

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA

Hungarian Veterinary Journal
Vol. 144. No. 2. – Budapest, February 2022.
Established by Prof. B. Nádaskay, 1878

Grade III/high grade mastocytoma kutyában

LÓ

Lovak odontoclast-sejtes fogfelszívódása és hypercementosisa

KISÁLLAT

P-glikoprotein immunhisztokémiai és áramlásos citometriai összehasonlító vizsgálata kutyák mastocytomái esetében

A kisállat-biztosítások megítélése és tapasztalatai az állattulajdonosok és az állatorvosok között Magyarországon

Bélrendszeri károsodást jelző biomarkerek vizsgálata *Isospora*-fertőzött kutyákban

VIROLÓGIA

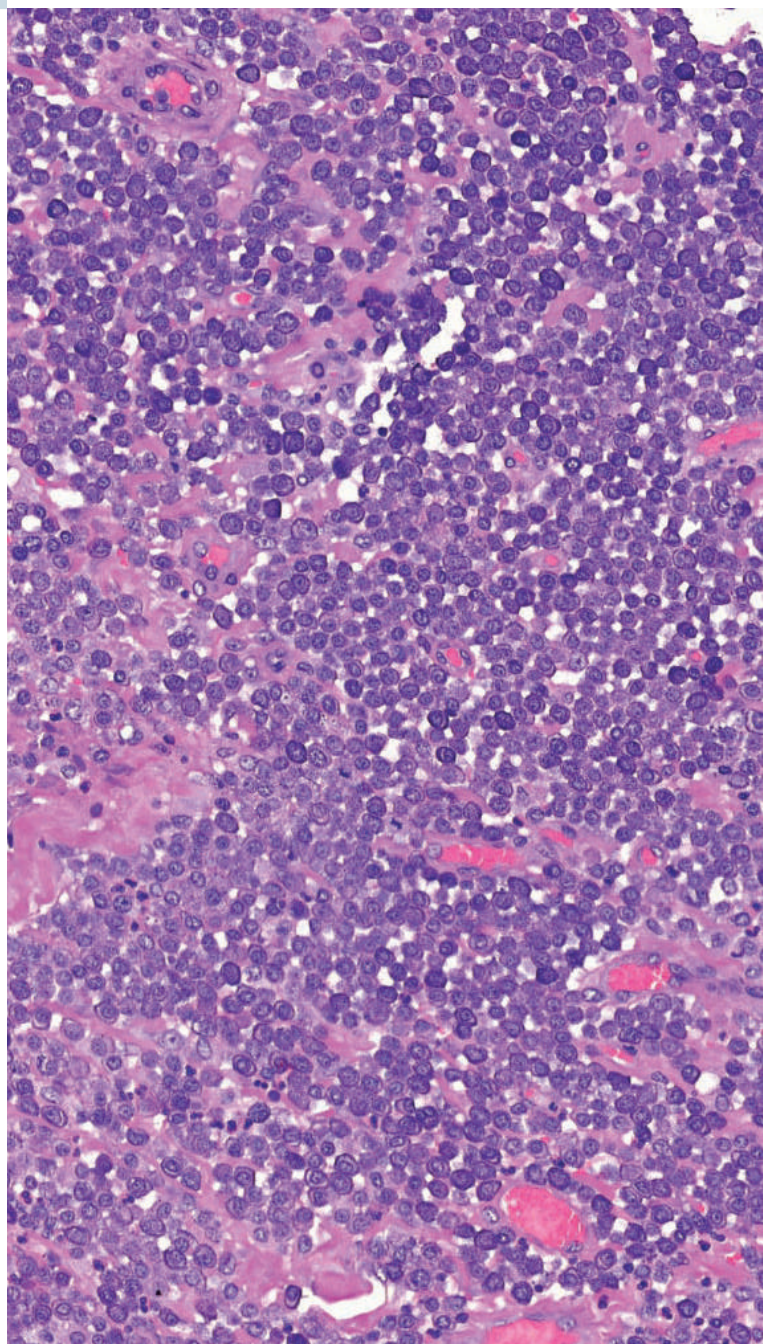
Kezdeti tapasztalatok az amplikon-mélyszekvenálás PRRS-mentesítési programba történő integrálásával kapcsolatban

ALMA MATER

A magyar nyelvű állatorvosi szakon 2021/2022-es tanévben végzett hallgatók névsora

FELHÍVÁS

Jubileumi diploma jelentkezés





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					



Bővebb információért keresse kollégáinkat a lenti elérhetőségek bármelyikén:
 Postacím: Herman Ottó Intézet Nonprofit Kft.
 1223 Budapest, Park u. 2.
 Telefon: 06-1/362-8100
 E-mail: info@agrarlapok.hu

LÓ / EQUINE

67. Joó K., Trúzsi R. L., Lengyel D. Á., Jakab Sz.: Lovak odontoclast-sejtes fogfelszívódása és hypercementosisa
Irodalmi összefoglaló
K. Joó, R. L. Trúzsi, D. Á. Lengyel, Sz. Jakab: Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis Literature review

KISÁLLAT / SMALL ANIMALS

77. Dékay V., Vajdovich P., Karai E.: P-glikoprotein immunhisztokémiai és áramlási citometriai összehasonlító vizsgálata kutyák mastocytomái esetében
V. Dékay, P. Vajdovich, E. Karai: Comparative study of P-glycoprotein detection by immunohistochemistry and flow cytometry in canine dermal mast cell tumors
91. Révész A., Ózsvári L.: A kisállat-biztosítások megítélése és tapasztalatai az állattulajdonosok és az állatorvosok között Magyarországon
A. Révész, L. Ózsvári: The perception and experience of pet insurance among pet owners and veterinary practitioners in Hungary
101. I. K. Yıldız, M. Ok: Bérendszeri károsodást jelző biomarkerek vizsgálata *Isospora*-fertőzött kutyákban
I. K. Yıldız, M. Ok: Investigation of selected intestinal damage biomarkers in determination of intestinal damage in dogs with isosporiasis

VIROLÓGIA / VIROLOGY

115. Jakab Sz., Marton Sz., Szabó I., Kecskeméti S., Bálint Á., Bányai K.: Kezdeti tapasztalatok az amplicon-mélyszekvenálás PRRS-mentesítési programba történő integrálásával kapcsolatban
Sz. Jakab, Sz. Marton, I. Szabó, S. Kecskeméti, Á. Bálint, K. Bányai: Preliminary observations concerning the integration of amplicon deep sequencing in the PRRS eradication program

ALMA MATER

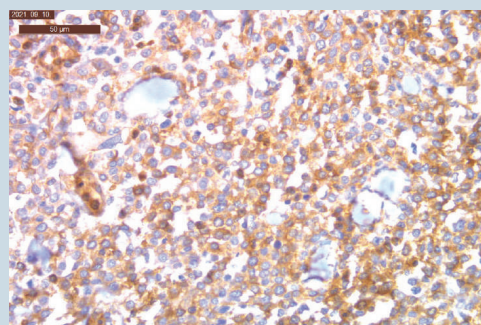
76. A magyar nyelvű állatorvosi szakon 2021/2022-es tanévben végzett hallgatók névsora

FELHÍVÁS

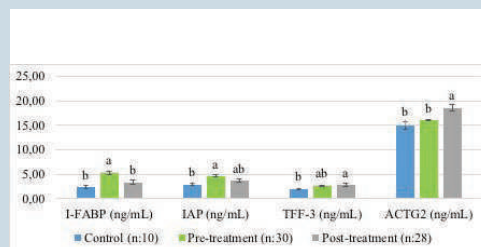
76. Jubileumi diploma jelentkezés



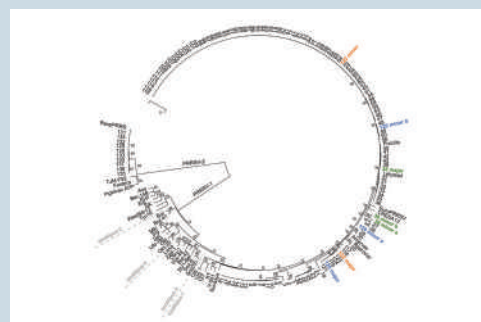
72. EOTRH lóban



83. P-gp-expresszió cutan mastocytomában



107. Bélkárosodást jelző biomarkerek kutyákban

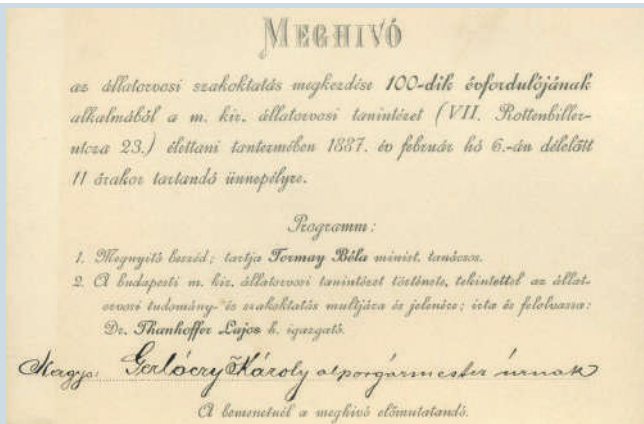


122. PRRSV ORF5-törzsfa

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 szerkesztőségétől/
Subscription orders to the Editorial Office (address above)

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



Meghívó 1887-ből

Szerény, kétórás ünnepi ülésel emlékeztek a hazai állatorvosképzés megindulásának 100. évfordulójára 135. évvel ezelőtt, 1887. február 6-án 11 órakor, az élettani előadóban. Az ünnep fényét persze nem a hossza, hanem a tartalma és a résztvevői adják. A terem pedig már 11 óra előtt zsúfolásig megtelt. Az első sorokban illusztris vendégek foglaltak helyet, közöttük SZÉCHENYI PÁL földművelés-, ipar- és kereskedelemügyi miniszter, BERNOLÁK SÁNDOR és LIPTHAY ISTVÁN miniszteri tanácsosok, a teljes állategészségügyi osztály, MARKUSOVSKY LAJOS kultuszminisztériumi tanácsos, FODOR JÓZSEF és KORÁNYI FRIGYES egyetemi tanárok, KLIMA MIKLÓS állami főállatorvos. A tudósítások nem említik GERLÓCZY KÁROLY alpolgármestert, akinek a képen látható meghívót címezték. Mellettük foglalt helyet a teljes tanári kar, a hátsó sorokat pedig a hallgatók töltötték meg. TREFORT ÁGOSTON kultuszminiszter levélben köszöntötte a jubiláló intézményt.

Először TORMAY BÉLA igazgató mondott beszédet, amelyben az állatgyógyászatnak a gazdasági életben betöltött szerepét méltatta. Őt THANHOFFER LAJOS helyettes igazgató előadása követte „Az állatorvosi tudomány és állatorvosi tanintézetünk története” címmel. Az állatorvoslás és az állatorvostudomány világtörténetének felvázolása után THANHOFFER nagy tisztelettel és megbecsüléssel emlékezett a hazai állatorvosi szakoktatás úttörőire, akik igen nehéz körülmények között vezették be e tudományszak oktatását a pesti egyetem orvosi fakultásán. Kezdetben csak elméleti órákat tarthattak az orvos- és sebésznövendékeknek. A gyakorlati képzés csak akkor kezdődhetett meg, amikor az állatgyógyászati tanszék önálló épülethez jutott. Az állatorvostudomány fejlődésével egyre több tanszék jött létre, egyre jobban képzett, külföldi tapasztalatokkal felvértezett oktatókkal. A hallgatók előképzettsége és az állatorvosi tanfolyam hossza is növekedett. Amikor végre a Rottenbiller utcai campusra költözhetek, ott helyezték el az országos jelentőségű vegykísérleti és a magvizsgáló állomást is. Az évforduló előtti időszakban működésüket megkezdő oktatók (LIEBERMANN, CZAKÓ, AZARY, PLÓSZ, HUTYRA) voltak a biztosítékai az európai színvonal elérésének. Nekik (s a már ott dolgozóknak) köszönhető, hogy – mint THANHOFFER írta – „...az önálló búvárlatokon vagy önálló tapasztalatokon alapuló értekezések- és nagyobb műveknek nemcsak száma, de belértéke is felkeltette intézetünk iránt az érdeklődést”.

Az ünnepséget SZÉCHENYI PÁL miniszter köszöntője zárta.

Orbán Éva

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) 362-8100
 Telefax: (36-1) 362-8104
 Internet: www.agrarlapok.hu
 E-mail: info@agrarlapok.hu
 Felelős kiadó: Bozzay Péter ügyvezető

HIRDETÉSEK FELVÉTELE

Telefon: (36-70) 232-4231, (36-1) 362-8100
 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

Markovics Réka

NYOMÁS

Zemplén-Vektor Kft.
 3900 Szerencs, Csalogány köz 5.

INDEX: 25531
 HU ISSN 0025-004X

LAPTULAJDONOS



KIADÓ



**Equine odontoclastic
tooth resorption and
hypercementosis**

Literature review

K. Joó^{1*}
R. L. Trúzsi²
D. Á. Lengyel²
Sz. Jakab³**Lovak odontoclast-sejtes
fogfelszívódása
és hypercementosisa
Irodalmi összefoglaló****Joó Kinga^{1*}, Trúzsi Roxána Laura², Lengyel Dóra Ágnes², Jakab Szilárd³**

1. Magyar Agrár- és Élettudományi
Egyetem, Kaposvári Campus,
Állattenyésztési Tudományok
Doktori Iskola,
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.

*e-mail: joo.kinga1@gmail.com

2. Állatorvostudományi Egyetem,
Budapest

3. Zetavet Állatklinika,
Zetelaka,
Románia

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők irodalmi adatok és saját tapasztalataik alapján bemutatják a lovak odontoclast-sejtes fogfelszívódását, amely az idős lovak metsző- és szemfogait érinti leggyakrabban, jellemzői a fogfelszívódás és -átépülés, a cementlerakódás és a periodontalis elváltozások. A kórképnek 7 típusa és 5 szakasza létezik. Tünetei a fogakat érintő, fizikális vizsgálattal is látható bulbosus elváltozás, erős fájdalom, rágási és harapási nehézségek, nyálzás, szájból kihulló takarmány, fejrázás, visszatérő étvágytalanság és fogyás is lehetnek, azonban a kórkép tünetmentes is maradhat. A diagnosztika radiológiailag lehetséges, az érintett fogak kihúzása (akár az összes metsző- és szemfogat beleértve) a ló életminőségének jelentős javulásához és a táplálékfelvétel könnyítéséhez vezet. Foghúzás nélkül a betegség kórjoslata rossz.

SUMMARY

Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis (EOTRH) is a relatively recently described condition of aged horses as an uncommon or possibly under-recognized disorder affecting primarily incisors and canine teeth. The disorder appears to increase with age and is characterized by tooth resorption and destruction in addition to cemental deposition either subsequently or concurrently. Clinical signs include pain, masticatory difficulty, quidding, hypersalivation, halitosis, biting problems, head shaking, periodic inappetence and weight loss. Risk factors of the disease include trauma caused by excessive dentistry, periodontal disease, type of feed, genetics and hormonal conditions such as equine Cushing's disease (pituitary pars intermedia dysfunction; PPID) and equine metabolic syndrome. Presumably the disease does not have a single determinant but rather occurs as the result of the cumulative impact of several risk factors. Radiography is the key in fully assessing the disease. The radiographic findings include radiopaque densities involving the alveolar tooth roots, shifting of the teeth, osteomyelitis of the alveolar and surrounding bone, and widened periodontal spaces, the teeth may appear as having bulbous enlargement with or without resorption. The disease is progressive and invariably results in the extraction of the tooth or teeth involved. Complete removal of all incisors seems radical, but often significantly improves the horse's quality of life and their ability toprehend feed. Until the aetiology of EOTRH is more fully understood, extraction of all clinically and radiographically affected teeth remains the treatment of choice, as no effective tooth-preserving therapy has yet been presented.

LÓ

A lovak odontoclast-sejtes fogfelszívódása és hypercementosis (equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis, EOTRH) egy viszonylag újonnan leírt kórkép. Elsőként KLUGH (2004) mutatta be a betegség klinikumát lovakban, mint egy ritka vagy feltehetően aluldiagnosztizált kórképet, amely idősebb lovak metsző- és szemfogait érintheti [1]. Ezt követően a kórfolyamat szövettani hátterét STASZYK és MTSAI írták le [2]. A betegség megjelenésének gyakorisága a kor előrehaladtával nő, jellegzetessége a fogfelszívódás és -átépülés, továbbá egyidejű vagy következményes cementdepozíció, ami gyakran összefüggésbe hozható a párhuzamosan kialakuló periodontális elváltozásokkal [2, 3].

A folyamatban leggyakrabban a metsző- és szemfogak érintettek

Az EOTRH egy újonnan leírt, idős lovakban jelentkező, fogfelszívódással, -átépüléssel és cementlerakódással járó kórkép

Habár a folyamatban leggyakrabban a metsző- és szemfogak érintettek, ritkán megfigyelhető a praemolaris és molaris fogak esetén is [4, 5]. A betegség jellemzően 15 éves kor felett jelenik meg és distomesialis irányba (a molaris fogaktól a metszőfogak felé) progrediál [3, 4]. Az EOTRH kifejezett fájdalommal járhat együtt, de lehet tünetmentes is, míg a reszorptív és proliferatív folyamatokhoz kapcsolt periodontitis súlyossá nem válik [4, 6]. Egy tanulmány során a 14 évnél idősebb állatok esetében a vizsgált lovak 88%-ánál diagnosztizálták a betegség valamelyik stádiumát radiológiai vizsgálattal, amely nem minden esetben jelentett klinikai tünetekben is megnyilvánuló formát [7].

A BETEGSÉG EREDETE ÉS TÍPUSAI

A betegség pontos kóroktana még nem tisztázott

Bár számos elméletet leírtak, az EOTRH pontos eredete egyelőre nem tisztázott [3, 6, 8]. Tekintve, hogy az embereknek és a macskáknak is létezik hasonló, immunmediált szindrómája, a lovak esetében is felmerül, hogy immunológiai eredetű folyamat áll a betegség hátterében [9]. Emberekben a foggyökerek idiopatikus felszívódásáról (multiple idiopathic root resorption, MIRR) [10], macskák esetén fogfelszívódásról (tooth resorption, TR), korábbi nevén odontoclast-sejtes fogfelszívódásról (feline odontoclastic resorptive lesion, FORL) beszélünk [11–13].

Egy másik elmélet szerint a betegség egyik kiváltó oka lehet, hogy a rágás közben kifejtett erő jelentős mechanikai stressznek teszi ki a periodontális szalagot [2, 14, 15]. Ennek hátterében az áll, hogy idős lovak esetén a periodontális szalagok aránya csökken a fogak rágófelszínéhez képest, azonban ezek továbbra is ugyanakkora terhelésnek vannak kitéve, mint a fiatal lovak fogai [16]. Ez a mechanikai stressz citokinfel szabadulást, valamint a periodontális ligamentum mikronecrosist és nem-szeptikus gyulladást eredményezi, de a folyamat a későbbiek során septicussá válhat [17]. A citokinek aktiválják a clast-sejteket: az odontoclastok, a cementoclastok és az osteoclastok a fog kemény szöveteinek és a periodontiumnak a pusztulását okozzák. Ekkor a fog reszorpciójáról beszélhetünk, ami akár a pulpáig is terjedhet [2, 18]. A reszorpció egy másodlagos, reparatív reakciót vált ki, amely során a cementoblastok szabálytalan elrendezésű kollagénrostokból álló, ún. szabálytalan cementet termelnek. Ez egy kontrollálatlan folyamat, ami a periodontális ligamentum térből ered és az érintett fogak felszínének bulbosus megnagyobbodását eredményezi [2, 7, 15]. Az is felmerült, hogy maga a periodontális gyulladás váltja ki a fog reszorpcióját [7, 19].

A kialakuló szövetelhalás és fogfelszívódás megfelelő környezetet biztosít egyes mikroorganizmusok megtelepedésének és szaporodásának. Egy 2014-es tanulmány szerint a *Treponema* és *Tannerella* baktériumfajok minden EOTRH-ot mutató ló esetében jelen voltak. Az eredmény felveti, hogy ezeknek a baktériumoknak is szerepe lehet a kórfejlődésben. Ugyanakkor a kontroll csoportban lévő lovakból is mutattak ki *Treponema* fajokat, ami megkérdőjelezi az előbbi feltevést [20].

A rágófogak is érintettek lehetnek EOTRH-ban, amelynek kialakulása során a cement mennyisége aránytalanul növekszik a dentinhez és a zománchoz képest.

A kórkép azonban csak sokkal enyhébb periodontalis elváltozásokban nyilvánul meg, mint az a metszőfogak esetében megfigyelhető. Nem kifejezettek továbbá a koronán lévő elváltozások sem, sőt, előfordul, hogy ezek nem is detektálhatóak [5, 8]. Egyelőre tisztázatlan, hogy az EOTRH ritkább-e a rágófogakban, vagy csak aluldiagnosztizált az előbb említett okok miatt [5]. Érdekes, hogy a hypercementosis a maxillaris rágófogaknak a palatális, a mandibularis rágófogaknak pedig a buccalis felszínén figyelhető meg. Pont azokon a régiókon, amelyek a legjobban ki vannak téve a biomechanikai erőknél a rágási folyamat során, ami az idős lovakban még kifejezettebb [21]. Ez tovább erősíti az elméletet, miszerint a biomechanikai tényezők hangsúlyosak az EOTRH oktatában.

A betegség hajlamosító tényezői között szerepel a metszőfogak túlreszelése

Az elmélet a szemfogak esetén mégis ellentmondásosnak tűnhet, hiszen ezek a fogak nincsenek kitéve a rágás okozta erőhatásoknak [3]. Egy vizsgálat során azonban igazolták, hogy a metszőfogakra kifejtett erő, ugyan sokkal kisebb mértékben, de tovább tud vezetődni az állkapocsra és a margo interalveolarison keresztül a szemfogak periodontalis területeire is [16]. A betegség hajlamosító tényezői között szerepel a nem megfelelően végrehajtott fogászati beavatkozás, a metszőfogak túlreszelése, ugyanis a mechanikus sérülés következtében stimulálódnak a cementoblast-sejtek. A cementnek nagy az ásványianyag-tartalma (65%), ezen belül is jelentős kalcium-hidroxipatit, ezért azt is feltételezik, hogy ha a mechanikus sérüléshez még nagy kalciumtartalmú takarmány (mint pl. lucerna) etetése is társul, az tovább fokozhatja az EOTRH kialakulásának lehetőségét [22]. Egy tanulmány szerint kétszer nagyobb az EOTRH kialakulásának veszélye olyan lovak esetében, amelyek csak lucernát kapnak szálas takarmányként [22]. A lucerna elfogyasztása lényegesen kevesebb időt vesz igénybe, mint a fűszénáé, a ló kevesebbet rág, kevesebb nyál termelődik, kevesebb ideig lesz lefelé hajtva a feje. Ilyen esetben a nyál kevésbé fogja „öblíteni” a metszőfogakat, így ez is hozzájárulhat a kórfolyamat kialakulásához [22]. Továbbá azt is feltételezik, hogy a lovak Cushing-szindrómája, azaz a hipofízis pars intermedia diszfunkciója (pituitary pars intermedia dysfunction, PPID) vagy a lovak metabolikus szindrómája (equine metabolic syndrome, EMS) esetén nagyobb a valószínűsége az EOTRH kialakulásának. Ennek lehetséges magyarázata az immunszuppresszív állapot, de a kortizol, ill. glükóz és inzulin megemelkedett plazmaszintje közvetlenül is hozzájárulhat a periodontalis elváltozások kialakulásához [22]. Egyéb okok, mint genetikai tényezők, A-hypervitaminosis vagy hyperparathyreosis is hajlamosíthatnak a betegségekre [23]. Más tanulmányok szerint nincs ismert fajta, genetikai, takarmányozási vagy menedzsmenttel kapcsolatos predispozíció [8, 18].

Az EORTH összetett kóroktanú betegség, amihez a biomechanikai hatások és egyes baktériumok is hozzájárulhatnak

Ezek az elméletek egyelőre nincsenek igazolva, és mint a legtöbb betegség, az EOTRH is valószínűleg összetett oktanú [15]. Azonban a kórszövettani leletek következetesen alátámasztják, hogy a betegséghez alapvetően hozzájárulnak a biomechanikai erőhatások, valamint a következményesen megtelepedő mikroorganizmusok [2, 19].

A betegséget jellemző két folyamat, a felszívódás és a hypercementosis aránya eltérő lehet az érintett fogakban. Ez a két tényező alapján a betegségnek 3 megjelenési formája létezik: a reszorpció-domináns, a hypercementosis-domináns, és a reszorpció és hypercementosis kombinálta forma [4]. Míg a reszorpció típusra jellemzőbb lehet a gyulladás és a fertőződés, a hypercementosis-domináns típus esetén a gyulladással járó folyamatok gátoltak és a reparatív folyamatok kerülnek előtérbe [24]. Bizonyos fokú reszorpció és hypercementosis minden esetben igazolható szövettanilag az EOTRH-tal érintett fogakban [2, 17, 18].

Radiológiai kritériumok alapján a fogak reszorpciójának különböző típusait és stádiumait lehet elkülöníteni

Radiológiai kritériumok alapján a fogak reszorpciójának különböző típusait és stádiumait lehet elkülöníteni. A reszorpció típusok alapján lehet 1) külső felületi reszorpció, 2) külső átépüléssel járó reszorpció, 3) külső gyulladással járó reszorpció, 4) külső nyaki és gyökér felületi reszorpció, 5) belső felületi reszorpció, 6) belső átépüléssel járó reszorpció.

**A külső átépülé-
ses reszorpció a
legelterjedtebb típus**

reszorpció, 7) belső gyulladással reszorpció, ill. nem osztályozható, ha a jellemzői nem felelnek meg a kritériumoknak [7].

A külső átépüléssel reszorpció a legelterjedtebb típus. A leggyakrabban érintett fog (mind a felső, mind az alsó fogsorban) csökkenő sorrendben a szegletfog, középfog és végül a fogófog. A külső gyulladással reszorpció a második leggyakoribb reszorpciótípus. A leggyakrabban érintett fog (mind a felső, mind az alsó fogsorban) csökkenő sorrendben a fogófog, ezt követi a középfog, majd a szegletfog [7].

HENRY és mtsai vizsgálataik során azt találták, hogy hypercementosis esetén mindig megfigyelhető volt a fog reszorpciója is, azonban nem minden fogreszorpcióhoz társult hypercementosis. A korábbi elméletek helyett hasznosabb lehet először a reszorpció típusát meghatározni, majd a hypercementosist reparatív folyamatként jellemezni a klinikai esetekben. Tehát a cementproliferáció (hypercementosis) inkább reparatív folyamat, mintsem primer betegség [7].

A fogreszorpció stádiumai pedig az alábbiak szerint csoportosíthatóak [15]:

1. *A fogállomány enyhe károsodása* (cementállományt vagy cementállományt és zománcot érintő folyamat).
2. *A fogállomány közepes károsodása* (cementállományt vagy cementállományt és zománcot érintő folyamat, a dentin megfogyatkozása nem terjed a pulpa üregbe).
3. *A fogállomány mélyre terjedő károsodása* (cement állományt vagy cement állományt és zománcot érintő folyamat, a dentin megfogyatkozása a pulpa üregbe terjed), a legtöbb fog megőrzi integritását.
4. *A fogállomány kifejezett károsodása* (cementállományt vagy cementállományt és zománcot érintő folyamat, a dentin megfogyatkozása a pulpa-üregbe terjed), a legtöbb fog elveszíti az integritását.
 - 4a: A korona és a gyökér egyformán érintett.
 - 4b: A korona kifejezettebben érintett, mint a gyökér.
 - 4c: A gyökér kifejezettebben érintett, mint a korona.
5. *A fogállomány maradványok már csak fokozott radiodezintású területeken láthatóak, az íny teljesen befedi azokat* (ez azonban ritka lovak esetén).

KLINIKUM, DIAGNOSZTIKA**Az EORTH leginkább
idős, 20 év feletti
lovakban jelentkezik**

Az EOTRH általában idős állatokban megjelenő elváltozás, egy tanulmányban a lovak átlagéletkora 24 (17–29) [18], míg egy másik tanulmányban 21,7 (10–32) volt [8]. Herélt lovakban, melegvérű lovakban és telivérekben gyakoribb a betegség, ami arra is visszavezethető lehet, hogy nem egyenletes a lópopulációkban a fogászati vizsgálatok száma [8]. A betegség erős fájdalommal járhat, rágási nehézség, nyálzás, harapási nehézség, szájból kihulló takarmány, bűzös lehelet, fejrázás, visszatérő étvágytalanság és fogyás is jelentkezhet [4], de az is előfordulhat, hogy előrehaladott állapotban is tünetmentes marad egy ló.

A szájüregi vizsgálat során, az íny gyulladása, ödémája és a fogközi papillák méretcsökkenése figyelhető meg [4]. Továbbá fogkő, ételmaradványok, subgingivalis duzzanatok, vagy akár ínnyen található járatok is megjelenhetnek [4]. Előrehaladott esetben a foggyökér göbszerű megnövekedése, a fogak mozgása és következményes periodontális elváltozások, végül a fogak törése és elvesztése következhet be (1. ábra) [4].

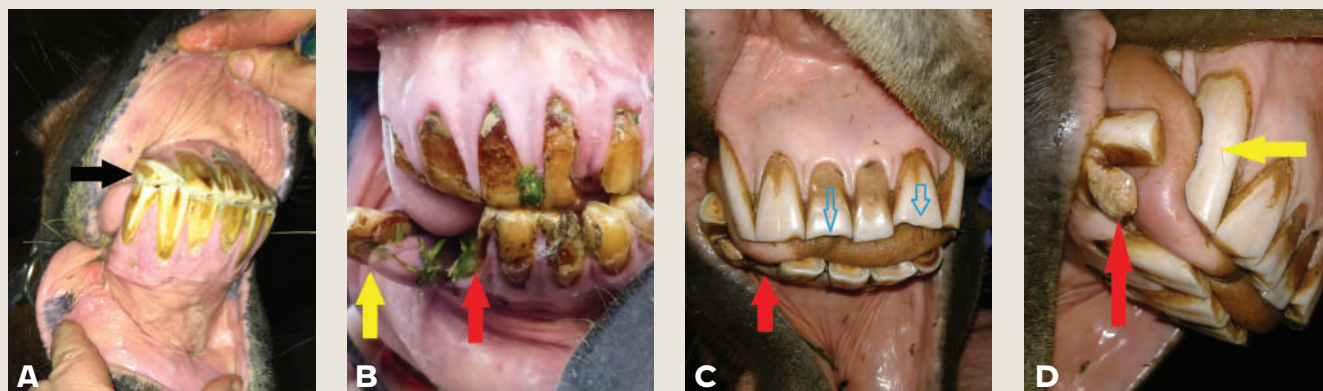
A felső fogsor metszőfogai vélhetően hamarabb válnak érintetté, mint az alsó fogsor metszőfogai, de a betegség progresszív jellege miatt az összes metszőfog érintetté fog válni a betegség előrehaladtával, sőt, akár a szemfogakon is megjelenhetnek az elváltozások [18].

A betegség pontos és korai diagnosztizálása radiológiailag lehetséges, ugyanis a korai elváltozások jelentős része először subgingivalisan jelentkezik [18, 19].

**Megfigyelhető az íny
gyulladás, ödémája
és a fogközi papillák
méretcsökkenése**

A betegség pontos és korai diagnosztizálása radiológiaiag lehetséges

A metszőfogakról és a szemfogakról készített intraoralis röntgenfelvételek könnyen kivitelezhetők istálló körülmények között is, bódított állatban. Ideális az ún. bisecting angle módszer alkalmazása, amelynek a kivitelezését a 2. ábra szemlélteti [25].



1. ÁBRA. Lovak odontoclast-sejtes fogfelszívódásáról és hypercementosisáról (szájüreg felől)

- A) Viszonylag enyhe elváltozások a szájüreg felől (drenáló járatok és ínygyulladás), 103-as fog kisfokú diagonálisitása (fekete nyíl). (Az enyhe szájüreg felőli elváltozások ellenére kifejezett radiológiaiag elváltozások /lásd később: 3. ábra/)
- B) Kifejezett ínyesorvadás, csontfogyás, hypercementosis, abnormálisan kopott rágófelszín, fogkő, 402-es fog patológiás törése (piros nyíl), 403-as fog diszlokációja (sárga nyíl)
- C), D) Abnormálisan kopott rágófelszín (kék nyílak), 402-es fog hiányzik (piros nyíl), 403-as fog diszlokációja következtében abnormálisan kopott a 103-as fog (sárga nyíl)

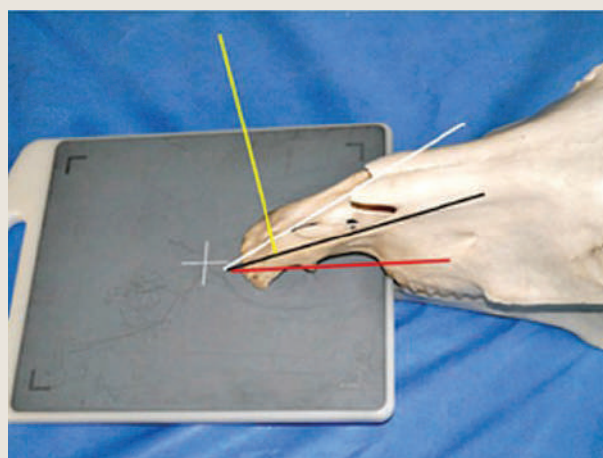
FIGURE 1. Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis (from the oral cavity)

- A) Clinically mild lesions (draining tracts and gingivitis), 103 small degree of diagonality (black arrow). (Despite the mild lesions within the oral cavity, marked lesions visible on radiographic image /see figure 3./)
- B) Marked gingival recession, bone loss, hypercementosis, odontolith, pathological tooth fracture (402, red arrow), dislocation (403, yellow arrow)
- C), D) Abrasion of the dental table (blue arrow), absent (402, red arrow), secondary to the dislocation of 403 there is an abnormal abrasion of the 103 teeth (yellow arrow)

2. ÁBRA. A centrális röntgensugár (sárga vonal) merőleges szöveget zár be azzal a síkkal (fekete vonal), ami kettészeli a metszőfog gyökere menti sík (fehér vonal) és a röntgen kazetta síkja (piros vonal) által bezárt szöveget
Érdeemes a lovaknál szedációt alkalmazni a nyelv- és rágómozgások elkerülése végett [25]

FIGURE 2. The central beam (yellow line) is directed perpendicular to the plane (black line) that bisects the angle between the incisor reserve crown root (white line) and the sensor (red line, D)

The patient must be sedated adequately to prevent chewing and tongue motion [25]



A röntgenfelvételen megfigyelhető lehet
 - fogfelszívódás
 - a periodontalis ligamentum tér kiszélesedése
 - a fogmederben lévő gyökér hagymaszerű megnövekedése
 - alveolaris reszorpció vagy csontátépülés is

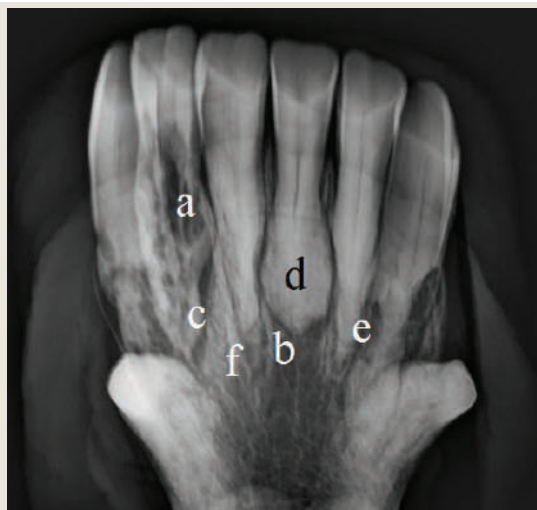
A röntgenfelvételen megfigyelhető lehet a fogfelszívódás, a periodontalis ligamentum tér kiszélesedése, a fogmederben lévő gyökér hagymaszerű megnövekedése, és az alveolaris reszorpció vagy csontátépülés is (3. ábra) [26]. LORELLO és mtsai (2015) azt találták, hogy idős lovak esetében a szájjüreg felől egészségesnek tűnő fogak is radiológiailag gyakran EOTRH-szerű elváltozásokat mutatnak [18]. A fogreszorpció-típusok meghatározásának klinikai jelentősége abban rejlik, hogy míg a gyulladással reszorpció esetén tipikusan szükséges kezelni a lovakat, addig az átépüléssel reszorpció esetén nem igényelnek kezelést [15]. A fogreszorpció stádiumainak meghatározása szintén segítségünkre lehet kezelés és a kórjóslat meghatározásában. A dentinállomány egy érzékeny szövet és a 2. stádiumtól kezdődően már fájdalmat érezhet a ló a betegség következtében [15].

