hogy a stressz befolyásolja az immunfunkciót [33]. Egyes tanulmányokban a vírusfertőzéseket, pl. a macskaherpeszvírust a stressz mérésére használták. Emellett arról számoltak be, hogy a stressz súlyosbíthatja mind az FeLV, mind az FIV fertőzés klinikai lefolyását, és immunszuppresszió révén hajlamosíthatja a macskát más vírusos betegségekre, pl. FP-re [5, 34]. Korábbi tanulmányok szerint az akut fluoxetin-adagolás növeli a szerotonin koncentrációját és serkenti a leukocytá-endothel interakciót *in vivo*, ami arra utal, hogy a szerotonin aktív szerepet játszik az akut gyulladásban [35]. Ezért javasolt megvizsgálni, hogy az első vizsgálatkor mért kis szerotoninszintek az FP kialakulásában vagy annak klinikai manifesztációjában játszik szerepet. Figyelembe véve az anamnézisből származó adatokat (a macskák életkora 4 és 6,5 hónap közötti, egyedüli macskaként élnek a háztartásban), hogy nem történt szállítás, születés vagy új háziállat hazahozatala,

a statisztikailag szignifikáns növekedés a granulocytaszámban ($p < 0,035$). In line with these data, the increased granulocyte count of the *Filgrastim* group can be explained by the ability of rhG-CSF to mobilize hematopoietic stem cells within 24 hours after the administration. These findings were consistent with the data reported in previous studies that rhG-CSF stimulates the production and release of functional neutrophils in the bone marrow 24 hours after administration [28]. The clinical significance of analytes such as MCH, MCV, and MCHC lies in their use for classifying anemia and evaluating cell morphology, particularly in assessing hematopoietic response in the context of FPV affinity. The higher MCV level of the *Filgrastim* group of the present study may be associated with the mobilization of blood progenitor cells into the peripheral blood [29]. Therefore, although the effect of filgrastim on survival in cats with FP with immunostimulation is controversial, the use of filgrastim in cases of FP may reduce the noncytopathic or poorly cytopathic effects of DNA viruses on blood cell progenitors and the destruction of polymorphonuclear leukocyte stem cells [30].

The exact function of serotonin is still not completely understood [9]. Although most of the body's serotonin is produced by intestinal enterochromaffin cells [31], platelets can release serotonin at locations of injury and inflammation [32]. More recently, the relationship between serotonin and stress and immune status has been investigated and it is a well-known fact that stress affects the immune function [33]. In some studies, viral infections such as feline herpesvirus were used as a measurement of stress. Also, it was reported that stress may exacerbate the clinical course of both FeLV and FIV infection and may predispose the cat to other viral diseases such as FP by causing immunosuppression [5, 34]. In previous studies, it was reported that acute fluoxetine administration increases serotonin concentrations and stimulates *in vivo* leukocyte-endothelial interaction, indicating that serotonin has an active role in acute inflammation [35]. Thus, it is recommended to investigate whether low serotonin levels at the first admission are more effective in the emergence of FP or the severity of its clinical manifestation. Considering the anamnestic data (ages of the cats ranging from 4 to 6.5 months, living in a single cat household), the absence of any transport, any birth and bringing home a new pet, collection of blood samples with minimum patient stress, lower serum serotonin levels of the cats with FP may be associated with immunosuppression and the effects of viral disease [36]. The elevated serum serotonin levels of the panleukopenic cats after filgrastim administration at a dose of 5 mcg/kg SC twice a day of the present study can be explained by the induction of immune response, presence of acute inflammation, diarrhea being a less

és a vérvétel minimális stresszel járt; az FP-s macskák kisebb szérumserotonin-szintje összefügghet az immunszuppresszióval és a vírusos betegség hatásaival [36]. A jelen tanulmányban a filgrasztim 5 µg/ttkg SC dózisának napi kétszeri adagolása után az FP-s macskák megnövekedett szérum szerotoninszintje magyarázható az immunválasz indukálásával, az akut gyulladás jelenlétével, a hasmenés ritkább előfordulásával kölyökmacskáknál FP esetén, valamint az enterochromaffin sejtek károsodásának hiányával [15]. Ezért, mivel a filgrasztim alkalmazása növeli a granulocytá- és őssejttermelést, a megnövekedett szerotonin-koncentrációk felhasználhatók az immunválasz értékelésére vírusos betegség jelenlétében.

Számos olyan esetet jelentettek humán gyógyászatban, ahol a granulocytakolónia-stimuláló faktor (G-CSF) thrombocytopeniát okozott, bár a mechanizmus nem ismert [37]. Felvetették, hogy a G-CSF-kezelésben részesülő betegeknél a thrombocytopenia oka összefüggésben lehet a megakariocytákban a proliferációval kapcsolatos gének csökkent kifejeződésével, míg egy másik tanulmány azt feltételezte, hogy a befecskendezett G-CSF a thrombocytákon jelen lévő receptorokra reagál és befolyásolja az érett alakokat [38]. Ezért, bár a filgrasztim alkalmazása immunstimulációt biztosít, a mellékhatásokat figyelembe kell venni. Ezenkívül a tanulmány korlátai a következők: a kezelés rövid követési időszaka, valamint az, hogy a bélkárosodás jelenlétét nem értékeltük kórszövettannal vagy bélspecifikus biomarkerekkel.

KÖVETKEZTETÉS

Az immunszuppresszió a macskák vírusos betegségeinek legpusztítóbb következménye. Jelen tanulmányban a filgrasztim alkalmazása FP-ben szenvedő macskáknál 24 órán belül növelte a teljes fehérvérsejtszámot, a granulocyták számának növekedése miatt. A filgrasztim által a vér progenitor sejtjeinek stimulációja által kiváltott immunválasz a szérum szerotonin koncentrációjának növekedését okozta. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a filgrasztim alkalmazása az FP esetek kezelésében javíthatja a túlélési arányokat, és a szérum szerotonin koncentrációjának változásainak nyomon követése hasznos lehet a kezelés előrehaladásának monitorozásában.

common finding in kittens with FP and the absence of intestinal enterochromaffin cell damage [15]. Therefore, since filgrastim administration increases granulocyte and stem cell production, increased serotonin concentrations can be used to evaluate the immune response in the presence of viral disease.

Several cases of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) causing thrombocytopenia have been reported in human medicine, although the mechanism is not known [37]. It has been suggested that the cause of thrombocytopenia in G-CSF-treated patients is related to under expression of proliferation-related genes in megakaryocytes, while another study postulated that injected G-CSF responds to receptors present on platelets and affects mature platelets [38]. For this reason, although filgrastim administration provides immune stimulation, side effects should be taken into consideration. Apart from this, the limitations of this study are: short treatment follow-up period and the fact that the presence of intestinal damage was not evaluated histopathologically or with intestine-specific biomarkers.

CONCLUSION

Immunosuppression is the most devastating consequence of feline viral diseases. In the present study, filgrastim administration in cats with FP increased the total WBC count via granulocytosis in a 24 hour period. The immune response caused by filgrastim stimulation of blood progenitor cells caused an increase in serum serotonin concentrations. It was concluded that administering filgrastim in the treatment of FP cases may enhance survival rates and monitoring alterations in serum serotonin concentration could be beneficial for monitoring treatment progress.

IRODALOM / REFERENCES

1. Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, Takahashi E (2000) Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* 278:13–19. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0653>
2. Sykes JE (2014) Elsevier Public Health Emergency Collection. Canine and Feline Infectious Diseases pp 187–194.
3. Kruse BD, Unterer S, Horlacher K (2010) Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. *J Vet Intern Med* 24:1271–1276. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0604.x>
4. Rice JK (2017) Successful Treatment of Feline Panleukopenia: A guideline for rescuers and veterinarians, Part I. *J Vet Sci Med Diagn* 6:2. <https://doi.org/10.4172/2325-9590.1000223>
5. Gülersoy E, Balıkcı C, Kismet E, Şahan A, Günel I (2023) The use of hg-csf in canine parvoviral enteritis: its effect on clinical and laboratory variables. *Veterinaria* 72:71–87. <http://dx.doi.org/10.51607/22331360.2023.72.1.71>
6. Kraft K, Kuffer M (1995) Treatment of severe neutropenias in the dog and cat with filgrastim. *Tierärztl Prax* 23:609–613.
7. Kuffer-Frank M, Jung H, Kraft W (1999) Use of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (r-metHuG-CSF) in neutropenic cats. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere-Heimtiere* 27:136–143.
8. Wiktorowicz JE, Soman KV (2016) Discovery of Candidate Biomarkers. *Adv Exp Med Biol* 919:443–462. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_21
9. Bacqué-Cazenave J, Bharatiya R, Barrière G, Delbecq JP, Bouguieyou N, Di Giovanni G, Cattaert D, De Deurwaerdere P (2020) Serotonin in Animal Cognition and Behavior. *Int J Mol Sci* 21:1649. <https://doi.org/10.3390/ijms21051649>
10. Chaoulhoff F, Berton O, Mormède P (1999) Serotonin and stress. *Neuropsychopharmacol* 21(2 Suppl):28–32.
11. Foster T, Battaglia D, Sanchez-Pino MD, Nichols C (2020) Virus-induced serotonin production correlates with severity of inflammation-associated ocular disease: Therapeutic potential of 5HT2A receptor agonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 61:429.
12. Pei Z, Sun M, Zhang X, Yan Y, Meng F, Mo R, Hu G (2020). Canine immunoglobulin F(ab')₂ fragments protect cats against feline parvovirus virus infection. *Int Immunopharmacol* 86:106752. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106752>
13. Riya B, Rathish RL, Deepa PM, John L, Janus A, Vijayakumar K (2020) Clinical manifestations in cats with feline panleukopenia. *Vet Anim Sci* 51:97–100
14. Neuerer FF, Horlacher K, Truyen U, Hartmann K (2008) Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J Felin Med Surg* 10:247–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.12.001>
15. Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, Greene CE, Vidyashankar AN, Jarrett O, Egberink HF (2007) Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J Felin Med Surg* 9:439–445. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.04.003>
16. Stuetzer B, Hartmann K (2014) Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet J* 201:150–155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.027>
17. Plumb DC (2005) Plumb's Veterinary Drug Handbook. Blackwell Press, Iowa
18. Beatty JA, Hartmann K (2021) Advances in Feline Viruses and Viral Diseases. *Viruses* 13:923. <https://doi.org/10.3390/v13050923>
19. Evermann JF, Kennedy AM (2011) Viral Infections. In: Peterson ME, Kutzler MA (eds) *Small Animal Pediatrics*, Volume 1. Saunders, USA
20. Parrish CR (1995) Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres Clin Haematol* 8:57–71. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(05\)80232-x](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(05)80232-x)
21. Fei-Fei D, Yong-Feng Z, Jian-Li W, Xue-Hua W, Kai C, Chuan-Yi L, Zhi-Jing X (2017) Molecular characterization of feline panleukopenia virus isolated from mink and its pathogenesis in mink. *Vet Microbiol* 205:92–98. <https://doi.org/10.1016/j.vet-mic.2017.05.017>
22. Litster A, Benjanirut C (2014) Case series of feline panleukopenia virus in an animal shelter. *J Felin Med Surg* 16:346–353. <https://doi.org/10.1177/1098612x13497738>
23. Donati P, Londoño LA, Tunes M, Villalta C, Guillemi EC (2022) Retrospective evaluation of the use of quick sepsis-related organ failure assessment (qsofa) as predictor of mortality and length of hospitalization in dogs with pyometra (2013–2019): 52 cases. *J Vet Emerg Crit Care* 32:223–228. <https://doi.org/10.1111/vec.13103>
24. Nunes RB, Alves JP, Kessler LP, Dal Lago P (2013) Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics (Sao Paulo)* 68:876–882. [https://doi.org/10.6061/2fcl-nics%2F2013\(06\)24](https://doi.org/10.6061/2fcl-nics%2F2013(06)24)
25. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC (2002) G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity* 17:413–423. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00424-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00424-7)
26. Ferran M, Gallardo F, Salar A, Iglesias M, Barranco C, Pujol RM (2006) Granulomatous dermatitis with enlarged histiocytes: A characteristic pattern of granulocyte colony-stimulating factor. *Dermatology* 212:188–193. <https://doi.org/10.1159/000090660>
27. Li Y, Guo R, Wang L, Li S, Zhu Z, Tu P (2019) G-CSF administration results in thrombocytopenia by inhibiting the differentiation of hematopoietic progenitors into megakaryocytes. *Biochem Pharmacol* 169:113624. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113624>
28. Novotný J, Zvarová M, Prazáková L, Jandlová M, Konvíčková L (1995) G-CSF (Neupogen Roche) in the treatment of patients with chronic aplastic anemia with severe neutropenia. *Vnitr Lek* 41:692–695.
29. Olivieri A, Scortechini I, Capelli D, Montanari M, Lucesole M, Gini G (2004) Combined administration of alphaerythropoietin and filgrastim can improve the outcome and cost balance of autologous stem cell transplantation in patients with lymphoproliferative disorders. *Bone Marrow Transplant* 34:693–702. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704643>
30. Morinet F, Leruez-Ville M, Pillet S, Fichelson S (2011) Concise review: Anemia caused by viruses. *Stem Cells* 29:1656–1660. <https://doi.org/10.1002/stem.725>
31. Walther DJ, Peter JU, Winter S, Holtje M, Paulmann N, Grohmann M (2003) Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet-granule release. *Cell* 115:851–862. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01014-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01014-6)

32. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, Cifuni SM, Mauler M, Cicko S, Bader M, Idzko M, Bode C, Wagner DD (2013) Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 121:1008–1015. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437392>

33. Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C (2014) Serotonin-pre-frontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression. *Front Behav Neurosci* 8:199. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00199>

34. Truyen U, Parrish CR (2000) Epidemiology and pathology of autonomous parvoviruses. In: Faisst S, Rommelaere J (eds) *Contributions to microbiology: parvoviruses*, Volume 4. Basel, Karger, pp 149–162

35. Roumier A, Béchade C, Maroteaux L (2019) In: Pilowsky PM (eds) *Serotonin and the Immune System. The Mediator That Spans Evolution*, Elsevier, pp 181–196

36. Riggio G, Mariti C, Sergi V, Diverio S, Gazzano A (2020) Serotonin and Tryptophan Serum Concentrations in Shelter Dogs Showing Different Behavioural Responses to a Potentially Stressful Procedure. *Vet Sci* 8:1. <https://doi.org/10.3390/vet-sci8010001>

37. Kovacic JC, Macdonald P, Freund J, Rasko JE, Allan R, Fernandes VB, Ma D, Moore J, Graham RM (2007) Profound thrombocytopenia related to G-CSF. *Am J Hematol* 82:229–230. <https://doi.org/10.1002/ajh.20787>

38. Kim KB, An JH, Lee JH, Park SM, Chae HK, Song WJ, Youn HY (2022) Transient thrombocytopenia in a cat following G-CSF treatment. *Vet Med Sci* 8:421–424. <https://doi.org/10.1002/vms3.706>

Közlésre érkező: 2023. dec. 30.

Examination of nuclear
and mitochondrial
genetic markers in
mouflons (*Ovis aries
musimon*) in Hungary

O. K. Zorkóczy^{1*}
Zs. Bujtor¹
Zs. Wagenhoffer¹
P. Lehotzky²
P. Zenke¹

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Állattenyésztési,
Takarmányozástani, és
Laborállat-tudományi Intézet,
1078 Budapest, István utca 2.

2. Országos Magyar
Vadászkamara, Fővárosi és Pest
Vármegyei Területi Szervezete,
Budapest

*e-mail: zorkoczy.orsolya.krisztina@
univet.hu

Sejtmagi és mitokondriális genetikai markerek tesztelése hazai muflonokban (*Ovis aries musimon*)

Zorkóczy Orsolya Krisztina^{1*}, Bujtor Zsófia¹, Wagenhoffer Zsombor¹,
Lehotzky Pál², Zenke Petra¹

ÖSSZEFOGLALÁS

Az európai muflon (*Ovis aries musimon*) hazánkban csaknem 13 ezres állománnyal rendelkezik és jelentős vadgazdálkodási értéket képvisel. Mivel az itt élő muflonok genetikai vizsgálatáról nem áll rendelkezésre adat, a szerzők különböző, megbízhatóan tipizálható markertípus alkalmazhatóságának felmérését tűzték ki célul. A kutatáshoz 80 darab, a *Cervidae* családjából származó tetramer szerkezetű nukleáris mikroszatellita-markert teszteltek, ill. szekvenálták a mitokondriális kontrollrégiót. Tíz egyed vizsgálata alapján három polimorf mikroszatellita-lokuszt és egy haplotípust kaptak, amely alapján a vizsgált magyarországi állomány vélhetően kicsi genetikai diverzitással rendelkezik.

SUMMARY

Background: The European mouflon (*Ovis aries musimon*) boasts a population of almost 13,000 in Hungary and holds significant value in game management due to its game meat and horn trophies. Since there is no data on genetic investigations of the mouflons in this region, the authors initiated this survey to test the usability of various markers.