3. ÁBRA. Dorsoventralis röntgenfelvétel egy ló mandibulájának rostralis részéről, láthatóak a EOTRH jellegzetes elváltozásai (1/a képhez tartozó röntgenfelvétel)

A korona (a) és a gyökér (b) reszorptív elváltozásai, a periodontalis ligamentum tér kiszélesedése (c), az intraalveolaris gyökér bulbosus megnagyobbodása (d), periapicalis alveolaris csontlízis (e), kondenzáló osteitis (periapicalis alveolaris csontsclerosis) (f)

FIGURE 3. A dorsoventral radiograph of the rostral mandible of a horse showing the typical radiographic changes associated with EOTRH (radiography of case present in image 1/a)

Resorptive lesions of the reserve crown (a) and apex (b), widening of the periodontal ligament space (c), bulbous enlargement of the intra-alveolar crown-root (d), periapical alveolar bone lysis (e), areas of condensing osteitis (periapical alveolar bone sclerosis) (f)



Fontos elkülöníteni az EOTRH-ot az idős korban jelentkező – hasonló klinikai/radiológiai képpel társuló – elváltozásoktól (pl. lekerekedett gyökércsúcs, a periodontalis rész kiszélesedése, alveolaris sclerosis és a periodontitis/periodontosis következtében kialakuló alveolaris csontreszorpciótól és csontátépüléstől) [15, 24].

További vizsgálatok szükségesek specifikusabb radiológiai jellegzetességek feltárására, ill. patognomikus tünetek vagy más diagnosztikai módszerek felkutatásához.

KEZELÉS, MENEDZSMENT

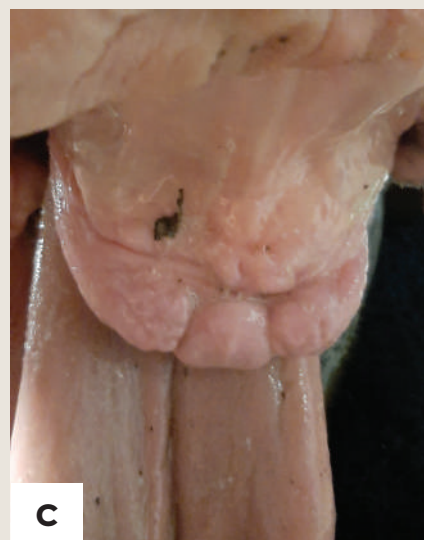
Az EOTRH által okozott fájdalmas táplálékfelvétel és rágás kezelésére a foghúzás az egyetlen megoldás

Az EOTRH által okozott fájdalmas táplálékfelvétel és rágás kezelésére jelenlegi ismereteink szerint foghúzás nélkül nincs érdemi lehetőség, de a betegség korai stádiumban diagnosztizálva, éveken át kielégítően menedzselhető. A gyakori – legalább félévente elvégzett – szájjüregi és radiológiai vizsgálat kulcsfontosságú, hiszen a betegség kórlefolyása nagyban eltér az egyes eseteknél [4]. A betegség korai szakaszában segíthet, ha a fogak között gyakran kialakuló diasztémákba betömörült, bomló takarmányt eltávolítják, ill. jelentősen javítja a száj higiéniés státuszát helyileg klórhexidin-glükonát oldat használata is [27]. Más szerzők szerint, a kóros elváltozások lassítására akár fájdalomcsillapítást, antibiotikumos kúrát, takarmánymódosítást, kortikoszteroidos kezelést, műtéti kürettálást is lehet alkalmazni [14]. A betegség progresszivitásának következtében azonban a foghúzás, – az elváltozások okozta táplálékfelvételi anomáliák és a fokozódó fájdalom orvoslására – elkerülhetetlenné válik. Amint az ínnyel fedett elváltozások (periodontitis, osteomyelitis, fogtörések, kifejezett fog reszorpció) a szájjüreg felől vizsgálva vagy radiológiailag megfigyelhetővé válnak, a fogak kihúzása marad az egyetlen megoldás [4]. Habár az összes metszőfog eltávolítása nagyon radikálisan hangzik, mégis gyakran ez vezet

a ló életminőségének jelentős javulásához, továbbá ez könnyíti meg a táplálékfelvételt is (4. ábra) [6]. Foghúzás nélkül a betegség kórjoslata a legjobb esetben is kétes, de inkább rossz kimenetelű [28], azonban az összes érintett fog eltávolításával (5. ábra) jó eséllyel nagy mértékben javítható az állatok életminősége [18].

4. ÁBRA. Kihúzott EOTRH metszőfogak

FIGURE 4. Multiple extracted EOTRH incisor teeth



5. ÁBRA. A képen látható EOTRH esetről az összes mandibularis és maxillaris metszőfog eltávolításra került, ezzel egy időben részleges alveolus reszekció történt, az alveolus feletti nyálkahártya egyesítése nélkül. A posztoperatív terápia így nyitott alveolus mellett történt

A) A felvétel a foghúzás után 9 nappal készült, megfigyelhető a metszőfogak eltávolítását követően elődomborodó mesialis szájpadrólási redő (piros nyíl)

B) A felvétel a foghúzás után 3 héttel készült, szabályosan granulálódó és epithelizálódó alveolus (fekete nyilak)

C) A felvétel a foghúzás után 6 hónappal készült

FIGURE 5. A case that underwent complete extraction of all mandibular incisors and all maxillary incisors. At the same time a partial alveolar resection was performed without fusion of the mucosa above the alveolus, thus postoperative therapy was performed with an open alveolus.

A) The image was taken 9 days post extraction, note the protruding mesial cleft palate fold after the extraction of the incisors (red arrow)

B) The image was taken 3 weeks post extraction, note the normally granulating and epithelializing alveolus (black arrows)

C) The image was taken 6 months post extraction

**A metszőfogak
eltávolítása történhet
foghúzással vagy
sebészi feltárással**

**A foghúzást követően a
lovak képesek a széna
és az abraktakarmány
elfogyasztására, sőt
akár legelésre is**

Összességében elmondható az EOTRH-val kapcsolatban, hogy fontos a betegség korai felismerése, és radiológiai diagnosztikája, az esetleges lokális kezelések elvégzése, és a tulajdonos felkészítése és meggyőzése arra vonatkozóan, hogy az állat megfelelő életminőségének megtartása, és a fájdalommentes táplálékfelvétel megőrzése érdekében, az érintett fogak eltávolítása idővel nem elkerülhető.

A metszőfogak eltávolítása történhet foghúzással vagy sebészi feltárással (pl.: buccotomia, transcorticalis osteotomia, replúzió) attól függően, hogy milyen jellegű és súlyosságú az elváltozás. A fogak kihúzása jól kivitelezhető álló helyzetű bódítás során, regionális anesztézia alkalmazása mellett [4]. A foghúzást követően az alveolus fragmentum mentességének igazolására javasolt a radiológiai kontroll [18]. Súlyos EOTRH esetén, amikor az összes metszőfog eltávolítása szükséges, a tulajdonost részletesen tájékoztatni kell a posztoperatív kezelésről, a takarmányozásról, a nyelv előesésének lehetőségéről (6. ábra) és a prognózisról [4]. Az előrehaladott esetekben fontos, hogy megfelelő gyakorlattal rendelkező sebész végezze a beavatkozást, a fog, ill. az alveolus fragmentációjának jelentős kockázata miatt. A lovak kis diszkomfortot mutatnak a metszőfogak teljes eltávolítását követően, ami jól kontrollálható nem-szteroid gyulladáscsökkentőkkel, továbbá 7–10 napos antibiotikumkúra is javasolt a fertőzések megelőzése végett [4]. A foghúzást követően a lovak képesek a széna és az abraktakarmány elfogyasztására is, sőt, a legtöbb lótulajdonos arról számol be, hogy a lovak kiválóan tudnak legelni, az ajkaikkal tépik le a fűvet [4]. Ettől függetlenül javasolni kell az áztatott pellet etetését kiegészítő takarmányként [6].

6. ÁBRA. A nyelv előesése a foghúzást követően gyakori jelenség

FIGURE 6. Tongue protrusion often occurs following incisor extractions



A legtöbb idős ló számára semmiféle nehézséget nem jelent a metszőfogak nélküli élet; egészséges, állatjóléti szempontok szerint is kedvező életet tudnak élni, miután eltávolításra kerültek a beteg fogak [18].

ÖSSZEGRZÉS

Amíg az EOTRH kialakulásának hátterét nem sikerül teljesen megérteni és feltárni, addig a klinikailag és radiológiai is érintett fogak (általában az összes metszőfog) eltávolítása marad a kezelési megoldás [18]. Habár ez jelenleg egy hatékony és jó megoldást jelent, további kutatásokkal remélhetőleg közelebb kerülhetünk az oktan megértéséhez, és így további terápiás megoldások szülehetnek erre az aluldiagnosztizált, destruktív és igen fájdalmas fogbetegségre.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítése az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-20-4-KE-9 kódszámú Új Nemzeti Kiválósági Programjának támogatásával készült, továbbá a kutatást az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 projekt támogatta.

IRODALOM

1. Klugh DO (2004) Incisor and canine periodontal disease. In: Proceedings of the 18th Annual Veterinary Dental Forum. Fort Worth, TX, USA, pp 166–169
2. Staszyc C, Bienert A, Kreutzer R, Wohlsein P, Simhofer H (2008) Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis. *Vet J* 178:372–379
3. Hole SL (2012) Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis (EOTRH): a review. In: Handbook of Proceedings, 21st ECVD. Lisbon, Portugal, pp 148
4. Earley E, Rawlinson JT (2013) A New Understanding of Oral and Dental Disorders of the Equine Incisor and Canine Teeth. *Vet Clin North Am Equine Pract* 29:273–300
5. Moore NT, Schroeder W, Staszyc C (2015) Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis affecting all cheek teeth in two horses: Clinical and histopathological findings. *Equine Vet Educ* 28:123–130
6. Rawlinson JT, Earley E (2013) Advances in the Treatment of Diseased Equine Incisor and Canine Teeth. *Vet Clin North Am Equine Pract* 29:411–440
7. Henry TJ, Puchalski SM, Arzi B, Kass PH, Verstraete FJM (2017) Radiographic evaluation in clinical practice of the types and stage of incisor tooth resorption and hypercementosis in horses. *Equine Veterinary Journal* 49:486–492
8. Smedley RC, Earley ET, Galloway SS, Baratt RM, Rawlinson JE (2015) Equine Odontoclastic Tooth Resorption and Hypercementosis: Histopathologic Features. *Vet Pathol* 52:903–909
9. Dixon PM, du Toit N, Dacre IT (2011) Equine dental pathology. In: Easley J, Dixon PM, Schumacher J (eds) *Equine dentistry*. 3rd ed., Elsevier, pp 129–147
10. Moody GH, Muir KF (1991) Multiple idiopathic root resorption. A case report and discussion of pathogenesis. *J Clin Periodontol* 18:577–580
11. Okuda A, Harvey CE (1992) Etiopathogenesis of Feline Dental Resorptive Lesions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 22:1385–1404
12. Reiter AM, Mendoza KA (2002) Feline odontoclastic resorptive lesions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 32:791–837
13. Reiter AM, Lewis JR, Okuda A (2005) Update on the Etiology of Tooth Resorption in Domestic Cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 35:913–942
14. Klugh DO (2010) *Principles of equine dentistry*. CRC Press
15. Limone LE (2020) Update on Equine Odontoclastic Tooth Resorption and Hypercementosis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 36:671–689
16. Schrock P, Lüpke M, Seifert H, Staszyc C (2013) Finite element analysis of equine incisor teeth. Part 2: Investigation of stresses and strain energy densities in the periodontal ligament and surrounding bone during tooth movement. *Vet J* 198:590–598
17. Hüls I, Bienert A, Staszyc C (2012) Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis (EOTRH): Röntgenologische und makroskopisch-anatomische Befunde. In: Proceedings. 10. Jahrestagung der Internationalen Gesellschaft zur Funktionsverbesserung der Pferde Zähne (IGFP)
18. Lorello O, Foster DL, Levine DG, Boyle A, Engiles J, Orsini JA (2015) Clinical treatment and prognosis of equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis: Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis. *Equine Vet J* 48:188–194
19. Rahmani V, Häyrynen L, Kareinen I, Ruohoniemi M (2019) History, clinical findings and outcome of horses with radiographical signs of equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis. *Vet Rec* 185:730–730
20. Sykora S, Pieber K, Simhofer H, Hackl V, Brodesser D, Brandt S (2014) Isolation of *Treponema* and *Tannerella* spp. from equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis related periodontal disease: *Treponema* and *Tannerella* spp. in equine periodontitis. *Equine Vet J* 46:358–363
21. Cordes V, Lüpke M, Gardemin M, Seifert H, Staszyc C (2012) Periodontal biomechanics: finite element simulations of closing stroke and power stroke in equine cheek teeth. *BMC Vet Res* 8:60
22. Pearson AM, Mansfield G, Conaway M, Koput K (2013) Associated risk factors of equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis. In: Proceedings of the 59th annual convention of the American association of equine practitioners (AAEP). Nashville, Tennessee, USA, pp 65–70
23. Caldwell LA (2007) Clinical features of chronic disease of the anterior dentition in horses. In: Proceedings of the 21st Annual Veterinary Dental Forum. Minneapolis MN, USA, pp 18–21
24. Hole SL, Staszyc C (2016) Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis. *Equine Vet Educ* 30:386–391
25. Limone LE, Baratt RM (2018) Dental Radiography of the Horse. *J Vet Dent* 35:37–41
26. Tremaine H (2012) A modern approach to equine dentistry 3. Imaging. In *Pract* 34:114–127
27. du Toit N, Rucker BA (2013) The Gold Standard of Dental Care. *Vet Clin North Am Equine Pract* 29:521–527
28. Tremaine H, Casey M (2012) A modern approach to equine dentistry 2. Identifying lesions. In *Pract* 34:78–89

Közlésre érkező: 2021. márc. 12.

A magyar nyelvű állatorvosi szakon 2021/2022-es tanévben végzett hallgatók névsora

Ágics Máttyás István	Károlyi Henrik Fülöp	Nándori Alexandra
Alexa Lili	Kékesy Vince	Nemesánszky Anna Jolán
Alföldi Rozália Anna	Kiss Eszter	Németh Balázs
Androsovits Réka	Kiss Márk	Nógrádi-Szabó Anna
Asztalos Éva	Kiss Szonja Petra	Óberling Gréta Laura
Áy Gergely	Koscsó Dóra	Orosz István
Bánáti László	Kovács Emma	Pálfi Tímea
Bársony Boglárka Gabriella	Kovács Tamás Sándor	Papp Zita
Bede Boglárka	Könczei Áron	Pásti Judit
Békássy Éva	Kővári Sarolta	Pethő Dorottya Kinga
Birinyi Réka Bella	Kurucz Ádám	Piller Pálma
Biró Petra	Kurucz Kata	Pintér Krisztina
Bohár-Bakarecz Fanni	Lambertus Balázs Péter	Pozsár Zsófia
Borus Noémi Eszter	Lázár Eszter	Pupp Katalin Zita
Bőr József	Lengyel Dóra Ágnes	Sáfár Anna Alexandra
Csiló Petra Gabriella	Limboczkai Richárd Dénes	Sebő Levente
Csóka Zsófia	Lipthay Ildikó	Selmeczi Petra Dorina
Csomor Janka	Lőrincz Viktória	Soós Rita
Csurgay Kristóf	Madocsay Alfréd László	Streicher Zita
Dénesi Dalma	Mag Patrik	Szabó Orsolya
Faragó Sándor	Major Edina	Szelva Péter Attila
Farkas Adrienn Emese	Markó Boglárka	Szentgyörgyi Nikolett
Földi Dóra	Medek Noémi Dóra	Szilassy Veronika Orsolya
Fürcht Flóra	Medvecz Réka	Szmetana Kornél Krisztián
Gneth Csaba	Méri Nikolett	Szobonya Csongor Árpád
Hatvany Korinna Boglárka	Dr. Mezeiné Bozsik Anett	Szobonya Péter Ákos
Herczog Anna	Mogyoróssy Ádám István	Szőke Csanád
Holl Ágoston	Mohácsi Luca Sára	Tokareva Marina
Horák Tamara	Molnár Klaudia	Tóth Barnabás
Horváth Anikó Melinda	Molnár Mónika	Tóth Kata Otília
Horváth Ariella Roxána	Montlika Lejla	Tóth Viktória Flávia
Horváth Miksa	Mónus Fanni Márta	Trúzsi Roxána Laura
Hrutka Ivett	Nagy Anita Kitti	Uszkai Virág Zsófia
Huszár Viktória	Nagy Anna Gabriella	Várady Klára
Jenei-Machay Domonkos István	Nagy Nikoletta	Varga Dóra
Kálfalvy-Molnár Lilla	Nagy-Czirok Balázs	Vásárhelyi Balázs
Kaponyás Orsolya	Nagypál Rebeka	Ziszisz Árisz

FELHÍVÁS

Az Állatorvostudományi Egyetem tisztelettel kéri azokat az állatorvosokat, akik oklevelüket 50, 60, 65, 70 illetve 75 évvel ezelőtt szerezték meg, hogy **jubileumi diplomájuk** odaítélése végett jelentkezzenek az Egyetem Tanulmányi Osztályánál.

A **jelentkezési lap** a <https://univet.hu/hu/alumni/alumni-jubileumi-diplomak/> címen található az Egyetem honlapján www.univet.hu, melyhez szíveskedjenek csatolni egy **rövid szakmai önéletrajzot** (max. 1 oldal kb. 25-30 sor, 2200 karakter, szóközökkel együtt) valamint egy db **igazolványképet**. A jelentkezéseket **2022. május 31-ig** kérjük beküldeni elektronikusan a csapo.timea@univet.hu vagy írásban postai úton az ÁTE Tanulmányi Osztály 1078 Budapest, István u. 2. címre.

Comparative study of P-glycoprotein detection by immunohistochemistry and flow cytometry in canine dermal mast cell tumors

V. Dékay^{*1,2}
P. Vajdovich^{1,3}
E. Karai³

1. Állatorvosi Hematológiai és
Onkológiai Központ,
H-1148 Budapest, Bolgárkertész u. 31.

*e-mail: dr.valeria.dekay@gmail.com

2. Mátix Állatorvosi Kórszövettani és
Citológiai Laboratórium,
Budapest

3. Állatorvostudományi Egyetem,
Kórélettani és Onkológiai Tanszék,
Budapest

P-glikoprotein immunhisztokémiai és áramlásos citometriai összehasonlító vizsgálata kutyák mastocytomái esetében

Dékay Valéria^{*1,2}, Vajdovich Péter^{1,3}, Karai Edina³

ÖSSZEFOGLALÁS

A kutyák cutan mastocytomáiban a kemoterápiát megghiúsító multidrog-rezisztencia kialakulásában részt vevő egyik fontos transzmembrán fehérje a P-glikoprotein (P-gp). Vizsgálataik során a szerzők 31 beteg tumorából történt immunhisztokémiai vizsgálat a fehérje expressziójának kimutatására. Ezek közül 25 páciensnél volt lehetőség a P-gp aktivitásának vizsgálatára áramlásos citométerrel is. Az eredmények szerint a kifejeződés mértéke, valamint az aktivitás pozitívan korrelál egymással, és mindkét érték változása tapasztalható a túlélési idővel összefüggésben. Ezeket az időket azonban több tényező befolyásolja, és az okokat nem lehet kizárólag egy transzmembrán funkcióra visszavezetni.

SUMMARY

Background: Dermal mast cell tumor is one of the most common skin tumors in dogs. Chemotherapy is often needed as treatment. P-glycoprotein is one of the most important transmembrane protein in the development of multidrug resistance (MDR) which can be associated with treatment failure.

Objectives: The aim of this study was to evaluate P-gp expression and make comparative examinations with the function of this efflux pump protein by flow cytometry. In addition, we aimed to determine the connection between P-gp results and survival times.

Material and Methods: In our study we examined mast cell tumors of 31 dogs. P-gp expression was detected by immunohistochemistry on paraffin embedded tumor tissue samples. We evaluated the percentage, the intensity and the location of the positive reaction (membrane/cytoplasm). P-gp function was also determined in 25 patients by flow cytometry analyses. Multidrug resistance Activity Factor (MAF) was determined by the calcein assay. Fluorescent signal intensity was determined by flow cytometry in cells with or without verapamil inhibition.

Results and Discussion: According to our examinations, changes of P-gp expression and function (quantifiable with MAF) are positively correlated ($r = 0.542$, $p < 0.05$). This observation was true in chemotherapy-treated patients ($n = 15$), as well. This observation was true in chemotherapy-treated patients ($n = 15$), too. The P-gp expression and MAF increased with „grade” and the survival times and „grade” had a negative correlation. Interestingly, P-gp expression and MAF had correlated positively with overall survival time and relapse free period. We determined several cut off values to make accurate survival analysis and only with 0.17 MAF cut off showed a negative correlation between MAF and relapse free period (sensitivity: 66.7%; specificity: 71.4%; $p = 0.8214$). It should be noted that the overall survival times were significantly influenced by several factors, such as cause of death, degree of malignancy, stage, treatments, so they can not be traced back to exclusively one membrane transporter function.

A hízósejtek malignus átalakulása okozta mastocytoma a kutyák leggyakoribb bőrdaganata, amely az összes bőrtumor mintegy 16–21%-át teszi ki [1, 2]. Jellemzően idősebb, átlagosan 8–9 éves kutyákban fordul elő, azonban egyre gyakrabban jelenik meg fiatal egyedekben is. Egyes vizsgálatok szerint az összes mastocytomás beteget tekintve 3 éves kor alatt 3%-ban, 4–6 éves kor között pedig 25,8%-ban találkozhatunk ezzel a tumortípussal [3]. Legtöbbször keverékekben fordul elő, de bizonyos fajtákban gyakoribb, ilyenek boxer, boston terrier, angol és francia bulldog, mopsz, labrador és golden retrieverek, cocker spániel, schnauzer, staffordshire terrier, beagle, vizslák, shar pei [1, 2, 4]. A megnövekedett kockázati faktor genetikai hátterére vonatkozóan jelenleg is széleskörű kutatások folynak [1].

A mastocytoma a kutyák leggyakoribb bőrdaganata

A hízósejtek degranulációja komoly helyi reakciókat okozhat a daganatban és akár szisztémásan is

A mastocytomák kezelése a megfelelő sebészi kimetszésen alapul

A szövetszaporulat leggyakrabban dermalis és subcutan megjelenésű, jellemzően solitaer, habár statisztikai vizsgálatok alapján a betegek 11–14%-ában multiplex formában jelentkezik [1]. Az úgynevezett visceralis formája a megbetegedésnek jellemzően disszemínált: a hasúri nyirokcsomókba történő infiltráció, a lép, a máj és/vagy a csontvelő érintettsége gyakori ezekben az esetekben. Ezek a formák klinikailag jóval agresszívebbek, a bőrre korlátozódó formáknál, gyorsabban növekednek, invazívak [5].

A bőr mastocytomái igen változatosak lehetnek, sokszor összekeverhetőek nem-daganatos elváltozásokkal. A kis (low grade) malignitású daganatok jellemzően jól körülhatárolt, nem fekélyes duzzanatok, és hónapokig nyugvó állapotban vannak. Ezzel szemben a nem differenciált tumorok gyorsan növekedőek, felszínük gyakrabban kifeléyesedik, környezetük ödémás, kipirult. A hízósejtek granulumaiban hisztamin, heparin és egyéb vazóaktív anyagok termelődhetnek. Ennek megfelelően fizikai behatásra vagy akár a klinikai vizsgálat során a daganatsejtek granulumjai kiürülhetnek (degranulálódhatnak), amelynek következtében helyi ödéma, erythema keletkezhet a környező szövetekben [6]. Kifejezetten nagyméretű, áttétes tumoroknál, vagy szisztémás mastocytosisnál olyan nagymértékű lehet a hízósejteredetű mediátorok felszabadulása, hogy sokkot, hirtelen rosszullétet, hányást, hasmenést, lázat, ritkán elhullást is okozhat [7].

MASTOCYTOMA KEZELÉSI MÓDJAI KUTYÁKBAN

A mastocytomák kezelését tekintve elsődlegesen választandó terápiás lehetőség a műtéti eltávolítás. A helyesen kivitelezett műtéti eljárás hagyományosan 3 cm ép széllel, egy izompólya mélyen volt ajánlott, ám több vizsgálat szerint a grade I és II /low grade primer tumorok esetében már 1–2 cm ép széllel történő eltávolítás is elég a teljes gyógyuláshoz [8]. Emellett egyes tanulmányok szerint nem igazolható statisztikai különbség a teljes túlélés tekintetében a teljes vagy inkomplett eltávolítást követően [8–10]. Amennyiben klinikailag indokolt, adjuváns kezelési módok javasolhatóak, úgymint sugárterápia vagy kemoterápia [1, 11, 12].

A neoadjuvánsan (műtétet megelőzően) adagolt prednisolon 1 mg/ttkg adagban vizsgálatok szerint csökkentheti a tumor méretét, így mérsékelve a kimetszendő terület nagyságát [11]. Kemoterápiás kezelés javasolt abban az esetben, ha a tumor kiterjedése vagy helyeződése miatt műtéti megoldás nem jön szóba, ill. high grade tumorok esetében adjuváns kezelésként alkalmazható. A vinblastin és prednisolon kombinációjával jelentősen megnövekedhet a teljes túlélési idő [12, 13]. Ezen felül lomustin/prednisolon terápia is hatékony lehet, különösen azokban az esetekben, ahol az előző kezelésekre ellenálló, rezisztens mastocytomákról van szó [11].

Alkalmazhatóak az ún. tirozin-kináz inhibitorok (TKI) is, amelyek főként akkor hatékonyak, amikor a c-kit gén mutációja is igazolható főként a juxtamembra-

Tirozin-kináz inhibitorok is alkalmazhatók a mastocytomák terápiájában

nosus domain (exon 11–12), kisebb részben az extracellularis domain (exon 8–9) területén [14, 15]. Ezek közül két hatóanyag állatgyógyászati készítményként is elérhető, a masitinib és a toceranib-foszfát. Ezen szerek a KIT-receptorok ATP-kötő helyeinek kompetitív antagonistái, így képesek gátolni a receptorok aktivítását [11]. Az említett gyógyszereknek számos kombinációs lehetősége létezik, ill. sugárterápiával való alkalmazásuk is hatásos lehet. A kezelések mellé gyomorfekélyre utaló tünetek esetében érdemes H1-blokkolókat (pl. difenhidramin), H2-blokkolókat (pl. famotidin) és egyéb gyomorvédőket (protonpuma-gátlók, bevonók, PGE-analógok) adni [1, 11, 16].

A kemoterápiás kezelést igénylő mastocytomák esetén is előfordulhat multidrog-rezisztencia

A P-GLIKOPROTEIN SZEREPE KUTYÁK MASTOCYTOMÁIBAN

A kemoterápiás kezelést igénylő mastocytomák esetén is találkozhatunk a multidrog-rezisztencia (MDR) problémakörével. A jelenség során a kezelés ellenére recidíva és progresszió tapasztalható. Jellemzően nem csak egy, hanem több gyógyszerre is együttesen alakul ki az ellenállóképesség, tehát a daganatsejtek keresztrezisztenciát mutathatnak a mind hatásmechanizmusukban, mind szerkezetükben különböző citotoxikus szerekkel szemben is, ami gyakorlati szempontból azt jelenti, hogy a beteg daganatát már a kemoterápiás szer változtatásával sem tudjuk megfelelően kezelni [17].

Számos tényező okozhat terápiarezisztenciát. Ilyenek pl. az ABC-membrántranszporterek (ATP-binding cassette transporters), amelyek adenzin-trifoszfát (ATP) segítségével képesek különböző molekulákat átjuttatni a sejtmembránon kívülre [18]. Ide soroljuk a *multidrog-rezisztencia fehérje-1 (MDR1)* génen expresszálandó P170-glükoproteint (P-gp) is, amely a szervezet számára nélkülözhetetlen számos fiziológias folyamathoz [13].

A tumorsejteken helyeződő P-gp membránfehérjék képesek kijuttatni a számukra szubsztrát kemoterápiás szereket

Azonban a tumorsejteken helyeződő P-gp membránfehérjék képesek kijuttatni a számukra szubsztrát kemoterápiás szereket, ezáltal eredményezve terápiarezisztenciát [13, 18]. Ezen pumpafehérje sejtfelszínen való megjelenése esetén a sejtek kemoterápia-indukált apoptosisa kifejezetten rossz hatásfokú, és a daganatos szövetből való kimutatása esetén várható, hogy a tumor kevésbé fog reagálni a citosztatikumokra. Ha ugyanis a membrántranszporterek kijuttatják a sejtekből a kezelésben használt gyógyszert, akkor azok nem tudják kifejteni a hatásukat a sejtekben. Ezáltal a tumort védi meg a behatoló rá nézve káros anyagoktól, ami a beteg szempontjából a kezelés sikertelenségéhez vezet [18]. P-gp által kipumpálható, ún. szubsztrátmolekula többek között a vinblasztin, vinkrisztin, doxorubicin, egyes szteroidok (pl. metil-prednizolon, dexametazon, progesteron), valamint egyes TKI-szerek, mint az imatinib és a gefitinib.

Fokozott P-gp-expresszió esetén a daganat rezisztens lehet a kemoterápiás kezelésre

Számos daganattípus esetén mutattak ki P-gp-pozitivitást immunhisztokémiai/immuncitokémia vizsgálatok segítségével [19, 20]. Mastocytomák esetében a P-gp immunhisztokémiai expresszióját Miyoshi és mtsai vizsgálták különböző malignitású formák esetén [21]. Ugyanakkor lehetőség van a protein által mediált rezisztencia mértékét ún. áramlási citométerrel is meghatározni. Ezzel a módszerrel nem csak a fehérje jelenléte, hanem funkcionális aktivitása is meghatározható. A vizsgálathoz olyan festékanyagok használatosak, amelyek a P-gp protein szubsztrátjai (pl. rhodamin, calcein), és a receptoron történő, extracelluláris térbe való transzport alkalmával detektálhatóak [21, 22].

SAJÁT VIZSGÁLAT

Vizsgálataink során az Állatorvosi Haematológiai és Onkológiai Központban kezelt és nyomon követett mastocytomás kutyák daganatainak P-glikoprotein immunhisztokémiai és áramlási citometriai összehasonlító vizsgálatát végeztük el. Megfigyeltük továbbá ezen mért paraméterek kapcsolatát az egyes klinikai tényezőkkel.

ANYAG ÉS MÓDSZER

BETEGANYAG

Vizsgálataink során összesen 31 cutan mastocytomában szenvedő kutya beteg mintáit gyűjtöttük össze. A betegek között 16 hím és 15 nőstény egyed volt, amelyek átlagéletkora 8,3 (± 2) év volt. A fajták a következők voltak; keverék ($n = 7$), labrador ($n = 5$), golden retriever ($n = 3$), mopsz ($n = 3$), magyar vizsla ($n = 3$), shar pei ($n = 1$), amerikai staffordshire terrier ($n = 1$), border collie ($n = 1$), argentin dog ($n = 1$), angol bulldog ($n = 1$), rottweiler ($n = 1$), boxer ($n = 1$), bichon frise ($n = 1$), gordon szetter ($n = 1$), jack russel terrier ($n = 1$). A Stage és Substage besorolás a WHO (World Health Organization) ajánlása szerint történt [1]. Ezt tekintve a betegek 54,8%-a Stage I ($n = 17$), 16,13% Stage II ($n = 5$), 22,58% Stage III ($n = 7$) és 6,45% Stage IV ($n = 2$) besorolás alá esett.

A tumorok primer lokalizációját is figyelembe véve a legtöbbször a daganat a mellkason volt található ($n = 12$), ezt követte a fej-nyaki régió ($n = 6$), majd a lágyékban ($n = 4$) valamint lábvégen ($n = 4$) és a comb lateralis oldalán ($n = 4$) előforduló esetek. Egy esetben pedig a vállon volt az elváltozás ($n = 1$). A betegek kórelőzményi adatait figyelembe véve 16 kutya ismerten krónikus allergiával küzdött, míg 15 páciens anamnézisében nem szerepelt a kórkép. Más, jellegzetesen a hízósejtek fokozott aktivitását, proliferációját is okozó kórkép, amely több egyedben egyformán előfordult volna, nem szerepelt a betegek kórelőzményében. Egyedi, véletlenszerűen előforduló kórképek, hányás, hasmenés, átmeneti légzőszervi, vagy bőrproblémák, természetesen csaknem minden egyedben előfordultak.