Objectives: The authors aim to evaluate cross-specific (*Cervidae*) tetranucleotide microsatellite markers capable of monitoring diversity and individual identification. Additionally, they plan to assess maternal lineage diversity based on the mitochondrial control region sequence.

Materials and Methods: In this preliminary study, the authors examined ten mouflon individuals from the Pilis mountain region. The tested 80 tetranucleotide microsatellites originating from the suborder *Ruminantia*. Published PCR protocols were available for all markers in the original species, which were adapted and optimized for mouflon samples. Subsequently, these PCR fragments were analyzed by capillary electrophoresis, and polymorphic markers were identified. Regarding the mitochondrial marker, the sequence of almost the entire control region was determined using the Sanger method using primers previously described in sheep.

Results and Discussion: Only 20 microsatellite markers provided PCR products of sufficient quality and quantity, resulting in the detection of three polymorphic markers with two alleles each. Regarding the mitochondrial control region, only one haplotype was identified. Our pilot study demonstrates the feasibility of cross-species markers and their primers in mouflon. Consistent with other international research on the species, our results suggest a potential low genetic variation in the Hungarian population, likely due to a genetic bottleneck, founder effect, and inbreeding. Given the limited number of polymorphic markers and allele polymorphism, the current set should be supplemented with more polymorphic markers from closely related species, and testing of mouflon samples from different regions is important.

Az európai muflon eredetét illetően több bizonytalanság áll fenn. A tudomány jelenlegi állása szerint a házi juh (*Ovis aries*) egy visszavadult alfaja [1–4], amely feltehetően 5–6 ezer évvel ezelőtt, mint szőrös juh, kiszorult a tenyésztésből. Egyes kutatások azonban különálló fajként (*Ovis musimon*) hivatkoznak rá [5–8], amely kialakulásának része lehetett egy mára kihalt, eddig ismeretlen juh fajjal való hibridizáció [1].

**Hazánk mai területére
először 1901- ben
kerültek muflonok**

**Jelenleg a hazai
állomány 12-13000
egyre tehető**

A hegyvidéki Szardínia és Korzika kivételével Európában nem őshonos muflont 1732-től telepítették a kontinensre, országunk mai területére pedig először 1901-ben került Gyimesről Füzérradványba [9, 10]. Egészen 1942-ig a további telepítésre használt egyedek is mind ezen állományból kerültek ki [11], ekkor a hazai muflonok száma elérte a kb. kétezret [9]. A második világháborút követően azonban az egyedszám kb. 50–100 egyedre esett vissza [9, 11]. A helyzet javítása érdekében indult betelepítéseknek köszönhetően, a '70-es években a muflonállomány komoly növekedésnek indult [9]. Napjainkban az ország valamennyi középhegységében előfordul [12, 13], a populációk azonban általában szigetszerűen vannak jelen [13] és a vérfrissítés hiánya miatt az állomány beltenyésztéses leromlásnak van kitéve. Egy franciaországi vizsgálat során azt találták, hogy mind a mufloncsigák mérete, mind az egyedek testtömege csökkenést mutatott az évtizedekkel korábbi állapotokhoz viszonyítva, és ennek okaként a nem szakszerű vadászatot, azaz a jó genetikai állományú állatok kilövését jelölték meg [14]. A muflonvadászatra való kereslet Magyarországon is folyamatosan nő. Trófeája mellett a húsa és a bőre is hasznosításra kerül, azonban a legnagyobb értéket az állat jellegzetes csiga alakú visszahajló szarva, az úgynevezett mufloncsiga képezi [15, 16]. Az állományunk 1997 óta folyamatosan növekszik – 10 ezer körüli példányszámról 12–13 ezer példányra emelkedett –, ezzel párhuzamosan a vadaskerti elejtések száma szintén egyre több [12].

EDDIGI GENETIKAI KUTATÁSOK MUFLONBAN ÉS MÁS ROKON FAJOKBAN

A kezdeti, vércsoportantigének és fehérjék azonosításán alapuló kutatásokat [17–21] már az ezredforduló előtt felváltották a DNS-szintű vizsgálatok [22]. A muflonokban történt eddigi genetikai tesztek nagyrészt Európában [1, 23–29], azon belül is Franciaországban [22, 30–41], Szardínián [14, 35, 36, 42–44], és Cipruson [45, 46] koncentráálódtak. Ezen kívül Amerikából [47, 48] és Ázsiából [1, 28, 29, 49–52] is rendelkezünk számos, muflonokon végzett genetikai kutatással. A különböző genetikai markerekkel végzett széles spektrumú, különböző célú kutatást az **1. táblázatban** foglaljuk össze.

Az állományok genetikai összetételének ismerete lényeges információkkal szolgál az állományok dinamikájával, fennmaradásával és túlélésével kapcsolatban, ill. hozzájárul a populációk fenntartható kezeléséhez, és az emberi tevékenységek negatív hatásainak minimalizálásához. A genetikai diverzitás kapcsolatban lehet egyes betegségek megjelenésével és a populációk szaporodásbiológiai mutatóival, a jerek és anyajuhok termékenységevel, valamint megvilágítják egyes gének öröklődésének mechanizmusait. Az igazságügyi célból végzett vizsgálatok kiemelkedő fontosságúak lehetnek a muflonokat érintő vadorzás és ételmisszer-hamisítási ügyekben. Az összehasonlító genetikai vizsgálatok muflonok és juhok között hozzájárulnak a genetikai hasonlóságok és különbségek feltáráshoz, a köztük lévő hibridizációs hatások, valamint az alfajok/fajták kialakulásának megértéséhez.

GENETIKAI MARKEREK KIVÁLASZTÁSA

A különböző célú genetikai vizsgálatokhoz leggyakrabban a nukleáris mikroszatellitákat (STR: short tandem repeat) és a mitokondriális kontrollrégiót vizsgálják (1. táblázat). Gyakori előfordulásuk és a kevesebb genotipizálási hiba miatt mikroszatellitákon belül, különösen igazságügyi célokra, javasolt a négy bázispár

1. TÁBLÁZAT. Genetikai vizsgálatok muflonban és rokonfajokban

TABLE 1. Genetic studies in mouflon and related species

Vizsgált markerek	Vizsgált fajok	Vizsgálat célja	Referencia
Mikroszatelliták	EM, CipM, kőszáli kecske, háziasított juhajták	fajmegőrzés, parazita rezisztencia, igazságügyi vizsgálatok, introgresszió, hibridizáció	[14, 22, 25–27, 31, 37–40, 43–50]
MHC gén	EM, háziasított juhajták	parazita rezisztencia, fajmegőrzés	[34, 39]
Y-STR, Y-SNP, SRY	EM, háziasított juhajták, kanadai vadjuh, urial, argali	Y kromoszómához kötött öröklődés, introgresszió	[24]
MT1 melatonin-receptor gén	EM	szaporodásbiológia	[42]
Endogén retrovírus markerek	EM, háziasított juhajták	introgresszió, hibridizáció	[26, 27]
mRNS, mikroRNS	EM, háziasított juhajták	termékenység	[80]
SNP-k (kazein génekben, teljes genomban)	EM, ÁM, muflon-juh hibridek, háziasított juhajták	fajták eredete, introgresszió	[28, 51, 52, 78]
Mitokondriális DNS (Cytb, kontroll régió, 12S rRNS)	EM, CipM, KorM, kőszáli kecske, zerge, urial, argali, háziasított juhajták	húsvizsgálat, fajmegőrzés, igazságügyi vizsgálatok	[14, 23, 35, 40, 41, 44–46]
Teljes genom szekvenálás	EM, AM, urial, szibériai juh, alaszakai vadjuh, argali	genomi információk kutatáshoz	[1, 29]

EM: európai muflon, AM: ázsiai muflon, CipM: ciprusi muflon, KorM: korzikai muflon

EM: European mouflon, AM: Asian mouflon, CipM: Cypriot mouflon, KorM: Corsican mouflon

Az adott faj genetikai diverzitásának felmérésére alkalmas markerkészlet fejlesztésének első lépése a lokuszok keresése

ismétlődésű tetranukleotidokat alkalmazni [53–57]. Az ennél rövidebb ismétlődő egységeket tartalmazó di- és trimer mikroszatelliták kevésbé egyértelműen meghatározhatók, mivel nagyobb valószínűséggel eredményeznek műterméket a PCR-reakció során [53, 56]. Az adott faj genetikai diverzitásának felmérésére alkalmas markerkészlet fejlesztésének első lépése a lokuszok keresése. Ez történhet a cél faj genomszekvenciájának vizsgálatával [57], vagy korábbi publikációban más, rokon fajokra leírt markerek kiválasztásával [43, 54, 56, 58, 59]. Ezt követően tesztelni és optimalizálni kell a PCR- programot, hogy a célfajban is specifikus, megfelelő mennyiségű és specifitású eredményt kapjunk. Mivel sem a muflonra sem a házi juhra nem áll rendelkezésre tetramer mikroszatellita-markerszett, a közelebbi rokonfajokban pedig szinte kizárólag csak dinukleotid mikroszatellita-markereket alkalmaznak, így a szarvasfélék családjába (*Cervidae*) tartozó távolabbi rokonfajoknál leírt primerpárokat választottunk tesztelésre. A taxonon

belül a markerek primerkötő régiója gyakran konzervált, ennek köszönhetően pedig sok primerpár több fajban is fel tudja sokszorosítani ugyanazt a szakaszt. Ehhez egy korábbi közleményben publikált 80 darab markert kívántuk első körben tesztelni, mivel ezek már legalább két szarvasfajra működtek, utalva konzervatív jellegükre, valamint mindhez rendelkezünk a szükséges jelölt primerekkel és kiindulási PCR-protokollal [60]. A mitokondriális kontrollrégió vizsgálatára a házi juhban (*Ovis aries*) működő primerpárok tesztelését terveztük.

ANYAG ÉS MÓDSZER

MINTAGYŰJTÉS ÉS DNS-KINYERÉS

A vizsgálatokhoz 10 muflonegyedtől származó izom- vagy szőrösbőr-szövetmintát használtunk fel, amelyek 2019 és 2023 között kerültek kilövésre a Pilisi Parkerdő Zrt. területén. A DNS kinyerése FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kittel (Favorgen Biotech Corp, Ping-Tung, Taiwan) történt a gyártó által megadott protokoll szerint. A DNS tisztítását követően annak minőségét 150 Volton 40 percig futtatva GelSafe (Danagen, Barcelona, Spanyolország) gélfestékkel festett 1%-os agarózgélén elektroforézissel ellenőriztük. Az egyedeket kétfajta markertípussal, nukleáris mikroszatellitákkal és a mitokondriális kontrollrégióval vizsgáltuk.

MIKROSZATELLITA-VIZSGÁLATOK

A 80 STR marker tesztelését első körben a hozzájuk leírt PCR beállítások alapján kíséreltük meg [60]. Amennyiben a kapott termék minősége (pl.: melléktermék jelenléte) vagy mennyisége nem volt megfelelő, abban az esetben az eredeti protokollt módosítottuk. Ehhez különböző anellációs hőmérsékleteken teszteltük a PCR során sokszorosított fragmenseket, segítve így a hőmérsékleti optimum megállapítását. A további vizsgálatokban alkalmazott két optimalizált protokoll kizárólag az primertapadási hőmérsékletben tér el: 60 (mp) másodperc 94 °C-on, majd 32 ciklus 30 mp denaturáció 94 °C-on, 60 mp primertapadás 58 °C vagy 63 °C-on, 40 mp elongáció 72 °C-on, ezt követően pedig 20 perc végső elongáció 72 °C-on. Az optimalizált PCR-t követően az allélek elválasztása és detektálása kapilláris elektroforézissel ABI Prism3500 GeneticAnalyzer készüléken (AppliedBiosystems, Foster City, USA), GeneScan™-500 LIZ™ méret standard segítségével történt. Ehhez a termékek floureszcens jelölésére volt szükség, amihez az úgynevezett „farkazásos” jelölési módszert alkalmaztuk [61]. Az eredmények kiértékelésére az OSIRIS programot 2.16 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/osiris/>) használtuk.

A leolvasott allélhosszak alapján a GenAIEx v6.5 szoftver segítségével meghatároztuk a genotípusokat, ill. a poliporfizmust mutató lokuszok esetében a megfigyelt és várt heterozigotizást [62, 63].

MITOKONDRIÁLIS KONTROLLRÉGIÓ VIZSGÁLATA

A kontroll régió sokszorosítására a korábban házi juhokra leírt primereket (MtOA_F15400 5'-ACACCAAGCTGAAGTTCTAC-3' és MtOA_R592 5'-AGAAGGGTATAAAG-CACCGCC -3') és a hozzá tartozó PCR-protokollt alkalmaztuk [64, 65].

A sikeres amplifikációt követően a PCR-termékeket GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) segítségével tisztítottuk, majd mindkét irányban szekvenáltuk a BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kittel (AppliedBiosystems, Foster City, USA). A szekvenált termékek kimutatása ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) készüléken történt. A forward és reverz szekvenciákat illesztettük és szükség esetén korrigáltuk a Sequencher™ 5.4.6 szoftver (Genes Codes Corp, Ann Arbor, MI, USA) segítségével. A konszenzus szekvenciákat ezután a GenBankban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) tárolt más kutatásokból származó szekvenciákkal hasonlítottuk össze.

*Szarvasfélék, ill. juhok
genetikai vizsgálatára
kifejlesztett markereket
teszteltek
10 muflon mintáján*

EREDMÉNYEK

A mikroszatelliták tesztelése során a 80 darab markerből 20 eredményezett megfelelő minőségű és mennyiségű terméket az optimalizált PCR beállításokat követően (2. táblázat). A kapilláris-elektroforézises detektálással az egyik marker (ApoV43) három termékcsúcsot eredményezett, amelyet a PCR beállítások változtatásával sem tudtunk kiküszöbölni, így ezt a lokuszt kivettük az elemzésekből.

A megmaradt 19 markerből három bizonyult polimorfnak két-két alléllal (2. táblázat). A tíz egyedből ezek alapján két-két genetikai profil egyezett. A várható heterozigotizás 0,18 és 0,49 között, míg a megfigyelt heterozigotizás 0,2 és 0,5 között alakult.

A kontrollrégió esetében mind a tíz egyed ugyanazt a haplotípust mutatta, amelyet PP782052 kódszámmal feltöltöttünk a GenBank adatbázisába. A GenBankban elérhető szekvenciákkal való összehasonlítás során három 100%-os egyezést találtunk, amelyek közül kettő (AY091487 és HM236185) németországi európai muflonokból, míg a harmadik (KF938360) egy kazahsztáni ázsiai muflonból lett kimutatva.

2. TÁBLÁZAT. A muflonokban működő 20 keresztspecifikus marker adatai

TABLE 2. Data of 20 cross-specific markers operating in mouflons

	Jelölés	Anell. T	Na	Ho	He	Eredeti faj	Ref.
C229	A	63 °C	2	0,20	0,18	Cervus elaphus	[56]
T108	C	63 °C	1	0,00	0,00		
T156	C	63 °C	1	0,00	0,00		
T507	D	63 °C	1	0,00	0,00		
Mgou19	A	58 °C	1	0,00	0,00	Mazama gouazoupira	[81]
Mgou21	C	58 °C	1	0,00	0,00		
OheH	B	58 °C	1	0,00	0,00	Odocoileus hemionus	[53]
OheI	A	58 °C	2	0,50	0,49		
OheK	D	58 °C	1	0,00	0,00		
C105	C	58 °C	1	0,00	0,00	Cervus canadensis	[58]
T115	A	63 °C	1	0,00	0,00		
Capcap15	C	63 °C	1	0,00	0,00	Capreolus capreolus	[57]
SBTD04	A	58 °C	1	0,00	0,00	Odocoileus hemionus sitkensis	[82]
SBTD06	B	58 °C	1	0,00	0,00		
ApoV43	A	58 °C	1	0,00	0,00	Axia porcinus	[83]
ApoV47	B	63 °C	1	0,00	0,00		
ApoV53	D	63 °C	1	0,00	0,00		
ApoV94	D	58 °C	2	0,20	0,42		
ApoV135	B	58 °C	1	0,00	0,00		
ApoV145	D	58 °C	1	0,00	0,00		

*: a markerek fluoreszcens jelölése a [61] alapján történt, T: anellációs hőmérséklet, Na: allélok száma, Ho és He: megfigyelt és várt heterozigotizás, Ref: a markereket először leíró cikkek referenciái és a származási faj

*: fluorescent labeling of the markers was done according to [61], T: annealing temperature, Na: number of alleles, Ho and He: observed and expected heterozygosity, Ref: references of the articles describing the markers for the first time and the species of origin

MEGVITATÁS

A kutatás keretein belül olyan rendelkezésre álló, rokon kérődzőfajokban működő mitokondriális és nukleáris markereket teszteltünk, amelyek potenciálisan alkalmasak lehetnek a muflon populációk diverzitásának felmérésére, monitorozására, ill. az egyedi és anyai leszármazási vonalak azonosítására.

A nukleáris mikroszatellitáknál a 80 vizsgált markerből mindössze 20 adott megfelelő PCR-terméket az optimalizáció után, amely a markerek forrásfaja és a muflon közötti genetikai eltéréseknek tudható be. Ezen mutációk a primerkötő régió szekvenciájának megváltozását és ezáltal a primer DNS-hez való kötődésének optimum változását okozhatják [66, 67]. A tíz egyeden 19 markerből kapott polimorfizmusadatok alapján a vizsgált muflonok csekély genetikai diverzitással rendelkeznek, hasonlóan más, szigetszerűen izolált muflonpopulációk vizsgálatának eredményeihez [34]. Azonban azzal a megfigyeléssel is számolni kell, hogy a hosszabb repetíciós (tetra-, penta-, hexamer) egységekből álló mikroszatelliták kisebb mértékű polimorfizmussal rendelkezhetnek a di-, ill. trimer szerekhez tartozó társaiknál [53]. A viszonylag nagyobb távolság a muflonok és a szarvasfélék – amelyekből a tesztelt markerek származtak – között, szintén magyarázhatja, hogy a szarvasokban változatosságot mutató lokuszok muflonban limitált polimorfizmust, ill. monomorf (egy allélos) tulajdonságot mutatnak.

A mitokondriális kontrollrégió esetében mindösszesen egy haplotípust találtunk mind a tíz vizsgált egyednél. Kis haplotípusdiverzitás-eredményeket kaptak más országokban végzett hasonló jellegű kutatások is [14, 24]. Mivel a kontrollrégió mint mitokondriális marker anyai öröklődésű, így a nőivarú egyedek migrációs képessége jelenti az egyetlen átmozgási lehetőséget a populációk között [30, 38]. A legtöbb kérődzőre jellemzően főként a hímek vándorolnak, így az eltérő anyai vonalak keveredése egymáshoz közeli populációk között sem feltétlenül megy végbe [30, 38]. A változatosságot így főként a beltenyésztés mértéke és az alapító egyedek kezdeti változatossága alakítja ki, amelyek közül egyikről sem állt rendelkezésre információ.

Az összességében kimutatott csekély genetikai változatosság mögött azonban több egyéb tényező együttes hatása állhat. Ilyen pl. a faj viszonylag nagy területhűsége [68–71]. Bár a kosok nagyobb migrációs hajlandóságot mutatnak a jerekénél, ennek mértéke mégis kicsi más fajokhoz viszonyítva [72–74]. A muflon más populációiban több kutatás is azt mutatta ki, hogy a nőivarú egyedek azon a területen maradnak, ahol nevelkedtek, míg a hímek a szaporodási időszak alatt kis mértékben ugyan, de átvándorolhatnak egyik területről a másikra a párzási kényszer miatt [14, 30, 38]. Abban azonban eltérés lehet, hogy egyes populációk kosai mekkora távolságot hajlandóak átmozogni két előfordulási terület között. Magyarországon az állomány általában szigetszerű elterjedést mutat [13], amely a különféle betelepítések során alakult ki [9–11, 75]. Bár a számára kedvező élőhelyeken a szabadjára engedett egyedek képesek fennmaradni és gyarapodni, a tapasztalat azt mutatja, hogy az új területek meghódítására kevésbé képesek [9]. A másik ok az alapító egyedek kis száma lehet, ami telepítésenként legtöbbször csak pár tucat egyedet jelentett [11], és azok is sokszor hasonlóan kis kezdeti számból felgyarapított forráspopulációkból származtak [76], ezzel tovább csökkentve a génállomány változatosságát. A ma Európában megtalálható muflonok szinte kizárólag Szardíniáról és Korzikáról származnak [77]. A korábbi Habsburg birodalomhoz tartozó legtöbb területre Németországból vitték be a fajt [11], így ennek az alapító populációnak a szűkös készleteiből merített a magyar és a feltételezhetően a többi környékbeli populáció is [9, 11], ráadásul az eredetinek számító szardíniai és korzikai populációk genetikai változatossága is kicsi jelenleg [14, 78]. Ugyanakkor a napjainkban fellelhető változatosság nem feltétlen árulkodik a telepítési hullámok során meglévő génkészletről. Az eredeti élőhelyén védelmet

*A mitokondriális
kontrollrégió esetében
mind a 10 állat egy
haplotípust mutatott*

*A megfigyelt csekély
genetikai változatosság
hátterében több
tényező állhat*

**A muflon kisebb
genetikai diverzitást
mutat más vadászható
fajokhoz képest**

élvező faj több konzervációt célzó kutatás alanya [14, 40, 43, 78], és ezek alapján mindkét szigeten a túlvadászat és területvesztés következtében egy vagy több genetikai beszűkülésen (ún. palacknyak-hatás) ment át a populáció, amelyek pontos idejét nehéz megállapítani.

A muflon ezen faktorok és kombinációik eredményeképpen a nemzetközi vizsgálatok alapján kisebb genetikai diverzitást mutat más vadászható fajokhoz képest [53, 56, 57]. Ez megnehezíti a megfelelő, polimorf markerek szelekcióját, de nem teszi lehetetlenné, és semmiképp nem indokolatlanná. Éppen a faj beszűkült genetikai változatossága szorgalmazza még inkább a széleskörű vizsgálatára és monitorozására alkalmas markerkészlet kifejlesztését, amely segítségével akár telepítési tervek is kidolgozhatóak a jövőben. Az eddigi 19 működő markert érdemes ezért más populációkban is tovább vizsgálni, mivel a kismértékű átjárás miatt az egyes populációkban monomorf lokuszok polimorfak lehetnek a területenként eltérő allélfixáció miatt. A jövőben szintén fontos lenne további, közelebbi rokon fajokból származó tetramer szerkezetű mikroszatelliták tesztelése.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tanulmány az Állatorvostudományi Egyetem Budapest stratégiai kutatási alapja (SRF-001 sz. támogatás) támogatásával készült. Köszönettel tartozunk ANTALNÉ GYŐRI ERIKÁNAK és ANTAL ISTVÁNNAK az illusztrációként felhasznált fényképekért.

IRODALOM

- Chen Z-H, Xu Y-X, Xie X-L, Wang D-F, Aguilar-Gómez D, Liu G-J, Li X, Esmailizadeh A, Rezaei V, Kantanen J, others (2021) Whole-genome sequence analysis unveils different origins of European and Asiatic mouflon and domestication-related genes in sheep. *Commun Biol* 4:1307. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02817-4>
- Vigne J-D (1992) Zooarchaeology and the biogeographical history of the mammals of Corsica and Sardinia since the last ice age. *Mammal Rev* 22:87–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1992.tb00124.x>
- Chessa B, Pereira F, Arnaud F, Amorim A, Goyache F, Mainland I, Kao RR, Pemberton JM, Beraldi D, Stear MJ, others (2009) Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science* 324:532–536. <https://doi.org/10.1126/science.1170587>
- Vigne J-D, Carrere I, Briois F, Guilaine J (2011) The early process of mammal domestication in the Near East: New evidence from the Pre-Neolithic and Pre-Pottery Neolithic in Cyprus. *Curr Anthropol* 52:S255–S271. <https://doi.org/10.1086/659306>
- Wang D, Salehian-Dehkordi H, Suo L, Lv F (2023) Impacts of Population Size and Domestication Process on Genetic Diversity and Genetic Load in Genus *Ovis*. *Genes* 14:1977. <https://doi.org/10.3390/genes14101977>
- Laca Megyesi Š, Königová A, Babják M, Molnár L, Rajský M, Szeštáková E, Major P, Soroka J, Urda Dolinská M, Komáromyová M, others (2020) Wild ruminants as a potential risk factor for transmission of drug resistance in the abomasal nematode *Haemonchus contortus*. *Eur j wildlife res* 66:1–6. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1351-x>
- Valenzuela-Moreno LF, Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Hernández-Rodríguez MA, del Carmen Carmona-Muciño M, Farfán-Morales JE, Correa D, Caballero-Ortega H (2020) Toxoplasma gondii infection in European mouflons (*Ovis musimon*) and captive wild felines from Puebla, México. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 13:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.07.005>
- Nasiadka P, Wajdzik M, Skubis J, others (2021) A comprehensive over 100 years history of mouflon (*Ovis musimon*) in Poland: from the promising beginning in 1902 to questionable future in 2014—a case study of wildlife management history. *Appl Ecol Environ Res* 19:993–1017. <http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1902-9931017>
- Mátrai G (1983) A muflon Magyarországon. *Nimród* 103:494–495
- Juriss J (1940) A muflon megtelepítése. *Nimród* 28:247
- Lénár G (1988) Muflon Zemplénben. *Nimród* 108:589–590
- Csányi S, Márton M, Bóti S, Schally G (2023) Vadgazdálkodási Adattár – 2022/2023. vadászati év
- Kispál L (2023) 140 éve bocsátották szabad területre az első muflonállományt a kontinensen. In: *Nimród Vadászújság*. <https://nimrod.hu/hirek/140>
- Satta V, Mereu P, Barbato M, Pirastru M, Bassu G, Manca L, Naitana S, Leoni GG (2021) Genetic characterization and implications for conservation of the last autochthonous Mouflon population in Europe. *Sci Rep* 11:14729. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94134-3>
- Milivoje U, Milosava M, Radomir M, Panče D (2023) Basic Morphometric Characteristics of Mouflon Trophies (*Ovis orientalis Gmelin*, 1774). *Pak J Zool* 55:2989. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20220711150759>
- Mátrai G (1980) A muflon és vadászata. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Bunch T, Nguyen T (1982) Blood group comparisons between European mouflon sheep and North American desert bighorn sheep. *J Hered* 73:112–114. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109591>

18. Stratil A, Glasnák V, Tomášek V, Williams J, R Clamp J (1984) Haemopexin in sheep, mouflon and goat: genetic polymorphism, heterogeneity and partial characterization. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 15:285–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1984.tb01128.x>
19. Stratil A n, Bobák P (1988) Comparison of biochemical polymorphisms in mouflon and sheep: isoelectric differences in haemoglobins and quantitative variation of mouflon haemopexin. *Comp Biochem phys B, Comp Biochem* 90:159–162. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90054-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90054-5)
20. Masala B, Manca L, Cocco E, Ledda S, Naitana S (1991) Kinetics of the ontogenic and reversible hemoglobin switching in the mouflon (*Ovis musimon*) and sheep x mouflon hybrid. *Comp Biochem Phys A, Comp Phys* 100:675–680. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90388-s](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90388-s)
21. Naitana S, Ledda S, Cocco E, Manca L, Masala B (1991) Haemoglobin phenotypes of the wild European mouflon sheep living on the island of Sardinia. *Anim Genet* 22:67–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1991.tb00647.x>
22. Petit E, Aulagnier S, Vaiman D, Bouissou C, Crouau-Roy B (1997) Microsatellite variation in an introduced mouflon population. *J Hered* 88:517–520. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023147>
23. Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, García T, Hernandez P, Martín R (2007) PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat sci* 76:644–652. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.02.002>
24. Meadows J, Kijas J (2009) Re-sequencing regions of the ovine Y chromosome in domestic and wild sheep reveals novel paternal haplotypes. *Anim Genet* 40:119–123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01799.x>
25. Calvo JH, Alvarez-Rodriguez J, Marcos-Carcavilla A, Serrano M, Sanz A (2011) Genetic diversity in the Churra tensina and Churra lebrejana endangered Spanish sheep breeds and relationship with other Churra group breeds and Spanish mouflon. *Small Ruminant Res* 95:34–39. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.09.003>
26. Schröder O, Lieckfeldt D, Lutz W, Rudloff C, Frölich K, Ludwig A (2016) Limited hybridization between domestic sheep and the European mouflon in Western Germany. *European J Wildlife Res* 62:307–314. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-1003-3>
27. Glazko V, Kosovsky GY, Erkenov T, Glazko T, Amerkhanov KA (2020) Population Genetic Relationships between Mouflon and Domesticated Sheep Breeds in Highly Polymorphic Genomic Elements. *Russ Agric Sci* 46:509–513. <http://dx.doi.org/10.31857/S2500262720040122>
28. Luigi-Sierra MG, Mármol-Sánchez E, Amills M (2020) Comparing the diversity of the casein genes in the Asian mouflon and domestic sheep. *Anim Genet* 51:470–475. <https://doi.org/10.1111/age.12937>
29. Su R, Qiao X, Gao Y, Li X, Jiang W, Chen W, Fan Y, Zheng B, Zhang Y, Liu Z, others (2020) Draft genome of the European mouflon (*Ovis orientalis musimon*). *Front Genet* 11:533611. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.533611>
30. Martins AG, Netto NT, Aulagnier S, Borges A, Dubois M, Vicente L, Gerard J-F, Maublanc M-L (2002) Population subdivision among mouflon sheep (*Ovis gmelini*) ewes and ranging behaviour of rams during the rut. *J Zool* 258:27–37. <http://dx.doi.org/10.1017/S0952836902001176>
31. Maudet C, Luikart G, Dubray D, Von Hardenberg A, Taberlet P (2004) Low genotyping error rates in wild ungulate faeces sampled in winter. *Mol Ecol Notes* 4:772–775. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00787.x>
32. Garel M, Cugnasse J-M, Gaillard J-M, Loison A, Gibert P, Douvre P, Dubray D (2005) Reproductive output of female mouflon (*Ovis gmelini musimon* times *Ovis sp.*): a comparative analysis. *J Zool* 266:65–71. <http://dx.doi.org/10.1017/S0952836905006667>
33. Garel M, Cugnasse J-M, Maillard D, Gaillard J-M, Hewison AM, Dubray D (2007) Selective harvesting and habitat loss produce long-term life history changes in a mouflon population. *Ecol Appl* 17:1607–1618. <https://doi.org/10.1890/06-0898.1>
34. Santucci F, Ibrahim K, Bruzzone A, Hewit G (2007) Selection on MHC-linked microsatellite loci in sheep populations. *Heredity* 99:340–348. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801006>
35. Sanna D, Barbato M, Hadjisterkotis E, Cossu P, Decandia L, Trova S, Pirastru M, Leoni GG, Naitana S, Francalacci P, others (2015) The first mitogenome of the Cyprus mouflon (*Ovis gmelini ophion*): new insights into the phylogeny of the genus *Ovis*. *PLoS ONE* 10:e0144257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144257>
36. Barbato M (2016) Unravelling the evolutionary history and adaptation of European mouflon and some domestic sheep populations with special emphasis on the ovines of Sardinia. PhD Thesis, Cardiff University
37. Portanier E, Garel M, Devillard S, Marchand P, Andru J, Maillard D, Bourgoïn G (2017) Introduction history overrides social factors in explaining genetic structure of females in Mediterranean mouflon. *Ecol Evol* 7:9580–9591. <https://doi.org/10.1002/ece3.3433>
38. Portanier E, Larroque J, Garel M, Marchand P, Maillard D, Bourgoïn G, Devillard S (2018) Landscape genetics matches with behavioral ecology and brings new insight on the functional connectivity in Mediterranean mouflon. *Landscape Ecol* 33:1069–1085. <https://doi.org/10.1007/s10980-018-0650-z>
39. Portanier E, Garel M, Devillard S, Maillard D, Poissant J, Galan M, Benabed S, Poirel M-T, Duhayer J, Itty C, others (2019) Both candidate gene and neutral genetic diversity correlate with parasite resistance in female Mediterranean mouflon. *BMC ecol* 19:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12898-019-0228-x>
40. Portanier E, Chevret P, Gélín P, Benedetti P, Sanchis F, Barbanera F, Kaerle C, Queney G, Bourgoïn G, Devillard S, others (2022) New insights into the past and recent evolutionary history of the Corsican mouflon (*Ovis gmelini musimon*) to inform its conservation. *Conserv Genet* 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01399-2>
41. Barbato M, Masseti M, Pirastru M, Columbano N, Scali M, Vignani R, Mereu P (2022) Islands as time capsules for genetic diversity conservation: The case of the Giglio Island mouflon. *Diversity* 14:609. <http://dx.doi.org/10.3390/d14080609>
42. Carcangiu V, Mura MC, Vacca GM, Dettori ML, Pazzola M, Daga C, Luridiana S (2010) Characterization of the melatonin receptor gene MT1 in mouflon (*Ovis Gmelini Musimon*) and its relationship with reproductive activity. *Mol reprod dev* 77:196. <https://doi.org/10.1002/mrd.21125>
43. Lorenzini R, Cabras P, Fanelli R, Carboni GL (2011) Wildlife molecular forensics: identification of the Sardinian mouflon using STR profiling and the Bayesian assignment test. *Forensic Sci Int Genet* 5:345–349. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.012>
44. Guerrini M, Forcina G, Panayides P, Lorenzini R, Garel M, Anayiotos P, Kassinis N, Barbanera F (2015) Molecular DNA identity of the mouflon of Cyprus (*Ovis orientalis ophion*, *Bovidae*): Near Eastern origin and divergence from Western Mediterranean conspecific populations. *Syst Biodivers* 13:472–483. <https://doi.org/10.1080/1472000.2015.1046409>