MINTAVÉTEL

A Klinikára érkező páciensek betegségének diagnózisát egy komplex kivizsgálást követően állítottuk fel. Ennek során történt átfogó vérkép és biokémiai panel vizsgálat, hasi ultrahang vizsgálat, szükség esetén mellkas röntgenvizsgálat. Ez alapján került sor a „staging”-re. A tumort tekintve műtét előtt készült vékonytű-aspirációs mintavétellel citológiai vizsgálat, majd műtétet követően minden esetben kórszövetteni vizsgálat. Az előzetes citológiai eredményre a műtėti eltávolítás megtervezéséhez volt szükséges, amellyel a tumor low grade vagy high grade mivolta, így lokalizációtól függően a szükséges sebészeti szél paraméterei is meghatározhatók voltak. A sebészeti beavatkozás során a mastocytomákat a szükséges ép sebszélekkel együtt kíséreltük meg eltávolítani, majd a kórszövetteni értékelést nem befolyásoló régiókból (sebszélektől távol, a tumor centrumából) elkülönítettünk egy kis részletet a későbbi áramlásos citometriai vizsgálatra.

KÓRSZÖVETANI VIZSGÁLAT

A kórszövetteni vizsgálathoz a mintát 10%-os pufferolt formalinban fixáltuk átlagosan 20–24 órán át. A szövetteni feldolgozás helyszíne a Mátrix Kórszövetteni és Citológiai Laboratórium, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének Laboratóriuma volt.

A fixálást követően a mintákat paraffinba ágyazták, majd 3–5 μm vastagságú metszeteket tárgylemezre helyezték. A P-glycoprotein jelöléséhez C494 klónszámú egér monoklonális antitestet használtunk (Enzo Clinical Labs Inc., New York, USA). Az eljáráshoz deparaffinálást követően feltárás történt 6-os pH-jú citrát pufferben, mikrohullámú sütő segítségével 800 Watton 5 percig, és 180 Watt teljesítményen 10 percig. A primer antitest alkalmazása előtt szükség volt a szövetek endogén peroxidáz enzimeinek blokkolására (EnVision FLEX Peroxidase-blocking Reagent, Dako Agilent) 10 percen keresztül. Ezután a minták inkubálása következett a monoklonális primer ellenanyag 1:20-as hígítású oldatában 40 percig. A primer antitest kötődésének kimutatásához másodlagos ellenanyagra is szükség volt (Dako Envision system-HRP). Ezen ellenanyagban a minták 20

A szerzők 31 mastocytomás kutya mintáit vizsgálták

A primer daganat legtöbbször a mellkasi területen volt megtalálható

A műtét előtt citológiai, azt követően pedig kórszövetteni vizsgálatokat is végeztek

A paraffinba ágyazott szövetmintákon P-gp immunhisztokémiai jelölést végeztek

percen át inkubálódtak. A kitben található másodlagos antitest mentes avidintól és biotintól. Ezen tulajdonságának köszönhetően nem okoz aspecifikus endogén avidin-biotin pozitívítást.

A specifikusan kötődött ellenanyagok ezután kromogénnel (Dako Envision Flex DAB) kerültek jelölésre, amely az elsődleges kötődési helyeket barna színben tette láthatóvá. Az előhívás után magfestés történt hematoxilinnel. PBS (phosphate-buffered saline) öblítést követően a lemezek víztelenítése és fedése zajlott xilolmentes fedőfolyadékkal.

A hematoxilinnel és eozinnel festett lemezek alapján történt a mastocytomák „grade” meghatározása a mai standardnak megfelelően kétszintes [23] és háromszintes [24] rendszer szerint.

A P-gp jelölt metszetekhez pozitív kontrollként egészséges kutyamájszövetet használtunk. A negatív kontrollhoz egy beteg tumormintáját vettük igénybe, amelyet nem inkubáltunk a primer antitesttel, de a jelölés többi lépése megtörtént.

A bírálathoz öt nagy nagyítású látótérben (400× nagyításon), látóterenként kb. 200 darab sejtet vizsgáltunk [25]. A P-gp százalékos expressziója alapján egy háromszintes pontozó rendszer szerint kategorizáltuk a betegeket; 1 = <10%, 2 = 10–50%, 3 = > 50% [22]. A pozitív sejtek aránya mellett figyeltük a festődés helyét (cytoplasma vagy sejtmembrán), valamint intenzitását. Az intenzitás mértékét három csoportba osztottuk (1. csoport: pozitív kontrollnál gyengébb intenzitás; 2. csoport: pozitív kontrollal megegyező intenzitás; 3. csoport: pozitív kontrollnál erősebb intenzitás).

A grade meghatározása a két-, ill. a háromszintes rendszerben is megtörtént

A P-gp-expressziót a pozitív sejtek aránya, a festődés helye és intenzitása szerint is értékelték

Az áramlásos citometriai vizsgálatokkal a P-gp aktivitását vizsgálták calcein-jelölés segítségével

ÁRAMLÁSOS CITOMETRIAI VIZSGÁLAT

Értékelhető eredményt jelentő áramlásos citometriai vizsgálatra 25 beteg esetében kerülhetett sor. A műtétet követően a vizsgálatra elkülönített szövetrészletet Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, USA) médiumban tároltuk 4 °C-on. Az RPMI egy, vitaminokat nagy koncentrációban tartalmazó tápoldat, amelyet sejtkultúrák táplálásához használnak. A további feldolgozást legkésőbb 48 óra múlva megkezdtük. A tumor apróra darabolása után a disszociált tumorsejteket szűrtük, centrifugáltuk.

A calcein-jelöléshez 10⁶ db sejtet mértünk ki, PBS-folyadékban. Három vizsgálati csoportot hoztunk létre. Az első csoport egyéb reagens nélkül 37 °C-on inkubálódott, a második csoporthoz dimetil-szulfoxid (DMSO) (Sigma Laboratories Ltd., Mumbai, India) került, a harmadikhoz az aktivált, vagy inaktivált Ca-csatornákat és magát a P-gp-t is blokkolni képes verapamilt (Sigma Laboratories Ltd., Mumbai, India) adtuk. Mindegyik csoporthoz tartozó csőben lévő elegyet 15 percig inkubáltuk.

A calcein-acetoximetilészter (AM) (Invitrogen, Life Technologies, USA) egy zsírol-dékony, nem fluoreszcens molekula, amely gyorsan képes penetrálni a membránon át a sejtekbe. Az élő sejtekbe jutva különböző észterázok hatására az AM-csoport leválik, és a calcein fluoreszcens molekulává alakul. A transzportfehérje hiányában felhalmozódik a sejtekben, áramlási citométerrel mérhetővé válik az intenzitása. Azonban abban az esetben, ha a transzmembrán protein mennyisége nagy a sejtek membránjában, akkor a fluoreszcens calcein az extracelluláris térbe jut, a jelintenzitás csökkenni fog a sejtekben. Amennyiben a sejtekhez Pgp-gátlót, vagyis verapamilt adunk, a pumpafehérje működését akadályozzuk, így a calcein-AM erős fluoreszcens jelét detektálhatjuk a sejtekben az áramlási citométer segítségével. A rezisztencia kvantitatív mértékére a Multidrog-rezisztencia Aktivitási Faktor (MAF) meghatározásával következtethetünk, amely a verapamillal gátolt, ill. gátlószer nélküli calcein akkumuláció arányából számítható ki;

$$\left(\text{IF}_{\text{verapamil}} - \text{IF}_{\text{calcein}} \right) / \text{IF}_{\text{verapamil}}$$

Az inkubációs idő leteltével a reakció hideg (4 °C-os) PBS-sel történő leállítása után mindhárom mintát tartalmazó csőhöz a holt és élő sejtek elkülönítésére szolgáló festékanyagot, 7-amino-aktinomicin D-t adtunk. Ezt követően a mintákat áramlásos citométer segítségével vizsgáltuk. Az áramlásos citometria alkalmazásával egyidőben mérhető a sejtek granuláltsága és nagysága. A mintákban található tumorsejtek képesek felvenni és átalakítani a calcein-AM festéket, a létrejött fluoreszcencia pedig detektálható és mérhető az áramlás citométerrel. A sejtek fluoreszcenciájának mérése FACScan (Fluoreszcencia aktivált sejtválogató és analizátor) (Becton Dickinson, San Jose, USA) áramlásos citométer segítségével történt.

BETEGKEZELÉS

A betegek kezelését a klinikai megjelenés, a stádium és kórszövettani eredmény együttes figyelembe vételével terveztük meg. Mindegyik kutya daganatát műtétilag eltávolítottuk. A 31 betegből 23 páciensnél kórszövettanilag igazoltan teljes eltávolítás történt, 8 esetben a sebszélek a tumor által érintettek voltak. Összesen 16 kutyánál történt kemoterápiás utókezelés prednizolonnal kiegészítve (2–0,5 mg/ttkg po adagban) és 15 kutyánál nem alkalmaztunk gyógyszeres utókezelést. A gyógyszerenkénti számszerű eloszlást a 1. táblázat mutatja.

A kezelést a klinikai megjelenés, a stádium és kórszövettani eredmény együttes figyelembe vételével tervezték meg

1. TÁBLÁZAT. A műtétet követően kemoterápiás kezeléseket kapott betegek szám szerinti felsorolása

TABLE 1. Number of patients, who received chemotherapy treatment after the surgery

Alkalmazandó hatóanyag neve	Kezelt betegek száma
Masitinib	5
Vinblastin	6
Masitinib + Vinblastin	3
Masitinib + Vinblastin + Lomustin	2

A masitinib (Masivet) (AB Science S.A., Párizs, Franciaország) adagolása 9,5–12,5 mg/kg terápiás sávban történt. Hematológiai eltérés, rosszullét a dózis csökkentését vagy akár a gyógyszer elhagyását vonta maga után. Megfelelő terápiás válasz hiánya esetén a kezelést szintén felfüggesztettük. Olyan esetben, ahol a műtéti eltávolítás nem volt sikeres, ill. eleve metasztatikus megbetegedés volt igazolható a klinikai vizsgálattal, 2–3,5 mg/m² hetente történő iv. vinblastin (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) kezelést alkalmaztunk. Szintén vinblastinra váltottunk, ahol a terápiás válasz nem volt megfelelő pusztán masitinib kezeléssel. Két beteg esetében, amelyek Stage IV stádiumban voltak 60–80 mg/m² dózisban Lomustin (CCNU) (Bristol-Myers Squibb Canada, Montreal, Kanada) kapszulával egészítettük ki a terápiát.

STATISZTIKAI VIZSGÁLAT

Minden beteg eltávolított tumorának meghatároztuk áramlási citométerrel a MAF-értékét, valamint a P-gp százalékos arányát, majd megvizsgáltuk Pearson-féle korrelációs analízissel a két módszer kapcsolatát. Student-féle t-próbával és khi-négyzet próbával ellenőriztük a szignifikancia szinteket. Kaplan-Meier analízissel pedig a túlélési időket vizsgáltuk és görbékkel ábráztuk a StatsDirect Software (StatsDirect Ltd. Merseyside, UK) felhasználásával.

A kapott eredményeket statisztikai módszerekkel értékelték

EREDMÉNYEK

A betegek kórszövettani besorolás alapján 25,8%-a low grade/grade I csoportba tartozott ($n = 8$), 45,2% low grade/grade II ($n = 14$), míg 6,45% ($n = 2$) high grade/grade II csoportba került. A high grade/grade III csoportba a tumorok 22,6%-a esett ($n = 7$) [23, 24].

A P-gp-festődés jellemzően intenzívebb volt a fehérjét nagyobb százalékban expresszáló daganatok esetében

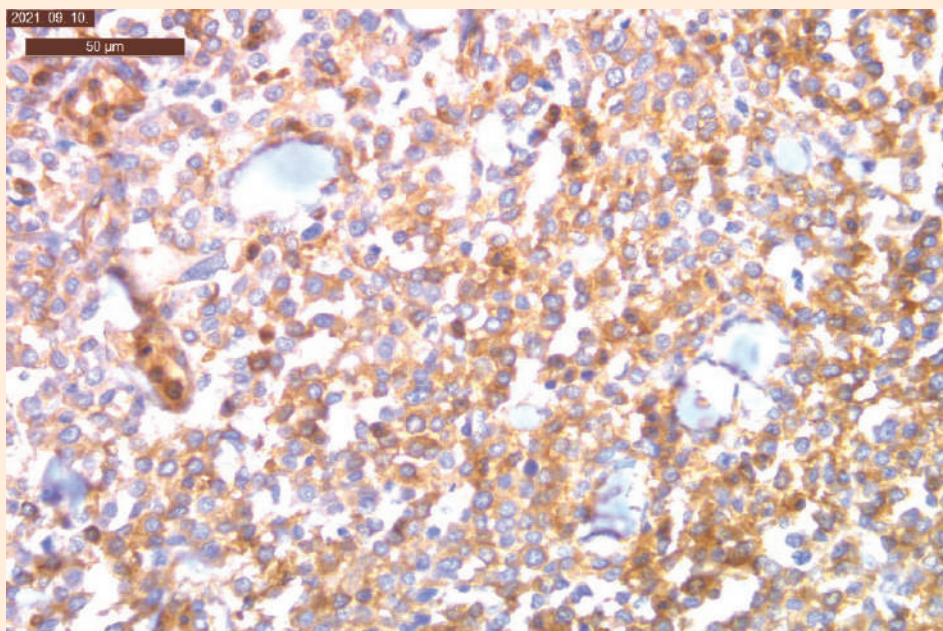
P-GLYCOPROTEIN-EXPRESSZIÓ VIZSGÁLAT

A 31 betegből készült immunhisztokémiai vizsgálat során meghatároztuk a P-gp expresszió százalékos arányát, a pozitív reakció helyét (membrán, cytoplasma) és a festődés intenzitását (1, 2. ábra). Az eredményeket az 2. táblázat mutatja.

A P-gp-festődés jellemzően intenzívebb volt a fehérjét nagyobb százalékban expresszáló daganatok esetében ($r = 0,5374$, $p < 0,05$).

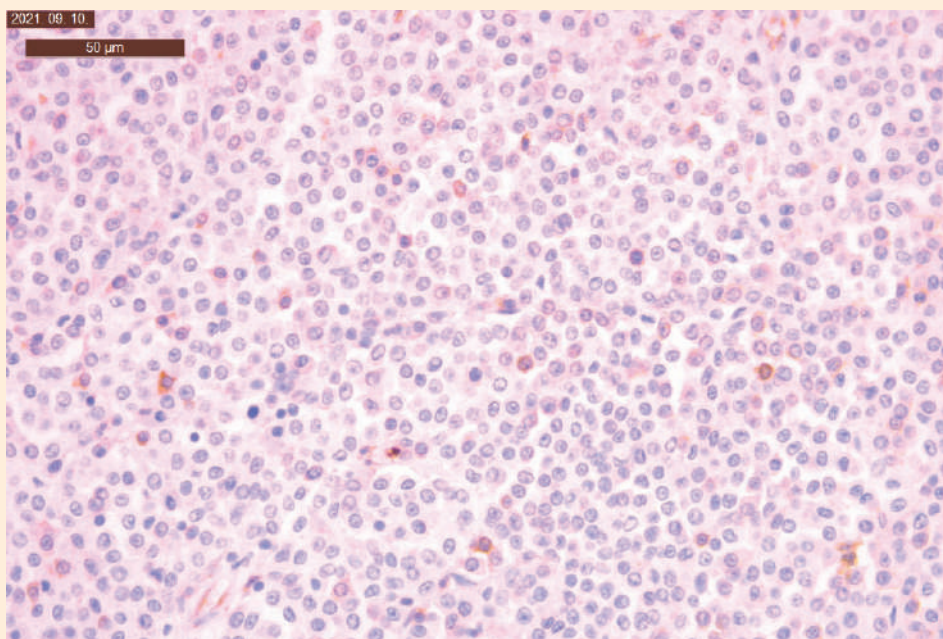
1. ÁBRA. 80% feletti P-glikoprotein-expresszió cutan mastocytomában
IHC, 400 \times , bar=50 μ m

FIGURE 1. Cutaneous mast cell tumor with >80% P-glycoprotein expression
IHC, 400 \times , bar=50 μ m



2. ÁBRA. 8–10%-os P-glikoprotein-expresszió cutan mastocytomában
IHC, 400 \times , bar=50 μ m

FIGURE 2. Cutaneous mast cell tumor with 8–10% P-glycoprotein expression
IHC, 400 \times , bar=50 μ m



2. TÁBLÁZAT. A páciensek P-gp-re vonatkozó vizsgálati eredményei

Az expresszió százalékos meghatározásához látóterenként 200 db sejtet számoltunk le, öt nagy nagyítású látótérben [32]. A mintázatot a P-gp expresszió helyeződése szerint határoztuk meg, aszerint, hogy csak a membránban, vagy a cytoplasmában is látható pozitív reakció. A festődés intenzitását a 3. táblázatnak megfelelően határoztuk meg

TABLE 2. The results of P-gp examinations

To determine the percentage of the expression, 200 cells per field of view were counted in five HPF. The pattern was evaluated according to the location of the positive reaction (perimembrane, intracytoplasmic). The intensity of the staining was determined according to table 3

A beteg sorszáma	P-gp %-ban kifejezett értéke	P-gp mintázat	P-gp intenzitás
1	9,4	membrán	2
2	13,1	membrán	2
3	18,7	membrán	2
4	24,3	membrán	2
5	28,1	membrán	3
6	32,8	membrán	2
7	33,7	cytoplasma	2
8	38,4	membrán	2
9	42,1	membrán	2
10	46,8	membrán	1
11	48,7	membrán	2
12	61,8	membrán	3
13	67,4	cytoplasma	2
14	71,1	membrán	3
15	84,3	cytoplasma	3
16	4,7	membrán	1
17	5,6	membrán	1
18	5,6	membrán	1
19	10,3	membrán	1
20	20,6	membrán	2
21	21,5	membrán	1
22	30,9	membrán	2
23	35,6	cytoplasma	3
24	37,4	membrán	2
25	39,3	membrán	1
26	43,1	membrán	2
27	47,7	cytoplasma	2
28	49,6	membrán	2
29	50,6	membrán	3
30	53,4	membrán	2
31	88,0	membrán	2

MULTIDROG-REZISZTENCIA AKTIVITÁSI FAKTOR (MAF) ÉRTÉKEK

A 25, vizsgálatban részt vett beteg MAF adata a 4. táblázatban látható.

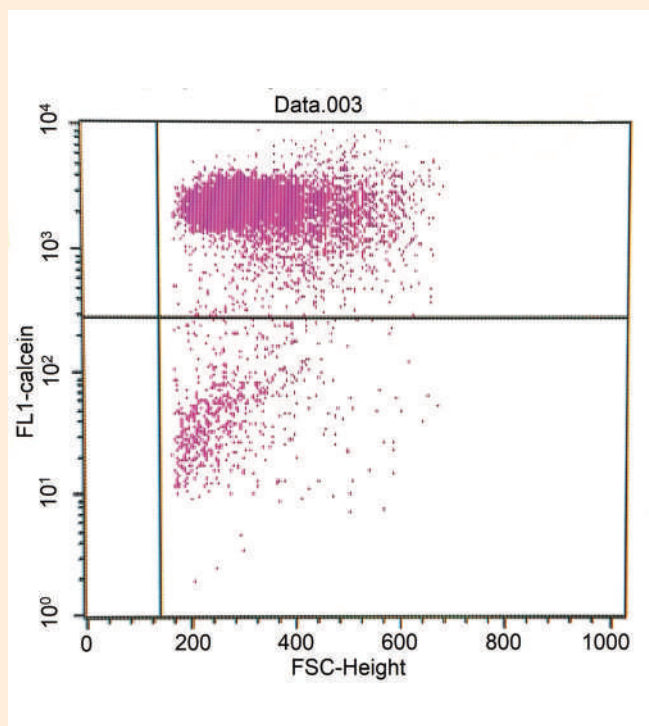
Az áramlásos citométer dot plot ábrája esetén a koordináta-rendszerben minden egyes pont egy sejtet jelöl. A hasonló tulajdonságú sejtek sejtpopulációkat alkotnak. Az x-tengelyen a méret (FSC), az y-tengelyen pedig a granuláltság (SSC) mértéke van feltüntetve (3. ábra).

A hagyományos hisztogram (4. ábra) esetén az x-tengelyen a fluoreszcencia intenzitása (vagyis a jelerősség), az y-tengelyen pedig a sejtek száma látható.

A fluoreszcencia-változás alapján felvett hisztogramok statisztikai értékéből kiszámítható a MAF érték.

Az általunk végzett vizsgálatok alapján a P-gp és MAF-adatok pozitívan korreláltak egymással ($r = 0,542$, $p < 0,05$). Ezt a szignifikáns összefüggést kaptuk akkor is, ha csak a kemoterápiával utókezelt betegeket ($n = 15$) vizsgáltuk, amely azért érdemel kiemelt figyelmet, mivel prognosztikai szempontból ezeknél az egyedeknél lehet lényeges a multidrog-rezisztencia jelenléte ($r = 0,55$, $p < 0,05$).

A vizsgálatok alapján a P-gp és MAF-adatok pozitívan korreláltak egymással

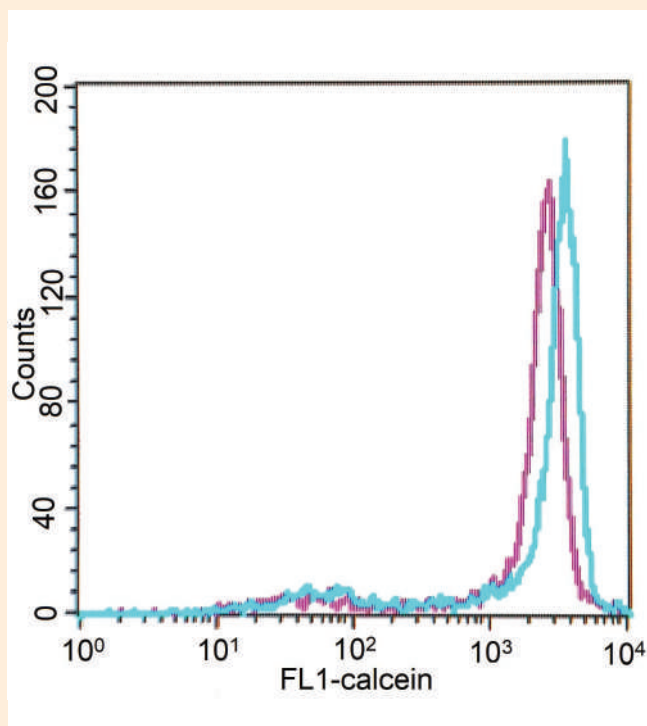


3. ÁBRA. A dot plot alkalmas az élő sejtpopuláció kiválasztására

Az y-tengelyen a sejtek fluoreszcenciájának intenzitása (IF-je) van feltüntetve. A calcein-negatív, vagyis a rezisztens (festéket kipumpáló) sejtek a választóvonal alatt, a calcein-pozitív, vagyis érzékeny sejtek a választóvonal fölött helyezkednek el

FIGURE 3. Dot plot is for examination of the living cell population

The y-axis shows the intensity of fluorescence. The calcein negative, resistant cells lies below the border line, while the sensitive cells are above the border line



4. ÁBRA. A fluoreszcencia intenzitásának változása egy beteg példáján szemlélítve (kék: verapamillal gátolt; lila: csak calceint tartalmazó sejtek fluoreszcencia intenzitása) Látható, hogy a sejtek fluoreszcenciája a verapamil hozzáadása után megnőtt, vagyis ott a pumpagátló működött, a festék a sejtekben maradt

FIGURE 4. The change of fluorescence intensity in a patient (blue: inhibited with verapamil, purple: cells without inhibitor) On the histogram, the fluorescence intensity is increased due to verapamil, which means, the verapamil prevented the protein's excretion mechanism

TÚLÉLÉSI ADATOK ÉS ÖSSZEHAJONLÍTÓ VIZSGÁLATOK

A teljes túlélési időt (overall survival time, OST) és recidívamentes túlélési időt (relapse free period, RFP) (4. táblázat) vizsgáltuk, és összefüggéseket kerestünk a P-gp- és MAF-adatok között ezen időtartamok figyelembe vételével.

Az emelkedő malignitási fokkal egyre nagyobb MAF- és P-gp-értékek voltak tapasztalhatók

A malignitási fok és a terápiarezisztencia összefüggései

A rendelkezésre álló tumorok malignitási foka („grade”-je) és a terápiarezisztenciára utaló, általunk vizsgált paraméterek (P-gp-immunhisztokémia és membrántranszporter-funkció, vagyis MAF) között nem fedeztünk fel jelentős kapcsolatot, bár az emelkedő malignitási fokkal egyre nagyobb MAF- és P-gp-értékek tapasztalhatók leginkább a Patnaik-féle felosztás szerint [24]. Csaknem szignifikáns különbség adódott az ún. Dunnet-multiplex, kontrollal végzett összehasonlítási módszerrel a MAF-értékek között a grade I, valamint grade II malignitási fokhoz tartozó daganatok esetében ($p = 0,0511$) (5. táblázat).

3. TÁBLÁZAT. Az egyes betegek MAF-adatai

A MAF-eredménnyel nem rendelkező pácienseket ($n = 6$) az összehasonlító vizsgálatokban cenzoráltuk

TABLE 3. The MAF results of the patients

The six patients without MAF were censored in the comparative examinations

Beteg sorszám	MAF	Beteg sorszám	MAF	Beteg sorszám	MAF
1	0,18	11	0,19	21	0,06
2	0,04	12		22	
3	0	13	0,45	23	0,30
4	0	14		24	0,09
5		15	0,17	25	0,28
6	0,00	16	0	26	0,1
7	0,09	17	0	27	0,3
8	0,12	18	0	28	0,17
9		19	0,36	29	0,3
10	0,24	20		30	0,24
				31	0,25

4. TÁBLÁZAT. Az egyes betegek napokban kifejezett recidívamentes túlélési (RFP) és teljes túlélési (OST) adatai**TABLE 4.** Relapse free periods (RFP) and overall survival times (OST) for each patient expressed in days

Beteg sorszám	Recidívamentes túlélési idő (relapse free period, RFP) (nap)	Teljes túlélési idő (overall survival time, OST) (nap)
1	131	185
2	87	118
3	212	213
4	238	330
5	1393	1393
6	43	90
7	171	245
8	326	326
9	59	160
10	654	670
11	104	210
12	590	590
13	410	472
14	81	81
15	1442	2152
16	337	337
17	1224	1862
18	1376	1863
19	398	398
20	608	608
21	265	1130
22	60	132
23	13	200
24	1656	1656
25	305	1443
26	472	472
27	1192	1192
28	374	374
29	12	89
30	1974	2388
31	128	130

5. TÁBLÁZAT. Különböző PATNAIK és KIUPEL szerint [23, 24] megállapított malignitási fokú mastocytomák MAF- és P-gp-értékei**TABLE 5.** MAF and P-gp values of mast cell tumors with different grades according to PATNAIK and KIUPEL [23, 24]

Patnaik	Grade I	Grade II	Grade III
MAF Átlag	0,14	0,16	0,19
MAF Szórás	0,14	0,12	0,21
KIUPEL	Low grade		High grade
MAF Átlag	0,16		0,14
MAF Szórás	0,12		0,18
PATNAIK	Grade I	Grade II	Grade III
P-gp Átlag	7,18	7,35	10,54
P-gp Szórás	5,77	3,55	5,70
KIUPEL	Low grade		High grade
P-gp Átlag	7,45		9,44
P-gp Szórás	4,42		5,46

MAF- és P-gp értékek túlélési időkhöz való összehasonlító vizsgálatai

A túlélési idők, MAF- és P-gp-értékek összehasonlítását az ún. cut off érték meghatározásával kezdtük.

Eszerint a hosszabb túlélési időkhöz nagyobb MAF- és P-gp-érték tartozott szinte minden vizsgált összehasonlításban (pl. összes eset, csak a kemoterápiás kezelésben résztvevő betegek, különböző malignitási fokozatú daganatokkal műtöt betegek stb.).

A P-gp esetében 37,5% cut off értéknél szignifikáns különbség figyelhető meg a teljes túlélést tekintve ($p = 0,0215$). Azon betegek, amelyek P-gp százalékos értéke a cut off érték felett volt, jelentősen hosszabb teljes túlélést (overall survival time, OST) mutattak (medián 1274 nap) azoknál a pácienseknél, amelyek mintájában a P-gp-érték kisebb volt, mint 37,5% (OST medián 330 nap).

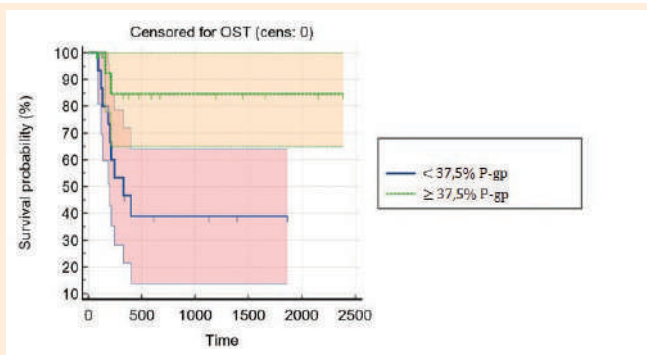
Az adatokhoz tartozó Kaplan-Meier túlélési görbéket az **5. ábra** mutatja.

Az OST adatokat tekintve a MAF esetében is pozitív korreláció volt tapasztalható az összes beteg vizsgálatakor és a kemoterápiával kezelt populációnál is. A teljes beteganyagot tekintve a medián OST 213 nap volt a 0,17-nél nagyobb MAF-értékkel rendelkező betegeknél, és medián 200 nap a 0,17 alatti MAF-fal rendelkező betegeknél ($p = 0,803$). A kemoterápiával kezelt egyedeket figyelembe véve ugyanezen cut off értéken medián 398 nap volt a teljes túlélés 0,17 MAF-felett és medián 245 nap volt az OST a 0,17 alatti MAF-értékkel rendelkező esetekben ($p = 0,707$).

Az recidívamentes túlélési időket vizsgálva azonban 0,17 cut off MAF-értéket alapul véve negatív korrelációt fedeztünk fel. A 0,17 alatti MAF-fal rendelkező betegek medián túlélési ideje (212 nap) hosszabb volt azokkal az esetekkel szemben, ahol a MAF a cut off érték felett volt (medián 131 nap) (**6. ábra**). Az eltérések nem szignifikánsak ($p = 0,8214$).

Az összefüggést 170 napos recidívamentes túlélésre vizsgáltuk a 0,17 cut off értéken, amelyre a ROC görbe alapján 66,7% szenzitivitást, 71,4% specifitást kaptunk. A recidívamentes túlélésekre vonatkozóan ez volt a legnagyobb specifitású megfigyelés.

A hosszabb túlélési időkhöz nagyobb MAF- és P-gp-érték tartozott szinte minden vizsgált összehasonlításban

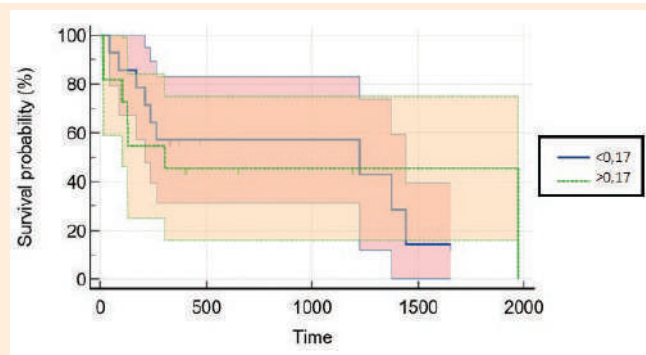


5. ÁBRA. Az adott Kaplan-Meier-görbén a 37,5% cut off értékhez tartozó OST-adatok ábrázolása látható

A betegek, amelyek tumorának P-gp-expressziója 37,5% alatt volt (kék folytonos vonal) jellemzően rövidebb ideig éltek. Ezzel szemben a 37,5%-nál nagyobb mértékű expresszióval rendelkező páciensek (zöld szaggatott vonal) szignifikánsan hosszabb túlélési idővel rendelkeztek

FIGURE 5. This Kaplan-Meier curve shows the OST data for the 37.5% cut off value

Patients with tumor P-gp expression below 37.5% (blue line) lived for a shorter time. While patients with above 37.5% expression (green line) had a significantly longer survival time



6. ÁBRA. Az adott Kaplan-Meier-görbén a 0,17 cut off értékhez tartozó RFP-adatok ábrázolása látható

A betegek, amelyek tumorának MAF-értéke 0,17 alatt volt (kék vonal) recidíva nélküli túlélési ideje hosszabb volt összehasonlítva azokkal a betegekkel, ahol a MAF-érték 0,17 felett volt (zöld vonal)

FIGURE 6. Kaplan-Meier curve represents the RFP data for the 0.17 cut off value

Patients with tumor MAF value below 0.17 (blue line) had a longer relapse free period compared to patients with MAF above 0.17 (green line)

MEGVITATÁS

Vizsgálatunk célja elsődlegesen az volt, hogy felmérjük a P-gp membrántranszporter fehérje immunhisztokémiai expressziójának mértékét, és összehasonlítsuk az áramlási citométeres eszközzel vizsgálható P-gp protein funkcióval. Különösen érdekesnek bizonyult, hogy ezeknek a paramétereknek a vizsgálatával sikerül-e a különböző kezelésekből résztvevő betegek tumor-progressziójának sebességét megjósolni a túlélési idők megfigyelésének segítségével.

Igazoltuk, hogy a rendelkezésre álló két vizsgálati módszer; az immunhisztokémia és a funkcionális, áramlási citometriás vizsgálat paraméterei egymással összehasonlíthatóak, és korrelálnak egymással. Az eredmények úgy értelmezhetőek, hogy minél nagyobb mértékben fejeződik ki a P-gp a kórszöveti metszeteken a sejtek felszínén, annál fokozottabb a sejtek membránon zajló calcein-kilökési működése (3. és 4. táblázatok).