45. Barbanera F, Guerrini M, Beccani C, Forcina G, Anayiotos P, Panayides P (2012) Conservation of endemic and threatened wildlife: molecular forensic DNA against poaching of the Cypriot mouflon (*Ovis orientalis ophion*, *Bovidae*). *Forensic Sci Int Genet* 6:671–675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.12.001>
46. Guerrini M, Panayides P, Mofrad NN, Kassinis N, Ioannou I, Forcina G, Hadjigerou P, Barbanera F (2021) Spatial genetic structure and Ovis haplogroup as a tool for an adaptive conservation management of the endangered Cyprus mouflon. *Zoology* 148:125959. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2021.125959>
47. Kaeuffer R, Coltman DW, CHAPUIS J-L, Reale D, Pontier D (2007) The effects of cyclic dynamics and mating system on the effective size of an island mouflon population. *Mol Ecol* 16:4482–4492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03501.x>
48. Kaeuffer R, Réale D, Pontier D, Chapuis J-L, Coltman DW (2008) Local effects of inbreeding on embryo number and consequences for genetic diversity in Kerguelen mouflon. *Biol Lett* 4:504–507. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0222>
49. Stahlberger-Saitbekova N, Schläpfer J, Dolf G, Gaillard C (2001) Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J Anim Breed Genet* 118:379–387. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0388.2001.00312.x>
50. Sadeghi B (2018) Genetic Diversity of Tendürek Mouflon Population. *Acta Vet Eurasia* 44:20–25
51. Ciani E, Mastrangelo S, Da Silva A, Marroni F, Ferenčaković M, Ajmone-Marsan P, Baird H, Barbato M, Colli L, Delvento C, others (2020) On the origin of European sheep as revealed by the diversity of the Balkan breeds and by optimizing population-genetic analysis tools. *Genet Sel Evol* 52:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00545-7>
52. Eydivandi S, Sahana G, Momen M, Moradi M, Schönherz A (2020) Genetic diversity in Iranian indigenous sheep vis-à-vis selected exogenous sheep breeds and wild mouflon. *Anim Genet* 51:772–787. <https://doi.org/10.1111/age.12985>
53. Jones K, Levine K, Banks J, others (2000) DNA-based genetic markers in black-tailed and mule deer for forensic applications. *Calif Fish Game* 86:115–126
54. Jones KC, Levine KF, Banks JD (2002) Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Mol Ecol Notes* 2:425–427. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00264.x>
55. Butler JM (2011) Advanced topics in forensic DNA typing: methodology. Academic press
56. Szabolcsi Z, Egyed B, Zenke P, Padar Z, Borsy A, Steger V, Pasztor E, Csanyi S, Buzas Z, Orosz L (2014) Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian red deer. *J Forensic Sci* 59:1090–1099
57. Morf NV, Kopps AM, Nater A, Lendvay B, Vasiljevic N, Webster LM, Fautley RG, Ogden R, Kratzer A (2021) STRoe deer: A validated forensic STR profiling system for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Forensic Sci Int Animals and Environments* 1:100023. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100023>
58. Meredith E, Rodzen J, Levine K, Banks J (2005) Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conserv Genet* 6:151–153. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-004-7735-8>
59. Turi O, Wagenhoffer Z, Battay M, Lehotzky P, Zorkóczy O (2023) Mikroszatellita-markerek tesztelése dámszarvasok egyedi azonosítása céljából. *Magy Állatorvosok Lapja* 145:67–76. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.03.183-19...>
60. Zorkóczy OK, Turi O, Wagenhoffer Z, Ózsvári L, Lehotzky P, Pádár Z, Zenke P (2023) A Selection of 14 Tetrameric Microsatellite Markers for Genetic Investigations in Fallow Deer (*Dama dama*). *Animals* 13:2083. <http://dx.doi.org/10.3390/ani13132083>
61. Blacket M, Robin C, Good R, Lee S, Miller A (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12:456–463. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
62. Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
63. Smouse RPP, Peakall R (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btfs460>
64. Gáspárdy A, Zenke P, Kovács E, Annus K, Posta J, Sáfár L, Maróti-Agóts Á (2022) Evaluation of maternal genetic background of two Hungarian autochthonous sheep breeds coming from different geographical directions. *Animals* 12:218. <https://doi.org/10.3390/ani12030218>
65. Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J Mol Evol* 47:441–448. <https://doi.org/10.1007/pl00006401>
66. Leibelt C, Budowle B, Collins P, Daoudi Y, Moretti T, Nunn G, Reeder D, Roby R (2003) Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles. *Forensic sci int* 133:220–227. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(03\)00035-5](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00035-5)
67. Takayama T, Takada N, Suzuki R, Nagaoka S, Watanabe Y (2007) Identification of a rare mutation in a TH01 primer binding site. *Legal med* 9:289–292. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2007.04.003>
68. Geist V, others (1971) Mountain sheep. A study in behavior and evolution. University of Chicago Press.
69. Dubois M, Bon R, Cransac N, Maublanc M-L (1994) Dispersal patterns of Corsican mouflon ewes: importance of age and proximate influences. *Appl Anim Behav Sci* 42:29–40. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0168-1591(94)90004-3)
70. Gross JE, Singer FJ, Moses ME (2000) Effects of disease, dispersal, and area on bighorn sheep restoration. *Restor Ecol* 8:25–37. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1526-100x.2000.80063.x>
71. Worley K, Strobeck C, Arthur S, Carey J, Schwantje H, Veitch A, Coltman D (2004) Population genetic structure of North American thinhorn sheep (*Ovis dalli*). *Mol Ecol* 13:2545–2556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2004.02248.x>
72. Dubois M, Quenette P-Y, Bideau E, Magnac M-P (1993) Seasonal range use by European mouflon rams in medium altitude mountains. *Acta Theriol* 38:185–198
73. Dubois M, Khazraïe K, Guilhem C, Maublanc M-L, Le Pendu Y (1995) Philopatry in mouflon rams during the rutting season: psycho-ethological determinism and functional consequences. *Behav Process* 35:93–100. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(95\)00044-5](https://doi.org/10.1016/0376-6357(95)00044-5)
74. King R, Brooks SP (2003) Survival and spatial fidelity of mouflons: The effect of location, age, and sex. *Journal of agricultural, biological, and environmental statistics* 8:486–513. <http://dx.doi.org/10.1198/1085711032570>
75. Bikfalvi G, Fluck D (1988) A muflon elterjedése Európában. *Nimród* 108:163

76. Homonnay Z (1986) VADTELEPÍTÉS - VÉRFRISSÍTÉS. Nimród 106:246–248
77. Uloth W (1972) To the history of the distribution, introduction and cross-breeding of the Tyrrhenis mouflon in Europe and oversea. Acta Theriol 17:412–413. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.72-32>
78. Barbato M, Hailer F, Orozco-terWengel P, Kijas J, Mereu P, Cabras P, others (2017) Genomic signatures of adaptive introgression from European mouflon into domestic sheep. Sci Rep 7:7623. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07382-7>
79. Kim BJ, Lee Y-S, An J, Park H-C, Okumura H, Lee H, Min M-S (2008) Species and sex identification of the Korean Goral (*Nemorhaedus caudatus*) by molecular analysis of non-invasive samples. Mol cells 26:314–8
80. Yang J, Li X, Cao Y-H, Pokharel K, Hu X-J, Chen Z-H, Xu S-S, Peippo J, Honkatukia M, Kantanen J, others (2019) Comparative mRNA and miRNA expression in European mouflon (*Ovis musimon*) and sheep (*Ovis aries*) provides novel insights into the genetic mechanisms for female reproductive success. Heredity 122:172–186. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0090-1>
81. Caparroz R, Mantellatto A, Bertioli DJ, Figueiredo MG, Duarte JMB (2015) Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. Genet Mol Biol 38:338–345. <https://doi.org/10.1590/s1415-475738320140344>
82. Brinkman TJ, Person DK, Schwartz MK, Pilgrim KL, Colson KE, Hundertmark KJ (2010) Individual identification of Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. Conserv Genet Resour 2:115–118. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-010-9176-7>
83. Hill E, Murphy N, Toop S, Linacre A, Strugnell JM (2022) Genetic analysis of hog deer (*Axis porcinus*) in Victoria, Australia, and its applications to invasive species and game management. Eur J Wildlife Res 68:45. <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-022-01592-9>

Közlésre érkezik: 2024. máj. 24.

Immune response to
West Nile virus infection
Part I.: Innate- and
cellular immune response
Literature review

Cs. H. Tolnai^{1*}

P. Forgách¹

M. Lőrincz¹

O. Kutasi²

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Járványtani és
Mikrobiológiai Tanszék,
1143 Budapest, Hungária krt. 23–25.

2. Állatorvostudományi Egyetem,
Takarmányozástani és Klinikai
Dietetikai Tanszék,
Budapest

*e-mail: tolnai.csenge@univet.hu

Nyugat-nílusi vírus fertőzésre adott immunválasz I. rész: Veleszületett és sejthez kötött immunválasz Irodalmi áttekintés

Tolnai Csenge Hanna^{1*}, Forgách Petra¹, Lőrincz Márta¹, Kutasi Orsolya²

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők szakirodalmi adatok alapján bemutatják a nyugat-nílusi vírus által okozott fertőzésre adott immunválasz legfontosabb elemeit. A nyugat-nílusi vírus (*Orthoflavivirus nilense* – West Nile virus – WNV) az *Orthoflavivirus* nemzetségbe sorolt szúnyog terjesztette pozitív szimpla szálú RNS-vírus. A kórokozó minden évben jelentős számú idegrendszeri megbetegedést okoz emberekben és lovakban, emiatt napjainkban az egyik legfontosabb, agyvelőgyulladást okozó arbovírusként tartják számon világszerte. A vírus széleskörű előfordulása és az általa jelentett növekvő fenyegetés ellenére is számos kérdés áll fenn a fertőzések klinikai manifesztációjának tekintetében.

SUMMARY

West Nile virus (WNV) is a single-stranded positive-sense RNA virus of the Flaviviridae family within the *Orthoflavivirus* genus. It was first isolated in 1937 in Uganda from a febrile woman and was considered a pathogen with minor significance until the late 1990s. The outbreaks in 1996 in Romania, and 1999 in the United States, respectively, have profoundly changed the perspectives around West Nile virus. Today, the pathogen is endemic on all continents of the world, except for Antarctica, and is considered one of the most important encephalitic arboviruses worldwide. West Nile virus causes a significant number of human and equine neurological cases every year by re-emerging in endemic areas and emerging in new territories. In humans approximately 80% of the infections remain asymptomatic, 20% of the patients develop flu-like symptoms and less than 1% develop neurological signs. In horses, 80-90% of the infections are asymptomatic and 10-20% of the infected animals develop neurological disease, ranging from mild ataxia to recumbency. West Nile virus has become an important threat to the whole world, but the clinical manifestation of the infection is still not understood. In the past 20 years, many research have been made in the area of cellular immune response to WNV infection. It is assumed that the cellular immune response plays an important role in the manifestation of the clinical disease. Exacerbated cytotoxic T-cell response, as well as delayed regulatory T-cell response was shown to play a role in the development of severe neurological form, however the regulatory mechanisms behind these pathways are still not clear. The first part of our review provides a summary of the innate- and cellular immune response during and following WNV infections in horses and humans.

A nyugat-nílusi vírus (*Orthoflavivirus nilense* – West Nile virus – WNV) a *Flaviviridae* víruscsaládba sorolt *Orthoflavivirus* nemzetség tagja [1]. A kórokozót először az afrikai Uganda nyugat-nílusi tartományában izolálták 1937-ben [2]. A nyugat-nílusi vírust az 1990-es évek közepéig minimális kockázati besorolású kórokozóként tartották számon, hiszen csupán sporadikusan okozott tünetmentes vagy enyhe tünetekben megnyilvánuló fertőzést emberekben, lovakban és madarakban [3]. Az 1996-os romániai, majd az 1999-es amerikai járványkitörés azonban alapjaiban megváltoztatta a nyugat-nílusi vírus fertőzés jelentette veszélyről kialakult gondolatokat [4, 5].

A legutóbbi
jelentős
WNV-járvány
2018-ban zajlott
Európában
és hazánkban

Az elmúlt két évtizedben jelentős mértékű emelkedés volt megfigyelhető az emberekben és a lovakban előforduló, WNV okozta idegrendszeri megbetegedések incidenciájában [6]. Napjainkban az Antarktisz kivételével a kórokozó a Föld minden kontinensén endémiássá vált, emiatt a legelterjedtebb és az egyik legfontosabb, agyvelőgyulladás okozó arbovírusként tartják számon [7, 8]. Magyarországon a vírust első alkalommal 2003-ban izolálták madarakból [9], majd lovakban okozott idegrendszeri tünetek hátterében elsőként 2007-ben azonosították [10]. A legutóbbi, megelőző évek átlagát meghaladó esetszámokkal járó európai járványkitörés 2018-ban zajlott, több, mint 1500 humán és 250 ló megbetegedéssel; Magyarországon 225 emberi és 118 ló esetet regisztráltak ebben az évben. Ezt követően, 2019 és 2022 között kisebb járványkitörések voltak megfigyelhetőek Olaszországban, Spanyolországban és Görögországban. Hazánkban 2019 és 2022 között a 2018-as járványkitöréshez képest az esetszámokban jelentős visszaesés volt tapasztalható. A tavalyi évben azonban ismét jelentősen emelkedett a korábbi évekhez képest az idegrendszeri tünetekben megnyilvánuló fertőzések száma hazánkban lovakban és emberekben is [6]. A magyarországi esetszámokat a *Táblázat* foglalja össze. A hullámszerű WNV-fertőzés okozta esetszámok kiválóan jelzik az orthoflavivírus-fertőzések kiszámíthatatlanságát, a hatékony védekezés érdekében pedig elengedhetetlen mind a vírus, mind a kórokozóra adott immunválasz mélységekre menő ismerete.

TÁBLÁZAT. Magyarországi WNV-esetszámok 2018–2023

TABLE. WNV case numbers in Hungary 2018–2023

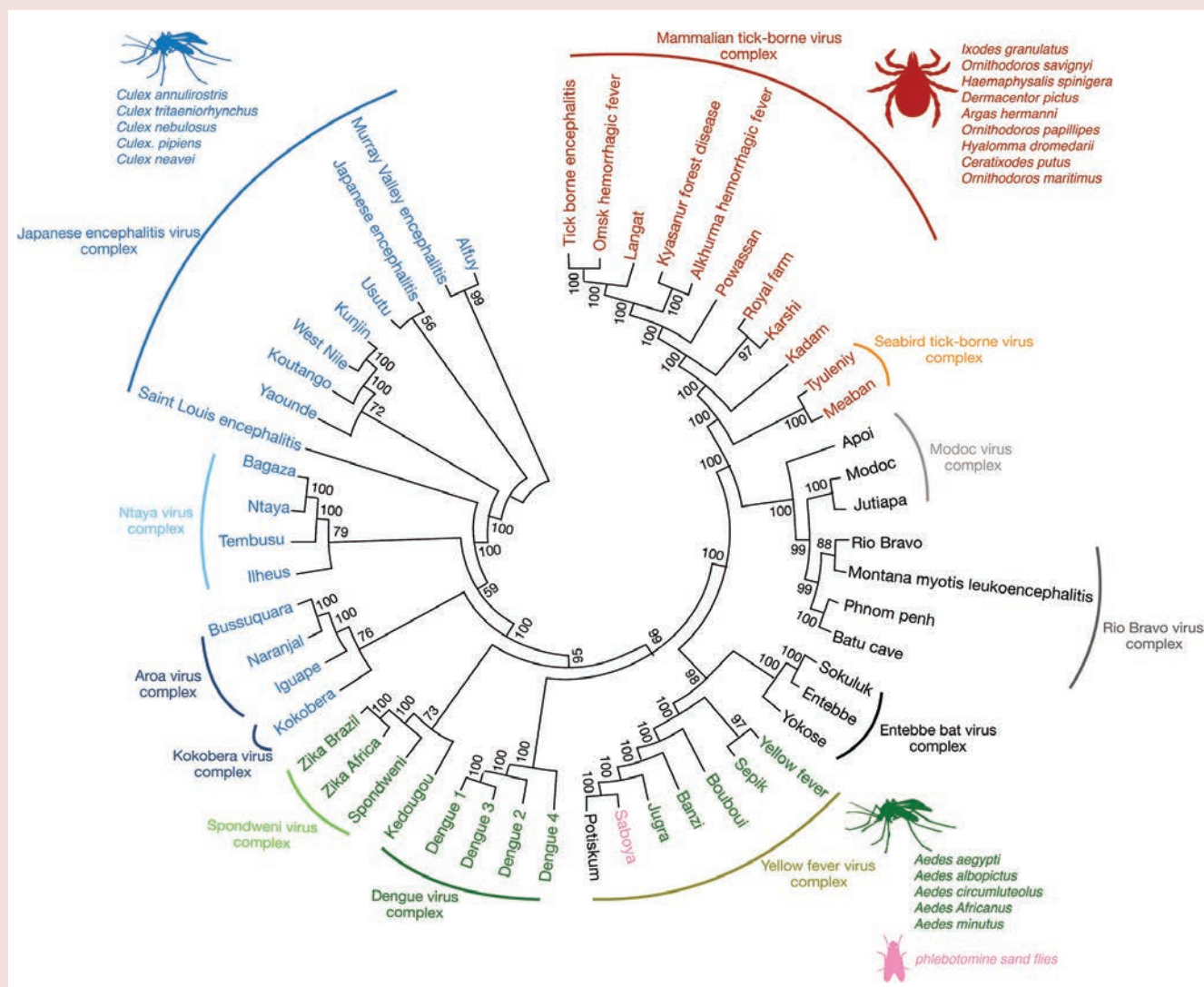
	Humán	Ló
2018	215	91
2019	36	7
2020	3	1
2021	7	3
2022	3	3
2023	29	26

A WNV az
Orthoflavivirus
nemzetségbe
tartozó, szúnyog
terjesztette vírus

JÁRVÁNYTAN

Az *Orthoflavivirus* nemzetségbe több, mint 70, vektor közvetítette kórokozó tartozik [11], amelyek a terjesztés módja szerint további három alcsoportba sorolhatóak [12]. Az első csoportba a szúnyog terjesztette vírusok, pl. a nyugat-nílusi vírus, valamint a hazánkban szintén endémiásan előforduló, lovakat és embereket is fertőzni képes Usutu vírus tartozik. A második csoport a nemzetségbe sorolt kullancs terjesztette kórokozókat foglalja össze, ide sorolandó a Magyarországon szintén endémiás, lovakat és embereket is fertőzni képes kórokozó, a kullancsen-cephalitis vírus; végül pedig az ismeretlen vektor által terjesztett csoport [12].

Ezen felül, az orthoflavavírusok antigéntulajdonságaik alapján szerokomplexekbe is csoportosítandóak. A két legnagyobb szerokomplex, a japán encephalitis vírus komplex (nyugat-nílusi vírus, Usutu vírus stb.), valamint a kullancsencephalitis vírus komplex (kullancsencephalitis vírus, Powassan vírus, louping ill vírus) (1. ábra) [13].



1. ÁBRA. Orthoflavivirus nemzetség [12]

FIGURE 1. Orthoflavivirus genus [12]

**A nyugat-nílusi vírus
szúnyogok és madarak
közötti enzootiás
ciklusban kering**

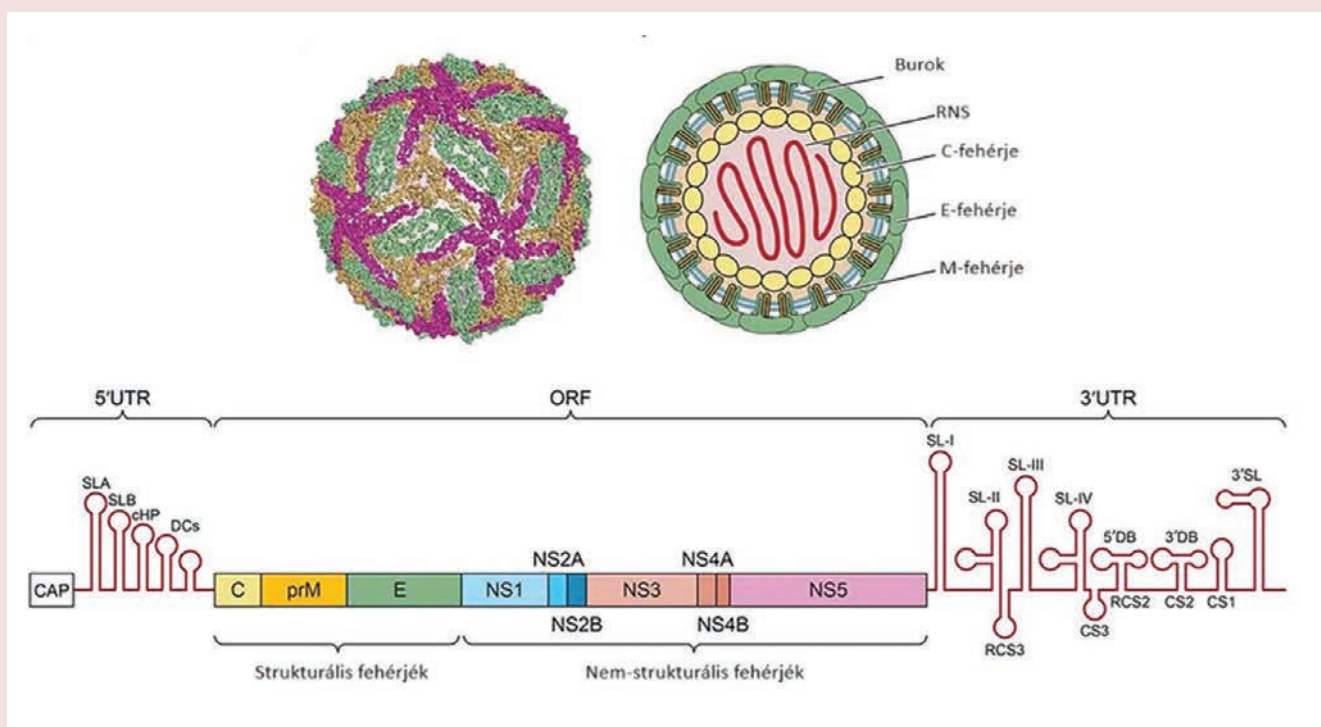
Filogenetikai vizsgálatok alapján a nyugat-nílusi vírus esetében 9 leszármazási vonalat (lineage) különböztetnek meg. Emberekben és állatokban a klinikai tünetek hátterében csak az 1-es vagy 2-es leszármazási vonalba sorolt törzseket írtak le [14]. Az európai járványkitörésekért 2004 óta a lineage 2 törzsek felelősek [15], habár a lineage 1 törzsek is jelen vannak a kontinensen, többnyire Spanyolországban, Franciaországban és Olaszországban jelentenek eseteket sporadikusan [16–18].

A nyugat-nílusi vírus szúnyogok és madarak közötti enzootiás ciklusban kering. Az emberek és a lovak a szúnyogcsípést követően fertőződnek, azonban a rövid ideig tartó, alacsony titerű vireamia alkalmatlanná teszi ezeket a fajokat a további vektorok fertőzésére [19]. Emberekben a fertőzések több, mint 80%-a tünetmentesen zajlik, nagyjából 20%-ban alakulnak ki enyhe, influenzaszerű tünetek és

**Lovak esetében
a fertőzött állatok
10%-ánál jelentkeznek
idegrendszeri tünetek**

kevesebb, mint 1%-ban idegrendszeri tünetek. A neurológiai tünetek nagyobb valószínűséggel jelentkeznek idősebb, vagy immunszupresszált betegekben [20]. Lovak esetében a fertőzött állatok 10%-ánál jelentkeznek idegrendszeri tünetek, ezért a fajt egyes kutatók a nyugat-nílusi vírusra fogékonyabbnak tartják [21]. A WNV-fertőzések szoros összefüggést mutatnak a vektorok aktivitásával, amely a betegség szezonálisában nyilvánul meg. A kontinentális éghajlaton a nyugat-nílusi vírus szezonja augusztus és november között jellemző [22]. Azonban a klímaváltozás a vektorok számára kedvező éghajlati feltételeket teremtve, ill. az egyre növekvő urbanizáció előreláthatólag a WNV-szezon tér- és időbeli terjedését fogja eredményezni [23, 24].

Az orthoflavivírusok pozitív szimpla szálú RNS-vírusok [11]. A virális genom egy hosszú nyílt leolvasási keretet (open reading frame) kódol, amely a sejtben egy szimpla polipeptiddé transzlálódik, ez ko- és poszttranszlációban 10 fehérjére hasítódik: 3 strukturális proteinre (capsid (C) fehérje, membrán (prM/M) fehérje és envelope (E) fehérje), amelyek a virionok felépítésében játszanak szerepet, továbbá 7 nem-strukturális proteinre (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B, és NS5), amelyek a virális replikációban, valamint a gazdaszervezet immunválaszának modulálásában töltenek be fontos szerepet (2. ábra) [25–27].



2. ÁBRA. Nyugat-nílusi vírus morfológiája [25]

FIGURE 2. Morphology of West Nile virus [25]

Immunológiai szempontból mégis az E protein a legfontosabb, amely a vírus sejt felszíni receptorokhoz való kapcsolódásáért, ezáltal a sejtbe jutásáért felel. Ez a protein azonban a vírusra specifikus és az *Orthoflavivirus* nemzetségre jellemző epitópokat egyaránt hordoz. Ennek következtében a genusba sorolt összes vírus antigénrokonságban áll az E fehérjék aminosavszekvenciáinak kisebb-nagyobb mértékű hasonlóságai következtében: szerokomplexen kívül 40–44%-os, azonos szerokomplexbe sorolt vírusok között 60–70%-os aminosavsorrend-egyeztést írtak le [28–31].

KÓRFEJLŐDÉS

Lovakban a vireamia az inokulációt követő 1–6. napon alakul ki, átlagosan 3 napon át tart és alacsony szinten marad

Egy korábbi publikáció ad mélyebb áttekintést a fertőzés kórfejlődéséről [32], amelynek jelen összefoglalóban kizárólag az immunválasz szempontjából lényeges, rövid ismertetésére kerül sor.

A szúnyogcsípést követően, a vírus a szervezetbe jutva a keratinocytákban és a Langerhans-sejtekben (a bőr antigénprezentáló, ún. dendritikus sejtjei) replikálódik. Az utóbbi sejtípussal a kórokozó eléri a lokális nyirokcsomót, majd onnan a vireamia során a perifériás szervekbe és a központi idegrendszerbe szóródik [8, 33, 34]. Lovakban a vireamia az inokulációt követő 1–6. napon alakul ki, amely átlagosan 3 napon át tart, a vírustiter 10^1 és 10^3 PFU/ml (plaque forming unit) között mozog [8]. A vírus központi idegrendszerbe történő bejutásának módja egyelőre tisztázatlan, több teória is felmerült ezt illetően [34]. Az első ezek közül a hematogén szóródás lehetősége, amelynek során a patogén a fertőzött vérsejtekkel jut a központi idegrendszerbe (KIR) [35]. Más feltételezések szerint a kórokozó passzív migrációval jut át a gyulladásos citokinek következtében áteresztőbbé vált vér-agy gáton [36]. A „trójai faló” mechanizmus szerint, a kórokozó a fagociták fagoszómájában túlélve jut a KIR-be [37]. Végül, a transzneurális mechanizmus lehetősége, amely szerint a vírus a szervezetbe jutás helyéről retrográd és vagy anterográd axonális transzporttal vándorol az idegrendszerben [38]. A központi idegrendszerbe jutva a vírus a neuronokban, az astrocytákban és a microglia-sejtekben is képes replikálódni. Lovak kísérleti WNV-fertőzése során a központi idegrendszerben a vírus koncentrációja 10^4 – $10^{6,8}$ PFU/ml. Az anatómiai lokalizációt tekintve leggyakrabban a gerincvelő laterális és ventralis szarva érintett, az agyban a thalamusban, a basalis ganglionokban, a középgagyban és az utóaggyban fordulnak elő leginkább elváltozások [8]. A neurológiai tüneteket a vírus direkt hatása, valamint a fertőzésre adott immunválasz során fellépő sejtkárosodások okozzák [33].

IMMUNVÁLASZ – ANTIVIRÁLIS IMMUNVÁLASZ, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A NYUGAT-NÍLUSI VÍRUSRA

VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZ

A veleszületett immunitás a fertőzés korai szakaszának kontrollálásáért felelős [33]. Az ide tartozó sejteken a patogénre jellemző molekuláris mintázat (Pathogen Associated Molecular Pattern – PAMP), valamint a veszélyre jellemző molekuláris mintázat (Damage Associated Molecular Pattern – DAMP) felismerésére alkalmas, ún. mintázatfelismerő receptorok (Pattern Recognition Receptors– PRR) találhatók [39, 40]. A nyugat-nílusi vírus a szervezetbe jutást követően mint obligát intracelluláris kórokozó, a keratinocytákban és Langerhans-típusú dendritikus sejtekben replikálódik, ezt követően DAMP-ok keletkezése mellett kijut a sejtből, majd újabb sejteket fertőz meg. A PAMP-ot és DAMP-ot az antigénprezentáló sejtek és neutrophil granulocyták ismerik fel. Ez gyulladásos kemokinek és citokinek (I-es típusú interferonok, IL-1, IL-6, TNF α) termelését eredményezi [40, 41]. WANG kutatásában az IL-6 és TNF α mennyisége hozzájárult a nyugat-nílusi vírus fertőzött egerek vér-agy gátjának megnövekedett áteresztőképességéhez, amely korrelált az idegrendszeri tünetek kialakulásával [42]. Az I-es típusú interferonok közé sorolt két legfontosabb citokin az interferon-alfa (IFN α) és interferon-béta (IFN β), amelyek termelődése már a fertőzést követő néhány órán belül megindul [43]. Ezek a citokinek segítik a T-sejtek klonális expanszióját, ill. az effektor funkciók kialakulását. Továbbá, a sejtek által termelt I-es típusú interferonok hatására csökken a szomszédos sejteken a vírus sejtbe jutásához szükséges fehérjék expressziója, ezáltal a vírus replikációja, ill. a központi idegrendszerbe történő szóródásnak lehetősége [42–45]. Érdekesség, hogy QIAN kutatásában az idősebb donorok vérében nyugat-nílusi vírus fertőzést követően csökkent

A hatékony vírusellenes immunválaszhoz fontos az I-es típusú interferonok megfelelő termelődése

*A fertőzés nyomán
kialakuló rendellenes
T-sejtválasz
következtében
immunpatológiás
folyamatok lépnek fel*

interferon-I-válasz volt megfigyelhető. A kutatók e jelenség hátterében a kor előrehaladtával fellépő fokozott oxidatív stressz okozta csökkent IFN-I génexpressziót feltételezik, amely szerepet játszhat a nagyobb valószínűséggel kialakuló súlyos klinikai manifesztációban, ill. a vakcinázásokra adott csökkent válaszkészségben [46]. Egy viszonylag új tanulmányban az I-es típusú interferonok elleni auto-antitestek mennyiségét vizsgálták idegrendszeri tünetekben megnyilvánuló WNV fertőzésen átesett betegekben. A páciensek 40%-ából mutatták ki az előbb említett ellenanyagokat, amely alátámasztja az I-es típusú interferonok nélkülözhetetlenségét a hatékony antivirális immunreakcióban [47]. Lovakban erre irányuló vizsgálatokat még nem végeztek.

A veleszületett immunválasz a fertőzés korai szakaszának limitálása mellett, az adaptív immunreakció kialakításában is fontos szerepet játszik. A lokális antigénprezentáló sejtek aktiválódása következtében a citokin- és kemokintermelés mellett, a dendritikus sejtek fokozzák a CCR7-kemokinreceptor expresszióját, amely a sejt nyirokcsomó felé történő migrációját eredményezi. Az afferens nyirokérén történő vándorlás során a dendritikus sejt fenotípusos és funkcionális érési folyamaton esik át. Ennek során kifejezettebbé válik nyúlványos jellege, és megváltozik sejt felszíni receptorkészlete: elveszíti PRR-jeit, és felszíni ko-stimulációs molekulákat expresszál. Emellett, a fagocitált kórokozó lebontása és MHCI és II receptorokon történő prezentálása is lezajlik, amely lehetővé teszi a T-sejtek aktiválását a nyirokcsomóban. A T-sejtek aktivációjához 3 feltétel teljesülése szükséges: T-sejtreceptor (T cell receptor, TCR) aktiválása a megfelelő antigénnel, ko-stimulációs molekulák (ún. B7-fehérjék), valamint a megfelelő citokinek jelenléte [39, 44, 48]. ZIMMERMAN kutatásában a WNV gátolta a dendritikus sejtek ko-stimulációs molekuláinak expresszióját, valamint a citokintermelést, a kontroll csoporthoz képest [49]. Ez vezethet többek között a rendellenes T-sejtválaszhoz és következményes immunpatológiás folyamatokhoz.