Miyoshi és mtsai 2002-ben szintén immunhisztokémiai vizsgálattal tanulmányozták 54 kutya mastocytoma sejtjein a P-gp és multidrug-resistance-associated protein (MRP) jelenlétét. Vizsgálatukban a P-gp-pozitivitást 10%-nál nagyobb expresszióval vették figyelembe. A Patnaik-féle szövettani besorolás szerint 15 grade I, 31 grade II és 8 grade III beteg tumor mintáit vizsgálták, amelyek közül 8 esetben találták pozitívnak a P-gp-, és 10 esetben az MRP-festődést (amely egy másik terápiareszisztenciát okozó pumpafehérje, hasonló a Pg-p-hez). A P-gp pozitív sejtek 5 db grade I-es és 3 db grade II-es besorolású páciensből származtak, míg az MRP-pozitív sejtek tekintetében 4 eset tartozott grade I, 6 eset pedig grade II besorolás alá. Az adatokból látszik, hogy egyetlen grade III tumorból izolált kimetszés sem tartalmazott P-gp- vagy MRP-protonpumpát. Nem tapasztaltak szignifikáns korrelációt a pumpák jelenléte és a szövettani „grade” besorolás között, de a grade II besorolású mintákban kisebb mértékű P-gp-expresszió volt tapasztalható, mint

Az immunhisztokémia és a funkcionális, áramlási citometriás vizsgálat paraméterei korreláltak egymással

a grade I esetekben [22]. Ezzel ellentétben mi azt találtuk, hogy a P-gp immunhisztokémiai expressziója nem szignifikánsan ugyan, de növekedik a malignitási fokkal ($r = 0,243$, $p = 0,187$), és a grade II esetek MAF-értékei pedig szignifikánsan nagyobbak a grade I esetekhez képest ($p = 0,0407$). Megfigyeléseink szerint a malignitási fokozat összefüggésben áll a túlélési idővel, negatívan befolyásolja azt. Azon betegek, amelyek daganata Kiupel szerint „high grade” volt (OST medián 132 nap), szignifikánsan rövidebb ideig éltek a „low grade” (OST medián 599 nap, $p < 0,05$) daganattal rendelkező egyedeknél. Számos vizsgálat igazolja a malignitási fok és túlélés közötti negatív korrelációt. Egy nagy összefoglaló vizsgálatban, amelyben sebészi kezelést kaptak a betegek, a Patnaik-féle osztályozásban csak sebészileg kezelt esetekben a grade I, II és III osztályokban a túlélési idő 801, 492 és 144 nap volt. A Kiupel-féle felosztásban a túlélési idők a low grade tumorok esetében 728, high grade tumoroknál 189 nap volt. Abban a tanulmányban, amelyben vegyes kezelési csoportok voltak, a túlélési idők csak a rosszabb indulatú formáknak voltak statisztikailag meghatározhatók. Ők a Patnaik-féle grade II-es csoportot is kisebb és nagyobb malignitású csoportokra osztották. A high grade/grade II-es csoport túlélése 226 nap volt, a high grade/grade III-as csoporté 203 nap [23, 24].

A túlélési idő és szövettani „grade” kapcsolatot árnyalja az a tény is, hogy hazánk betegpopulációjában a „high grade” esetek gyakran előre haladottabb stádiumba (Stage III, IV) sorolhatók onkológiai szakrendelésre kerülésük idejében. Ezen esetek jellemzően egyéb, kiegészítő citosztatikus terápiát igényelnek a sebészeti beavatkozás mellett, és rövidebbek a várható túlélési adataik. Az érintett páciensek állapota akár ki is zárja a műtéti eltávolítás lehetőségét, amennyiben a műtéttől nem várható az életminőség javulása, a túlélési idő növekedése. Azt is tapasztaltuk, hogy a teljes túlélési idő annál rövidebb, minél kisebb a P-gp-expresszió, vagyis a membrántranszporter funkció. Figyelembe kell vennünk, hogy a teljes túlélési időt több tényező (elhullás oka, malignitás foka, stádium, kezelés módja) jelentősen befolyásolja, amelyeket csak nagy kohorszvizsgálatokkal lehetne elemezni. A statisztikailag értékelhető elemszámot az limitálja, hogy mennyi az a beteg, amely a daganat előrehaladottsága miatt hullik el, és nem valamilyen egyéb, a daganat előrehaladottságával összefüggést nem mutató (pl. trauma, fertőzés, nem megfelelő tulajdonosi hozzáállás a gyógyszerek adásával kapcsolatban stb.) ok következtében. A mi esetünkben ez az elemszám viszonylag kicsi volt (11/31; 35%). Nem véletlen, hogy a rosszabb indulatú („high grade”) és előrehaladottabb daganatban szenvedő betegeket kezeltük inkább kemoterápiával, és ezek pusztultak el a tumor miatt többnyire (10/11), míg azok közül, amelyek nem a daganat miatt hullottak el ($n = 20$), csak 7 kapott kemoterápiát. A túlélést kifejezetten nagy mértékben befolyásolja a stádium, a műtét melletti egyéb kemoterápiás kezelés, tehát nem lehet kizárólag a membrántranszporter működésre visszavezetni.

Ugyanakkor viszonylag hasznos paraméternek látszik a MAF-érték a recidívamentes túlélési idő vonatkozásában, mert azok a betegek tumorai, amelyek MAF-értéke kisebb, mint 0,17, később recidíválnak, és a recidíva kb. 170 nap múlva következik be. Használható paraméternek látszik a MAF-érték a specifitási (66,7%) és szenzitivitási (71,4%) adatok alapján, bár a szignifikancia nem mutatja a csoportok közti különbséget.

Mindezek mellett úgy látjuk, hogy kutatási eredményeinket jelentősen befolyásolja a kemoterápiával kezelt betegek csekély száma, és ezek között a malignus, high grade-nek mondható esetek száma is kicsi volt. Feltehetően ezeket a paramétereket nagyszámú, főként kemoterápiával kezelt beteganyagban kellene vizsgálni, különösen kiemelve a recidívamentes túlélési idők elemzését. Úgy véljük, hogy a terápiarezisztenciát jelző P-gp immunhisztokémiai expressziója, valamint áramlási citometriával mért funkciója nem tekinthető független túlélési markernek, főként kisebb grade-besorolású tumorok esetében. A malignitási fokozat mellett olyan paraméterek is jelentősen befolyásolhatnak, mint az elhullás oka, a

Az áramlási citométerrel meghatározott MAF-érték hasznos paraméternek tűnt a recidívamentes túlélés vonatkozásában

Az eredményeket jelentősen befolyásolja a kemoterápiával kezelt betegek csekély száma

stádium, a kezelés módja. Mindezek mellett pedig gyanítható, hogy a multidrog-rezisztencia a hízósejtes tumorok esetében más rezisztenciamechanizmusok útján is (pl. CYP450 enzimrendszer) aktívan érvényesül, és ezen jelátviteli utak dominánsabbak lehetnek a P-gp funkcionál is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak a Mátrix Kórszövettani és Citológiai Laboratórium, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszék munkatársainak a kórszövettani vizsgálatokban nyújtott segítségükért, ezen felül az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban dolgozóknak a mastocytomás betegekből nyert mintáikért.

IRODALOM

1. Withrow SJ, Vail DM, Page RL (2013) Small animal clinical oncology (5th ed). St. Louis, Missouri: Elsevier pp 335–346
2. Bostock DE (1986) Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J* 142:19
3. Śmiech A, Ślaska B, Łopuszyński W, Jasik A, Bochyńska D, Dąbrowski R (2018) Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. *Acta Vet Scand* 60:70
4. Finnie JW, Bostock DE (1979) Skin neoplasia in dogs. *Aust Vet J* 55:602–604
5. Ozaki K, Yamagami T, Nomura K (2002) Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. *Vet Pathol* 39:557–564
6. Tams TR, Macy DW (1981) Canine mast cell tumors. *Comp Cont Ed Pract Vet* 27:259–263
7. White CR, Hohenhaus AE, Kelsey J, Procter-Gray E (2011) Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *J Am Anim Hosp Assoc* 47:210–216
8. Simpson AM, Ludwig LL, Newman SJ, Bergman PJ, Hottinger HA, Patnaik AK (2004) Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 224:236–240
9. Scarpa F, Sabattini S, Marconato L, Capitani O, Morini M, Bettini G (2012) Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. *J Am Vet Med Assoc* 240: 1181–1187
10. Sledge DG, Webster J, Kiupel M (2016) Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J* 215:43–54
11. Poirier VJ, Adams WM, Forrest LJ, Green EM, Dubielzig RR, Vail DV (2006) Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 42:430–434
12. Stancliff RM, Gilson SD (2008) Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 232:53–62
13. Thamm DH, Turek MM, Vail DM (2006) Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *J Vet Med Sci* 68:581–587
14. Thompson JJ, Morrison JA, Pearl DL, Boston SE, Wood GA, Foster RA, Coomber BL (2016) Receptor tyrosine kinase expression profiles in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 53:545–558
15. Ohmori K, Kawarai S, Yasuda N, Tanaka A, Matsuda H, Nishimura R, Sasaki N, Tsujimoto H, Masuda K (2008) Identification of c-kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. *Vet Immunol Immunopathol* 126:43–53
16. Zandvliet M, Teske E (2015) Mechanisms of Drug Resistance in Veterinary Oncology- A Review with an Emphasis on Canine Lymphoma. *Vet Sci* 2:150–184
17. Dank G (2016) Review of the Treatment of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Isr J Vet Med* 71:3–9
18. Martinez M, Modric S, Sharkey M, Troutman L (2008) The pharmacogenomics of P-glycoprotein (P-gp) and its role in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 31:285–300
19. Lee JY, Rosenbaum DM (2017) Transporters Revealed. *Cell* 168:951–953
20. Moore A, Leville C, Reimann K, Shu H, Arias I (1995) The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Invest* 13:475–479
21. Ginn P (1996) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet Pathol* 33:533–541
22. Miyoshi N, Tojo E, Oishi A, Fujiki M, Misumi K, Sakamoto H, Kameyama K, Shimizu T, Yasuda N (2002) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Med Sci* 64:531–533
23. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller MA, Misdorp W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, Snyder PW, Southorn E, et al. (2011) Proposal of a two-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biologic behavior. *Vet Pathol* 48:147–155
24. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG (1984) Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 21:469–474
25. Hyokai S, Tanaka H, Aihara N, Kamiie J (2020) Expression of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in three cases of canine lymphoma showing drug resistance. *J Vet Med Sci* 83:473–477

Közlésre érkező: 2021. okt. 8.

The perception and experience of pet insurance among pet owners and veterinary practitioners in Hungary

A. Révész¹,
L. Ózsvári^{2*}

1. RÉ-VET Állategészségügyi centrum,
4100 Berettyóújfalu,
Millennium u. 8/A.

2. Állatorvostudományi Egyetem,
Törvényszéki Állatorvostani és
Gazdaságtudományi Tanszék,
Budapest

*e-mail: ozsvari.laszlo@univet.hu

A kisállat-biztosítások megítélése és tapasztalatai az állattulajdonosok és az állatorvosok között Magyarországon

Révész Andrea¹, Ózsvári László^{2*}

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők felmérték az állattulajdonosok és az állatorvosok véleményét és tapasztalatait a kisállat-biztosításokról Magyarországon. Az eredmények azt mutatják, hogy az állattulajdonosok többsége hallott már a kisállat-biztosításról, de nagyon kevesen kötötték meg azt, jellemzően kutyákra. Az állatorvosok többsége szerint az állattartókat az anyagiak jelentős mértékben befolyásolják kedvencük ellátása során, de akik rendelkeznek kisállat-biztosítással, könnyebben elfogadják a felajánlott kezeléseket. Az állattulajdonosok többsége (70%) évi max. 10 000 Ft összeget lenne hajlandó kisállat-biztosításért fizetni, ami megegyezik az állatorvosok többségének véleményével.

SUMMARY

Background: In North-America and Western-Europe more and more dogs and cats are insured, while in Hungary just a few percent of pet owners have insurance.

Objectives: The aim of the study was to survey the pet owners' and the veterinary practitioners' opinion and experience about pet insurance in Hungary.

Materials and Methods: We compiled two questionnaires: one for pet owners (it was available in both printed and online forms) and one for veterinarians (only online access), and they could be filled between January and October 2017. Altogether 343 responses from pet owners (227 online and 116 in printed forms) and 223 from veterinarians were received from all over Hungary, and the collected data were processed by using Microsoft Excel™ program.

Results and Discussion: The results show that the majority of pet owner respondents was aware of pet insurance, however, just 14% percent of their pets (prevalingly dogs) were insured, typically as part of their home insurance. Despite the low pet insurance coverage, 42% of pet owners admitted that their pets' acute illness or accident imposing unexpected pet health costs caused them financial difficulties. The pet owners' primary information source about pet insurance was the Internet, only 9% of them heard about it from a vet practitioner at first, while 80% of pet owners would prefer to be informed about pet insurance in a veterinary clinic. Most pet owners, who had pet insurance already, agreed to a certain extent that they more willingly accepted the treatments offered by the veterinarian, and the pet insurance was worth it financially (in 86% and 88%, respectively). Nearly half (47%) of the veterinary respondents said that the number of patients with pet insurance was below 1% in their practices, and 14% of them had no insured pets at all. The vast majority (92%) of vets agreed on that pet owners are influenced by the financial costs of the offered treatments to a large or medium extent. The majority of pet owner respondents (70%) was willing to pay max. 32.4 euro annually for pet insurance, which was in line with 66% of veterinary respondents' opinion.

KISÁLLAT

Az állatorvosok munkájuk során sokszor szembesülnek azzal, hogy a kisállat-tulajdonosok számára anyagi nehézséget jelent kedvencük váratlan betegsége vagy balesete esetén a kezelések, műtétek, a fejlettebb, de drágább műszeres diagnosztikai vizsgálatok költsége, sőt, nem egy esetben, inkább az eutanáziát választják. A váratlanul felmerülő nagyobb összegű kiadások problémájára megoldást jelenthet az állatbiztosítás. A biztosítási szerződés egyezség a biztosító és a biztosítást megvásárló személy, azaz az állattartó között. Létrejöttének lényege, hogy a biztosítást kötő személy tart attól, hogy olyasmi történhet kedvenc állatával, ami jelentős állatorvosi ellátási költséget eredményez. Emiatt a szerződő fél időközönként kisebb összeget fizet a biztosítónak, hogy az átvállalja az esetleges jövőbeli állatorvosi ellátás anyagi kockázatát [1].

Az állatbiztosítás leginkább a váratlanul felmerülő nagyobb összegű kiadásokra jelenthet megoldást

A biztosítás költsége leginkább az állat tartási helyétől, fajtától, fajtájától, korától és a biztosítás típusától függ

Bár a legelső állatbiztosítást Svédországban kötötték meg haszonállatokra és lovakra, az első kisállat-biztosítás Nagy-Britanniában jött létre és 2017-ben már a brit kedvtelésből tartott állatok 25%-ának volt biztosítása [2]. Nagy-Britanniában jelenleg a kedvenc állatok tartói több tucat biztosító közül választhatnak, amelyek kutyák és macskák mellett nyulakra is köthetők, és az önálló kisállat-biztosítások két nagy csoportba sorolhatók: az évente megújítandókra és az élethosszig tartókra. Bizonyos betegségek vagy fennálló állapot kizáró tényezője lehet a biztosítás létrejöttének, így korábbi sérülések, betegségek, vemhességgel kapcsolatos problémák. Elsősorban fiatal, egészséges állatok biztosítását ösztönzik a biztosítók kedvező ajánlatokkal. A biztosítás költsége változó, nagyban függ az állat tartási helyétől, fajtától, fajtájától, korától, és természetesen a biztosítás típusától. Biztosítás köthető abban az esetben is, ha az állat korábban megbetegedett vagy megsérült, de erről tájékoztatni kell a biztosítót és ezek a kötvényben a kizáró tényezők között fognak szerepelni, azaz ezek előfordulása esetén nem fizet a biztosító. Akár kutya, macska vagy nyúl biztosításáról van szó, van egy minimum és maximum életkor, amely között a biztosítás megköthető, amely sok esetben a fajtától is függ. Kutyák, macskák és nyulak mellett lehetőség van lovak, egyéb emlősállatok, hüllők és madarak biztosítására is [3].

Svédországban 50% feletti a biztosított házi kedvencek aránya

Svédországban több évtizedes múltra tekint vissza a kisállat-biztosítás és több biztosító közül is választhatnak a gazdák [4]. A jelentős állatorvosi költségek is ösztönzőleg hatnak, így igen nagy arányú, 50% feletti a biztosított házi kedvencek aránya [2]. Az USA-ban az első kisállat-biztosítást csak 1982-ben kötötte Lassie-re a Veterinary Pet Insurance Company, de 2005-re már közel félmillió kutya és macska volt biztosítva [2, 5]. Németországban szintén több biztosító foglalkozik kisállat-biztosításokkal, pl. az Allianz kutyákra, macskákra is köt biztosítást, baleset és betegség esetére, sőt a biztosítás kiterjed a külföldi utazásokra is [6].

Az Aegon biztosító, amely Magyarországon elsőként önállóan is kínált kisállat-biztosítást, rendelkezésünkre bocsátotta a 2016-ban kötött hazai kisállat-biztosításai statisztikáit [7]:

- Kutyákra 5848 esetben kötöttek biztosítást, ebből 854 db (15%) önálló kisállat-biztosítás, míg 4994 db (85%) lakásbiztosításban lévő kisállat kiegészítő biztosítás volt.
- Macskákra 387 esetben kötöttek biztosítást, ebből 34 db (9%) önálló kisállat-biztosítás, míg 353 db (91%) lakásbiztosításban lévő kisállat kiegészítő biztosítás volt.

Hazánkban leginkább kiegészítő biztosításként kötnek kisállat-biztosítást, leginkább kutyákra

Az adatokból látható, hogy túlnyomó többségben kiegészítő biztosításként került sor kisállat-biztosítás kötésére és macskák részére jelentősen kevesebb biztosítást kötöttek. Bár Magyarországon ennél a biztosítónál kötötték 2016-ban az összes kisállat-biztosítás 6,2%-át, de a szerződések száma így is elenyészőnek tűnik a hazai kutya- és macskapopuláció milliós nagyságához képest, és ha a többi hazai biztosítót is számításba vesszük, amelyek lakásbiztosításhoz köthető kiegészítő

**A teljes hazai
kisálltpopuláció pár
százaléka lehetett
biztosítva**

**A felmérést külön az
állatorvosoknak és az
állattartóknak szóló
kérdőívek segítségével
végezték 2017 januárja
és októbere között**

**Összesen 343
állattulajdonos
és 223 állatorvos
töltötte ki a kérdőívet
értékelhető módon**

kisállat-biztosítást kínáltak (pl. Generali, Groupama, K&H, Posta, Uniqua), a teljes hazai kisálltpopuláció pár százaléka lehetett biztosítva. A kedvtelésből tartott állataink alacsony biztosítási arányának egyik alapvető okát a hazai kisállat-biztosítási szolgáltatás fejletlenségében, hagyományainak hiányában kereshetjük az észak-amerikai és nyugat-európai országokhoz képest, de a jövőben nálunk is gyors felfutás várható a kisállat-biztosítások számában a hazai életszínvonal és az állat-egészségügyi ellátás szintjének további emelkedésével.

A kutatás célja a kisállat-biztosítások megítélésének és tapasztalatainak felmérése volt az állattulajdonosok és az állatorvosok között Magyarországon.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A felmérést külön az állatorvosoknak és az állattartóknak szóló kérdőívek segítségével végeztük 2017 januárja és októbere között. Az állattulajdonosok nyomtatott formában a rendelői váróban és online formában a Facebook-on is kitölthették a kérdőívet, az állatorvosok online válaszolhattak a kérdőív kérdéseire a Hungarovet állatorvosi fórumon, a Vetmail levelező listán és a Facebook-on. Az online kérdőívek szerkesztéséhez az onlinekerdoiv.com internetes oldalt használtuk. Az állattulajdonosi kérdőívben csak egyszerű válaszok szerepeltek, az állatorvosi kérdőívben voltak nyitott kérdések is, amelyeknél rövid választ lehetett írni. Az állattulajdonosok számára készített kérdőívre 343 értékelhető válasz érkezett (227 online, valamint 116 nyomtatott formában), az állatorvosok 223 kérdőívet töltöttek ki értékelhető módon.

A 343 válaszadó állattulajdonos 18%-a 25 év alatti, 47%-a 25–45 év közötti és 35%-a 45 év feletti korosztályba tartozott. Az állattartók földrajzi eloszlását tekintve, mind a hét régióból érkeztek válaszok, a legtöbb az Észak-Alföldről (45%), ahol a kérdőívek nyomtatott formában is elérhetőek voltak, valamint Közép-Magyarországról (29%), a legkevesebb a Nyugat- és Dél-Dunántúli régiókból (4–4%). A Közép-Dunántúli válaszadók aránya 8%-ot, az Észak-Magyarországi és Dél-Alföldi kitöltőké 5–5%-ot tett ki. A legtöbb válaszadó (42%) kisvárosban (20 000 fő alatt) élt, mivel itt a kérdőív nyomtatott formában is elérhető volt, őket követték 23%-ban a nagyvárosi (20 000 fő felett), a budapesti (19%) és a községekben élő (16%) állattartók. A 343 válaszadó állattartó 53%-a kutyát, 18%-a macskát és 29%-a mindkettőt tartott, és közel felük (49%) évente kettőnél több alkalommal járt kedvencével állatorvosnál, 28%-uk egyszer, 21%-uk kétszer és 2%-uk egyszer sem.

A 223 válaszadó állatorvos 60%-a kizárólag kisállatpraxist, 40%-uk vegyes praxist folytatott, és 48%-uk a Közép-Magyarországi régióban, 10–10%-uk Közép- és Dél-Dunántúlon, 9%-uk az Észak-Alföldön, 8–8%-uk Nyugat-Dunántúlon és Észak-Magyarországon, 7%-uk pedig Dél-Alföldön folytatta a tevékenységét. A felmért állatorvosok legnagyobb része, 34%-a kisvárosban (20 000 fő alatt) praktizált, 27%-a Budapesten, 23%-a nagyvárosban (20 000 fő felett) és 16%-a községben.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A KISÁLLAT-BIZTOSÍTÁSOK MEGÍTÉLÉSE ÉS TAPASZTALATAI AZ ÁLLATTULAJDONOSOK KÖZÖTT

A felmérés során vizsgáltuk, hogy az állattartók milyen döntést hoznának kedvencük váratlan betegsége vagy balesete esetén anyagi szempontból. Arra a kérdésre, hogy „előfordult-e már váratlan állatorvosi kiadás kedvence betegsége vagy balesete miatt”, az állattartók 83%-a igennel válaszolt ($n = 343$). Az igennel válaszolók közül 118 főnek (42%) anyagi nehézséget okozott kedvence kezeltetése

**Az állattartók
42%-ának okozott
már gondot váratlan
állatorvosi kiadás**

**A válaszadó
állattartók 61%-a
tudná költségektől
függetlenül a legjobb
ellátást biztosítani
egy váratlan betegség
vagy baleset esetén**

**A válaszadó
állattulajdonosok 61%-a
hallott már kisállat-
biztosításról és 14%-a
kötötte már meg azt**

**Az USA-ban végzett
felmérések szerint az
állattartók 50%-kal
több kisállat-biztosítást
kötnének, ha azt az
állatorvosuk ajánlaná**

miatt az állatorvosi kiadás ($n = 283$). Ez igen nagy aránynak mondható, és ezekben az esetekben lényeges lett volna a kisállat-biztosítás megléte, hogy a lehető legjobb ellátást kapja a kedvtelésből tartott állat. A brit kisállat-biztosítók felelősségvállalása sérülés esetén a biztosítás megkötése után azonnal életbe lép, míg megbetegedés esetén a szerződés létrejöttétől számított 14. napot követően. Az állatorvosi javallatra igénybe vett kiegészítő kezelések, mint pl. az akupunktúra, fitoterápia, homeopátia, hidroterápia, fizioterápia költségeinek fedezésére szintén lehetőség van [3].

Arra a kérdésre, hogy „*ha most történne kedvencével váratlan betegség vagy baleset*”, hogyan döntenének, a válaszadók 61%-a nem nézné a költségeket, minden vizsgálatot elvégeztetne és a legjobb kezelést kérné, 15%-uk csak a legszükségesebb vizsgálatot és kezelést kérné, míg 24%-uk nagyobb összegű kezelést vagy műtétet nem tudna vállalni ($n = 343$). Vagyis a felmérésben részt vevő állattartók közel kétötöde esetén mindenképpen hasznos lenne a kisállat-biztosítás megkötése. Az USA-ban a kisállat-biztosítások zöme a számos műtét és diagnosztikai vizsgálat mellett nem csak a heveny, de az idült betegségek kezelését is fizeti. Az állattartók jellemzően kétféle kártalanítási mód közül választhatnak: az egyiknél meghatározott százalékát kapják vissza az állatorvosi ellátás díjának, míg a másikonál a biztosító által az adott sérülésre, megbetegedésre meghatározott összeget kapják, függetlenül attól, mennyit fizettek az állatorvosnál. Ezt a biztosítási szerződés megkötésekor el kell dönteniük és többféle csomagból választhatnak az abban foglalt szolgáltatások alapján [5].

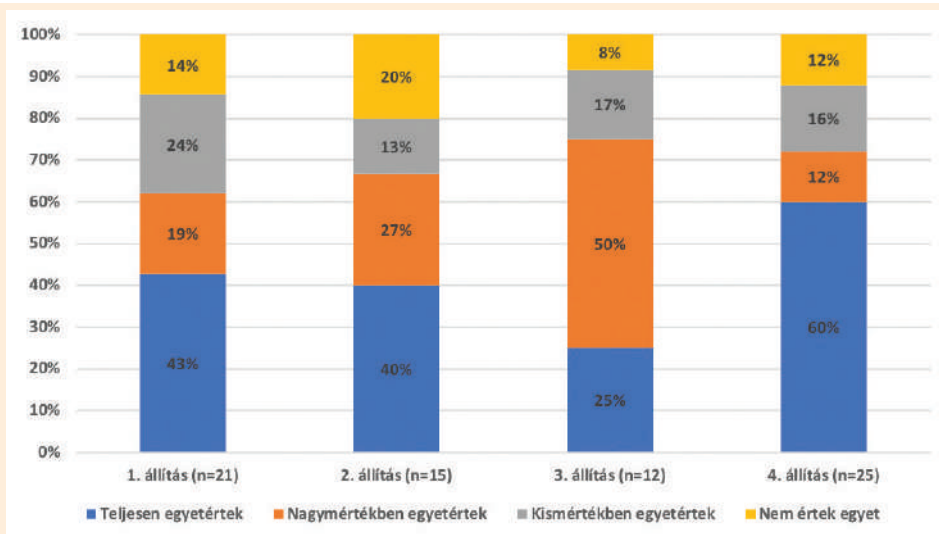
Felmértük azt is, hogy milyen a kisállat-biztosítás ismertsége az állattartók körében és milyen tapasztalataik vannak vele. Arra a kérdésre, hogy „*hallott-e már Ön a kisállat-biztosításról*”, a 343 válaszoló 61%-a válaszolt igennel, de csak az összes felmért állattartó 14%-a kötötte meg („*igen, és meg is kötöttem*”), 47%-a nem („*igen, de nem kötöttem ilyen biztosítást*”). A megkérdezett tulajdonosok igen nagy hányada, 39%-a nem is hallott még a kisállat-biztosításról! A kisállat-biztosítással rendelkezők 17%-ánál ez önálló kisállat-biztosítás, a fennmaradó 83% esetében a lakásbiztosításuk része volt ($n = 48$).

Azoknak a válaszadó állattulajdonosoknak, akik ismerték a kisállat-biztosítási lehetőséget, 71%-a az internetről, 20%-a biztosítótársaságok képviselőjétől és csak 9%-a (!) hallott az állatorvosi rendelőben róla. Arra a kérdésre, hogy „*a kisállat-biztosítás befolyásolná-e döntését a felajánlott vizsgálatok/kezelések elfogadásában*” a válaszadók közel fele (46%-a) mondta, hogy befolyásolná döntését, mert tudná, hogy a biztosító fedezi a költségek egy részét, 40%-uk döntését viszont nem befolyásolná és 14%-uk nem tudta ($n = 304$). Arról, hogy „*szívesen vennék-e, ha már az állatorvosi rendelőben tájékoztatást kapnának a kisállat-biztosításról*”, a 343 válaszoló 80%-a (!) igennel válaszolt, 7%-uk nem szeretne a rendelőben tájékoztatást kapni ebben a témában, míg 13%-uk nem tudott ebben a kérdésben dönteni. Mivel ugyanezen állattartói kör 9%-a mondta, hogy az állatorvosi rendelőben értesült a kisállat-biztosítás lehetőségéről, ezért elmondhatjuk, hogy jelentős igény lenne az állatorvosi tájékoztatásra. Az USA-ban végzett felmérések szerint az állattartók 50%-kal több kisállat-biztosítást kötnének, ha azt az állatorvosuk ajánlaná, akár szóban, a váróban kihelyezett tájékoztatókban, a rendelő honlapján lévő ismertető szövegben, ill. a biztosító honlapjához vezető link megadásával [8].

Azokat a kisállat-tulajdonosokat, akik rendelkeztek kisállat-biztosítással, a tapasztalataikról is megkérdeztük. Négy kategóriát tartalmazó skálán jelezhetnék, hogy mennyire értenek egyet az állításokkal: teljesen, nagymértékben, kismértékben értenek egyet, vagy nem értenek egyet az állítással (1. ábra).

1. ÁBRA. A kisállat-biztosítással kapcsolatos állattulajdonosi tapasztalatok

FIGURE 1. Pet owners' experiences about pet insurance

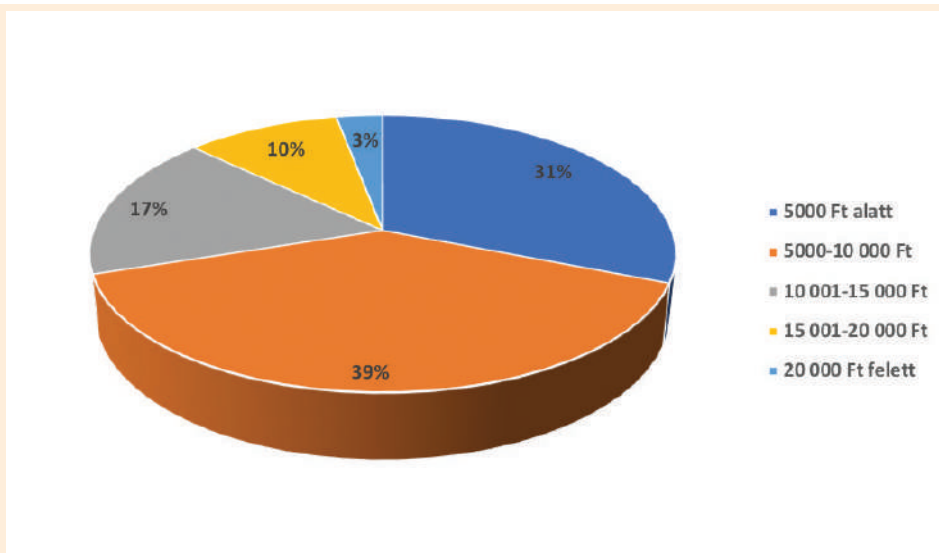


1. állítás: „könnyebben elfogadom az állatorvos által ajánlott kezelést”,
2. állítás: „döntésemet nem befolyásolják az anyagiak”,
3. állítás: „a biztosítás fedezte a költségek nagy részét”,
4. állítás: „úgy érztem, megérte biztosítást kötnöm”.

A North American Pet Health Insurance Association-nek [8] a kanadai és egyesült államokbeli kisállat-tulajdonosok és állatorvosok körében végzett kutatási eredményei azt mutatták, hogy az állattartók többnyire érzelmi alapon kötnek biztosítást, mert segítség számukra (59%), kimutatja az állatok iránti szeretetüket (55%), felelős állattartóknak érzik magukat (53%), megnyugtatja őket (49%), jó befektetésnek tűnik (48%) és elkerülhető vele, hogy fájdalmas döntést kelljen hozniuk (42%).

2. ÁBRA. Az éves kisállat-biztosítási összeg nagysága, amit az állattartók hajlandók megfizetni (n = 337)

FIGURE 2. The annual amount of pet insurance that pet owners are willing to pay (n = 337)



A tulajdonosok 70%-a legfeljebb évi tízezer Ft-ot fizetne kis egy évben kisállat-biztosítási díjra

Az állattartói kérdőívben feltett utolsó kérdés arra kereste a választ, hogy évente milyen összeget lennének hajlandók kisállat-biztosításra fordítani (2. ábra). A tulajdonosok 70%-a maximum tízezer Ft-ot lett volna hajlandó egy évben kisállat-biztosítási díjra kifizetni, a legtöbben (39%) 5000–10 000 F közötti összeget.

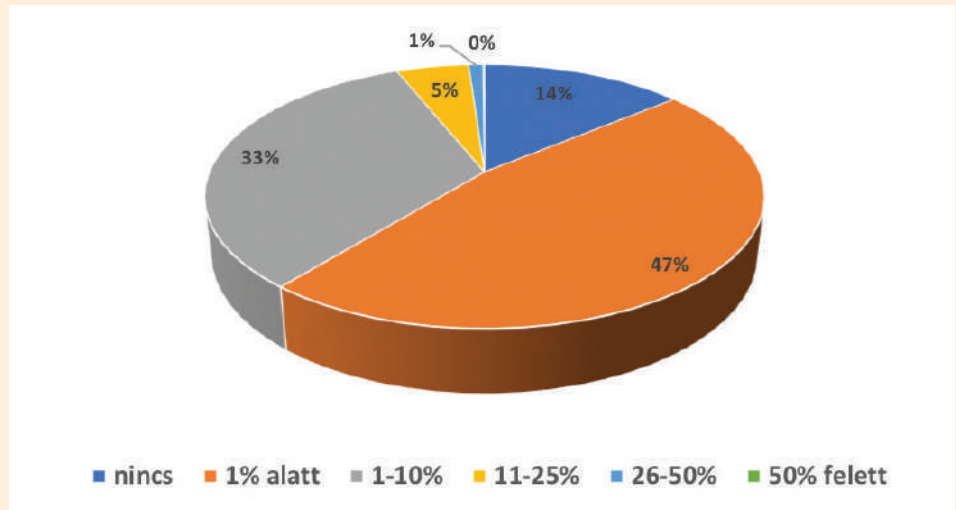
A felmért állatorvosi praxisok több mint felében nem fordult elő, vagy 1% alatt volt a kisállat-biztosítással rendelkező páciensek aránya

3. ÁBRA. A kisállat-biztosítással rendelkező páciensek aránya a praxisokban (n = 223)

FIGURE 3. Share of insured pets in the veterinary practices (n = 223)

A KISÁLLLAT-BIZTOSÍTÁSOK MEGÍTÉLÉSE ÉS TAPASZTALATAI AZ ÁLLAT-ORVOSOK KÖZÖTT

A felmért állatorvosi praxisok közel felében (47%) a kisállat-biztosítással rendelkezők aránya 1% (!) alatt volt, egyharmaduknál 1–10% között, de 14%-uknál egyáltalán nem fordulnak elő kisállat-biztosítással rendelkező páciensek (3. ábra).