SEJTHEZ KÖTÖTT IMMUNVÁLASZ A PERIFÉRIÁN

A naív T-sejtek aktiválása a sejtek osztódása és differenciációja révén effektor-sejt-populációk kialakulását eredményezi, amelyek meghatározott feladatokat látnak el a celluláris immunválasz részeként. Az MHCII receptoron prezentált antigénhez az ennek felismerésére alkalmas TCR-rel rendelkező CD4+ Th0 sejt kapcsolódik, ez a megfelelő ko-stimulációs molekulák jelenlétében a T-sejt aktivációját és osztódását eredményezi. Az antigén aktivált CD4+ T-sejtek különböző szubpopulációkra (Th1, Th2, Th17, Th9, Tfh, Treg) differenciálódnak, amelynek irányát főként a dendritikus sejt által termelt citokinek határozzák meg. Intracelluláris kórokozóval történő fertőződés esetén I-es típusú interferonok és IL-12 jelenlétében a Th1-sejt szubpopuláció dominál, amelyek nagy mennyiségű IL-2-t, IFN γ -t és TNF α -t termelnek. Az IFN γ a fagocitaaktivitást fokozva az intracelluláris kórokozók eliminálásában, valamint a Th1-sejtválasz fokozásában játszik szerepet, az IL-2 a CD8+ T-sejtek (citotoxikus T-lymphocyták, CTL) proliferációjában tölt be szerepet.

A Th2 sejtek az extracelluláris kórokozók elleni védekezés mellett, a B-sejtek aktiválásban nélkülözhetetlenek. A Th17 sejtek a gyulladás fenntartásában játszanak szerepet. A Tfh- (follicularis T-helper) sejtek citokinek és ko-stimulációs molekulák termelése mellett a B-sejtreakciót segítik a másodlagos nyirokszervek csírákőzpontjában, ezzel hozzájárulva a kórokozó specifikus ellenanyagok termeléséhez. Végül, a Treg-sejtek, az immunválasz kontrollálásáért felelős szubpopuláció, az immunválasz szabályozása, ezáltal az immunpatológiás folyamatok megelőzésében nélkülözhetetlenek [39, 44, 48–52].

Az antigénprezentáló sejteken vagy a fertőzött sejteken lévő MHCI-receptoron prezentált peptidekhez a CD8+ T-sejtek TCR-jei kapcsolódnak. A naív CD8+ T-sejtek a megfelelő ko-stimulációs molekulák, valamint IL-12 és I-es típusú interferonok és IL-2 jelenlétében aktiválódva osztódnak és citotoxikus T-sejtekké differenciálódnak.

Az aktivált citotoxikus T-sejtek a Th1-sejtekhez hasonlóan nagy mennyiségű IFN γ -t és TNF α -t termelnek, amelyek a vírus nem-citolitikus úton történő kontrollálásáért felelnek. A citotoxikus T-sejtek továbbá granzimet és perforint tartalmazó vezikulumokat is képeznek, amelyek felszabadulása a szomszédos sejtek apoptosist idézi elő. Emellett, az aktivált citotoxikus T-sejtek az idegen peptidet prezentáló sejtek ún. extrinsic úton történő apoptosist is képesek előidézni a Fas ligand (FasL) és Fas receptor kapcsolódása révén [39, 44, 48].

SEJTHEZ KÖTÖTT IMMUNVÁLASZ A KÖZPONTI IDEGRENDSZERBEN

*A vírus direkt
sejtkárosító hatása
következtében a
neuronok gyulladásos
citokineket és kemo-
kineket termelnek*

Az aktivált T-sejtek a nyirokcsomót elhagyva az efferens nyirokereken keresztül a fertőzés helyére vándorolnak, WNV-fertőzés esetén ennek fontos részét képezi a központi idegrendszer. A vírus direkt sejtkárosító hatása következtében a neuronok gyulladásos citokineket (I-es típusú interferonok, IL-1, IL-6) és kemokineket termelnek. Ezek, ill. a vírus sejtéből történő kiszabadulása során keletkező PAMP-ok és DAMP-ok aktiválják a microgliasejteket, valamint az astrocytákat. Az sejtek aktiválása még több gyulladásos citokin (I-es típusú interferonok és az IL-1 családba tartozó citokinek), valamint kemokin termelését váltja ki, emellett a microgliasejteken fokozódik az MHC-receptorok expressziója. A gyulladás következtében a KIR kapillárisok endothelsejtjein nő az adhézis molekulák kifejeződése. A parenchymában termelt kemokinek (CCL2, CCL5, CXCL10) az endothelsejtek luminalis oldalához kötődve a leukocyták kilépését teszik lehetővé [53–58]. Nyugat-nílusi vírus fertőzés esetén az eddigi tanulmányok az előbb említett valamely kemokin termelésének hiányában a KIR-be történő csökkent leukocytavándorlás következtében nagyobb víruskoncentrációt és súlyosabb elváltozásokat figyeltek meg a fertőzött egerek KIR állományában a kontroll csoporthoz képest [59–61]. Szintén a kemokinek fontosságát támasztja alá GLASS kutatása: a tünetekben megnyilvánuló WNV-fertőzésen átesett emberekben nagyobb arányban találtak mutációt a CCL5 receptor (CCR5) génjében, amely feltehetőleg a leukocyták központi idegrendszerbe történő csökkent migrációjához vezet [62]. Az extravazációt követően az immunsejteket a perivascularis térben a lokális antigénprezentáló sejtek re-aktiválják, amelyek a T-lymphocyták parenchymába lépését és effektor funkcióit szabályozzák [53, 54, 56, 57]. DURRANT kutatásában az APC-k ko-stimulációs receptorainak expressziója és az IL-1-receptor közötti összefüggés fontosságára mutatott rá WNV-fertőzés esetén: IL-1R1 $^{-/-}$ egérben a KIR-ben lévő lokális APC-ken csökkent ko-stimulációs receptorok mennyisége rendellenes helper T-sejttaktivációhoz és következményesen kevésbé hatékony citotoxikus T-sejtválaszt váltott ki a KIR-ben. Az agyvelő állományában a citotoxikus T-sejtek száma ugyan a kontroll csoportéval azonos volt, azonban az IL-1R1 $^{-/-}$ egerekben fokozott víruskoncentráció és neuroinflammáció volt megfigyelhető. Ezzel szemben a periférián a viraemia mértéke változatlan volt. Tehát az IL-1 citokinek a KIR-ben a T-lymphocyták vírusellenes hatékonyságát szabályozza, a rendellenes T-sejtválasz pedig immunpatológias folyamatokhoz vezethet [63]. Egy másik tanulmányban ugyan eltérő mechanizmus által, de hasonló következtetésekre jutottak a kutatók: az IL-1 β szabályozza a perivascularis térben a lokális APC-k által termelt CXCL12 kemokin mennyiségét, és ezáltal befolyásolja a CXCR4-t expresszáló T-lymphocyták reaktivációját és parenchymába történő migrációját WNV-fertőzés esetén. A megfelelően aktivált T-sejtek CXCR4 receptorának expressziója, ezáltal CXCL12-höz való kapcsolódása csökkent, így a parenchymába tudtak vándorolni. IL-1 β hiányában azonban a nem megfelelően aktivált T-sejtek is képesek voltak az agy állományába lépni, amely szintén hozzájárulhat az immunpatológias folyamatok kialakulásához [64].

A perivascularis térben történő reaktivációt követően az immunsejtek a KIR parenchymájába lépnek, ahol vírusellenes effektor funkciókat látnak el, amely célja a patogén hatékony eliminálása a terminálisan differenciálódott idegsejtek

**A citotoxikus T-sejtek
korlátozzák a
WNV replikációját,
valamint eliminálják a
kórokozót a központi
idegrendszerből**

károsodásának minimalizálása mellett. A központi idegrendszerben az effektor immunsejtfunkciók csökkenése vagy szabályozatlansága súlyos következményeket vonhat magával [48, 55]. A nyugat-nílusi vírus központi idegrendszerből történő eliminációja, ezáltal a fertőzés kontrollálása főként a citotoxikus T-sejtek révén történik. Azokban a fertőzött egerekben, amelyek nem rendelkeztek az említett lymphocytaszubpopulációval vagy MHCI receptorokkal, nagyobb víruskoncentrációt mértek a központi idegrendszerben, és a mortalitási arány is megnövekedett, a kontroll csoporthoz képest. A citotoxikus T-lymphocyták hiányában a fertőzést túlélő állatok központi idegrendszeréből hetekkel később is izolálni lehetett a vírust [64]. A citotoxikus T-sejtek tehát limitálják a WNV replikációját, valamint eliminálják a kórokozót a központi idegrendszerből és megakadályozzák a perzisztens fertőzés kialakulását. WANG kutatásában különböző koncentrációjú (10^{-10} PFU) vírusszuspenzióval fertőzött MHCI receptorral és CD8+ T-sejtekkel nem rendelkező ($\beta 2\text{-m}^{-/-}$) egereket. Alacsony víruskoncentráció esetén a $\beta 2\text{-m}^{-/-}$ egerek agyából a vírust 3 nappal korábban lehetett izolálni, nagyobb víruskoncentráció, és több fertőzött neuron volt megfigyelhető, nagyobb arányú (80%) mortalitást eredményezve a kontroll csoporthoz képest (20%). Nagyobb koncentrációjú vírusszuspenzió esetén azonban ez megfordult: a kontroll csoportban 100%-os, a $\beta 2\text{-m}^{-/-}$ egerekben 80%-os elhullási arányt írtak le. A nagyobb koncentrációjú vírusszuspenzió esetén tapasztalt eredmények magyarázatául a CD8+ T-sejtválasz során kialakuló immunpatológias folyamatokat, ill. a $\beta 2\text{-m}^{-/-}$ egerekben ezek hiányát feltételezték a kutatók [65]. Perforin és FasL hiányában nagyobb víruskoncentrációt és mortalitási rátát írtak le WNV fertőzött egerekben [66]. SHRESTHA kutatásában a perforinnal nem rendelkező egerekben nagyobb víruskoncentrációt mértek a központi idegrendszer állományában, valamint a túlélő állatokban lényegesen hosszabb ideig volt jelen a vírus a központi idegrendszerben, a kontroll csoporttal szemben [67]. Ezek a kutatások egyértelműen alátámasztják az citotoxikus effektor T-sejtek szerepét a nyugat-nílusi vírus okozta fertőzés kontrollálásában. Ugyanakkor megemlítenéd, hogy más vírusfertőzések esetén, pl. Sindbis vírus, lymphocytás choriomeningitis vírus a perforin hiányában, míg a szintén *Ortho-flavivirus* genusba sorolt Murray Valley encephalitis vírus esetén a FasL hiányában változatlan morbiditás mellett csökkent súlyosságú klinikai tüneteket írtak le, amely az effektor T-sejt funkciók immunpatológias folyamatokhoz való hozzájárulását feltételezi [68, 69].

A WNV-fertőzés nem citolitikus úton történő kontrollálása az effektor sejtek által termelt IFN γ és TNF α vírusreplikációt gátló hatásán keresztül valósul meg. Az IFN γ szerepe a KIR-ben WNV-fertőzés esetén ugyanakkor megkérdőjelezhető: ugyan *in vitro* tizedére csökkenti a vírus replikációját, *in vivo* nem befolyásolta a fertőzés kimenetelét [70]. WANG tanulmányában a TNF α a vér-agy gát permeabilitásának fokozása révén hozzájárult a WNV-fertőzés súlyosabb klinikai manifesztációjának kialakulásához [42]. Ezzel szemben egy későbbi tanulmányban a TNF α -t neutralizáló ellenanyagok jelenlétében vagy a TNF α receptor hiányában nagyobb eséllyel alakultak ki idegrendszeri tünetek [71]. Szintén a TNF α WNV-fertőzés hatására kialakuló hatékony immunválaszban betöltött szerepét támasztja alá az infliximabbal (anti-TNF α monoklonális ellenanyag) kezelt rheumatoid arthritisben szenvedő humán páciens esete, aki súlyos idegrendszeri tüneteket produkált nyugat-nílusi vírus okozta fertőzést követően [72]. TNF-R1 $^{-/-}$ egerekben a periférián a T-sejtválasz nem tért el a kontroll csoporttól, azonban a központi idegrendszerben nagyobb volt a vírus koncentrációja és kisebb volt a CD8+ T-sejtek száma [71]. Ennek hátterében feltehetőleg a TNF α -szignál hiányában kisebb mennyiségben termelt CCL5 és CXCL10, valamint az endothelsejteken az adhézis molekulák csökkent mértékű expressziója állhat [71, 73].

A központi idegrendszer állományában zajló hatékony citotoxikus T-sejtfunkciókhoz elengedhetetlen a helper T-sejtekkel történő megfelelő együttműködés.

**A celluláris
immunválasz
nélkülözhetetlen
szerepet tölt be
a nyugat-nílusi
vírus központi
idegrendszerből
történő
eliminálásában**

A helper T-sejtekkel vagy MHCII receptorokkal nem rendelkező WNV-fertőzött egerekben csökkent a citotoxikus T-sejtek aktivációja és kisebb IgG ellenanyag-szintek voltak mérhetőek. A periférián a viraemia mértéke változatlan volt a két csoport között, ellenben a központi idegrendszerben nagyobb volt a vírus koncentrációja, amely nagyobb arányú mortalitást eredményezett a kontroll csoporthoz képest [74]. BRIEN kutatásában a helper T-sejtek nyugat-nílusi vírus fertőzött egerek agyában tanúsított direkt citotoxikus hatásáról számol be [75]. Egy másik tanulmányban a tünetekben megnyilvánuló WNV fertőzött emberek vérmintáiban nagyobb arányban izoláltak Tim-3-at expresszáló helper T-sejteket, amely a sejtes immunválaszért felelős citokinek (IFN γ) negatív szabályozójaként funkcionál [76]. A helper T-sejtek szubpopulációját képezik a regulációs, ún. Treg-sejtek, amelyek az immunválaszt szabályozzák, többek között a citotoxikus T-sejt reakció kontrollálásával. LANTERI tanulmányában a tünetmentes és a klinikai tünetekben megnyilvánuló páciensek vérmintáiban hasonlította össze a regulációs T-sejtek koncentrációját WNV-fertőzést követően. A tünetmentes emberek mintáiban nagyobb regulációs T-sejtmennyiséget mért, amely eredmény felveti a lehetőségét a helper T-sejt szubpopuláció szerepének a súlyos klinikai manifesztáció megelőzésében. Nyugat-nílusi vírus fertőzött egerekben a tünetmentes csoportban szintén nagyobb a T-sejtek mennyisége a tünetes csoporthoz képest, valamint a regulációs T-lymphocyta funkciókat gátolva a fertőzést követően rövid idővel súlyos klinikai tünetek alakultak ki 93%-os elhullási arány mellett. További érdekesség, hogy a tünetmentes állatokban fordított arányosság volt megfigyelhető a regulációs T-sejtek és a citotoxikus T-sejtek száma között. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy WNV fertőzés esetén a regulációs T-lymphocyta klinikai manifesztációban betöltött szerepe a citotoxikus T-sejtek szabályozása révén az immunpatológiás folyamatok gátlásával magyarázható [77]. GRAHAM kutatásában a regulációs T-lymphocyta CD8+ T-sejteket szabályozó hatására mutatott rá a központi idegrendszerben: a tünetmentes egerek agyában nagyobb regulációs T-sejtmennyiséget, ill. a fertőzés előrehaladtával (fertőzést követő 14. napon) kisebb citotoxikus T-sejtszámot figyeltek meg [78]. JAMES tanulmányában nem talált különbséget a regulációs T-lymphocyta arányában a tünetmentes és tünetekben megnyilvánuló WNV-fertőzésen átesett betegek mintáiban, azonban az utóbbi csoport regulációs T-sejtjei nagyobb mértékben expresszáltak CTL-4-et (T-sejtfunkciót gátló molekula) [79]. Ezek az eredmények, a korábban említett idegrendszeri tünetekben megnyilvánuló fertőzések során potenciálisan fellépő rendellenes citotoxikus T-sejtválaszokat figyelembe véve, még inkább alátámasztják a hatékony, de ugyanakkor megfelelően szabályozott immunválasz fontosságát a nyugat-nílusi vírus fertőzés során.

Az effektor T-lymphocytaikat a szervezet az immunválasz lezajlását követően apoptosis révén távolítja el. Ezzel szemben a patogénspecifikus memória T-sejtek különböző szubpopulációi hosszú ideig fennmaradnak. Ezek a sejtek a naív T-lymphocytaéhoz képest lényegesen hosszabb élettartamúak, a specifikus antigénnel találkozáskor gyorsabban és hatékonyabban aktiválódnak, akár APC-k hiányában is, és feltehetőleg hosszú távú védelmet nyújtanak az adott kórokozóval szemben [80–83]. A nyugat-nílusi vírus fertőzést követően kialakuló memória T-sejtekről, ill. ezek másodlagos fertőzések elleni védelemben betöltött szerepéről sem emberekben, sem lovakban nem rendelkezünk információval.

Összegezve tehát, a celluláris immunválasz nélkülözhetetlen szerepet tölt be a nyugat-nílusi vírus központi idegrendszerből történő eliminálásában, ugyanakkor, a rendellenes T-sejtválasz nagy valószínűséggel hozzájárul a súlyos klinikai manifesztációhoz.

IRODALOM

1. Postler TS, Beer M, Blitvich BJ, Bukh J, De Lamballerie X, Drexler JF, Imrie A, Kapoor A, Karganova GG, Lemey P, Lohmann V, Simmonds P, Smith DB, Stapleton JT, Kuhn JH (2023) Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. *Arch Virol* 168:224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
2. Sejvar JJ (2003) West Nile Virus: An Historical Overview. *Ochsner journal* 5:6–10
3. Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, Niedrig M, Papa A, Pierro A, Rossini G, Varani S, Vocale C, Landini MP (2013) West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect* 19:699–704. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12211>
4. Petersen LR, Hayes EB (2008) West Nile Virus in the Americas. *Med Clin North Am* 92:1307–1322. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.07.004>
5. Tsai T, Popovici F, Cernescu C, Campbell G, Nedelcu N (1998) West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *The Lancet* 352:767–771. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03538-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03538-7)
6. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-virus-infection>
7. Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M (2015) The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *BioMed Res Int* 2015:1–20. <https://doi.org/10.1155/2015/376230>
8. Schwarz ER, Long MT (2023) Comparison of West Nile Virus Disease in Humans and Horses: Exploiting Similarities for Enhancing Syndromic Surveillance. *Viruses* 15:1230. <https://doi.org/10.3390/v15061230>
9. Bakonyi T, Ivanics É, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N (2006) Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 12:618–623. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051379>
10. Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, Biksi I, Ferenczi E, Bahun C, Sardi S, Zientara S, Szenci O (2011) Equine Encephalomyelitis Outbreak Caused by a Genetic Lineage 2 West Nile Virus in Hungary: Lineage 2 West Nile Virus Encephalomyelitis. *J Vet Intern Med* 25:586–591. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0715.x>
11. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK and Kedzierski L (2018) Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol* 9:2180. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>
12. Rathore APS and St. John AL (2020) Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. *Front Immunol* 11:334. doi.org/10.3389/fimmu.2020.00334
13. Chan KR, Ismail AA, Thergarajan G, Raju CS, Yam HC, Rishya M, Sekaran SD (2022) Serological cross-reactivity among common flaviviruses. *Front Cell Infect Microbiol* 12:975398. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.975398>
14. Fall G, Di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CDM, Loucoubar C, Zantotto PMDA, Faye O, Sall AA (2017) Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0006078. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006078>
15. Hernández-Triana LM, Jeffries CL, Mansfield KL, Carnell G, Fooks AR, Johnson N (2014) Emergence of West Nile Virus Lineage 2 in Europe: A Review on the Introduction and Spread of a Mosquito-Borne Disease. *Front Public Health* 2:271. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00271>
16. Figuerola J, Jiménez-Clavero MÁ, Ruíz-López MJ, Llorente F, Ruiz S, Hoefer A, Aguilera-Sepúlveda P, Jiménez-Peñuela J, García-Ruiz O, Herrero L, Soriguer RC, Fernández Delgado R, Sánchez-Seco MP, Martínez-de La Puente J, Vázquez A (2022) A One Health view of the West Nile virus outbreak in Andalusia (Spain) in 2020. *Emerg Microbes Infect* 11:2570–2578. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2134055>
17. Beck C, Leparç Goffart I, Franke F, Gonzalez G, Dumarest M, Lowenski S, Blanchard Y, Lucas P, Lamballerie XD, Grard G, Durand GA, Zientara S, Tapprest J, L'Ambert G, Durand B, Desvaux S, Lecollinet S (2020) Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens* 9:908. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110908>
18. Mencattelli G, Iapao F, Monaco F, Fusco G, De Martinis C, Portanti O, Di Gennaro A, Curini V, Polci A, Berjaoui S, Di Felice E, Rosà R, Rizzoli A, Savini G (2021) West Nile Virus Lineage 1 in Italy: Newly Introduced or a Re-Occurrence of a Previously Circulating Strain? *Viruses* 14:64. <https://doi.org/10.3390/v14010064>
19. Troupin A, Colpitts TM (2016) Overview of West Nile Virus Transmission and Epidemiology. In: Colpitts TM (ed) *West Nile Virus*. Springer New York, New York, NY, pp 15–18
20. Sejvar J (2014) Clinical Manifestations and Outcomes of West Nile Virus Infection. *Viruses* 6:606–623. <https://doi.org/10.3390/v6020606>
21. Fehér OE, Fehérvári P, Tolnai CH, Forgách P, Malik P, Jerzsele Á, Wagenhoffer Z, Szenci O, Korbacska-Kutasi O (2022) Epidemiology and Clinical Manifestation of West Nile Virus Infections of Equines in Hungary, 2007–2020. *Viruses* 14:2551. <https://doi.org/10.3390/v14112551>
22. Ciota A, Kramer L (2013) Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. *Viruses* 5:3021–3047. <https://doi.org/10.3390/v5123021>
23. Paz S (2015) Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. *Phil Trans R Soc B* 370:20130561. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0561>
24. Farooq Z, Rocklöv J, Wallin J, Abiri N, Sewe MO, Sjödin H, Semenza JC (2022) Artificial intelligence to predict West Nile virus outbreaks with eco-climatic drivers. *The Lancet Regional Health - Europe* 17:100370. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2022.100370>
25. Saiz J-C, Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Escribano-Romero E, Poderoso T, Jiménez De Oya N (2021) Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation. *Virulence* 12:1145–1173. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1908740>
26. Van Leur SW, Heunis T, Munnur D, Sanyal S (2021) Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence* 12:2814–2838. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>
27. MacLachlan NJ, Dubovi JE (2017) *Flaviviridae*. In: MacLachlan NJ, Dubovi JE (eds) *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*, Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00029-5>
28. Kaaijk P, Luytjes W (2018) Are we prepared for emerging flaviviruses in Europe? Challenges for vaccination. *Hum Vaccine Immunother* 14:337–344. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1389363>
29. Saron WAA, Rathore APS, Ting L, Ooi EE, Low J, Abraham SN, John ALS (2018) Flavivirus serocomplex cross-reactive immunity is protective by activating heterologous memory CD4 T cells. *Sci Adv* 4:eaar4297. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar4297>
30. Oliphant T, Nybakken GE, Engle M, Xu Q, Nelson CA, Sukupolvi-Petty S, Marri A, Lachmi B-E, Olshevsky U, Fremont DH, Pierson TC, Diamond MS (2006) Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein. *J Virol* 80:12149–12159. <https://doi.org/10.1128/JVI.01732-06>

31. Hurtado-Monzón AM, Cordero-Rivera CD, Farfan-Morales CN, Osuna-Ramos JF, De Jesús-González LA, Reyes-Ruiz JM, Del Ángel RM (2020) The role of anti-flavivirus humoral immune response in protection and pathogenesis. *Rev Med Virol* 30:e2100. <https://doi.org/10.1002/rmv.2100>
32. Sárdi, S, Szentpáli-Gavallér, K, Bakonyi, T, Szenci, O, Kutasi, O (2012) Lovak nyugat-nílusi vírus okozta agy- és gerincvelő gyulladása. Irodalmi áttekintés. *Magy Állatorvosok Lapja* 134:707–717
33. Bai F, Thompson EA, Vig PJS, Leis AA (2019) Current Understanding of West Nile Virus Clinical Manifestations, Immune Responses, Neuroinvasion, and Immunotherapeutic Implications. *Pathogens* 8:193. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040193>
34. Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H (2020) West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications. *Pathogens* 9:589. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070589>
35. Byas AD, Ebel GD (2020) Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals. *Pathogens* 9:48. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010048>
36. Garcia-Tapia D, Hassett DE, Mitchell WJ, Johnson GC, Kleiboeker SB (2007) West Nile virus encephalitis: sequential histopathological and immunological events in a murine model of infection. *J Neurovirol* 13:130–138. <https://doi.org/10.1080/13550280601187185>
37. Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B, Nerurkar VR, Verma S (2012) West Nile virus-induced disruption of the blood–brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J Gen Virol* 93:1193–1203. <https://doi.org/10.1099/vir.0.040899-0>
38. Samuel MA, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD, Diamond MS (2007) Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17140–17145. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705837104>
39. Valko, A, Lőrincz, M (2020). *Immunológiai illusztrációk könyve*
40. Quicke K, Suthar M (2013) The Innate Immune Playbook for Restricting West Nile Virus Infection. *Viruses* 5:2643–2658. <https://doi.org/10.3390/v5112643>
41. Hassert M, Brien JD, Pinto AK (2019) The Temporal Role of Cytokines in Flavivirus Protection and Pathogenesis. *Curr Clin Micro Rpt* 6:25–33. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0106-x>
42. Wang Y, Liu L, Davies DR, Segal DM (2010) Dimerization of Toll-like Receptor 3 (TLR3) Is Required for Ligand Binding. *J Biol Chem* 285:36836–36841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167973>
43. Samuel MA, Diamond MS (2005) Alpha/Beta Interferon Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Restricting Cellular Tropism and Enhancing Neuronal Survival. *J Virol* 79:13350–13361. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13350-13361.2005>
44. Tizard RI (2016) *Veterinary Immunology*. Elsevier Health Sciences, 2017
45. Bourne N, Scholle F, Silva MC, Rossi SL, Dewsbury N, Judy B, De Aguiar JB, Leon MA, Estes DM, Fayzulín R, Mason PW (2007) Early Production of Type I Interferon during West Nile Virus Infection: Role for Lymphoid Tissues in IRF3-Independent Interferon Production. *J Virol* 81:9100–9108. <https://doi.org/10.1128/JVI.00316-07>
46. Qian F, Wang X, Zhang L, Lin A, Zhao H, Fikrig E, Montgomery RR (2011) Impaired Interferon Signaling in Dendritic Cells From Older Donors Infected In Vitro With West Nile Virus. *J Infect Dis* 203:1415–1424. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir048>
47. Gervais A, Rovida F, Avanzini MA, Croce S, Marchal A, Lin S-C, Ferrari A, Thorball CW, Constant O, Le Voyer T, Philippot Q, Rosain J, Angelini M, Pérez Lorenzo M, Bizien L, Achille C, Trespidi F, Burdino E, Cassaniti I, Lilleri D, Fornara C, Sammartino JC, Cereda D, Marrocu C, Piralla A, Valsecchi C, Ricagno S, Cogo P, Neth O, Marín-Cruz I, Pacenti M, Sinigaglia A, Trevisan M, Volpe A, Marzollo A, Conti F, Lazzarotto T, Pession A, Viale P, Fellay J, Ghirardello S, Aubart M, Ghisetti V, Aiuti A, Jouanguy E, Bastard P, Percivalle E, Baldanti F, Puel A, MacDonald MR, Rice CM, Rossini G, Murray KO, Simonin Y, Nagy A, Barzon L, Abel L, Diamond MS, Cobat A, Zhang S-Y, Casanova J-L, Borghesi A (2023) Autoantibodies neutralizing type I IFNs underlie West Nile virus encephalitis in ~40% of patients. *J Exp Med* 220:e20230661. <https://doi.org/10.1084/jem.20230661>
48. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM (2013) T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* 37:273–283. <https://doi.org/10.1152/advan.00066.2013>
49. Zimmerman MG, Bowen JR, McDonald CE, Pulendran B, Suthar MS (2019) West Nile Virus Infection Blocks Inflammatory Response and T Cell Costimulatory Capacity of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Virol* 93:e00664–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00664-19>
50. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol* 2012:1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
51. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123:326–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x>
52. Spellberg B, Edwards JE (2001) Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 32:76–102. <https://doi.org/10.1086/317537>
53. Ransohoff RM, Engelhardt B (2012) The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 12:623–635. <https://doi.org/10.1038/nri3265>
54. Engelhardt B, Coisne C (2011) Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS* 8:4. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-4>
55. Ai S, Klein RS (2020) Update on T cells in the virally infected brain: friends and foes. *Curr Opin Neurol* 33:405–412. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000825>
56. Nayak D, Zinselmeyer BH, Corps KN, McGavern DB (2012) In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *IntraVital* 1:95–106. <https://doi.org/10.4161/intv.22823>
57. Ransohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122:1164–1171. <https://doi.org/10.1172/JCI58644>
58. Furr, M (2015) *Immunology of the Central Nervous System*. In: Furr, M, Reed, MS (eds) *Equine Neurology*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118993712.ch3>
59. Bardina SV, Michlmayr D, Hoffman KW, Obara CJ, Sum J, Charo IF, Lu W, Pletnev AG, Lim JK (2015) Differential Roles of Chemokines CCL2 and CCL7 in Monocytosis and Leukocyte Migration during West Nile Virus Infection. *J Immunol* 195:4306–4318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500352>
60. Durrant DM, Daniels BP, Pasieka T, Dorsey D, Klein RS (2015) CCR5 limits cortical viral loads during West Nile virus infection of the central nervous system. *J Neuroinflammation* 12:233. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0447-9>

61. Klein RS, Lin E, Zhang B, Luster AD, Tollett J, Samuel MA, Engle M, Diamond MS (2005) Neuronal CXCL10 Directs CD8 α T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis. *J Virol* 79:11457–11466. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.17.11457-11466.2005>
62. Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, Pape J, Cheshier RC, Murphy PM (2006) CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med* 203:35–40. <https://doi.org/10.1084/jem.20051970>
63. Durrant DM, Robinette ML, Klein RS (2013) IL-1R1 is required for dendritic cell-mediated T cell reactivation within the CNS during West Nile virus encephalitis. *J Exp Med* 210:503–516. <https://doi.org/10.1084/jem.20121897>
64. Durrant DM, Daniels BP, Klein RS (2014) IL-1R1 Signaling Regulates CXCL12-Mediated T Cell Localization and Fate within the Central Nervous System during West Nile Virus Encephalitis. *J Immunol* 193:4095–4106. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401192>
65. Wang Y, Lobigs M, Lee E, Müllbacher A (2003) CD8 T Cells Mediate Recovery and Immunopathology in West Nile Virus Encephalitis. *J Virol* 77:13323–13334. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.24.13323-13334.2003>
66. Wang Y, Lobigs M, Lee E, Müllbacher A (2004) Exocytosis and Fas mediated cytolytic mechanisms exert protection from West Nile virus induced encephalitis in mice. *Immunol Cell Biol* 82:170–173. <https://doi.org/10.1046/j.0818-9641.2004.01227.x>
67. Shrestha B, Samuel MA, Diamond MS (2006) CD8 α T Cells Require Perforin To Clear West Nile Virus from Infected Neurons. *J Virol* 80:119–129. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.1.119-129.2006>
68. Rowell JF, Griffin DE (2002) Contribution of T cells to mortality in neurovirulent Sindbis virus encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 127:106–114. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00108-X](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00108-X)
69. Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R, Clark WR (1994) Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10854–10858. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.10854>
70. Shrestha B, Wang T, Samuel MA, Whitby K, Craft J, Fikrig E, Diamond MS (2006) Gamma Interferon Plays a Crucial Early Antiviral Role in Protection against West Nile Virus Infection. *J Virol* 80:5338–5348. <https://doi.org/10.1128/JVI.00274-06>
71. Shrestha B, Zhang B, Purtha WE, Klein RS, Diamond MS (2008) Tumor Necrosis Factor Alpha Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Promoting Trafficking of Mononuclear Leukocytes into the Central Nervous System. *J Virol* 82:8956–8964. <https://doi.org/10.1128/JVI.01118-08>
72. Chan-Tack KM, Forrest G (2006) West Nile Virus Meningoencephalitis and Acute Flaccid Paralysis After Infliximab Treatment. *J Rheumatol* 33:191–192
73. Shen J, T-To SS, Schrieber L, King NJ (1997) Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines. *J Virol* 71:9323–9332. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9323-9332.1997>
74. Sitati EM, Diamond MS (2006) CD4 $^{+}$ T-Cell Responses Are Required for Clearance of West Nile Virus from the Central Nervous System. *J Virol* 80:12060–12069. <https://doi.org/10.1128/JVI.01650-06>
75. Brien JD, Uhrlaub JL, Nikolich-Zugich J (2008) West Nile Virus-Specific CD4 T Cells Exhibit Direct Antiviral Cytokine Secretion and Cytotoxicity and Are Sufficient for Antiviral Protection. *J Immunol* 181:8568–8575. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8568>
76. Lanteri MC, Diamond MS, Law JP, Chew GM, Wu S, Ingellis HC, Wong D, Busch MP, Norris PJ, Ndhlovu LC (2014) Increased Frequency of Tim-3 Expressing T Cells Is Associated with Symptomatic West Nile Virus Infection. *PLoS ONE* 9:e92134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092134>
77. Lanteri MC, O'Brien KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, Owen RE, Heitman JW, Custer B, Hirschhorn DF, Tobler LH, Kiely N, Prince HE, Ndhlovu LC, Nixon DF, Kamel HT, Kelvin DJ, Busch MP, Rudensky AY, Diamond MS, Norris PJ (2009) Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J Clin Invest* 119:3266–3277. <https://doi.org/10.1172/JCI39387>
78. Graham JB, Swarts JL, Thomas S, Voss KM, Sekine A, Green R, Ireton RC, Gale M, Lund JM (2019) Immune Correlates of Protection From West Nile Virus Neuroinvasion and Disease. *J Infect Dis* 219:1162–1171. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy623>
79. James EA, Gates TJ, LaFond RE, Yamamoto S, Ni C, Mai D, Gersuk VH, O'Brien K, Nguyen Q-A, Zeitner B, Lanteri MC, Norris PJ, Chaussabel D, Malhotra U, Kwok WW (2016) Neuroinvasive West Nile Infection Elicits Elevated and Atypically Polarized T Cell Responses That Promote a Pathogenic Outcome. *PLoS Pathog* 12:e1005375. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005375>
80. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP (2014) Human memory T cell generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14:24–35. <https://doi.org/10.1038/nri3567>
81. Wherry EJ, Ahmed R (2004) Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J Virol* 78:5535–5545. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004>
82. Woodland DL, Kohlmeier JE (2009) Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 9:153–161. <https://doi.org/10.1038/nri2496>
83. Gray JJ, Westerhof LM, MacLeod MKL (2018) The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. *Immunology* 154:574–581. <https://doi.org/10.1111/imm.12929>

Közlésre érkező: 2024. júli. 29.