A válaszadó állatorvosok 56%-a szerint nagymértékben, 36%-a szerint közepes mértékben, 6%-a szerint kismértékben befolyásolják az állattulajdonosokat az anyagiak a felajánlott költségesebb vizsgálatok, kezelések elfogadásában, és csak a megkérdezettek 2%-a szerint lényegtelenek a költségek a számukra, és csak a kedvencük gyógyulása számít (n = 222). Ez az eredmény ellentmondásban van az az állattartók azon válaszához képest, miszerint 61%-uk úgy nyilatkozott, nem néznék az anyagiakat, hogy a legjobb kezelést adják kedvencük váratlan betegsége vagy balesete esetén. Az állattartók és az állatorvosok közötti eltérő megítélés valószínű oka, hogy az állattartók elsősorban az érzelmeikre hagyatkozva válaszoltak erre a kérdésre, és közülük sokan valószínűleg nincsenek pontosan tisztában egy bonyolultabb műtét vagy egy súlyos, hosszantartó betegség költségeivel, mert még nem szembesültek vele. Az állategészségügyi ellátás költséges és ez csak még kifejezettebbé válik, mikor specialisták vagy sürgősségi klinikák szolgáltatásait kell igénybe venni. Az állattartók közül sajnos kevesen ismerik a kisállat-biztosítást, legtöbbször akkor hallanak róla, amikor már megtörtént a baj, és ez persze a továbbiakban megkötött biztosítás esetében kizárja a szerződés hatálya alól az állat meglévő betegségét [9]. Ezért a kisállat-biztosításról az új kisállattartót érdemes még kedvence kölyökkorában tájékoztatni, az első oltások idején [10].

A válaszadó állatorvosok 96%-a szerint a tulajdonosok jobban elfogadnák a költségesebb beavatkozásokat, ha azokat részben a biztosító fedezné

Arra a kérdésre, hogy „jobban elfogadnák-e a gazdik a költségesebb kezeléseket és vizsgálatokat, ha tudnák, hogy a biztosító fedezi a költségek egy részét”, a 222 válaszadó állatorvos túlnyomó többsége, 96%-a (!) igennel válaszolt. Ez jóval nagyobb arány, mint az állattartók esetében, akiknek csak 46%-a válaszolt igennel hasonló kérdésre. Az eltérés magyarázata valószínűleg a komplexebb állatorvosi szolgáltatások költségeinek nem megfelelő ismeretében rejlik itt is az állattartók részéről. A tapasztalatok ugyanakkor azt mutatják, hogy az USA-ban a kisállat-biztosítással rendelkező kedvenceik esetében az állattulajdonosok kutyáknál 29%-kal, macskáknál pedig 81%-kal (!) többet költöttek évente állatorvosi költségekre, mint a biztosítással nem rendelkező állatok esetében [8].

A felmért praxisokban a biztosítással rendelkező kisállatok 91%-a kutya, 8%-a macska volt és 1%-ban mindkét faj egyedi között voltak biztosítottak

A válaszadó állatorvosok alig több, mint fele szokta javasolt a kisállat-biztosítást a gazdák számára

A felmért praxisokban a biztosítással rendelkező kisállatok 91%-a kutya, 8%-a macska volt és 1%-ban mindkét faj egyedi között voltak biztosítottak ($n = 198$). Ezzel összefüggésben megkérdeztük az állatorvosokat, hogy mely faj részére javasolnák a kisállat-biztosítást, és 81%-uk kutyák, 19%-uk pedig macskák részére ($n = 218$), tehát lényegi eltérés nincs az előző kérdés válaszaihoz képest, de a macskáknál nagyobb növekedési lehetőséget látnak a praktizáló állatorvosok.

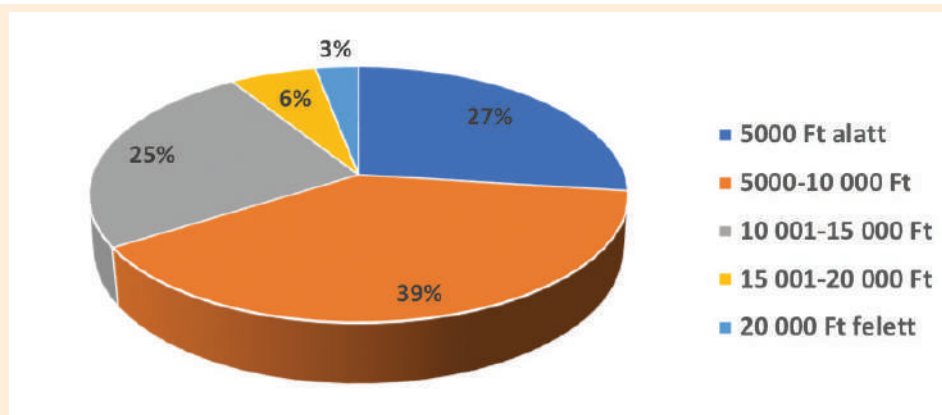
Kutatásunkban arra a kérdésre, hogy szokta-e javasolni a kisállat-biztosítást a gazdik számára, a megkérdezett állatorvosok kicsivel több, mint fele (54%) igennel felelt, ami nincs összhangban az állattartók tapasztalatával, mivel csak 9%-uk mondta, hogy az állatorvosi rendelőben ajánlották neki a kisállat-biztosítást. Az állattartók tapasztalatához képest jóval nagyobb arányú pozitív állatorvosi válasz oka az lehet, hogy egyrészt a kérdőívet kitöltő állatorvosok eleve jobban érdeklődtek a kisállat-biztosítási szolgáltatás iránt, mint a többi gyakorló állatorvos, másrészt szerepet játszhatott a válaszukban, hogy a társadalmi elvárásoknak is megfeleljenek, amire korábbi hazai felmérésben is találtunk példát, többek között a különböző hatékonyságú és költségű parazitaellenes készítmények alkalmazásának kiválasztásakor [11].

Az USA-ban az állatorvosok általában tájékoztatják az állattartókat a kisállat-biztosítási lehetőségekről, és szoktak számukra ajánlani olyan biztosítót, akivel jó tapasztalatuk volt korábban, nemcsak a biztosítási díjat figyelembe véve, hanem a várható kifizetések összegét is. Emellett mind az állatorvosoknak, mind az állattartóknak tisztában kell lenniük a biztosításban foglalt kizáró tényezőkkel (pl. valamely öröklött betegség), és azzal, hogy a biztosítás az állat egész életére szól, vagy csak az állat bizonyos koráig, valamint a biztosítás éves megújításának feltételeivel. Az állattartókat minél korábban érdemes tájékoztatni, még mielőtt költséges kezelések felmerülnének [9].

Az állatorvosokat arról is megkérdeztük, hogy szerintük „milyen összeget lennének hajlandók fizetni a gazdik a kisállat-biztosításért évente” (4. ábra). A legtöbben (39%) 5000 és 10 000 Ft közötti összeget jelöltek meg, és csak 9%-uk szerint lennének hajlandók 15 000 Ft feletti díjat fizetni, tehát a kapott eredmény nagyon hasonló ahhoz, amit az állattartók adtak válaszként ugyanerre a kérdésre.

4. ÁBRA. Az állatorvosok szerint a kisállattartók által a biztosításra szánt éves összeg nagysága ($n = 216$)

FIGURE 4. The annual amount of pet insurance that pet owners are willing to pay according to the veterinary practitioners ($n = 216$)



Az állatorvosoknak azt a nyitott kérdést is feltettük, hogy „hasznosnak tartja-e Ön a kisállat-biztosítást”, és ha igen, miért. A 163 válasz között nagyon sok hasonló volt, amelyekből a következő érvek voltak a leggyakoribbak:

- A biztosítással rendelkező betegek esetében, bonyolultabb állatorvosi esetben is sokkal nyugodtabban ajánlható fel és fogadtatható el egy költségesebb vizsgálat, kezelés. Továbbá a biztosítással rendelkező kisállatot a biztosító által előírt kötelező oltások és féreghajtások miatt sokkal gyakrabban viszik állatorvoshoz.

- Biztonságosabbá, tervezhetőbbé válik a kisállatok tartása során esetlegesen felmerülő – nem várt – anyagi kiadások kérdése.
- Felelősségre neveli a tulajdonosokat. Az állateledel költségét pl. hajlamosak a napi vásárlásokhoz hozzáadni, ezt viszont egyértelműen, nevesítve az állatra költik, így jobban tudatosul bennük, hogy az állattartás és az állat-egészségügyi szolgáltatások pénzbe kerülnek.
- Bizonyos esetekben az állattulajdonosok nem tudják vállalni a beavatkozást az ára miatt, ilyenkor jól jöhet a biztosítás, ezekben az esetekben az állatorvosnak sem kell a legolcsóbb kezelést elvégeznie.
- A kisállat-biztosítás nem egy állat életét mentette már meg, mert ha a biztosító nem fedezi a költségeket, a tulajdonos a kezelés helyett az eutanáziát választotta volna.
- A tulajdonosok több vizsgálatot kérnek, a továbbküldés igénye a szakrendelés (pl. csontsebészet, szemészet) felé megnő.
- Könnyebbé teszi a kommunikációt és az együttműködést a gazdikkal, hiszen anyagi oldalról kapnak támogatást a biztosítótól, így az állatorvos képes a szakmai oldalt teljeskörűen, alaposan ellátni.

A kisállat-biztosítás

előnyei:

- kevesebb anyagi korlát
- pontosabb diagnózis
- szélesebb körű kezelési lehetőség
- igény a specializált ellátásra
- kevesebb eutanázia

Ami a válaszokból látható, hogy nagyon sok előnye lehet a kisállat-biztosításnak: kevesebb anyagi korlát, ezáltal pontosabb diagnózis, szélesebb körű kezelési lehetőség, igény a specializált ellátásra, kevesebb eutanázia, valamint az állattartók az egészséges állataikkal is többször keresnek fel a rendelőt, nagyobb hangsúlyt fordítva a betegségek megelőzésére. Nagy-Britanniában az állattartónak, akár kutyája, macskája vagy nyula van, bizonyítania kell a biztosító felé, hogy törődik az állata egészségével; erre szolgálnak pl. az évenkénti kötelező fogászati szűrővizsgálatok [3]. A Royal Insurance Group (RSA), amely az Egyesült Királyság egyik legnagyobb biztosítási csoportja, 2015-ben létrehozta a szerződött állatorvos-partnereinek listáját, amelynek lényege, hogy az állattartónak, ha nem sürgősségi ellátásról van szó, ezeket az állategészségügyi ellátókat kell felkeresnie. Ha az állattartó nem a listán szereplő rendelőbe viszi az állatát, akkor nagyobb összeget kell fizetnie. A következő 18 hónapban azt tapasztalták, hogy az átlagos kárigény 385 angol font volt, ami lényegesen kevesebb az RSA által 2016-ban mért 757 angol fontnál [12].

Felmérésünk során arra kérdésre, hogy esetleg miért nem tartják hasznosnak az állatorvosok a kisállat-biztosítást, jóval kevesebb, 32 válasz érkezett. A legjellemzőbb válaszok a következők voltak:

- Magyarországon ma nincs kellően megoldva a kisállat-biztosítás marketingje: ez nem csak az állatorvos dolga, hanem a biztosítóké is.
- Ha drága állatorvosi beavatkozásra kerül sor a kedvtelésből tartott állatnál, akkor hasznos lehet. A vidéki praxisokban a szegényebb állattartó réteg, akinek jól jönne a biztosítói támogatás, nem fog költeni rendszeres biztosítási díjra.
- A tulajdonosnak meg kell előlegeznie az esetenként komoly összeget, csak később látja viszont egy részét, esetleges újabb beavatkozásoknál, ez sokszor elgondolkodtatja a gazdát.

A biztosított állatok esetében a tetemes állatorvosi költségek megelőlegezésének problémájára USA-ban egyre inkább elterjedt az a gyakorlat, hogy a kisállat-praxis a kezelést követően annak csak egy részét számlázza ki a tulajdonos felé, majd helyette beküldi a kárigényt a biztosítónak, és amikor az kiutalja az összeget, rendezik a fennmaradó részt, vagy túlfizetés esetén a következő vizitnél levonják ennek összegét. Ezzel azt is biztosítják a rendelők, hogy az állattartó ne máshol keressen ellátást [8]. Nagy-Britanniában a kárigényt az állatorvos nyújtja be és a biztosítótársaság neki téríti meg a kezelés díját. Vannak biztosítók, amelyek a költségek 100%-át fizetik, mások csak egy részét térítik meg. Korábban nem volt megtéríthető a vakcinázások, ivartalanítások költsége, most már egyes biztosítók ezen beavatkozások költségeit is viselik [3, 13].

KÖVETKEZTETÉSEK

A biztosítók és az állatorvosok közösen tehetnének azért, hogy a kisállat-biztosítás szélesebb körben elterjedjen

A biztosítók és az állatorvosok közösen tehetnének azért, hogy a kisállat-biztosítás szélesebb körben elterjedjen. A kisállat-biztosítás segítséget nyújt az állattartók számára abban az esetben, ha kedvencüket betegség vagy baleset éri. Ezért körükben ennek a terméknek a megismertetése elősegítené, hogy anyagilag szabadabban dönthessenek kedvencük kezeltetéséről. Az állatorvosok számára sem közömbös, hogy egy alapszintű vagy egy drágább, bonyolultabb kezelést tudnak-e nyújtani az állattulajdonos számára, ezenkívül elkerülhető lehet az a szakmai frusztráció, ami abból adódna, hogy hiába a fejlett diagnosztikai eszközök és a magas szintű tudás megléte, ha a tulajdonos anyagi korlátai megkötik a gyakorló állatorvos kezét és nem tudja megmenteni az állat életét. A kisállat-biztosítások szélesebb körű elterjedéséhez további kutatások szükségesek mind az állattulajdonosok, mind az állatorvosok, mind a biztosítók elvárásainak megismeréséhez.

IRODALOM

1. Heinke ML, McCarthy JB (2001) Practice Made Perfect: A Guide to Veterinary Practice Management. AAHA Press, Lakewood, CO, USA
2. Petfirst Healthcare (2017) A short history of pet insurance around the world. <https://www.petfirst.com/News/A-Short-History-of-Pet-Insurance-Around-the-World.aspx> Accessed: 14 Jan 2021
3. Petplan (2021) Multipet insurance. <https://www.petplan.co.uk/multi-pet-insurance/> Accessed: 14 Jan 2021
4. Agria Animal Insurance (2021) <https://www.agria.se/> Accessed: 12 March 2021
5. Veterinary Pet Insurance Company (VPIC) (2021) Find the right pet insurance, <https://www.petinsurance.com/pet-insurance> Accessed: 12 March 2021
6. Allianz Tierkrankenversicherung (2021) <https://www.allianz.de/gesundheit/tierkrankenversicherung/> Accessed: 12 March 2021
7. AEGON (2017) Kisállat-biztosítási adattár
8. North American Pet Health Insurance Association (NAPHIA) (2016) State of the Industry Report 2016. <https://naphia.org/news/naphia-news/state-industry-report-2016/> Accessed: 30 March 2021
9. Ackerman L (2007) Five-Minute Veterinary Practice Management Consult, Blackwell Publishing, Ames, IA, USA
10. Bower J, Gripper J, Gripper P, Gunn SD (2001) Veterinary Practice Management. 3rd Edition. Blackwell Science, London, England
11. Ózsvári L (2005) Az állatorvosok motivációi a kisállatgyógyászatban használt anthelmintikumok választásában. Magyar Állatorvosok Lapja, 127:495–503
12. British Veterinary Association (BVA) (2017) Criticism remains for RSA's referral network despite cost of claims falling. Vet Rec, 181:251 <https://doi.org/10.1136/vr.j4135>
13. Dixon, S (2012) Pet insurance, understanding the current state of play. Vet Business J 116:6–9

Közlésre érk.: 2021. aug. 24.

AZ ÁTTÖRÉSES FÁJDALOM

KISÉRTI A KUTYÁKAT

DAXOCOX[®]

ÁTTÖRÉS AZ ÁTTÖRÉSES
FÁJDALOM KEZELÉSÉBEN



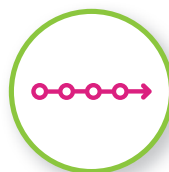
► Daxocox[®] - áttörés az áttöréses fájdalomban

Az első és egyedüli, heti alkalmazású Daxocox[®] tablettá segít a kutyák áttöréses fájdalmának megelőzésében



TULAJDONOSBARÁT

Heti egyszeri, ízesített tablettá egyszerű adagolás
7x kisebb a kihagyott adag kockázata a napi adagoláshoz képest.



ÁLLANDÓ PLAZMASZINT

Folyamatos fájdalomkontroll
7napon át
A Daxocox[®] 24 óra alatt eléri a kívánt plazmaszintet, és fenntartja azt 7 napig.



FELLÁNGOLÁSOK

Megbízható fájdalomcsillapítás
A felhasználóbarát alkalmazás és a 7 napig tartó, kimagasló hatékonyság kombinációjának köszönhetően minimalizálja a fellángolások esélyét.



A BETEGSÉG ELŐREHALADÁSA

Az OA összes szakaszára engedélyezve
Folyamatosan alkalmazható a több irányú fájdalom management részeként.



A Daxocox[®] egy szelektív COX2 inhibitor NSAID gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító, kutyák osteoarthritisének kezelésére engedélyezve.

7 NAPOS FARMAKOLÓGIAI HATÁS



(70) 776 15 74 • (70) 365 75 48 • (70) 776 10 55 • (70) 512 64 55
www.virbac.hu

Shaping the future
of animal health

Virbac

Investigation of
selected intestinal
damage biomarkers in
determination of intestinal
damage in dogs with
isosporiasis

I. K. Yıldız
M. Ok*

Selcuk University,
Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Internal Medicine
42003, Konya, Turkey

*e-mail: mok@selcuk.edu.tr

Bélrendszeri károsodást jelző biomarkerek vizsgálata *Isospora*- fertőzött kutyákban

Ibrahim Kubilay Yıldız, Mahmut Ok*

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen tanulmányban a szerzők bélrendszeri károsodást jelző biomarkerek hatékonyságát vizsgálták isosporiasisos kutyák bélhámkárosodásának diagnosztikájában. 30 *Isospora*-fertőzött és 10 egészséges kutya véréből végeztek hematológiai vizsgálatot, valamint az intestinalis zsírsavkötő fehérje (I-FABP), a trefoil faktor 3 (TFF3), az intestinalis alkalikus foszfatáz (IAP) és az ACTG2 (gamma enteric smooth muscle actin) szint meghatározást. Fertőzött kutyákban ezen faktorok szintje, valamint a granulocyták száma nőtt, míg a vörösvérsejtek száma, a hematokrit- és hemoglobinnérték csökkent. A vizsgált biomarkerek hatékonyak bizonyultak *Isospora*-fertőzéssel járó bélhámkárosodás kimutatására kutyákban.

SUMMARY

This study aimed to investigate the potential efficacy of selected intestinal damage biomarkers in determination of the presence of intestinal epithelial damage in dogs with isosporiasis.

Animal material of this study consisted of 40 dogs in total, aged 2-6 months old from different breeds, both sexes. Of these, 30 were infected with isosporiasis (Trial Group) and 10 were healthy (Control Group). Fatigue, depression, fever, vomiting, abdominal pain, and mucoid to hemorrhagic diarrhea were observed in the Trial Group. The diagnosis was confirmed by the presence of *Isospora* oocytes under microscopic examination of fecal samples of dogs suspected of being affected with isosporiasis. Blood samples were taken from all dogs via *v. cephalica* or *v. cephana* venepuncture and hemogram analysis was performed using autoanalyzer from blood samples with anticoagulant (K_3 EDTA). For biomarker measurements, blood samples with coagulant were used. Serum intestinal-fatty acid-binding protein (I-FABP), trefoil factor 3 (TFF3), intestinal alkaline phosphatase (IAP), and gamma-enteric smooth muscle actin (ACTG2) levels were measured with ELISA kits. As a result of standard treatment protocol, 28 of 30 dogs with isosporiasis recovered while two of them died.

Results of hemogram analysis showed that leukocytes (WBC) and granulocytes (Gran) levels were increased whereas erythrocytes (RBC), hematocrit (Hct), and hemoglobin (Hgb) levels were decreased. Moreover, serum I-FABP, IAP, TFF3, and ACTG2 levels were found to be significantly higher in dogs with isosporiasis compared to the healthy ones.

In conclusion, this study showed a significant increase in serum I-FABP, IAP, TFF3, and ACTG2 levels in dogs with isosporiasis. Also, these biomarkers were found to be useful and reliable in determination of intestinal epithelial damage caused by isosporiasis in dogs.

This manuscript was summarized from M.Sc. thesis of Ibrahim Kubilay Yıldız.

KISÁLLAT

Az isosporiasis, más néven coccidiosis vagy cystoisosporiasis, a kutyák egyik leggyakoribb gyomor-bélrendszeri fertőzése, amelyet leggyakrabban *Isoospora canis*, *I. ohioensis*, *I. neorivolta*, és *I. burrowsi* fajok okoznak [1–4]. A betegség főként 2–6 hónapos kutyakölykökben fordul elő, különösen kóbor vagy menhelyen tartott állatok esetén, ahol a rossz higiéniai viszonyok és a zsúfoltság növelik a betegség megjelenésének kockázatát [5–7]. A fertőzés sporulált *Isoospora*-oociszták felvételével történik, amelyekből az epe hatására sporozoiták szabadulnak ki, majd kezdenek szaporodni a bélben. A merogonia a bélhámsejtekben zajlik, a sejtek és a villusok károsodását, valamint következményes felszívódási zavart okozva [4]. A fertőzés elsősorban fiatal állatokat érint, és vérzéses bélgyulladással, fogyással, kiszáradással, valamint elhullással jár. A vérzéses bélgyulladás hátterében a bélhámsejtekben osztódó *Isoospora*-merozoiták által okozott vékony- és vastagbélhám-károsodás áll [4, 7].

A különböző oktanú bélgyulladások kezelési protokolljának kialakításához napjainkban bélrendszeri károsodást jelző biomarkereket használnak, amelyekkel a károsodás helye és súlyossága vizsgálható [8–13]. A biomarkerek különböző, a szervezet által szintetizált fehérjék, amelyek közül egyesek a bélben kialakult károsodást jelzik, míg mások ezekkel szemben látnak el védő, vagy helyreállító szerepet [8, 9].

Ezen biomarkerek egyike az *intestinalis zsírsavkötő fehérje* (intestinal fatty-acid binding protein, I-FABP), amely vizsgálata megbízható információt nyújt a nyálkahártyák károsodásáról [8–13]. Az I-FABP a gyomorban és a bélben szabadul fel, és heveny ischaemiás bélkárosodás megállapítására használható [14]. Egy másik faktor, a TFF-3 (trefoil faktor 3) esetében leírták, hogy szignifikánsan megemelkedik a szintje elhalásos bélgyulladásban (necrotizing enterocolitis, NEC) szenvedő gyerekek esetében, hasonlóan az I-FABP és az L-FABP (Liver-type fatty acid binding protein, máj zsírsavkötő fehérje) faktorokhoz [15]. Ezentúl szignifikánsan nagyobb I-FABP-értékeket írtak le gyulladásos bélbetegségben szenvedőknél, gyógyult és egészséges személyekhez viszonyítva [16]. Szintén emelkedett I-FABP értékeket találtak *Giardia*-fertőzött gyerekekben egészséges társaikhoz képest [17]. Koraszülött borjak I-FABP- és L-FABP-értékei nagyobbak bizonyultak, mint az egészséges egyedeké, függetlenül attól, hogy légzési distressz szindrómával (RDS) terheltek voltak-e [11]. Újszülöttkori hasmenéses borjak esetén szintén szignifikánsan emelkedik ezen két biomarker koncentrációja, amely alátámasztja alkalmazhatóságukat a bélhámkárosodás diagnosztizálásában [13]. GULERSOY és mtsai parvovírussal fertőzött kutyákban vizsgálták az I-FABP-szintek alakulását, és ezen betegség esetén is szignifikáns emelkedést tapasztaltak egészséges állatok értékeihez viszonyítva, így a biomarker hatékonyak és

One of the most common gastrointestinal infection that affect dogs is isosporiasis, which is known as coccidiosis or cystoisosporiasis. Generally, *Isoospora (I) canis*, *I. ohioensis*, *I. neorivolta*, and *I. burrowsi* species cause isosporiasis in dogs [1–4]. Isosporiasis is more common in puppies aged between 2–6 months, especially among stray dogs and at shelters where puppies live together and where poor hygienic conditions and overcrowding pose a serious threat of occasional outbreaks [5–7]. Transmission occurs with the oral intake of sporulated *Isoospora* oocysts and sporozoite from oocysts opened with the effect of bile acid which begin to multiply in the intestines. The merogonic proliferation in the intestinal epithelium cells causes epithelial cell destruction, loss of villus and malabsorption [4]. The infection affects especially younger animals causing weight loss, hemorrhagic enteritis and dehydration resulting in death. The cause of hemorrhagic enteritis is a serious damage to the small and large intestine epithelium during the proliferation phase of *Isoospora* sporoids [4, 7].

Recently, the localization and severity of damage caused by different diseases and agents have been evaluated by assessing various intestinal damage biomarkers in order to guide treatment protocols in enteritis cases [8–13]. Intestinal biomarkers are proteins that are naturally synthesized in the organism. Some of these biomarkers act as indicators of damage in the intestines while others act as protectors and/or repairments of the damage [8, 9].

One of these biomarkers, I-FABP is considered to be a reliable diagnostic biomarker for determining mucosal damage [8–13]. I-FABP, which is released from the stomach and intestines, is a biomarker that can be used to determine acute ischemic intestinal damage [14]. TFF-3 was found to be increased significantly in infants with necrotizing enterocolitis (NEC) along with I-FABP and L-FABP [15]. I-FABP levels were found to be significantly higher in humans with inflammatory bowel disease compared to the survivors and healthy individuals [16]. I-FABP level was found to be high in children with Giardiasis compared to the healthy ones [17]. In premature calves with and without respiratory distress syndrome (RDS), I-FABP and L-FABP levels were found to be higher in both groups compared to the healthy calves [11]. It was demonstrated that I-FABP and L-FABP increase significantly in calves with neonatal diarrhea caused by different infectious factors which makes these biomarkers very efficient in determining intestinal epithelial damage [13]. GULERSOY et al (2020) [12] found that in dogs with parvoviral enteritis, I-FABP levels were increased significantly compared to healthy dogs and that I-FABP was a useful and reliable biomarker either for determining intestinal damage and predicting mortality.

TFF-3 is considered to be the most important peptide involved in protecting the intestinal mucosa and repair-

megbízhatónak bizonyult a bélkárosodás, valamint a mortalitás előrejelzésében [12].

A bélnyálkahártya védelmében, valamint károsodásainak helyreállításában résztvevő legfontosabb peptid a TFF-3 [18], amelynek szintje – hasonlóan az I-FABP és L-FABP-hez – megemelkedik NEC-ben szenvedő betegekben a bélnyálkahártya károsodása következményeként kialakuló gyulladáshoz való válasz során [15]. Leírták továbbá a TFF-3 mennyiségének növekedését atréziás, vastagbélgyulladásos [10], valamint koraszülött, RDS-es borjakban [11]. Szintén emelkedett TFF-3-értékeket mértek újszülöttkori hasmenéses borjakban [13] és parvovírusos kutyákban az egészséges egyedekhez viszonyítva [12].

Az *intestinalis alkalikus foszfatáz* (intestinal alkaline phosphatase, IAP) a különböző bélszakaszok közül elsősorban a patkó- és éhbélben, jóval kevésbé a csípő- és vastagbélben termelődik [19]. Fő szerepe a bikarbonát előállításának és a duodenum felszíni pH-jának szabályozása, valamint a hosszú szénláncú zsírsavak felszívódásának befolyásolása, de részt vesz az endotoxin (lipopoliszacharid, LPS) semlegesítésében, így helyi és szisztémás gyulladáscsökkentő hatása is van [20]. Leírták, hogy ezen biomarker szintje szignifikánsan emelkedett vastagbél-atréziás borjakban [10], különböző oktanú bélgyulladásos borjakban [13], továbbá humán betegekben, ahol a bélsatornában elhalás alakult ki [21].

A plazma *intestinalis* γ -simaizomaktin (gamma enteric smooth muscle actin, ACTG2) szintje szintén szignifikánsan megnő vékony- és vastagbélgyulladásban szenvedő gyerekekben, így fontos szerepe lehet a bélsatorna károsodásának kimutatásában [22]. Ezen túl *Escherichia coli*-val fertőzött [13], valamint koraszülött, RDS-es borjak [11] esetében is leírták a biomarker szignifikánsan nagyobb mennyiségét. Ez utóbbi esetben az RDS-es állatok ACTG2-szintje nagyobb volt a nem koraszülött, és a koraszülött, nem RDS-es csoport értékeinél is, amelynek hátterében feltehetően a bélsatorna ischaemiája és hypoxiája állt [11].

Jelen vizsgálat célja az volt, hogy a fenti, bélrendszeri károsodást jelző biomarkerek szintjét és diagnosztikai alkalmazhatóságát vizsgálja egy új területen: *Isospora*-fertőzött kutyák bélhámkárosodásának kimutatásában.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A VIZSGÁLATBAN SZEREPLŐ ÁLLATOK

A Kísérleti Csoportba összesen 30, tulajdonosnál élő, 2 és 6 hónap közötti életkorú, vegyes fajtájú és nemű kutya került. Ezen állatok mindegyike nyálkástól véresig terjedő súlyosságú hasmenéssel került be a kísérletben részt vevő klinikára vizsgálat és gyógykezelés céljából, majd mindegyikükönél *Isospora*-fertőzést diagnosztizáltak. További bevonási kritérium volt még a közepes

ing damage of the gastrointestinal tract [18]. It has been reported that TFF-3 concentrations increase together with I-FABP and L-FABP after inflammatory response caused by intestinal mucosal damage in patients with NEC [15]. YILDIZ et al (2018) [10] found that TFF-3 levels in calves with atresia-colitis were significantly higher compared with the healthy ones. TFF-3 level was reported to be high in premature calves with RDS (YILDIZ et al., 2019). Also, Ok et al (2020) [13] found that the level of TFF-3 in calves with neonatal diarrhea caused by different infectious agents was significantly higher than that of the healthy calves. GULERSOY et al (2020) reported that TFF-3 levels increased significantly in dogs with parvoviral enteritis compared to healthy dogs [12].

Intestinal alkaline phosphatase (IAP) is expressed in large quantities in the duodenum and jejunum in the gastrointestinal tract, but much less in the ileum and colon [19]. The main functions of IAP in the gastrointestinal tract are regulation of bicarbonate secretion and pH on the surface of the duodenum, adjusting the absorption of intestinal long-chain fatty acids, detoxification of endotoxin lipopolysaccharide (LPS), which has local intestinal and systemic anti-inflammatory effects [20]. Serum IAP level was found to be significantly higher in calves with atresia coli compared to the healthy ones [10]. McLACHLAN et al (1993) [21] reported significantly higher levels of IAP in patients with intestinal necrosis. Ok et al (2020) [13] found a significant increase in IAP level in calves with enteritis caused by different etiological agents. Plasma ACTG2 has been reported to increase significantly in infants with enterocolitis and may be a useful marker for diagnosing intestinal muscle damage [22]. Serum ACTG2 levels of neonatal calves infected with *E. Coli* were reported to be significantly higher than the healthy ones [13]. In premature calves with RDS, ACTG2 levels were found to be higher compared both to the Control group and the non-RDS group and this was attributed to hypoxic ischemia in the intestines caused by RDS [11].

Therefore, this study aimed to investigate the efficacy of selected intestinal damage biomarkers in determination of the presence of intestinal epithelial damage in dogs with isosporiasis.

MATERIALS AND METHODS

ANIMAL MATERIAL

The Trial Group of the present study consisted of 30 owned dogs, aged 2-6 months from different breeds and sexes. All were admitted to the clinic for diagnosis and treatment for mucoid to hemorrhagic diarrhea. The dogs in the Trial Group were diagnosed with isosporiasis. Only dogs with a moderate dehydration (8-10%) and confirmed isosporiasis were included. The purpose of selection of dogs with isosporiasis with 8-10% dehydration was the

fokú (8–10%-os) dehidráció megléte a fertőzött állatoknál, amely már valószínűsítette ezen egyedeknél az elégtelen keringésből fakadó ischaemiás károsodást a bélsatornában. A kontrollcsoport állatai (összesen 10) klinikai és laboratóriumi vizsgálatok alapján egészségesnek bizonyult, hasonló korú, fajtájú és nemű kutyák voltak.

FERTŐZÖTT ÁLLATOK KIVÁLASZTÁSA

A kísérleti csoport állatainak körelőzményébe felvételle került a koruk, fajtájuk, nemük, valamint a tüneteik megjelenésének ideje, továbbá sor került rutin klinikai vizsgálatukra is. Az isosporiasis megállapítása az állatoktól vett bélsárminta mikroszkópos vizsgálatával történt, Fülleborn-féle flotációs módszerrel, az *Isospora*-oocysták jelenléte alapján. A differenciáldiagnózis szempontjából szóba jövő egyéb, nyálkás-véres hasmenést okozó betegségek (parvovírusos bélgyulladás, szopornyica, giardiosis) kizárása antigén-gyorstesztekkel történt a kutyák bélsármintájából (CPV/CCV/Giardia Ag Rapid Test, Vet Expert®, Lomianki, Lengyelország), és az állatok csak ezen tesztek negatív eredménye esetén kerülhettek be a kísérleti csoportba.

EGÉSZSÉGES ÁLLATOK KIVÁLASZTÁSA

A kontrollcsoport állatai szintén tulajdonosnál élő kutyák voltak, a kísérleti csoporthoz hasonló kor, fajta és nem eloszlással, amelyeket rutin ellenőrzés vagy vakcinázás céljából vittek be a klinikára. Ezen kutyák esetén is történt klinikai vizsgálat, valamint kiegészítő laboratóriumi tesztek (hematológia, mikroszkópos bélsárminta vizsgálat, antigén gyorsteszt), amelyek minden esetben negatív eredményt adtak, vagyis ezen csoport állatai egészségesek voltak.

VÉRVÉTEL

A hematológiai értékek és biomarkerszintek vizsgálata céljából az *Isospora*-fertőzött állatok vérvételére a kezelésük előtt és után került sor (0. és 7. nap), a *v. cephalica* és a *v. saphena*-ból, véralvadásgátlót tartalmazó, és attól mentes vérvételi csövekbe egyaránt. Az egészséges kutyákból csak egyszer történt vérvétel, szintén véralvadásgátlós és anélküli csövekbe. A K_3 EDTA-s vérvételi csövek tartalma került hematológiai vizsgálatra, amelyre a mintavétel utáni 5–10 percben került sor. Az alvadásban nem gátolt csövek 15 perces szobahőmérsékleten való tárolás után centrifugálásra kerültek (5000 rpm fordulatszám, 10 percig), majd az így nyert szérumot -20°C -on fagyasztva tárolták a biomarkerek meghatározásáig.

KEZELÉSI PROTOKOLL

Az isosporiasis kutyák kezelése standard klinikai protokoll szerint történt, amely folyadék- és elektrolitpótlásból

probable ischemic damage due to the inadequate microcirculation of the intestines as a result of fluid loss. The Control group consisted of 10 dogs from similar ages, breeds and sexes which were determined to be healthy as a result of clinical and laboratory examinations.

SELECTION OF DOGS WITH ISOSPORIOSIS

Anamnestic data included age, breed, sex and duration of the clinical symptoms. Routine clinical examinations of all the dogs were performed. The diagnosis of isosporiasis was made by observing the *isospora* oocytes in microscopic examination of feces samples of the dogs in the Trial Group using the Fülleborn flotation technique, which is one of the methods of parasitologic examination. In the differential diagnosis, parvoviral enteritis, distemper virus infection and giardiasis, which may cause mucoid to hemorrhagic diarrhea, were considered and a rapid fecal antigen test (CPV/CCV/Giardia Ag Rapid Test, Vet Expert®, Lomianki, Poland) was performed from feces samples of the dogs in the Trial Group. All were determined to be negative.

HEALTHY DOG SELECTION

The Control Group consisted of owned dogs from ages, breeds and sexes which were similar to the dogs of the Trial Group. All were admitted to the clinic either for routine check-up or vaccination. As a result of clinical and laboratory examinations including hemogram, microscopic feces examination and rapid antigen test applications, they were determined to be healthy. No *isospora* oocytes were observed in the microscopic feces examination.

COLLECTION OF BLOOD SAMPLES

Blood samples with and without anticoagulants were taken from dogs which were diagnosed with isosporiasis both for hemogram and intestinal biomarker measurements before and after treatment (day 0 and 7) from *v. cephalica* or *v. cephana* venepuncture. Blood samples with and without anticoagulants were taken from the healthy dogs only once. Tubes with K_3 EDTA were used for hemogram measurement. Anticoagulant-free gelatinous tubes were used for serum collection. Hemogram analysis was performed within 5–10 minutes after sampling. After the sampling, blood samples in anticoagulant-free gelatinous tubes were kept at room temperature for 15 minutes and centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes. Their sera were extracted and stored in a freezer at -20°C for the day of biomarker measurement.

STANDARD TREATMENT PROTOCOL

A standardized treatment protocol was administered to the dogs with isosporiasis. The treatment protocol consisted of fluid-electrolyte therapy, anticoccidial drug

(Ringer-Laktát és 5% dextróz, (Polyfleks Polypharma®, Isztambul, Törökország), iv., 3 napig) coccidiumellenes terápiából (szulfadimidin-trimetoprim, Ba-sulfa®, Bavet, Isztambul, Törökország), 50 mg/kg, im., 6 napig), valamint kiegészítő kezeléssel: 3 mg/ttkg B-vitamin komplex (Berovit B12® Ceva, Isztambul, Törökország); 1 mg/kg K-vitamin (Hemadur- K®, Alke, Isztambul, Törökország); és 10 ml/kg aminosav-, ásványianyag- és vitamintartalmú infúzió (Duphalyte®, Zoetis, Isztambul, Törökország, szintén 6 napig) állt. A hasi fájdalom enyhítésére butilszkopolamin-bromid és metamizol-nátrium kombinációját (Buscopan® Compositum Boehringer Ingelheim, Új-Zéland) alkalmazták 3 napig, 0,1 ml/ttkg dózisban. Ezen felül 6 napon keresztül probiotikus *Saccharomyces boulardii* (Reflor®, Biocodex, Isztambul, Törökország) törzset is kaptak az állatok szájon át a bélmikrobióta helyreállítása céljából.

HEMATOLÓGIAI VIZSGÁLAT

A hematológiai vizsgálat (fehérvérsejt-, granulocyt-, lymphocyt-, vörösvérsejt- és vérlemezkeszám, valamint hemoglobin- és hematokritértékek meghatározása) MS4e automatával történt (CFE 279®, Hematology Analyzer, Melet Schlosing Laboratories, Franciaország) a K₃EDTA-s csövekbe vett vénás vérből.

BÉLRENDSZERI KÁROSODÁST JELZŐ BIOMARKEREK VIZSGÁLATA

A szérumban I-FABP, TFF-3, IAP, és ACTG2 szintjeinek meghatározása kutya-specifikus ELISA-kitekekkel (Bioassay Technology Laboratory, Sanghaj, Kína) történt a gyártó előírása szerint. Az első három paraméter esetén a vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti variációs koefficiens (CV) értékei rendre $\leq 8\%$ és $\leq 10\%$ voltak. Az I-FABP mérésénél (katalógusszám: E0304Ca) a legkisebb kimutatható koncentráció (minimal detectable concentration, MDC) értéke 0,12 ng/ml, a kimutathatósági határok pedig 0,3–90 ng/ml között alakultak. A TFF-3 meghatározásánál (katalógusszám: E0436Ca) az MDC 0,022 ng/ml, a határok pedig 0,5–30 ng/ml voltak. IAP-nál (katalógusszám: E0438Ca) az MDC 0,26 ng/ml, a határok 0,5–150 ng/ml között voltak. ACTG2 (katalógusszám: E0437Ca) esetén a vizsgálaton belüli és vizsgálatok közötti CV rendre 8% és $\leq 10\%$ volt, míg az MDC értéke 0,053 ng/ml, a határok pedig 0,1–40 ng/ml.

STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatok statisztikai elemzése SPSS 22.0 (IBM®, USA) szoftverrel zajlott. Az adatok paraméteres vagy nem-paraméteres mivoltának meghatározása Kolmogorov-Smirnov-tesztel, elemzésük pedig ANOVA és post-hoc Tukey-tesztel történt. Az adatok bemutatása átlag \pm szórás formában történik. A próbák során $p < 0,05$ értékek esetén került sor statisztikai szignifikancia megállapítására.

administration and a supportive therapy. As a fluid-electrolyte therapy, lactated ringer's along with 5% dextrose solutions (Polyfleks Polypharma®, Istanbul, Turkey) were given for 3 days via IV route. As an anticoccidial drug, combination of trimethoprim sulfadimidine (Ba-sulfa®, Bavet, Istanbul, Turkey) was applied for 6 days at a dose of 50 mg/kg via IM route. Also, supportive therapy included B complex vitamin (Berovit B12® Ceva, Istanbul, Turkey) at a dose of 3 mg/kg, amino acids, minerals and vitamins (Duphalyte®, Zoetis, Istanbul, Turkey) at a dose of 10 ml/kg and vitamin K (Hemadur- K®, Alke, Istanbul, Turkey) at a dose of 1 mg/kg administrations for 6 days. The combination of butylscopolamine bromide and metamizole sodium (Buscopan®, Compositum Boehringer Ingelheim, New Zealand) was used for 3 days at a dose of 0.1 ml/kg to relieve abdominal pain. In addition, probiotic *Saccharomyces boulardii* (Reflor®, Biocodex, Istanbul, Turkey) was given orally for 6 days to normalize intestinal flora.

HEMOGRAM ANALYSIS

Hemogram parameters including WBC, RBC, Hgb, Hct, and PLT were measured on the MS4e autoanalyzer (CFE 279®, Hematology Analyzer, Melet Schlosing Laboratories, France) from the venous blood samples collected with K₃EDTA containing tubes.

INTESTINAL BIOMARKER ANALYSIS

The concentrations of serum I-FABP, TFF-3, IAP, and ACTG2 biomarkers were measured according to the manufacturer's instructions (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai-China) using commercial ELISA kits specific to dogs. For I-FABP (Cat. No: E0304Ca), intra-assay (in-study) and inter-assay variation coefficients (CV) were $\leq 8\%$ and $\leq 10\%$, minimum detectable concentration (MDC) was 0.12 ng/mL and detection limit range was 0.3 ng/mL–90 ng/mL. For TFF-3 (Cat. No: E0436Ca), intra-assay and inter-assay variation coefficients (CV) were $\leq 8\%$ and $\leq 10\%$, minimum detectable concentration (MDC) was 0.022 ng/mL and detection limit range was 0.5–30 ng/mL, respectively. For IAP (Cat No: E0438Ca), intra-assay and inter-assay variation coefficient (CV) were $\leq 8\%$ and $\leq 10\%$, minimum detectable concentration (MDC) was 0.26 ng/mL, and detection limit range was 0.5 ng/mL–150 ng/mL. For ACTG2 (Cat. No E0437Ca), intra-assay and inter-assay variation coefficient (CV) for was 8% and $\leq 10\%$, minimum detectable concentration (MDC) was 0.053 ng/mL, detection limit range was 0.1 ng/mL–40 ng/mL, respectively.

STATISTICAL ANALYSIS

All data were evaluated by using SPSS 22.0 (IBM®, USA) statistical software. Kolmogorov-Smirnov test was used to determine whether the data were parametric or non-parametric. The results of the study were presented as mean \pm standard error (mean \pm SE). Also, the data were

EREDMÉNYEK

KLINIKAI TÜNETEK

Az isosporiasis kutyák klinikai vizsgálata során a következő tünetek kerültek megállapításra: testtömegvesztés, gyengeség, elesettség, emelkedett testhőmérséklet (21 esetben $>39,1$ °C), sápadt nyálkahártyák, hányás, kiszáradás, hasi fájdalom, valamint nyálkástól véresig terjedő súlyosságú hasmenés. A kezelés 2. napjára ezen tünetek egy része szignifikáns javulást mutatott, ideértve a növekvő étvágyat, a fokozódó érdeklődést a környezet felé, valamint a hányás és hasmenés csökkent előfordulását. Az 5. napra az állatok klinikailag gyógyultnak lettek nyilvánítva, bélsaruk visszanyerte az egészséges konzisztenciáját. A kezelés végére összesen 28 állat teljesen gyógyultan került elbocsátásra a klinikáról. Egy állat hullott el a kezelés utáni 24. órában, egy másik pedig a 60. órában. A kezelés 7. napján a gyógyult állatoktól vér- és bélsár-mintavétel történt, az előbbi hematológiai és biomarker-vizsgálatra, utóbbi pedig mikroszkópos elemzésre *Isospora*-oocysták kimutatása céljából.

BÉLRENDSZERI BIOMARKEREK

A szérum I-FABP-szintje az isosporiasis kutyákban szignifikánsan magasabb volt a kezelés előtt, mint az egészséges állatoké, majd a kezelés végére szignifikánsan csökkent, és így a csoportok közötti különbség megszűnt (1. táblázat, Ábra). Hasonlóan az I-FABP-értékekhez, a fertőzött kutyák IAP-szintje is szignifikánsan magasabb volt a kontrollnál kezelés előtt, majd a különbség a kezelés végére ezen esetben is eltűnt (1. táblázat, Ábra). Ezzel szemben a TFF-3 és ACTG2 esetén a kezelés előtt nem volt különbség a két csoport értékeiben, ugyanakkor a kezelés végére a fertőzött állatok értékei szignifikánsan megemelkedtek (1. táblázat, Ábra). Ezen túlmenően a kezelés után az egészséges kutyákéhoz képest emelkedett ACTG2-értékek voltak megfigyelhetők (1. táblázat, Ábra)

HEMATOLÓGIAI ÉRTÉKEK

A fertőzött állatok fehérvérsejt- és granulocytaszáma a kezelés előtt és után egyaránt szignifikánsan nagyobb volt az egészséges egyedekhez képest, de a kezelés végére ezen értékek csökkentek (2. táblázat). Ezzel szemben a vörösvérsejtek száma, valamint a hemoglobin- és hematokritérték szignifikánsan kisebb volt az isosporiasis kutyákban kezelés előtt és után is a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A lymphocyták és a vérlemezkék száma ugyanakkor nem tért el a két csoport között (2. táblázat).

evaluated by ANOVA and post hoc Tukey test. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

CLINICAL RESULTS

Anorexia, stagnation, weakness, depression, increased body temperature (in 21 cases, >39.1 °C), pallor of the mucous membranes, vomiting, dehydration, abdominal pain, mucoid to hemorrhagic diarrhea were determined as a result of clinical examination of the dogs with isosporiasis. On the 2nd day of the treatment, increase in appetite, interest in the environment, decrease in the frequency of vomiting and diarrhea and a significant clinical improvement were observed. On the 5th day of the treatment, the feces had completely solidified, returned to its normal consistency and the dogs were recovered clinically. At the end of the treatment, 28 dogs were fully recovered and discharged from the clinic. One dog died at the 24th hour and another one died at the 60th hour during the treatment protocol. On the 7th day of treatment, blood and feces samples were taken from the dogs that recovered. The feces samples were evaluated microscopically for the presence of *isospora* oocysts and no oocysts were observed.

INTESTINAL BIOMARKER RESULTS

While it was determined that the serum I-FABP level of dogs with isosporiasis before the treatment was statistically significantly higher than that of healthy dogs, no statistical difference was determined after the treatment (Table 1, Figure). Moreover, it was observed that the serum I-FABP level before the treatment decreased statistically significantly after the treatment. Even though significantly higher serum IAP level of dogs with isosporiasis before the treatment was observed, no statistical difference was determined after the treatment (Table 1, Figure). While the pre-treatment serum TFF-3 levels of dogs with isosporiasis were not statistically different compared to healthy dogs, a significant increase was determined after the treatment (Table 1, Figure). The pre-treatment serum ACTG2 level of dogs with isosporiasis was not statistically different compared to the healthy dogs whereas a significant increase was determined after the treatment. In addition, increased post-treatment serum ACTG2 level was observed compared with the healthy dogs (Table 1, Figure).

HEMOGRAM RESULTS

It was determined that the levels of WBC and granulocytes pre- and post-treatment of dogs with isosporiasis were statistically significantly higher compared with the healthy ones (Table 2). After the treatment, there was a reduction in the levels of these parameters. It was

determined that the levels of RBC, Hgb, and Hct in dogs with isosporiasis pre- and post-treatment decreased significantly compared with the healthy ones. In terms of lymphocytes and PLT levels, no statistical differences were determined (Table 2).

1. TÁBLÁZAT. A szérumban I-FABP, IAP, TFF3 és ACTG2 biomarker szintjei egészséges és isosporiasisos kutyákban, kezelés előtt és után (átlag ± szórás). Control: kontroll – egészséges állatok, Pre-treatment: fertőzött állatok kezelés előtt, Post-treatment: fertőzött állatok kezelés után

TABLE 1. Serum I-FABP, IAP, TFF3 and ACTG2 levels in the healthy and diseased dogs before and after treatment (mean ± SE)

Parameters	Control Group (n = 10)	Pre-treatment (n = 30)	Post-treatment (n = 28)
I-FABP (ng/mL)	2,42 ± 0,41b	5,36 ± 0,36a	3,40 ± 0,48b
IAP (ng/mL)	2,94 ± 0,23b	4,66 ± 0,21a	3,72 ± 0,28ab
TFF-3 (ng/mL)	2,02 ± 0,12b	2,73 ± 0,12ab	2,84 ± 0,25a
ACTG2 (ng/mL)	14,95 ± 0,82b	16,12 ± 0,17b	18,62 ± 0,60a

I-FABP: Intestinal-fatty acid binding protein, IAP: Intestinal alkaline phosphatase, TFF3: Trefoil factor 3, ACTG2: Gamma-intestinal smooth muscle actin
a, b : Means in the same row with different letters differed significantly ($p \leq 0.05$)

a, b: A sorokban szereplő számok utáni eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p \leq 0,05$)

2. TÁBLÁZAT. Hematológiai értékek egészséges és isosporiasisos kutyákban, kezelés előtt és után (átlag ± szórás). Control: kontroll – egészséges állatok, Pre-treatment: fertőzött állatok kezelés előtt, Post-treatment: fertőzött állatok kezelés után

TABLE 2. The hemogram parameters in healthy dogs and dogs with isosporiasis before and after treatment (Mean ± SE)

Parameters	Control Group (n = 10)	Pre-treatment (n = 30)	Post-treatment (n = 28)
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,95 ± 0,52b	15,22 ± 1,27a	13,95 ± 0,98a
Lymph. ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5,47 ± 0,47a	6,69 ± 0,73a	6,29 ± 0,57a
Gran. ($10^3/\mu\text{L}$)	2,78 ± 0,38b	6,83 ± 0,92a	4,93 ± 0,52ab
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,69 ± 0,36a	4,73 ± 0,22b	5,29 ± 0,21b
Hgb (g/dL)	13,31 ± 0,79a	8,64 ± 0,41b	10,36 ± 0,46b
Hct (%)	50,10 ± 3,02a	34,25 ± 1,59b	40,76 ± 2,05b
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	107,60 ± 25,12a	167,10 ± 17,01a	141,82 ± 14,10a

WBC: Leukocytes/Fehérvérsejtszám, Lymph: Lymphocytes/Lymphocytaszám, Gran: Granulocytes/Granulocytaszám, RBC: Red blood cells/Vörösvérsejtszám, Hgb: Hemoglobin, Hct: Hematocrite/Hematokrit, PLT: Trombocyte/Vérlemezkészám

a, b : Means in the same row with different letters differed significantly ($p \leq 0.05$)

a, b: A sorokban szereplő számok utáni eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p \leq 0,05$)

ÁBRA. A szérumban I-FABP, IAP, TFF3 és ACTG2 biomarker szintjei egészséges és isosporiasisos kutyákban, kezelés előtt és után
Control: kontroll – egészséges állatok, Pre-treatment: fertőzött állatok kezelés előtt, Post-treatment: fertőzött állatok kezelés után
I-FABP: Intestinal-fatty acid binding protein, IAP: Intestinal alkaline phosphatase, TFF3: Trefoil factor 3, ACTG2: Gamma-intestinal smooth muscle actin

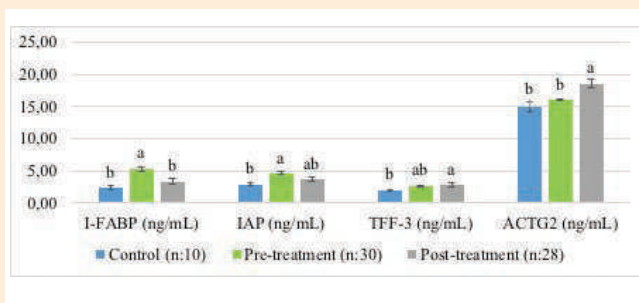


FIGURE. Serum I-FABP, IAP, TFF3 and ACTG2 biomarker levels in healthy dogs and dogs with isosporiasis before and after treatment
I-FABP: Intestinal-fatty acid binding protein, IAP: Intestinal alkaline phosphatase, TFF3: Trefoil factor 3, ACTG2: Gamma-intestinal smooth muscle actin

a, b : Means marked with different letters above the columns differed significantly ($p \leq 0.05$)

a, b: Az oszlopok feletti eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p \leq 0,05$)

MEGVITATÁS

Jelen vizsgálat során *Isoospora*-fertőzött kutyák bélrendszeri károsodása került vizsgálatra egyes bélkárosodásra specifikus biomarkerekkel. Jelenleg a szakirodalomban ezen területről korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésre, így a kapott eredmények más fajokkal, elsősorban humán adatokkal hasonlíthatók össze.

A biomarkerek, mint az I-FABP, TFF3, ACTG2, IAP, CLDN (claudin) és az LP (leptin), elsősorban a bélhámsejtek által szintetizált fehérjék, amelyeknek fontos szerepe van a nyálkahártya károsodásának kimutatásában. Akut ischaemiás bélgyulladás esetén a bélhámsejtek I-FABP-leadása nő, amelynek következtében a vérben megemelkedik ezen paraméter szintje [14]. NEC-ben szenvedő gyerekek esetén azt találták, hogy az I-FABP-, L-FABP- és TFF-3-szintek szignifikánsan megemelkedtek [15]. THUIJLS és mtsai leírták azt is, hogy NEC-ben elhunyt betegek szérum I-FABP- és TFF-3-értékei szignifikánsan nagyobbak voltak azokénál, akik túléltek a betegséget. Azt is megállapították, hogy ezen biomarkerek megbízhatóan alkalmazhatók a NEC diagnosztizálására [23]. ABDEL-HAIE és mtsai szintén szignifikánsan magasabb szérum I-FABP-szinteket találtak NEC-beteg újszülöttekben, és arra a következtetésre jutottak, hogy a biomarker használható lehet a betegség korai diagnózisára, valamint a prognózis meghatározására [24]. COUFAL és mtsai NEC-ben szenvedő gyerekek vizeletében találtak szignifikáns I-FABP-, L-FABP-és TFF3-emelkedést, különösen azokban, akiknél septicaemia is kialakult. Megállapították, hogy ezen biomarkerek vizsgálata jelentősen hozzájárulhat a NEC noninvasív diagnózisához, valamint megfelelő kezeléséhez [25]. NG és mtsai leírták, hogy az I-FABP, amely egy bélbarrier fehérje, hatékony, új biomarker koraszülöttek korai NEC-diagnózisában [26]. Ugyanakkor az I-FABP nem volt alkalmas hasi kompartment szindrómás betegekben a hasi szerveket érintő komplikációk rizikójának megállapítására [27]. GIARDIASISOS gyerekekben szintén magasabb I-FABP-szinteket tapasztaltak egészséges társaikhoz viszonyítva [17]. YILDIZ és mtsai vastagbél-atréziás borjakban találtak emelkedett I-FABP- és L-FABP-értékeket, amit az elzáródás előtt felgyülemelő bélsár által okozott bélfali nyomás következményeként kialakuló ischaemiás károsodásnak tulajdonítottak. Megállapították továbbá, hogy az L-FABP egy megbízható diagnosztikai marker [10].

Kísérletesen kiváltott heveny ischaemiás bélkárosodásban az I-FABP szintén megbízható bélkárosodást jelző biomarkernek bizonyult emberekben [14, 28]. HOLMES és mtsai akut bélgyulladás és ischaemia esetén találtak szignifikánsan emelkedett szérum- és vizelet I-FABP-szinteket, és megállapították, hogy ezen biomarker használható lehet az ischaemia és gyulladás okozta bélkárosodás korai diagnózisára [29]. Akut hasi

DISCUSSION

In this study, damage of the intestines in dogs with isosporiasis and its severity were demonstrated by using intestine-specific damage biomarkers. However, since the available publications about the current subject in dogs are quite limited, the present results are discussed mostly on the basis of the literature from the other species, especially humans.

Biomarker proteins such as I-FABP, TFF3, ACTG2, IAP, CLDN, and LP are mostly synthesized by enterocytes and are clinically important for the detection of intestinal mucosal damage. Intestinal fatty acid-binding proteins in enterocytes cause an increase in the blood I-FABP level by releasing I-FABP from the enterocytes into the blood in cases of intestinal damage caused by acute ischemic enteritis [14]. It was demonstrated that I-FABP, L-FABP and TFF-3 levels increase significantly in infants with NEC [15]. THUIJLS et al (2010) [23] showed that serum I-FABP and TFF-3 levels in patients with NEC were significantly higher in those who died of the disease compared to the survivors. Also, it was reported that these biomarkers were highly reliable in the determination of the presence of NEC. Moreover, ABDEL-HAIE et al (2017) [24] reported that the serum I-FABP level increased significantly in neonatal infants with NEC and could be a useful biomarker for early diagnosis and prediction of the prognosis of the disease. COUFAL et al (2020) [25] determined a significant increase in urine I-FABP, L-FABP, and TFF3 levels in infants with NEC, especially in those who developed sepsis, and reported that these biomarkers could contribute significantly as a noninvasive diagnosis and for adequate management of NEC. NG et al (2020) [26] have revealed that I-FABP, one of the intestinal barrier proteins, is a useful novel unique biomarker for the early diagnosis of NEC in preterm infants. However, it was also reported that I-FABP as a biomarker has no significance in determining the risk of complications that may develop in the abdominal organs of people due to abdominal compartment syndrome [27]. I-FABP level was found to be higher in children with Giardiasis compared to the healthy ones [17]. YILDIZ et al (2018) [10] indicated that the serum I-FABP and L-FABP levels increased significantly in calves with atresia coli compared to the healthy calves and this increase was attributed to the content which accumulated ahead of the obstruction that had caused ischemic damage by compressing the intestinal wall. As a result, it was reported that L-FABP is a reliable diagnostic marker.

In the determination of the experimentally induced acute intestinal ischemic damage in humans, I-FABP was reported to be a reliable intestinal damage biomarker [14, 28]. HOLMES et al (2001) [29] reported that the blood and urine I-FABP level in acute intestinal inflammation and ischemia were increased significantly and

panaszokkal kórházba kerülő betegek esetén a szérum I-FABP-szintje szintén megbízható paraméternek bizonyult a vékonybelet érintő ischaemia rizikójának megállapítására [30].

Állatorvosi területen kólikás lovak esetén írták le, hogy a vér és a peritoneális folyadék I-FABP-szintjének mérése használható a prognózis, valamint egy esetleges hasi műtét szükségességének megállapítására [31]. Ezen túl sertésekben is azt találták, hogy a plazma I-FABP-szintje szignifikánsan emelkedik kísérletesen kiváltott bélkárosodás esetén, és hogy ezen biomarker mennyisége megbízható paraméter a károsodás meghatározására, valamint a bélcsatorna egészségének monitorozására [32].

Lovak és sertések mellett borjakban is azt tapasztalták, hogy az I-FABP- és L-FABP-szintek szignifikánsan emelkednek újszülött, különböző fertőző oktanú hasmenéses borjakban, továbbá, hogy a mérésük használható a bélhám károsodásának meghatározására [13]. Ezen túl GULERSOY és mtsai emelkedett I-FABP-értékeket mértek parvovírusos bélgyulladásban szenvedő kutyákban az egészséges egyedekhez hasonlítva, és a biomarkert megfelelőnek találták a bélkárosodás és a mortalitás előrejelzésére [12].

Jelen vizsgálatban *Isoospora*-fertőzött kutyák esetén a kezelés előtt mért I-FABP-szintek szignifikánsan magasabbak voltak az egészséges állatokhoz viszonyítva, majd a biomarker szintje szignifikánsan csökkent és a kezelés végére a csoportok közötti különbség eltűnt (1. táblázat). Az eredmények alátámasztják, hogy az I-FABP megbízhatóan használható paraméter a bélrendszeri károsodás meghatározására, ahogy az a korábbi tanulmányokban is megállapításra került [10–14, 17, 24, 26, 30, 32]. Az *Isoospora*-fertőzött kutyák vérében mért emelkedett I-FABP-szintek mögött feltételezhetően a bélhámsejtek szerkezeti károsodása állt, amelyet az élősködő okozott, és amelynek következményeként a biomarker a sejtekből a keringésbe került [17]. A kezelés hatására csökkenő I-FABP-szintek pedig a károsodott hámréteg regenerációjával függtek össze, amely összhangban áll az irodalmi adatokkal [14, 23]. A bélkárosodást jelző biomarkerek vizsgálatát elsőként GULERSOY és mtsai végezték kutyákban a bélkárosodás megállapítása céljából [12]. Ebben a kutatásban parvovírusos bélgyulladásban kialakuló bélkárosodás mérésére az I-FABP megfelelő biomarkernek bizonyult. Jelen vizsgálat során az I-FABP isosporiasis kutyák bélkárosodásának kimutatására is alkalmasnak mutatkozott, így a kapott eredmények összhangban állnak a korábbi, kutyákról szóló publikációval [12].

Az IAP-nek jelentős és összetett szerepe van a bélcsatorna természetes védekező folyamataiban. A bélhámsejtek károsodása esetén felszabadul az apikális mikrovillusokból, részt vesz a baktériumok nyálkahártya

that this biomarker could be used as an indicator for early diagnosis to determine the damage to the intestines as a result of ischemia and inflammation. It was reported that serum I-FABP measurement was a reliable parameter for assessing the risk of ischemia in the small intestine in people who were admitted to the hospital with acute abdominal complaints [30]. It was expressed that blood and peritoneal fluid I-FABP measurement can be used to determine the necessity of abdominal surgery and for the prognosis in the treatment of horses with colic [31]. It was determined that plasma I-FABP in experimentally induced intestinal damage in pigs increased significantly and thus, I-FABP was a reliable parameter that could be used both for determination of intestinal damage and for monitoring intestinal health [32].

It has been shown that I-FABP and L-FABP increase significantly in calves with neonatal diarrhea caused by different infectious factors. For this reason, these biomarkers could be very useful and reliable in determining intestinal epithelial damage [13]. In addition, GULERSOY et al (2020) [12] found that I-FABP level significantly increased in dogs with parvoviral enteritis compared with the healthy ones and that I-FABP was determined to be a useful and reliable biomarker for determining both for intestinal damage and mortality prediction. In the present study, it was determined that pre-treatment serum I-FABP level of dogs with isosporiasis was significantly higher than that of the healthy ones while no statistical difference was determined in terms of post-treatment. However, it was observed that serum I-FABP level decreased significantly compared to the post-treatment level (Table 1). As reported by many researchers [10–14, 17, 24, 26, 30, 32], it was demonstrated also in this study that I-FABP was a useful and reliable biomarker in determining intestinal damage due to various causes. The main reason for the elevated level of I-FABP in the blood in case of intestinal damage was thought to be the release of I-FABP by enterocytes into the circulation as a result of disruption of the structure of intestinal enterocytes by isospora species [17]. The reason of the decreased I-FABP level after the treatment was considered to be related to the repair of damaged epithelial as a result of treatment. This finding was consistent with the previous [14, 23]. The first study about the efficacy of intestinal damage biomarkers in determining intestinal damage in dogs was conducted by GULERSOY et al (2020) [12]. In their study, it was reported that significant damage of the intestines occurred in cases of parvoviral enteritis and thus, I-FABP was determined to be a useful diagnostic biomarker for detecting this damage. In the present study, a significant damage to the intestines in isosporiasis of dogs was evident and I-FABP, one of the intestinal damage biomarkers, was determined to be a useful diagnostic

barrieren keresztüli transzlokációjával szembeni védelemben, valamint hozzájárul az LPS detoxikálásához, és a bélmikrobióta homeosztázisának fenntartásához [19, 20, 33]. Szignifikánsan magasabb IAP-szintek voltak mérhetőek a bélcsatorna elhalása esetén emberekben [21], újszülött borjak különböző oktanú bélgyulladásánál [13], valamint vastagbél-atréziás borjakban [10]. Jelen vizsgálat során isosporiasisos kutyák kezelés előtti szérumban IAP-szintjei szignifikánsan magasabbak voltak az egészséges egyedekhez képest, amely különbség a kezelés végére már nem volt meg (1. táblázat). Ezen eredmények összhangban vannak a szakirodalmi adatokkal [10, 13, 21]. Az emelkedett IAP-értékek mögött feltételezhetően a faktor fokozott, védekező célú leadása áll a bélhámsejtekből, ideértve a baktériumok transzlokációjának gátlását, az LPS detoxikálását, valamint a bélmikrobióta homeosztázisának fenntartását [19, 20, 33]. IAP alkalmazásával védő hatást lehet elérni emberekben NEC ellen [34], a faktor parenteralis beadása pedig csökkentette sepszisben szenvedő emberek és egerek szervi károsodásainak mértékét [35, 36].

A TFF-3 azon biomarker-fehérjék közé tartozik, amelyeket a bélhámsejtek a károsodott nyálkahártya helyreállításának érdekében szekretálnak. Ezen faktor szerepe a szöveti károsodások javítása, a regeneráció segítése [37]. A TFF-3-at tartják a legfontosabb fehérjének a bélnyálkahártya védelmében és a bélcsatorna károsodásainak helyreállításában [18]. A bélnyálkahártya károsodása esetén a bélhámsejtek TFF-3 szekréciója növekszik a regeneráció érdekében, amely a faktor emelkedett plazmaszintjéhez vezet. NEC-ben szenvedő betegekben a bélnyálkahártya károsodása okozta gyulladással járó válaszcélú TFF-3 szintje – hasonlóan az L-FABP és I-FABP értékeihez – megemelkedik [15]. Ezen túl a fehérje plazmakoncentrációja szignifikánsan nagyobb fekélyes vastagbélgyulladásban szenvedő embereknél az egészségesekhez képest, amely alátámasztja, hogy a TFF-3 használható biomarkerként a nyálkahártya károsodásának és gyógyulásának értékelésére [38].

YILDIZ és mtsai emelkedett TFF-3-szinteket mértek atréziás borjakban az egészséges egyedekhez képest [10]. Ehhez hasonlóan GULERSOY és mtsai a faktor mennyiségének szignifikáns emelkedését írták le parvovírusos bélgyulladásban szenvedő kutyákban a nem fertőzött társaikhoz képest. Ezen megfigyelés alapján a TFF-3 – hasonlóan az I-FABP-hoz – megbízhatóan használhatónak bizonyult a bélkárosodás kimutatásában és a mortalitás előrejelzésében [12]. Hasonló megállapításra jutottak Ok és mtsai, akik a TFF-3, I-FABP, L-FABP és IAP alkalmazhatóságát írták le különböző oktanú bélgyulladások okozta bélkárosodás diagnosztikájában [13].

Jelen vizsgálat során az *Isospora*-fertőzött kutyák kezelés előtti TFF-3-szintjei nem tértek el szignifikánsan az egészségesekhez képest, ugyanakkor a kezelés

biomarker in determining the damage in accordance with the findings reported by GULERSOY et al (2020) [12].

Intestinal alkaline phosphatase, which plays an important role in the intestinal defence mechanism, is involved in the prevention of bacterial translocation [19] by being released from apical microvillus in enterocyte damage, in the detoxification of endotoxin lipopolysaccharides, in maintaining normal homeostasis of intestinal microbial and inhibiting translocation of bacteria into the intestinal mucosal barrier [20, 33]. McLACHLAN et al (1993) [21] reported significantly higher levels of IAP in people with intestinal necrosis. Ok et al (2020) [13] showed a significant increase in IAP levels in enteritis in neonatal calves due to different etiological agents. YILDIZ et al (2018) [10] determined that the level of IAP increased significantly in calves with atresia coli. In the present study, it was determined that the pre-treatment serum IAP level of dogs with isosporiasis was significantly higher than the healthy ones whereas no statistical difference was determined in the level of post-treatment (Table 1). Our results are in accordance with the results of previous reports [10, 13, 21]. The reason of the increase in serum IAP level in dogs with isosporiasis was thought to be related to prevent bacterial translocation into the mucosal barrier by increasing IAP release of enterocytes for defence purposes, to provide detoxification of endotoxin lipopolysaccharides that may damage the organism, and also to maintain normal homeostasis of intestinal microbiota [19, 20, 33]. Our findings are in accordance with the earlier results that IAP application provides a protective effect on human NEC [34] and parenteral IAP administration reduces organ damage in human and mice with sepsis [35, 36].

Enterocytes secrete some proteins, so-called intestinal biomarkers, to repair the damage to the intestinal mucosal barrier due to various causes. Of these, TFF-3 has different functions. These functions are repairing tissue damage while the normal epithelial cells remain stable by limiting mucus production stimulation and ensuring the healing of gastrointestinal damage [37]. TFF-3 is considered to be the most important peptide involved in protecting the intestinal mucosa and repairing damage to the gastrointestinal tract [18]. In cases of intestinal mucosal damage, TFF-3 level elevation is caused by increased release from enterocytes for repair purposes. It was reported that TFF-3 concentration increased along with L-FABP and I-FABP after inflammatory response caused by intestinal mucosal damage in patients with NEC [15]. In addition, compared with the healthy individuals, TFF-3 levels were found to be significantly higher in people with ulcerative colitis and thus, TFF-3 may serve as a potential biomarker in the evaluation of mucosal damage recovery [38].