Klinikumok

BÓDAI EMESE és BAKOS ZOLTÁN újszülött csikók légcsőátmérőjét határozták meg ultrahangvizsgálat segítségével. A megfelelő méretű endotrachealis tubus kiválasztása újszülött csikók inhalációs anesztéziájához gyakran bonyolult feladat. A humán gyakorlatban sikeresen alkalmaznak ultrahangvizsgálat során végzett mérést a gége- és a légcsőátmérők meghatározásához, így a megfelelő légcsőtubus kiválasztásához. A munkájuk célja az volt, hogy felmérjék, csikókban alkalmazható-e az ultrahanggal történő mérés a gége és a légcső átmérőinek meghatározására, és az így kapott adatok mennyire tükrözik a valóságot. A 2023-as szezonban a Lógyógyászati Tanszék és Klinikára érkező 10 újszülött csikót (életkor: 0–32 nap) vizsgálták. Feljegyezték a csikók fajtáját, korát, nemét, testtömegét, ill. a vemhesség hosszát. Megmérték a csikók marmagasságát, övméretét, testhosszát, háthosszát, a nyak körmértét két ponton, valamint a nyak hosszát dorsalisán az orrtól a marig, valamint ventralisan az orrtól a mellkasbejáratig. Ezután elvégezték a felső légutak ultrahangvizsgálatát 6 MHz-es lineáris vizsgálófejjel, melynek során megmérték a gége és a légcső átmérőit. A mérést a gége esetén egy ponton, a legszélesebb síkban, a légcsőét pedig három ponton, az atlas szárnyának vonalában, a nyak közepén és a mellkasbejáratban végezték. A valamilyen egyéb ok miatt bódított vagy altatott csikókról latero-laterális röntgenfelvételeket is készítettek, hogy a különböző képalkotási eljárásokkal nyert mérési adatokat is össze tudják hasonlítani. Két esetben CT-vizsgálatot is végeztek a pontos mérésekhez, valamint az elhullott csikók gége- és légcsőátmérőit lemérték kipreparálva az adott pontokon, és összehasonlították az eredményeket, hogy képet kapjanak az ultrahangos méréseik megbízhatóságáról. Az eddigi eredményeik alapján az ultrahangvizsgálattal végzett mérések alkalmasak az újszülött csikók gége- és légcsőátmérőinek meghatározására, így a módszer segítséget nyújthat a megfelelő méretű légcsőtubus kiválasztásához. Az eljárás jól alkalmazható klinikai körülmények között, hiszen gyors, nem invazív, és nem szükséges hozzá bódítás, így rossz általános állapotban lévő egyedeken is biztonságosan elvégezhető. Az idei szezonban további csikókat szeretnének bevonni a mérésekbe, hogy tovább pontosítsák a mérési módszert, emelve annak megbízhatóságát, valamint esetleges összefüggéseket keressenek a felvett testméretek és az átmérők között. A hallgatóság kérdést tett fel a legcaudalisabban elvégzett mérési ponttal kapcsolatban, amely válaszból kiderült, hogy ennek klinikai jelentősége lehet tracheostomia esetén. A gége átmérőjének méréséről ugyancsak elhangzott

kérdés, válaszában az előadó kitért arra, hogy a gége hypoplasiája ritka, így a légcsőtübs méretét általában a légcső átmérője limitálja.

BOROS KOPPÁNY, SUE DYSON és NAGY ANNAMÁRIA angol telivér versenylovak elülső csüdizületeinek képalkotó diagnosztikai vizsgálatáról készítették egy longitudinális tanulmányt. Aktívan versenyző angol telivér versenylovak elülső csüdizületeinek képalkotó diagnosztikai módszerekkel detektálható elváltozásairól összehasonlító, ill. longitudinális adatok még nem állnak rendelkezésre. A vizsgálat célja angol telivér versenylovak elülső csüdizületeiben detektálható adaptív és patológiás jellegű komputertomográfiás (CT-), mágneses rezonanciás (MRI-), és röntgenelváltozások leírása a versenytréning kezdetét követő két évben volt. A kutatásba 40, a galopp tréning kezdetén álló sántaságmentes, egyéves angol telivér lett bevéve. Egy kezdeti vizsgálatot követően további négy alkalommal végezték el a lovak fizikális vizsgálatát, szubjektív és objektív sántaságvizsgálatot, az elülső csüdizületek CT-, MRI- és röntgenvizsgálatát. Ezt egy alkalommal a hátulsó csüdizületek állóhelyzetű CT-vizsgálatával egészítették ki tíz ló esetében. Az első vizsgálat képalkotó diagnosztikai felvételeinek szubjektív, valamint az első három vizsgálat esetében a hármass metacarpalis csont (McIII) sagittalis taraj CT-elváltozásainak szubjektív és objektív kiértékelése megtörtént. A további felvételek elemzése folyamatosan zajlik, különös tekintettel a proximalis szezámcsontok, a metacarpalis condylusok és a csüdcsont proximalis részének elváltozásaira. Emellett az elülső és hátulsó csüdizületekben található elváltozások összehasonlítása is folyamatban van. Az első vizsgálat során készült CT-felvételeken osteochondrosisra utaló hipoattenuáló elváltozás volt azonosítható a McIII sagittalis tarajában 33/80 (41,3%) végtagon. Gyakori volt a denzitás növekedést jelző enyhe hiperattenuáció a metacarpalis condylusok trabecularis csontjának dorsomedialis (36/80) és palmarolateralis (25/80) részén. Focalis elváltozás volt detektálható a csüdcsont ($n = 19$) és a McIII ($n = 11$) subchondralis csontjában. Kitágult ércsatornák voltak láthatók a metacarpalis condylusokban 57/80 végtagon és a proximalis szezámcsontokban minden végtagon. A McIII sagittalis taraj CT-elváltozások nyomon követésével a csontdenzitás növekedése volt detektálható a tréning első hat hónapjában, valamint a hipoattenuáló elváltozások gyógyulásra való hajlama volt megállapítható a lovak kétéves korában is. Következtetésképpen, fiatal angol telivér lovak elülső csüdizületeiben gyakoriak a modern képalkotó diagnosztikai eljárásokkal detektálható elváltozások, ezeknek kis része képezhető le röntgenfelvételeken. Az elváltozások nyomon követése szükséges a klinikai jelentőség, valamint a körfejlődés megítéléséhez. A hallgatóság kérdést tett

fel az MRI-vizsgálatokról, amelyek külön publikációban fognak megjelenni. A szerzők válaszukban arra is kitértek, hogy mivel low-field MRI-t használtak, bizonyos elváltozások nem voltak detektálhatók, amelyek CT-vel azonban igen. A hallgatóság és a szerzők között diskusszió alakult ki a sántaság diagnosztikájáról, amelynek a legmegbízhatóbb módszere a szerzők szerint továbbra is a diagnosztikai érzéstelenítés, azonban egyre több és megbízhatóbb mesterséges intelligencia által használható módszert is ismertettek. A kutatás az FK 138825 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, az FK_21 „OTKA” Fiatal kutatói kiválósági program finanszírozásában valósult meg. Munkájukat az NKB kutatási pályázat támogatta. A kutatás a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-5 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült. NAGY ANNAMÁRIA Bolyai János tudományos ösztöndíjban részesült.

LACZKÓ LEHEL, SOLYMOSSI NORBERT, LACZKÓ LÁSZLÓ és NÉMETH TIBOR a sebészi terápia hatékonyságát vizsgálták pre- és posztoperatív klinikai és radiológiai adatok elemzésével Hansen I típusú porckorongsérves kutyákban. A kutyák leggyakoribb gerincbetegsége a Hansen I típusú porckorongsér, amely 3,5% prevalenciával fordul elő. A betegség degeneratív jellegű, amelynek kóroktanát sikerült korábban megismerni. A prospektív kutatás célja volt, hogy bizonyítsa vagy cáfolja a nagy felbontóképességű képalkotó eljárásokkal meghatározott gerincvelő-kompresszió mértékének prognosztikai faktorként való alkalmazhatóságát. További szempontként vizsgálták a gerincsérv korszerű műtéti ellátásának hatékonyságát a pre- és posztoperatív morfológiai és neurológiai klinikai adatok változása alapján. Hipotézisként feltételezték, hogy pozitív korreláció áll fent a gerincsérv volumene által kialakított kompresszió súlyossága és a preoperatív neurológiai státusz között, ill. a dekompresszió mértéke és a posztoperatív neurológiai státusz között. A vizsgálatba bevont esetek feltétele volt, hogy a neurológiai diagnózis kizárólag chondrodystrophiás kutyák thoracolumbaris gerincszakaszt érintő Hansen I típusú IVDD legyen. Konkurens neurológiai vagy ortopédiai betegségek kizárásra kerültek. Mindegyik esetben a fizikális neurológiai kategorizálást követően CT- és MRI-vizsgálatokat egyaránt végeztek, majd a diagnózist követően azonnali dekompressziós műtéti beavatkozást (hemilaminectomia) végzett ugyanaz a tapasztalt ortopédsebész (MKOE-tag). Ezt követően további tulajdonosi beleegyezésre a műtétet követően kontroll CT- és MRI-felvételek készültek. A képalkotó vizsgálatok méréseit pre- és posztoperatív is elvégezték, és azok számszerű értékeit vetették össze

a pre- és posztoperatív klinikai státuszt jellemző adatokkal (pl. módosított Frankel-skála, önálló vizeletürítés visszatérésig eltelt napok száma stb.). Szignifikáns összefüggést találtak a preoperatív myelonátmérő (CT) és az önálló vizeletürítés visszatéréséig eltelt napok száma között ($p = 0.625$, $p = 0.01282$): minél nagyobb a preoperatív átmérő (azaz minél kisebb mértékű a kompresszió), annál rövidebb idő alatt normalizálódik a vizeletürítés. Egy korábbi kutatásban összefüggést igazoltak a rosszabb klinikai stádiumok (MFS) és később visszatérő önálló vizeletürítés és járás között. Ugyanakkor bizonyítást nyert az is, hogy az önálló vizeletürítés és az önálló járóképesség visszatérése eltérő időpontban következik be, amit a kutatásuk is megerősít. Ebből kifolyólag a CT által meghatározott kompresszió csak közvetett módon lehet alkalmas megbecsülni a járóképesség visszatérésének valószínűsíthető időpontját. A hallgatóság kérdést tett fel arról, hogy milyen eséllyel alakul ki újabb sérv a műtétet követően és ez mennyire befolyásolná a klinikai tüneteket. A szakirodalmi adatok alapján erre kevés az esély, azonban ezek megléte csak kontroll MRI segítségével lett volna pontosan megmondható.

SZELÉNYI ZOLTÁN, LIPTHAY ILDIKÓ, SÁNTA ATTILA, LÉNÁRT LEA, RÉPÁSI ATTILA és SZENCI OTTÓ egy vemhességi gyorsteszt által adott vemhességi eredmények értékelését vizsgálták. A tejtermelő szarvasmarha-állományokban tapasztalható termeléskoncentráció új kihívás elé állítja a gyakorlatban dolgozó szakembereket. A megnövekedett munkamennyiség egyrészt hosszú távon egészségkárosodást okozhat, elsősorban a szarvasmarha- és lópraxisban dolgozó állatorvosoknak, másrészt a kapacitási problémák miatt a vemhességvizsgálati módszerek folyamatos felülvizsgálatát igényli. Munkájuk célja egy új vemhességvizsgálati teszt gyakorlati alkalmazásának validálása volt, az eredmények összehasonlítása a transrectalis ultrahangvizsgálatok eredményével a vemhesség korai szakaszában. Egy-egy és többször ellett állatok vemhességvizsgálatát végezték el egyrészt transrectalis ultrahangvizsgálattal, másrészt egy vemhességi gyorsteszt (Alertys On Farm Test) segítségével, amely teszt a laterális diffúzió elvén működik. 637 állat került vemhességvizsgálatra, a vemhességi ultrahangvizsgálatokat a termékenyítéstől számított 28–35. napon végezték, ugyanaznap, amikor a vemhességi gyorstesztet is. A megerősítő vemhességi diagnózis a termékenyítéstől számított 57–64. napon történt, transrectalis tapintásos vizsgálattal. További adatokat gyűjtöttek az ellés sorszámaról, az ellésről és a termékenyítésről. A vemhességi gyorsteszt pontossága 93,1% volt, ahol is az érzékenység 98,9%, a specificitás 88,7%, a pozitív előrejelző érték 86,8%, míg a negatív előrejelző érték 99,1% volt. Első ellésű állatokban az érzékenység 100%, a specificitás 81,6%, míg többször

ellett állatokban az érzékenység 98,5% és a specificitás 89,5% voltak. A vemhességi veszteségek mértéke a laktáció sorszámaival növekedett. Az első ellésű állatok 2,6%-os vesztesége mellett a harmadik laktációjukat teljesítő állatok vesztesége 17,6% volt. Az évszaknak is volt hatása, a tavaszi termékenyítésekből származó állatok gyakrabban mentek át a vemhesség elvesztésén, mint az ősziek. Az állatorvosi munkafolyamatokat is értékelték. A két vemhességvizsgálati módszer kombinálásával: először laterális diffúziós teszt, majd ultrahangvizsgálattal vizsgálva az előző tesztben negatív állatokat 32 és 74% közötti csökkenést lehetett elérni a vizsgált állatok számában. A teszt alkalmazásával jó eredményeket lehetett elérni növendék üszőkben, valamint első laktációjukat teljesítő állatoknál, ezért a későbbiekben felmerül, hogy a megnövekedett arányú transrectalis ultrahangvizsgálatok helyettesíthetők a vérből történő rutinszerű vemhességvizsgálattal. Eredményeiket azonban jelentős mértékben befolyásolta a laktáció sorszáma, valamint állományszinten a vemhesség elvesztésének mértéke. A hallgatóság kérdést tett fel a vemhesülési arányról, amely befolyásolhatja a teszt megbízhatóságát. A szerzők tapasztalatai alapján a vemhesülési arány megfelelt a szakirodalmi adatoknak. A hallgatóság és a szerzők tanácskoztak a teszt jelentőségéről, amely a negatív eredmények esetében nyilvánul meg a korai vemhesség diagnosztikánál, ugyanis ezekkel az állatokkal kell az állatorvosnak a későbbiekben foglalkozni, amennyiben ezek a tesztek nagyobb arányban felhasználásra kerülnek. Kutatásukat az Állatorvostudományi Egyetem Kutatási Pályázat No. SRF-001 pályázata támogatta.

Bakos Zoltán



GRASSLANDHU

Pannon gyepek és kapcsolódó élőhelyek hosszú távú
megőrzése a Priorizált Akció Tervben foglalt
intézkedések megvalósításával



@ grassland@hoi.hu
facebook.com/grasslandlifeip
insatgram.com/grasslandlifeip



A **LIFE IP GRASSLAND-HU**
(LIFE17 IPE/HU/000018) projekt
az Európai Unió LIFE programjának
támogatásával valósul meg.



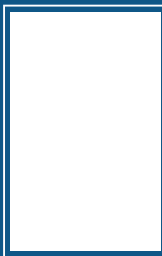
**Hirdetési
felületek már
60 000 Ft-tól**

Többszöri megjelenés esetén
további engedményeket
biztosítunk

Hirdessen Ön is a Magyar Állatorvosok Lapja c. tudományos-szakmai folyóiratban!

Most kedvező áron tesszük közzé hirdetését!

Felület	Méret (mm)	Nettó ár (Ft)
1/1	200 X 285	130 000
1/2	200 X 142	110 000
1/3	200 X 95	75 000
1/4	200 X 70	60 000
B2, B3, B4	200 X 285	155 000
PR	-	100 000



1/1 tükrös
méret



1/1 kifutó
tükrös



1/2
méret



1/3
méret



1/4
méret



- › VIDÉKFEJLESZTÉS
- › AGRÁRSZAKKÉPZÉS
- › TERMÉSZETMEGŐRZÉS