YILDIZ et al (2018) [10] found that serum TFF-3 levels in calves with atresia were higher than the healthy ones.

végére a faktor mennyisége szignifikánsan megemelkedett (1. táblázat). Ezen megfigyelés összhangban van a szakirodalmi adatokkal, ahol leírták a TFF-3 koncentráció szignifikáns emelkedését különböző oktanú bélgyulladásokban [10, 12, 13, 15, 37, 38]. A vizsgálat során tapasztalt TFF-3-emelkedés feltehetően az *Isospora* által okozott vékony- és vastagbélkárosodással szembeni javító mechanizmusok következménye. Ennek hátterében az áll, hogy a bélhámsejtek által szekretált TFF-3 szerepet játszik a károsodások helyreállításában és a nyálkahártya-barrier integritásának fenntartásában a mucinnal együtt [18, 37]. A jelen vizsgálatban tapasztalt enyhe kezelés előtti, és jelentős kezelés utáni TFF-3-szintemelkedés (1. táblázat) vélhetően a gyulladás következtében károsodott nyálkahártya helyreállítását szolgálja. Ezen tapasztalatok összhangban vannak TRAN és mtsai munkájával, ahol a bélcsatornában alkalmazott rekombináns TFF-3 hatékonyan bizonyult patkányok gyulladással járó betegségének kezelésében [39].

Az ACTG2 egy intestinalis simaizomaktin, amely csak a bélcsatorna simaizomszövetében található meg. Ischaemiás vagy elhalásos bélgyulladásban, amikor ez a simaizom jelentősen károsodik, a leadott ACTG2-szintje megnő a vérkeringésben. Minél súlyosabb a bélcsatorna károsodása, annál nagyobb a szérum ACTG2-koncentrációja [40–42]. Az ACTG2-szintje, hasonlóan az I-FABP-hoz, szignifikánsan megemelkedett NEC-ben szenvedő emberekben, és ischaemiás-reperfúziós bélkárosodású patkányokban. Ez alapján az ACTG2 használható biomarker lehet a bélcsatorna simaizom károsodásának meghatározására [22]. Ok és mtsai szignifikánsan magasabb szérum ACTG2-szinteket mértek *E. coli* hasmenéses borjakban a kontroll csoporthoz képest [13], míg YILDIZ és mtsai RDS-es borjakban írták le a faktor mennyiségének emelkedését a kezelés előtti állapothoz képest a kezelés végére [11].

Jelen vizsgálat során az isosporiasis kutyák kezelés előtti ACTG2-szintje nem különbözött az egészséges állatokétól, ugyanakkor a kezelés végére szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a faktor koncentrációjában (1. táblázat). Ezen tapasztalat összhangban van a korábbi publikációk adataival, ahol magasabb ACTG2-szinteket mértek különböző oktanú bélgyulladásos esetekben [11, 13, 22, 40–42]. Az *Isospora*-fertőzött kutyákban megfigyelt ACTG2-emelkedés feltehetően annak a következménye, hogy a parazita a nyálkahártyarétegen átjutva a bélcsatorna izomszövetét is károsítani tudta. A kezelés végén is fennmaradó emelkedett ACTG2-szintek arra utalhatnak, hogy a rendelkezésre álló rövid alatt még nem zajlott le a károsodott szövetek helyreállítása. Ezen eredmények összhangban vannak YILDIZ és mtsai [11], valamint Ok és mtsai [13] tapasztalataival, ahol koraszülött, RDS-es borjak esetében szintén magas ACTG2-koncentráció volt mérhető a kezelésük után is.

GULERSOV et al (2020) [12] found that TFF-3 levels increased significantly in dogs with parvoviral enteritis compared with the healthy dogs and that is why, TFF-3 along with I-FABP, were determined to be useful and reliable biomarkers for determining intestinal damage and predicting mortality. In determining intestinal damage caused by enteritis caused by different etiological agents, Ok et al (2020) [13] found that TFF-3 was a reliable and useful diagnostic biomarker together with I-FABP, L-FABP and IAP, as well. In this study, while the pre-treatment serum TFF3 level of dogs with isosporiasis was not statistically different in comparison with the healthy ones, a significant increase was determined in terms of post-treatment level (Table 1). Many researchers [10, 12, 13, 15, 37, 38] reported that TFF-3 level increased significantly in enteritis or enterocolitis due to different causes, which was confirmed by the presence of significant increase in post-treatment TFF-3 level in the present study. The reason of the increased TFF3 level was interpreted as a result of repair response to the damage caused by *isospora* species in the small and large intestine. It was expressed that TFF3 is secreted from enterocytes to repair the damage and maintain the integrity of the intestinal mucosal barrier [37]. TFF-3 and mucin protect the intestinal epithelial barrier together [18]. In this study, a mild increase before treatment and the high presence of TFF-3 after treatment (Table 1) was thought to ensure the repair of the mucosal epithelial barrier of the intestines in enteritis or enterocolitis. These findings were consistent with the study of TRAN et al (1999) [39] where recombinant TFF-3 applied luminally was determined to be effective in the healing of inflammatory bowel disease in rats.

ACTG2, which is an intestinal smooth muscle actin, is found only in enteric muscle tissues. In cases of ischemic or necrotic enteritis, where significant damage develops in intestinal smooth muscles, ACTG2 is released into the circulation and thus, its serum level increases. It has been reported that the higher serum ACTG2 level, the more severe intestinal damage develops [40–42].

ACTG2 and I-FABP levels increased significantly in humans with NEC and in rat with ischemic-reperfusion intestinal damage. That is why ACTG2 may serve as a useful and reliable biomarker for determining intestinal muscle damage [22]. Ok et al (2020) [13] found that the serum ACTG2 level in calves with *E. coli* diarrhea was significantly higher than those in the Control group. YILDIZ et al (2019) [11] demonstrated that the ACTG2 level in calves with RDS significantly increased after treatment compared to the values of pre-treatment.

In the present study, pre-treatment serum ACTG2 levels of dogs with isosporiasis were not statistically different than healthy ones. However, a significant increase was observed after treatment. Moreover, a significant increase was determined in pre-treatment serum ACTG2

Összegezve a fentieket, jelen vizsgálatban megállapításra került, hogy a szérumban I-FABP-, IAP-, TFF3- és ACTG2-szintjei szignifikánsan emelkednek isosporiasis kutyákban. A tapasztaltak alapján ezen paraméterek hatékonyak és megbízhatónak mondhatók a bélhámkárosodás mértékének meghatározására *Isoospora*-fertőzésben szenvedő kutyáknál.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a „Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator (SUBAP; project number 20202003)” finanszírozásával valósult meg.

ETIKAI NYILATKOZAT

A kutatás állatkísérleti engedélyét az “Animal Ethical Committee of the Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Experimental Animals Production and Research Center (SUVDAFEK)” adta ki (engedélyszám: 2019/90).

level compared to the values of post-treatment (Table 1). Previous studies of increased ACTG2 levels in enteritis cases which had different etiologies [11, 13, 22, 40–42] supported the present study in which a significant increase in serum ACTG2 levels in dogs with isosporiasis was observed. The increase in ACTG2 levels in dogs with isosporiasis was interpreted as a result of deep damage spreading from the mucous barrier of the intestines to the muscle layer caused by isospora species. The reason of the constant high ACTG2 levels even after treatment could be related to the inability to repair the damage caused as a result of isosporiasis in such a short time. Our results were consistent with the findings of YILDIZ et al (2019) [11] and Ok et al (2020) [13] as they reported that post-treatment ACTG2 level increases in preterm calves with RDS.

In conclusion, this study demonstrated that serum I-FABP, IAP, TFF3 and ACTG2 levels increase significantly in dogs with isosporiasis. These biomarkers were found to be efficient and reliable to determine the extent of intestinal epithelial damage caused by isosporiasis in dogs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was financially supported by Selcuk University Scientific Research Projects Coordinator (SUBAP; project number 20202003).

ETHICAL STATEMENT

This study was approved by the Animal Ethical Committee of the Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Experimental Animals Production and Research Center (SUVDAFEK) (Approval No: 2019/90).

IRODALOM / REFERENCES

- Mitchell SM, Zajac AM, Charles S, Duncan RB, Lindsay DS (2007) *Cystoisospora canis* Nemeséri, 1959 (syn. *Isoospora canis*), infections in dogs: clinical signs, pathogenesis, and reproducible clinical disease in beagle dogs fed oocysts. *J Parasitol* 93:345–352
- Reinemeyer CR, Lindsay DS, Mitchell SM, Mundt HC, Charles SD, Arther RG, Settje TL (2007) Development of Experimental *Cystoisospora canis* infection models in Beagle puppies and efficacy evaluation of 5% Ponazuril (Toltrazuril sulfone) oral suspension. *Parasitology Research* 12:129–136
- Dubey JP (2009) The evolution of the knowledge of cat and dog coccidia. *Vet Parasitol* 136:1469–1475
- Dubey JP, Lindsay DS (2019a) Coccidiosis in dogs—100 years of progress. *Vet Parasitol* 266:34–56
- Buehl IE, Prosl H, Mundt HC, Tichy AG, Joachim A (2006) Canine isosporosis—epidemiology of field and experimental infections. *J Vet Med* 53:482–487
- Houk AE, O’connar T, Pena HFJ, Gennari SM, Zajac AM, Lindsay DS (2013) Experimentally induced clinical *cystoisospora canis* coccidiosis in dogs with prior natural patent *cystoisospora ohioensis*-like or *C.canis* infections. *J Parasitol* 99:892–895
- Dubey JP, Lindsay DS (2019b) Re-evaluation of asynchronous asexual development of *cystoisospora canis* in intestines of dogs. *J Parasitology* 105:25–28
- Furuhashi M, Hotamisligil GS (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 7:489
- Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen YH (2013) Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers* 1:249–278
- Yildiz R, Ok M, Ider M, Aydogdu U, Naseri A, Parlak K, Guler soy E (2018) Evaluation of intestinal damage biomarkers in calves with atresia coli. *J Vet Res* 62:379–384
- Yildiz R, Ok M, Ider M, Akar A, Naseri A, Koral E (2019) The changes in biomarkers for necrotising enterocolitis in premature calves with respiratory distress syndrome. *Veterinárni Medicína* 64:440–447

12. Gulersoy E, Ok M, Yildiz R, Koral E, Ider M, Sevinc M, Zhunushova A (2020) Assessment of intestinal and cardiac-related biomarkers in dogs with parvoviral enteritis. *Polish J Vet* 23:211–219
13. Ok M, Yildiz R, Hatipoglu F, Baspinar N, Ider M, Üney K, Ertürk A, Durgut MK, Terzi F (2020) Use of intestine-related biomarkers for detecting intestinal epithelial damage in neonatal calves with diarrhea. *Am J Vet Res* 81:139–146
14. Gollin G, Marks C, Marks WH (1993) Intestinal fatty acid binding protein in serum and urine reflects early ischemic injury to the small bowel. *Surgery* 113:545–551
15. Ng EWY, Poon TC, Lam HS, Cheung HM, Ma TP, Chan K, Ng PC (2013) Gut-associated biomarkers L-FABP, I-FABP, and TFF3 and LIT score for diagnosis of surgical necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Ann Surg* 258:1111–1118
16. Sarıkaya M, Ergül B, Doğan Z, Filik L, Can M, Arslan L (2015) Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a promising test for Crohn's disease: a preliminary study. *Clin Lab* 61:87–91
17. Cascais-Figueiredo T, Austriaco-Teixeira P, Fantinatti M, Silva-Freitas ML, Santos-Oliveira JR, Coelho CH, Singer SM, Da-Cruz AM (2020) Giardiasis Alters Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) and Plasma Cytokines Levels in Children in Brazil. *Pathogen* 9:1–10
18. Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP (2003) The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regulatory Peptides* 116:53–60
19. Martinez-Moya P, Ortega-Gonzalez M, Gonzalez R, Anzola A, Ocon B, Hernandez-Chirilaque C, Lopez-Posadas R, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS (2014) Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats. *Pharmacol Res* 66:144–153
20. Lallès JP (2014) Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutrition Reviews* 72:82–94
21. McLachlan R, Coakley J, Murton L, Campbell N (1993) Plasma intestinal alkaline phosphatase isoenzymes in neonates with bowel necrosis. *J Clin Pathol* 46:654–659
22. Evennett N, Cerigioni E, Hall NJ, Pierro A, Eaton S (2014) Smooth muscle actin as a novel serologic marker of severe intestinal damage in rat intestinal ischemia-reperfusion and human necrotizing enterocolitis. *J Surg Res* 191:323–330
23. Thuijls G, Derikx JP, de Haan JJ, Grootjans J, de Bruïne A, Masclee AA, Buurman WA (2010) Urine-based detection of intestinal tight junction loss. *J Clin Gastroenterol* 44:14–19
24. Abdel-Haie OM, Behiry E, Abd Almonea ER, Ahmed ES, Assar E (2017) Predictive and diagnostic value of serum intestinal fatty acid binding protein in neonatal necrotizing enterocolitis (case series). *Annals Med and Surg* 21:9–13
25. Coufal S, Kokesova A, Tlaskalova-Hogenova H, Frybova B, Sanajdauf J, Rygl M, Kverka M (2020) Urinary I-FABP, L-FABP, TFF3 and SAA can diagnose and predict the disease course in necrotizing enterocolitis at the early stage of disease. *J Immunol Res* 11:43–53
26. Ng EWY, Ng PC, Lam HS, Cheung HM, Chan KY, Wong P, Leung KT, Li K, Poon TCW (2020) Gut barrier proteins in diagnosing necrotizing enterocolitis in preterm infants: abridged secondary publication. *Hong Kong Med J* 26:4–5
27. Strang SG, Habes QML, Hoven BV, Tuinebreijer WE, Verhofstad MHJ, Pickkers P, Van Lieshout EMM, Van Waas OJF (2021) Intestinal fatty acid binding protein as predictor intra-abdominal pressure-related complication in patients admitted to intensive care unit, a prospective cohort study (I-Fabulous study). *J Crit Care* 63:211–217
28. Kanda T, Fujii H, Tani T, Murakami H, Suda T, Sakai Y, Ono T, Hatakeyama K (1996) Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *J Gastroenterol* 110:339–343
29. Holmes JH, Lieberman JM, Probert CB, Marks WH, Hill ME, Paull DL, Hall RA (2001) Elevated intestinal fatty binding protein and gastrointestinal complications following cardiopulmonary bypass: a preliminary analysis. *J Surg Res* 100:192–196
30. Kanda T, Tsukahara A, Ueki K, Sakai Y, Tani T, Nishimura A, Yamazaki T, Tamiya Y, Tada T, Hirota M, Hasegawa J, Funaoaka H, Fujii H, Hatakeyama K (2011) Diagnosis of ischemic small bowel disease by measurement of serum intestinal fatty acid-binding protein in patients with acute abdomen: a multicenter, observer-blinded validation study. *J Gastroenterol* 46:492–500
31. Nieto JE, Aldridge BM, Beldomenico PM, Aleman M, Snyder JR (2005) Characterization of equine intestinal fatty acid binding protein and its use in managing horses with colic. *Am J Vet Res* 66:223–232
32. Niewold TA, Meinen M, Van der Meulen J (2004) Plasma intestinal fatty acid binding protein (IFABP) concentrations increase following intestinal ischemia in pigs. *Res Vet Sci* 77:89–91
33. Lallès JP (2010) Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutrition Reviews* 68:323–332
34. Riggle KM, Rentea RM, Welak SR, Pritchard KAJ, Oldham KT, Gourlay DM (2013) Intestinal alkaline phosphatase prevents the systemic inflammatory response associated with necrotizing enterocolitis. *J Surg Res* 180:21–26
35. Koyama I, Matsunaga T, Harada T, Hokari S, Komoda T (2002) Alkaline phosphatases reduce toxicity of lipopolysaccharides in vivo and in vitro through dephosphorylation. *Clinical Biochemist* 35:455–461
36. Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, Dijkstra G (2009) Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut* 58:379–387
37. Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Gespach C (2004) Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 25:885–898
38. Srivastava S, Kedia S, Kumar S, Pratap Mouli V, Dhingra R, Sachdev V, Tiwari V, Kurrey L, Pradhan R, Ahuja V (2015) Serum human trefoil factor 3 is a biomarker for mucosal healing in ulcerative colitis patients with minimal disease activity. *J Crohn's and Colitis* 9:575–579
39. Tran CP, Cook GA, Yeomans ND (1999) Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potentially accelerates healing and reduces inflammations in a rat models of colitis. *Gu*, 44:635–642
40. Stefanutti G, Pierro A, Parkinson EJ, Smith V, Eaton S (2008) Moderate hypothermia as a rescue therapy against intestinal ischemia and reperfusion injury in rat. *Crit Care Med* 36:1564–1572
41. Derikx JP, Bijker EM, Vos GD, van Bijnen AA, Heineman E, Buurman WA, van Waardenburg DA (2010) Gut mucosal cell damage in meningococcal sepsis in children: relation with clinical outcome. *Critical Care Med* 38:133–137
42. Pontell L, Sharma P, Rivera LR, Thacker M, Tan YH, Brock JA, Furness JB (2011) Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. *Cell and Tissue Research* 343:411–419

**Az
egészségünkért,
és hogy működjön
az ország:**

**KÉRJE A
3. OLTÁST!**

Preliminary observations concerning the integration of amplicon deep sequencing in the PRRS eradication program

Sz. Jakab^{1*}

Sz. Marton¹

I. Szabó²

S. Kecskeméti³

Á. Bálint³

K. Bányai^{1,4}

1. Állatorvostudományi Kutatóintézet,
Eötvös Loránd Kutatási Hálózat,
H-1143 Budapest, Hungária krt. 21.

*e-mail: jakab.szilvia@vmri.hu

2. Nemzeti PRRS
Mentesítési Bizottság,
Budapest

3. NÉBIH ÁDI,
Budapest

4. Állatorvostudományi Egyetem,
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék,
Budapest

Kezdeti tapasztalatok az amplicon-mélyszekvenálás PRRS-mentesítési programba történő integrálásával kapcsolatban

Jakab Szilvia^{1*}, Marton Szilvia¹, Szabó István², Kecskeméti Sándor³, Bálint Ádám³, Bányai Krisztián^{1,4}

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők ismertetik a sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómáját okozó vírusának (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) újgenerációs DNS-szekvenáláson alapuló tipizálásával kapcsolatos megfigyeléseiket. Röviden felvezetik azt a diagnosztikát érintő problémát, ami e közlemény megírásához vezetett. Ismertetik az amplicon-mélyszekvenálás módszertani megközelítéseit a PRRSV molekuláris azonosítási munkafolyamatában. Megállapítják, hogy a fenti módszerek segítségével a természetes közegben kialakult kevert fertőzések közül sikeresen azonosíthatóak a különböző vírusvariánsok. Végezetül felhívják a figyelmet a sertéstelepeken egyidejűleg keringő vakcinavírusok és vad típusú törzsek pontos ismeretének fontosságára.

SUMMARY

Background: The global emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) has led to great economic losses in all affected countries. To control the disease in Hungary, a National PRRS Eradication Program has been commenced. The program requires extensive monitoring of the PRRS virus (PRRSV) by serological and virological methods. Sanger sequencing of selected genomic regions is a basic method to identify and characterize circulating PRRSV strains.

Objectives: During the national elimination program in 2016, conventional sequencing approaches failed to identify the causative strains in numerous clinical specimens. An amplicon deep sequencing protocol was introduced to overcome the issues related to Sanger sequencing.

Materials and Methods: PRRSV-1 ($n = 187$) and PRRSV-2 ($n = 13$) positive samples were used in this study. The authors compared two amplicon deep sequencing protocols and the more robust method was chosen to sequence either ORF5 or ORF7 products on an Ion Torrent PGM platform.

Results and Discussion: Based on initial sequencing results the conventional (i.e. fragmentation and adapter ligation based) library preparation method was used in this pilot study. The majority of samples contained one sequence variant of PRRSV, whereas a minority of specimens ($n = 5$), that originally could not be sequenced by the Sanger method, were classified as mixed infections with different PRRSV strains of major and minor variants. We conclude that amplicon deep sequencing is a useful alternative to Sanger sequencing when multiple strains (e.g., at some point of the PRRS elimination process) co-circulate in swine farms.

A sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómája (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) kiemelkedő gazdasági kártételt kiváltó, vírusos eredetű megbetegedés. A fertőzést nagy ragályozóképesség jellemzi. A PRRS állományon belül túlnyomórészt közvetlen érintkezéssel és levegő útján terjed, a sertésstelepek közötti terjedésben pedig az élőállat-forgalom mellett ragályfogó eszközök és ízeltlábúak is részt vehetnek [1]. A házisertések minden korú egyede fogékony a fertőzéssel szemben. Légúti tünetek bármelyik korcsoportban jelentkezhetnek, ami fiatal állatoknál csökkent testtömeg-gyapapodással, míg kocáknál súlyos szaporodásbiológiai zavarokkal társulhat [2]. Tartósan fennálló megbetegedés esetén számolni kell a másodlagos fertőzések kialakulásának lehetőségével, ami tovább növeli a PRRS okozta nagymértékű gazdasági veszteséget.

A PRRS kiemelkedő gazdasági kártételt kiváltó, vírusos eredetű megbetegedés

A tünetegyüttes kórokozó fajai a *Betaarterivirus suid 1* és a *Betaarterivirus suid 2* (PRRSV-1 és PRRSV-2) az *Arteriviridae* családba tartozó burkos vírusok (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/arteriviridae). A PRRSV pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkezik, ami hozzávetőlegesen 15 kbp hosszúságú. Összesen 10 nyílt leolvasási keretéről (open reading frame, ORF) kettő nem-szerkezeti fehérjéket kódoló polipeptid és nyolc szerkezeti fehérje íródik át [3].

A vírus különböző változatainak jellemzésére jelenleg az ORF5 és ORF7 szekvenciákat használják. Az ORF5 kódolja a 5-ös glikoproteint, míg az ORF7 a nukleokapszid fehérjét. A filogenetikai elemzések alapján mindkét vírusfajt leszármazási vonalakra és szubtypusokra lehet elkülöníteni [4–6]. A rekombináció és a nagy mutációs ráta következtében kialakult genetikai változatosság megnehezíti a PRRSV ellen irányuló védekezést [6].

Hazánkban a PRRS megjelenését először sertésvérminták szeropozitivitása jelezte az 1990-es években [7]. A következő évek során a PRRSV hazai előfordulása számottevővé vált, mindeközben pedig a cirkuláló törzsek genetikai diverzitása folyamatosan nőtt. Magyarországon a jelentős gazdasági károk enyhítése és a hazai sertéságazat nemzetközi versenyképességének fokozása érdekében 2010-ben elindult és 2014-től hatályba lépett a PRRS Nemzeti Mentésítési Terv (továbbiakban PRRS-NMT). A mentésítési program jóvoltából 2018-ra tíz megye teljes területét és további 11 járást PRRS-től mentesnek nyilvánítottak, ami egyúttal a nagylétszámú állományok 75%-át is magába foglalta [8]. A PRRS-NMT érdekében folyamatosan végzett diagnosztikai monitoringvizsgálatok jelentősen hozzájárultak egy olyan naprakész hazai PRRSV-vírus-térkép megalkotásához, amelynek a segítségével lehetővé vált az újonnan jelentkező járványkitörések teljes körű nyomonkövetése [9].

A PRRS-mentésítésben résztvevő hazai állategészségügyi diagnosztikai laboratóriumok adott sertésstelepen a PRRSV jelenlétére vonatkozó információt gyűjtenek szerológiai tesztek és/vagy a vírus jelenlétének közvetlen bizonyítékként elfogadott molekuláris diagnosztikai módszer, a reverz transzkriptiót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével. Ezt követően szükség szerint megállapítják az ORF5 és/vagy az ORF7 régió nukleotidszekvenciáját a vad típusú és a vakcinatörzsek elkülönítésének, továbbá az azonosított törzsek eredetének és terjedésének nyomon követése céljából. Hagyományos (Sanger) szekvenálási eljárást alkalmazva a törzsazonosítás könnyen beépíthető a munkafolyamatokba. Azonban az állományok és egyúttal az egyedek lehetséges kevert fertőzése esetén, valamint a mentésítés azon fázisában, amikor a vad- és vakcinavírusok együttesen jelen vannak az állományban, a szekvenanciaeredmények kiértékelése nehézkessé vagy éppen lehetetlenné válik. Koinfekció esetén a törzsek azonosítása hagyományos megközelítés szerint molekuláris klóno-

Hazánkban a PRRS megjelenését először sertésvérminták szeropozitivitása jelezte az 1990-es években

A PRRS-mentésítési program jóvoltából 2018-ra tíz megye teljes területét és további 11 járást PRRS-től mentesnek nyilvánítottak

A mentésítés során gyűjtött mintákból a szerzők nagy számú ORF5 szekvenciát határoztak meg

zással lehetséges, amelynek során a kapott PCR-terméket vektorba klónozzák, majd reprezentatív számú kolóniából Sanger-szekvenálással meghatározzák a plazmidba épült DNS-szakasz nukleotidszortrendjét. A diagnosztikában, de még inkább a járványügyi nyomozás esetén, ez a módszer kevésbé célravezető, hiszen az eljárás idő- és költségigényes. Ennek feloldására számos szerző javasolja az újabb, nagy áteresztőképességű szekvenáló készülékek nyújtotta előnyöket [10]. A diagnosztikában az újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing, NGS), azon belül is az amplitikon-mélyszekvenálás ma már nélkülözhetetlen a személyre szabott gyógyászatban a humán onkológia és genetika területén, járványügyi felmérésekben és kórokozók azonosításában egyaránt [11–19]. Manapság, szolgáltatótól és az adatfeldolgozás mértékének függvényében az NGS-alapú amplitikon-szekvenálás költségei közelítik a Sanger-szekvenálás költségeit [20].

2016 folyamán a hazai PRRS-mentesítéssel összefüggésben végzett rutin diagnosztikai munka során növekvő számú esetben jeleztek Sanger-szekvenálásból származó értelmezhetetlen adatokat. A jelenség tisztázása érdekében és egy előzetes tanulmány erejéig hat hónapon keresztül a PCR-termékek Sanger-szekvenálása helyett újgenerációs szekvenáló platformot alkalmaztunk. Mivel az NGS rutin állategészségügyi diagnosztikába történő integrálása egyre közelebbé válik, a szerzők fontosnak érezték, hogy gondolatébresztő szándékkal tapasztalataikat közzé tegyék a hazai állatorvos kollégák számára.

A szerzők újgenerációs szekvenáló platform alkalmazásával végzett szekvenciameghatározás tapasztalatait mutatják be

ANYAG ÉS MÓDSZER

MÉLYSEKVENÁLÁS - MÓDSZERTANI MEGKÖZELÍTÉSEK

A tanulmányhoz gyűjtött minták minden esetben különböző állategyedekből származtak. A savómintákból az RNS kivonása a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) segítségével történt.

Az adott cél régió mélyszekvenálását NGS-technológiával hajtottuk végre. Minden NGS-készülék egy úgynevezett DNS-könyvtár elkészítését igényli (lépései függenek az adott NGS-rendszerrel), ami tartalmazza a szekvenálni kívánt DNS-szálakat, ill. az azokhoz kapcsolt egyéb, a készülékkel kompatibilis adaptereket és vonalkódokat. Ezt a folyó vizsgálatok mentén két megközelítésben végeztük (1. ábra).

Hagyományos könyvtárkészítés (I. módszer): Az I. módszer során az ORF5 nested PCR első körét és az ORF7 régiót One-Step RT-PCR kittel (Qiagen) szaporítottuk fel. Az ORF5 nested PCR második köréhez a TopTaq DNS polimerázt (Qiagen) használtuk. Az alkalmazott primerpárokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. A PCR-termékek (amplitikonok) tisztítását oszlopos, kereskedelmi forgalomban kapható kittel végeztük (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid). Ezt követően az enzimatis fragmentálást és az Ion Torrent adapterek kapcsolását a NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent kit és az Ion Xpress Barcode Adapters (New England Biolabs) felhasználásával végeztük el. A DNS-könyvtárak klonális amplifikációja az Ion PGM Hi-Q View OT2 Kittel történt. Ez a PCR-hez hasonló termociklusos módszer jelen esetben 200 bp hosszúságú, mikrogöngy felszínén rögzített könyvtár DNS-ek klonális amplifikálására szolgál egy, a célra fejlesztett készüléken (Ion OneTouch v2). Bővebb információt az olvasó a <https://www.thermofisher.com> honlapon talál.

PCR-alapú könyvtárkészítés (II. módszer): A II. módszer esetében a PRRSV RNS-ről reverz transzkripcióval cDNS készült (SuperScript™ III, Invitrogen™), majd az adott régiók felszaporítása Phusion DNS polimeráz enzimmel (Thermo Scientific™) valósult meg, konvencionális PCR-rel. A PCR során a cél régióra (ORF5 és ORF7) specifikus primereket úgy módosítottuk, hogy azokat Ion Tor-

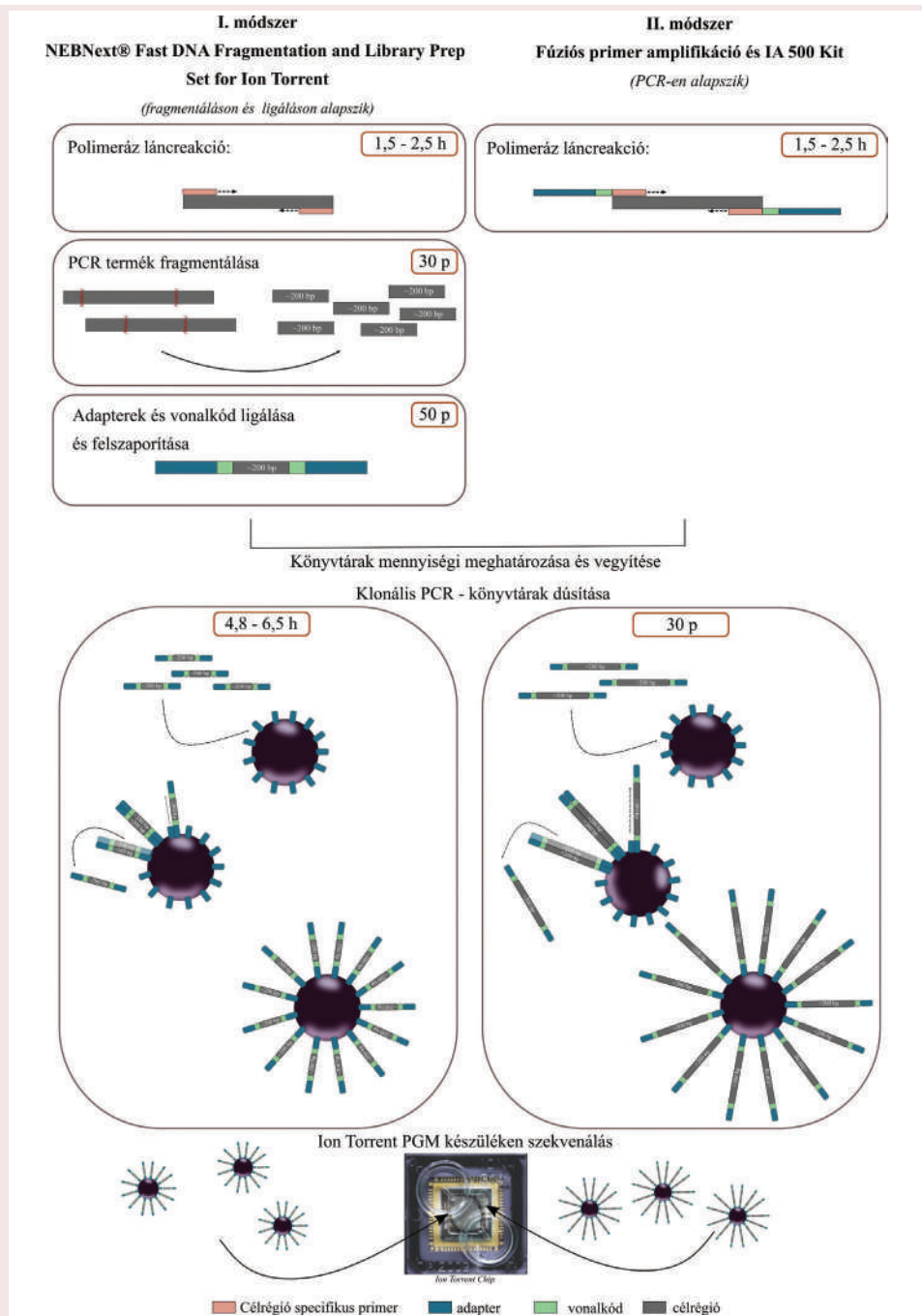
A mélyszekvenáláshoz szükséges DNS-könyvtárkészítést hagyományos és PCR-alapú módszerrel is elvégezték

rent-specifikus adapterekkel és az egyedi azonosítást biztosító vonalkód szekvenciákkal egészítettük ki (fúziós primerek; 1. táblázat). Ennél a módszernél egy lépésben, PCR segítségével állítható elő az Ion Torrent rendszerrel kompatibilis könyvtár. Az így kapott DNS-könyvtárat az IA 500 kit segítségével klonálisan amplifikáltuk. Ez a módszer izotermális körülmények között zajlik, szobahőmérsékleten, azaz nem igényli speciális készülék használatát a mikrogyöngy felszínen rögzített könyvtár DNS-ek klonális felerősítéséhez. Ráadásul időben gyorsabb és akár 500 bázispár hosszú könyvtárak is készíthetők.

Akár az I-es, akár a II-es módszerrel történt a könyvtárkészítés, végül a klonálisan amplifikált könyvtár DNS-t hordozó gyöngyöket Ion OneTouch ES készülékkel dúsítottuk, majd elúciót követően Ion 314-es vagy Ion 316-os chip felületére szélesztettük.

1. ÁBRA. Az esettanulmányban alkalmazott DNS-könyvtárkészítő módszerek sematikus ábrázolása

FIGURE 1. Schematic representation of the applied DNA library preparation methods



1. TÁBLÁZAT. A hagyományos (I. módszer) és a PCR-alapú (II. módszer) DNS-könyvtárkészítő módszer oligonukleotid-szekvenciái Félkövér betűtípussal az adapter szekvenciákat emeltük ki. A vonalkód-szekvenciák (xxxx) 12 bázis hosszúságúak és a minták egyedi azonosítását biztosítják

TABLE 1. Oligonucleotide sequences of the conventional (method I.) and the PCR-based (method II.) DNA library preparation method

The adapter sequences were marked with bold type characters. The 12 bp long barcode sequences (xxxx) are unique identifiers of the samples

	Célrégió	Szekvencia (5' – 3')
I. módszer	ORF7	F: CAGCCAGTCAATCARCTGTG R: TCGCCCTAATTGAATAGGTG
	ORF5	1. kör F: GTTGCTSCATTCMTGACAC R: TATGTIATGCTAAAGGCTAGCAC
		2. kör F: CAATGAGGTGGGCIACAACC R: ATCGTCTAGGCCTCCCATTG
II. módszer	ORF7	A F: CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG _{xxxx} CAGCCAGTCAATCARCTGTG R: CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT TCGCCCTAATTGAATAGGTG
		B F: CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT CAGCCAGTCAATCARCTGTG R: CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG _{xxxx} TCGCCCTAATTGAATAGGTG
	ORF5	A F: CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG _{xxxx} ATGAGATGTTCTCACAAATTGGGGCG R: CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT CTAGGCCTCCCATTGCTCAGCCGAAGT
		B F: CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT ATGAGATGTTCTCACAAATTGGGGCG R: CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG _{xxxx} TAGGCCTCCCATTGCTCAGCCGAAGT

A NYERS SEKVENCIAADATOK FELDOLGOZÁSA

Az Ion Torrent készülékkel generált szekvenciaszakaszok feldolgozását a kísérleti tanulmány ideje alatt CLC Genomics Workbench v7 szoftver segítségével végeztük. Jelen tanulmány írásakor az adatokat újra elemeztük a Geneious 9.1.8-as verziószámú szoftverrel. A végső szekvenciák meghatározását a két PRRSV prototípustörzs (PRRSV-1: Lelystad, PRRSV-2: VR2332) ORF5 és ORF7 régiójához történő illesztéssel végeztük a Geneious program saját algoritmusának alapbeállításával. Az egy pontos nukleotidvariáció (SNV) gyakoriságát a szoftver beépített opcióját alkalmazva határoztuk meg, 1%-os gyakorisági határértékkel. A kevert fertőzés jelenlétére utaló SNV eloszlás esetén a Bowtie illesztőprogramot alkalmazva párhuzamosan több referenciához újra illesztve határoztuk meg a kérdéses mintában található szekvencia változatokat.

FILOGENETIKAI ELEMZÉS

Az ORF5 és ORF7 szekvenciákat (beleértve a PRRSV-1 és PRRSV-2 reprezentatív törzseinek, ill. a génbankban megtalálható vakcinatörzsek szekvenciáit is) az AliView programmal rendeztük össze [21]. A filogenetikai rekonstrukciók a MEGA 10.1.8 verziószámú programmal készültek. A minták és a vakcinatörzs-szekvenciák páronkénti összehasonlítását és a nukleinsavsorrend százalékos egyezésének ábrázolását a MEGA 10.1.8 és az SDTv1.2 programokkal végeztük [22, 23]. A szekvenciák közötti rekombinációt az RDP5 (Beta 5.05) programmal elemeztük [24].

DEFINIÍCIÓK

Szekvenciaread – az NGS futtatás eredményeként kapott nyers nukleotidszekvencia-szakasz/töredék; **szekvenálási mélység** – mérőszám az átlagos szekvenciaread-mennyiségre, amely a referenciaszekvenciához illesztés során ráfekszik

A nyers szekvenciaadatok elemzését követően filogenetikai vizsgálatokat végeznek

arra, vagyis a célrégió (itt: a szekvenált gén) nukleotidjaira eső readok átlagos mennyisége; *lefedettség* – a célrégió (itt: a szekvenált gén) sikeresen megszekvenált hányada; *major variáns* és *minor variáns* – az az NGS adatokból összeállított szekvencia, amit a szekvencia readok legnagyobb része, ill. kisebb hányada képvisel; *kiméra szekvencia* – a PCR során keletkező fals termék, amely egynél több templátszekvencia tulajdonságait hordozza.

EREDMÉNYEK

AMPLIKON-MÉLYSZEKVENÁLÁS

A diagnosztikai PCR során nyert termékekből (ORF5 $n = 182$, ORF7 $n = 10$) a hagyományos könyvtárkészítési módszerrel (I. módszer) mintánként átlagosan 12 903 db szekvenciaread (minimum–maximum: 161–39 764) kihozatalt kaptunk, 141 bp átlagos hosszúsággal. A szekvenciareadok átlagosan 67%-át (minimum–maximum: 0–98%) PRRSV specifikus szekvencia readok tették ki (2. ábra). Az ORF5 gén esetében a PRRSV-1 ($n = 169$) és PRRSV-2 ($n = 13$) minták többségének (80% és 77%) nukleotidsorrendjét meg lehetett határozni; a többi esetben a PCR-termékek eltérő, azaz nem a célgén szekvenciáját tartalmazták. Az ORF7 génre 10 mintát dolgoztunk fel, amelyek egy kivétellel elemezhető szekvenciaadatot eredményeztek. A sikeresen összeállított szekvenciákhoz történő illesztéskor megfigyelt szekvenálási mélység $10\times$ és $8080\times$ között mozgott, a lefedettség 100%-os volt. Mivel a heti gyakorisággal végzett szekvenálást a futó PRRS-mentesítési program ütemtervéhez igazítottuk, a szekvenálási mélység nagyban függött attól is, hogy hány minta került a szekvenáló berendezésbe.

A fúziós primerrel (II. módszer) felerősített PRRSV-1 PCR-termékek (ORF5 $n = 5$, ORF7 $n = 5$) szekvenálása során mintánként átlagosan 208 db szekvenciaread-et kaptunk. A szekvenálási mélység átlagosan $60\times$ (minimum–maximum: 7–132 \times) volt (2. ábra). A II. módszerrel kapott átlagos szekvenciareadhossz 212 bp volt (ORF5 esetén 214 bp, míg ORF7 esetén 211 bp). Ez a vártnál rosszabb aránynak bizonyult és még a 606 bázispár nagyságú ORF5 régiónál is mintánként átlagosan mindössze öt darab szekvencia read érte el az 500 bp hosszúságot és csupán egyetlen szekvenciareadhossza haladta meg jelentősen a gyárilag várt értéket (ez 604 bázis hosszúságú volt).

EGYEDI ÉS KEVERT FERTŐZÉSEK ELKÜLÖNÍTÉSE

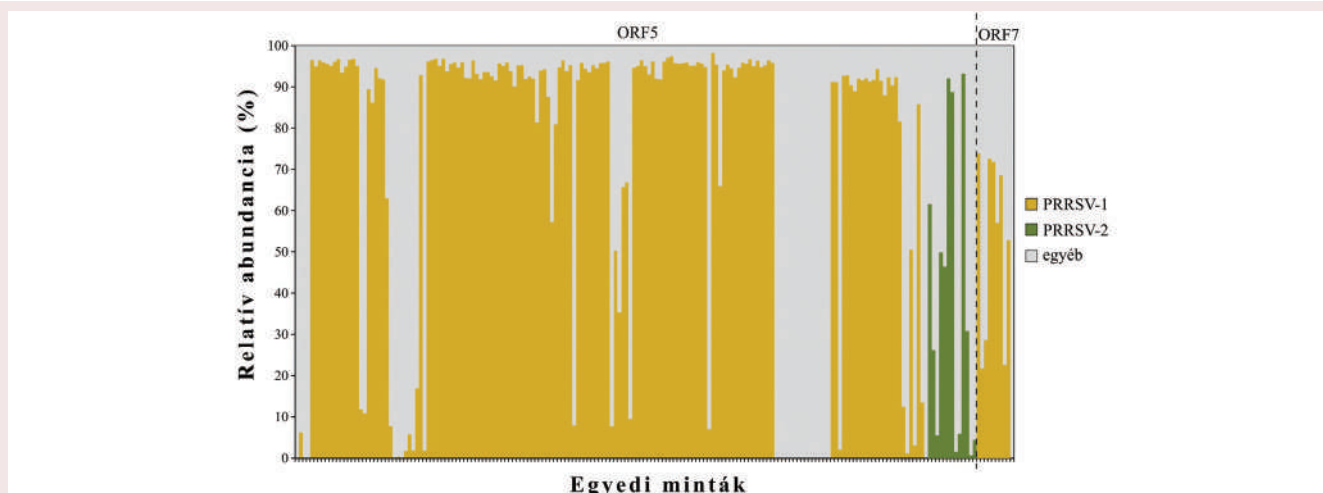
Az ORF5 és ORF7 gén meghatározásakor 159 minta esetén egy-egy végső szekvenciát kaptunk, ezek egyedi fertőzésre utaltak.

Öt minta (3%) esetében viszont két-három különböző génvariánst azonosítottunk az egyedi mintákban. Három ORF5 és két ORF7 gén (mintaazonosítók – ORF5: 38, 120, 122, ORF7: 1, 8) esetén a szekvenciareadok különböző referenciákhoz történő párhuzamos illesztése során arra a következtetésre jutottunk, hogy a kérdéses minták eltérő PRRSV-törzsekkel fertőzött sertésekéből származtak. Az összeállított szekvenciák alapján a 38-as és 120-as minták ORF5 génjeiben egy-egy major és két-két minor variáns, a többiben egy-egy major és minor variáns volt (3. ábra). A kevert mintákban az illesztett szekvenciareadok alapján a major és minor variánsok aránya hozzávetőlegesen 7:1 volt (minimum – maximum, 3,3:1 – 17,5:1).

Fontos megjegyezni, hogy a három különböző variánst hordozó 120-as számú mintában az egyik minor variánsnál bioinformatikai módszerek lehetséges rekombinációs eseményt jeleztek. A rekombinációs eseményben az adatok szerint a mintában azonosított major és a másik minor variáns vehetett részt. Ugyanakkor az a lehetőség sem zárható ki teljesen, hogy a PCR során keletkezett kiméra szekvenciát azonosítottunk. Mivel PCR-eredetű kiméra szekvenciákat nem keresünk szisztematikusan a mintákban, ezért a kérdéses rekombinációs szignált fenntartásokkal kezeltük.

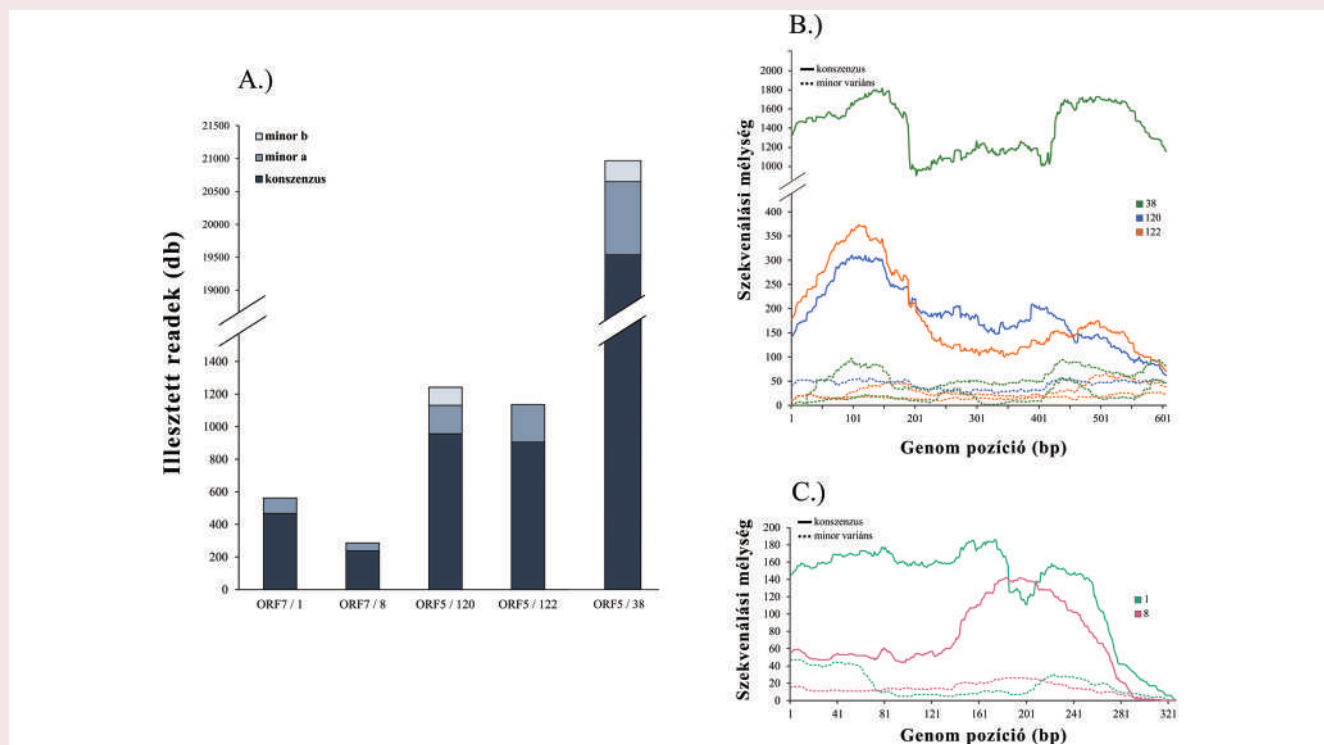
A sikeresen összeállított szekvenciákhoz történő illesztéskor megfigyelt szekvenálási mélység $10\times$ és $8080\times$ között mozgott, a lefedettség 100%-os volt

A módszerrel egy időben több vírusváltozattal fertőzött sertésből származó mintákat is azonosítottak



2. ÁBRA. PRRSV-specifikus readek arányának ábrázolása az esettanulmány feldolgozott mintáiban

FIGURE 2. PRRSV specific reads of the sequenced samples



3. ÁBRA. A kevert fertőzésben résztvevő azonosított PRRSV-variánsok ampikon-mélyszekvenálás adatainak az ábrázolása
A., Az ampikon-mélyszekvenálásból származó readek megoszlása a kevert fertőzésű mintákban azonosított vírus variánsok között

B., A kevert fertőzésű ORF5 mintákból azonosított vírus variánsok szekvenálási mélysége

C., A kevert fertőzésű ORF7 mintákból azonosított vírus variánsok szekvenálási mélysége

FIGURE 3. Representation of the deep sequencing data regarding the PRRSV variants identified in the coinfecting samples

A., Ratio of the PRRSV specific deep sequencing reads to the identified coinfecting PRRSV variants

B., Sequencing depth of the coinfecting PRRSV variants regarding the ORF5 region

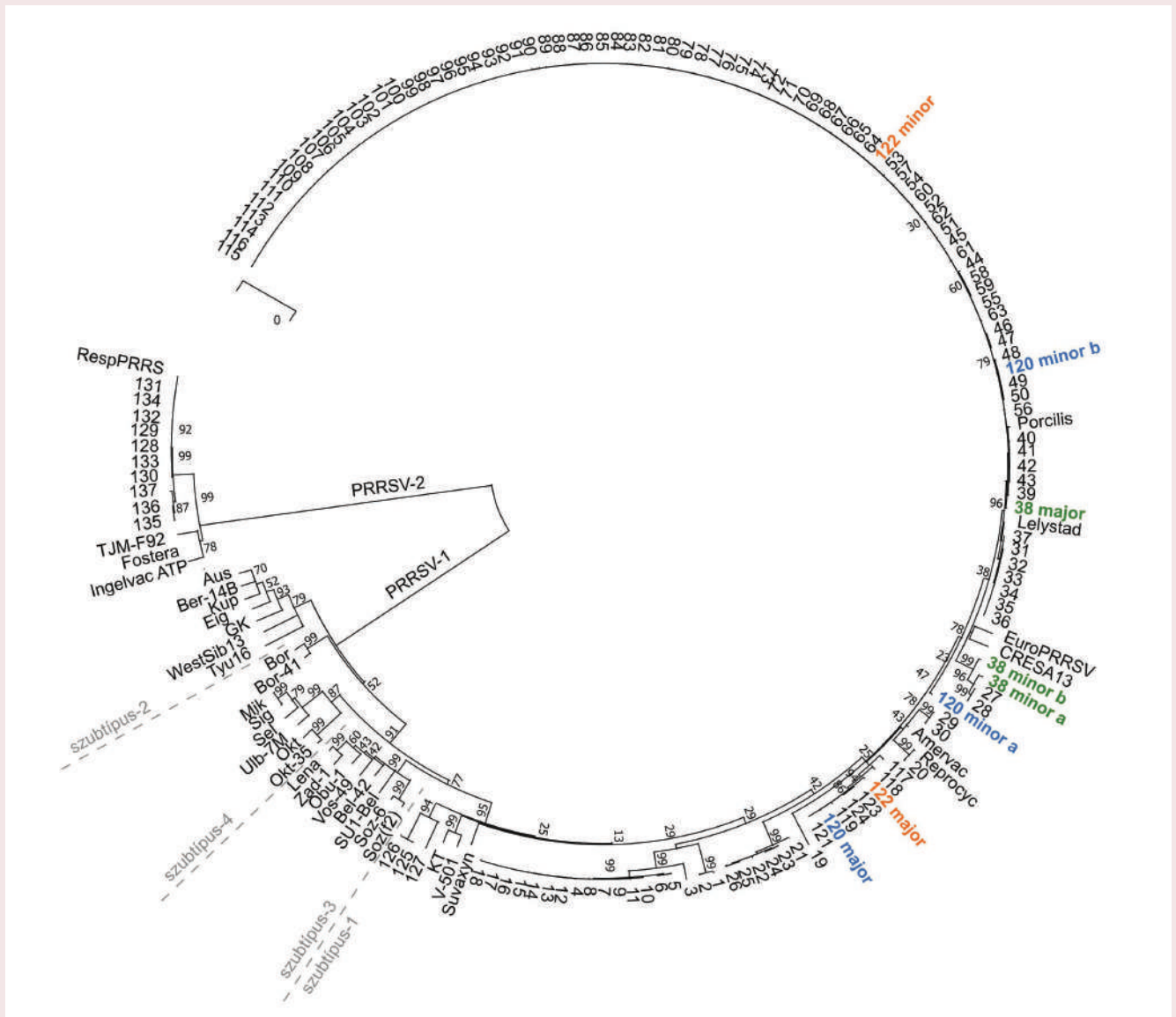
C., Sequencing depth of the coinfecting PRRSV variants regarding the ORF7 region

**Az ORF5 gén
filogenetikai elemzése
alapján megállapították,
hogy a PRRSV-1
minták az 1-es
szubtípushoz tartoztak**

FILOGENETIKAI ELEMZÉS

Az ORF5 gén filogenetikai elemzése alapján megállapítottuk, hogy a PRRSV-1 minták az 1-es szubtípushoz tartoztak (4. ábra). BALKA és mtsai (2018) [4] által meghatározott csoportok közül az alábbiakban helyezkedtek el a mintáink: Porcilis, 1e, 1f (Lelystad), 1b, Amervac, Reprocyc, 1g és 3d (nem közölt adat).

A PRRSV-1 eredetű ORF5 gének 13,6%-a az 1g csoporthoz, 8,3%-a az Amervac vakcinatörzs-eredetű kládhoz, míg legnagyobb részük (61,4%) a Porcilis PRRS vakcinaeredetű szekvenciákat magába foglaló kládba tartozott. A Porcilis kládba tartozó minták 92,6%-a (75 db) legalább 99%-os hasonlóságot mutatott a Porcilis vakcina ORF5 szekvenciával.



4. ÁBRA. PRRSV (-1 és -2) ORF5 referencia és e tanulmányban azonosított (számok: 1–135) szekvenciák alapján készült filogenetikai fa

A kevert fertőzésben résztvevő variánsok szekvenciáit kiemeltük

FIGURE 4. Phylogenetic tree based on PRRSV-1 and PRRSV-2 ORF5 sequences

The PRRSV variants of the coinfecting samples sequenced by the authors are coloured

Számos vakcinaeredetű szekvenciát is azonosítottak

Az ORF5 génszekvenciák elemzésekor azonosított kevert fertőzések bizonyos variánsai (38 major, 120 minor b, 122 minor) Porcilis vakcinaeredetű törzseknek bizonyultak (>98%-os hasonlóság), egy részük (120 major, 120 minor a, 122 major) közeli rokonságot mutatott az Amervac vakcinatörzsszel (2. táblázat, 5. ábra) [25]. A 38-as minta mindkét minor variánsa valószínűleg vad típusú törzs volt, mivel ugyanabból az évből, de különböző hazai telephelyekről származó törzsekkel mutatták a legközelebbi rokonságot (1e klád).

Az ORF7 génszekvenciák elemzése szerint hét minta a Porcilis vakcinatörzsszel, két minta az Amervac vakcinatörzsszel tartozott közös kládba (nem közölt adat).

A kevert fertőzést mutató ORF7 szekvenciák variánsai közül az egyikről (1 major) nem volt megállapítható, hogy Porcilis vakcinaeredetű-e, mivel az ORF7 szekvenciaazonosság alapján nem megkülönböztethető a Lelystad törzstől (amely egy vad típusú referencia PRRSV-1 törzs) (2. táblázat, 5. ábra) [25]. Az 1-es minta minor és a 8-as minta major szekvenciavariánsai feltételezhetően Amervac vakcina eredetűek voltak (2. táblázat). A 8-as minta minor variánsa egyik vakcinával se mutatott közeli rokonságot.

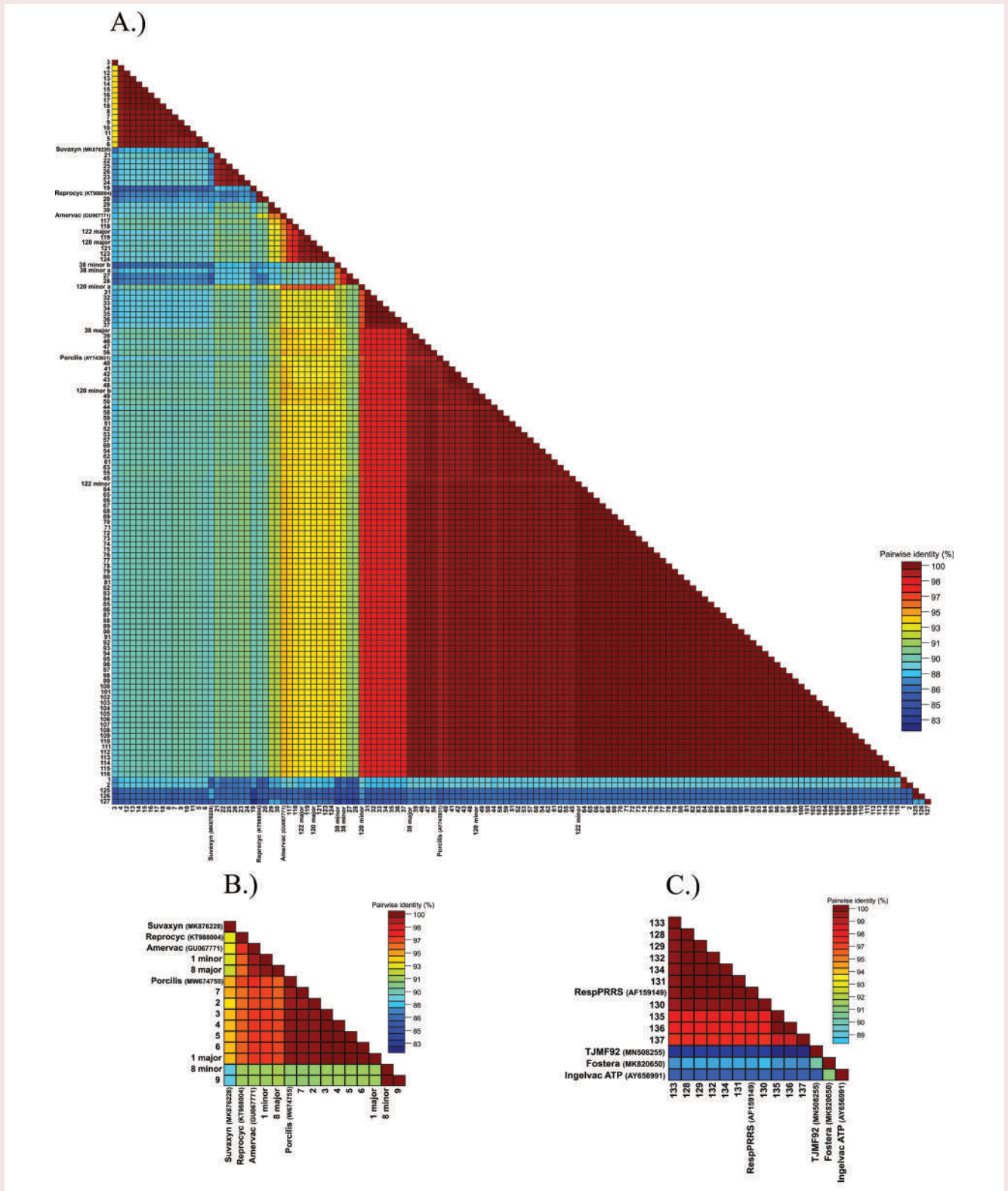
A PRRSV-2 eredetű ORF5 génszekvenciák elemzése során megállapítottuk, hogy hét minta Ingelvac® PRRS MLV vakcinavírus-eredetű volt (100% nukleotidazonosság). Három minta pedig 98,3% nukleotidazonosságot mutatott egy másik, 2017-ben hazánkban izolált amerikai típusú PRRSV-2 mintával (5. ábra).

2. TÁBLÁZAT. A kevert fertőzésben résztvevő azonosított PRRSV-1 variánsok és az élő, attenuált vakcinatörzsek közötti nukleotidazonosság (%)

Félkövér betűtípussal kiemelve a >98%-os azonosságok

TABLE 2. Nucleotide identity (%) values between the identified coinfecting PRRSV variants and modified live vaccine strain sequences >98% nucleotide identities are bold type characters

Gén	Minta	Porcilis	Amervac	Reprocyt	Suvaxyn
ORF5	120 major	92,9	95,2	89,9	89,1
	120 minor a	96,4	96	91,1	89,3
	120 minor b	99	94,4	89,4	88,9
	122 major	92,9	95	89,6	88,8
	122 minor	99,2	94,2	89,6	89,1
	38 major	98,8	94,6	89,9	89,4
	38 minor a	91,7	89,9	87,6	86,8
	38 minor b	92,4	89,3	86,8	85,6
ORF7	1 major	99,7	96,8	96,1	94,2
	1 minor	96,4	99,4	96,1	92,5
	8 major	96,1	99	95,8	92,2
	8 minor	90,9	91,2	91,2	88,3



5. ÁBRA. Az esettanulmányban feldolgozott minták és génbanki referenciaszekvenciák nukleotidazonosságát (%) ábrázoló mátrixok

A., PRRSV-1 ORF5; **B.,** PRRSV-1 ORF7; **C.,** PRRSV-2 ORF5

FIGURE 5. Nucleotide identity (%) matrices of the sequenced samples and reference sequences

A., PRRSV-1 ORF5; **B.,** PRRSV-1 ORF7; **C.,** PRRSV-2 ORF5

MEGVITATÁS

Az újgenerációs DNS-szekvenálási módszerek létjogosultsága folyamatosan nő

Bizonyos diagnosztikai munkafolyamatokban az újgenerációs DNS-szekvenálási módszerek létjogosultsága folyamatosan nő [26–30]. Az elmúlt évek során a hazai PRRS mentesítésben ennek a módszernek a vírusgenomok meghatározásában volt szerepe, hiszen a teljes genom PCR-rel történő felerősítése majd a PCR-termék(ek) NGS-módszerrel történő szekvenálása idő és költségek tekintetében is hatékonyabb megközelítést nyújtott a hagyományos szekvenálással szemben [31–33]. A szerzők jelenlegi tanulmányát az a diagnosztikai megfigyelés ihlette, hogy a PRRSV ORF5 gének Sanger-szekvenálással végzett meghatározása rendre értékelhetetlen eredményeket szolgáltatott, amely jelentősen nehezítette a Nemzeti PRRS Mentelési Terv azon igényét, hogy valós időben megtörténjék a hazánkban keringő törzsek genetikai jellemzése. Munkacsoportunk alternatívát kínált egy, a mentesítésben részt vevő intézmény számára és egy előzetes tanulmány erejéig forrást biztosított a vizsgálatokhoz.

A módszertani részben vázolt szekvenálási protokollok közül az alkalmasabb kiválasztása érdekében néhány mintán előzetesen, analitikai célból összehasonlító vizsgálatokat végeztünk (nem közölt adatok). Hosszútávon mind költséghatékonyság, mind folyamatoptimalizálás szempontjából előnyös lett volna, hogy a fúziós primerekkel végzett amplifikálás és a kapott termék közvetlen szekvenálása (II. módszer) működjön. Annak ellenére azonban, hogy egészen hosszú (500–600 bázis közötti) egyedi szekvenciareadokat is generáltunk a II. módszerrel, az ilyen hosszúságú szekvenciareadok száma elenyésző volt, ami perspektivikusan nem feltétlenül nyújt a szekvenálási hibák ellensúlyozására alkalmas szekvenálási mélységet. Lehetségesnek tűnik, hogy a klonális amplifikáció és a mintadúsítás további finomítást igényelt volna, azonban a módszer optimalizálására finanszírozási okokból végül nem került sor.

A metodikai megközelítést illetően a saját eredmények és a szakirodalmi adatok összevetése után a következő megállapításokra jutottunk. Ugyanazt az izotermális könyvtárkészítő kitet alkalmazva BARONE és mtsai (2015) a mi eredményeinkhez hasonló átlagos hosszúságú szekvenciaread-kihozatalt kaptak [34]. A fúziós primereken alapuló módszert alkalmazó szerzők mind a szekvenciareadok átlagos hosszában, mind a szekvenálás kihozatalában jobb eredményekről számoltak be [35, 36]. Az eltérések hátterében nemcsak az állhat, hogy a könyvtárkészítés kémiaja a kitek újabb verzióiban jelentősen javulhatott, de rámutat arra is, hogy a kérdéses módszerek adaptálhatósága eltérő laboratóriumi környezetben nem egyszerű feladat.

Számos szempont figyelembevételével a szerzők leginkább a hagyományos könyvtárkészítési módszert alkalmazták

Az említettek figyelembevételével előzetes tanulmányunkban az I. módszerként jelölt eljárást alkalmaztuk. Noha ez a módszer valamelyest költségesebbnek bizonyult ahhoz képest, mintha Sanger-szekvenálási szolgáltatást vettük volna igénybe valamely hazai partnernél, nem tartjuk kizártnak, hogy egy NGS-amplikon-szekvenáláson alapuló vírusdiagnosztikai és vírusazonosítási rendszer költség-hatékony módon működtethető lenne, hasonlóan a különböző szolgáltatók által kínált bakteriális 16S rRNS amplikon-mélyszekvenálás alapú metagenomikai vizsgálatokhoz. Mindez azonban megfelelő számú mintát is feltételez, amelyet az állategészségügyben talán csak egy újabb járványügyi kezdeményezésben indított mentesítési program lesz képes biztosítani.

Az összességében 192 db minta szekvenálása során a minták 3%-ánál figyeltek meg kevert fertőzést

Az összességében 192 db minta szekvenálására kiterjedő előzetes tanulmány során a minták 3%-ánál figyeltünk meg kevert fertőzést. Az NGS-technológia segítségével nem csak a különböző törzsek és az egyedi variánsok jelenlétére, hanem a mintában az egymáshoz viszonyított megközelítő arányukra is következtethetünk, ahogy azt korábbi megfigyelések is alátámasztják [37–40]. Az NGS-amplikon-szekvenálás a kevert fertőzések azonosításában messze felülmúlja a Sanger-szekvenáláshoz képest. A Sanger-szekvenálással kapott kromato-

**Kevert fertőzés
leginkább ott várható,
ahol élő vírust
tartalmazó vakcinát
alkalmazznak**

**Némely sertéstelepen
egyidejűleg több
vakcinatörzs is keringhet**

grammok ugyanis vagy értelmezhetetlenek az átfedő hullámok miatt vagy elfedik a kevert fertőzéseket. Előbbi jelenség akkor áll fenn, ha a kevert szekvenciájú mintában közel azonos az eltérő törzsek aránya, utóbbi akkor lehetséges, ha a minor variáns aránya lényegesen kisebb, mint a major variánsé és emiatt jelenléte a kromatogrammban nem kimutatható.

Kevert fertőzés leginkább ott várható, ahol élő vírust tartalmazó vakcina alkalmazásával folyik a mentesítés és így a telepen mind a vakcina, mind a telepi vadvírus jelen van. Adataink mindezt alátámasztani látszottak. A kevert fertőzést mutató minták mindegyike hordozott valamilyen vakcinaeredetű variánst. Az ORF5 120-as és 122-es mintákban kisebb arányban volt megtalálható Porcilis eredetű variáns, míg az ORF5 38-ban major variánsként jelent meg. A másik jelentős hazai jelenléttel bíró vakcinatörzs (Amervac) az ORF7 8-as mintában major variánsként azonosítottuk, minor variánsként pedig az ORF7 1-ben jelent meg.

Az általunk jellemzett szekvenciák beillesztése az országos PRRSV-térképbe a közeljövőben meg fog történni. Jelen tanulmányban nem volt célunk a járványügyi háttéradatok kiértékelése. Így csupán annyi észrevételt teszünk, hogy a feldolgozott minták nagyobb része Porcilis vakcinaeredetűnek bizonyult, a kevert fertőzésként azonosított esetek pedig arról árulkodtak, hogy némely sertéstelepen egyidejűleg több vakcinatörzs is keringhet. Mindezt érdemes folyamatosan figyelemmel kísérni, annál is inkább, mert nemrég olyan PRRSV-1-törzseket is azonosítottak, amelyek két különböző vakcinatörzs rekombinációjával alakulhattak ki, sőt, az egyik ilyen esetben a rekombináns törzs súlyos járványkitörést okozott [41, 42].

Összességében megállapítható, hogy az amplikon alapú újgenerációs szekvenálás alkalmazása sikeresen alkalmazható kevert PRRSV-fertőzések azonosítására, azonban a gyorsabb, s egyben egyszerűbb DNS-könyvtárkészítési módszer további finomítást és alternatív platformokra (pl. Illumina, Oxford Nanopore) történő adaptálást igényel a közeljövőben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

JAKAB SZILVIA munkáját a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alapból finanszírozott Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programja támogatta.

IRODALOM

- Pileri E, Mateu E (2016) Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Vet. Res.* 47:108
- Maclachlan NJ, Dubovi EJ (2016) *Fenner's Veterinary Virology*, 5th ed. Academic Press
- Dokland T (2010) The structural biology of PRRSV. *Virus Res* 154:86–97
- Balka G, Podgórska K, Brar MS, Bálint Á, Cadar D, Celer V, Dénes L, Dirbakova Z, Jedryczko A, Márton L, Novosel D, Petrović T, Sirakov I, Szalay D, Toplak I, Leung FCC, Stadejek T (2018) Genetic diversity of PRRSV 1 in Central Eastern Europe in 1994–2014: origin and evolution of the virus in the region. *Sci Rep* 8:1–12
- Shi M, Lam TT-Y, Hon C-C, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RK-H, Li J, Wong LT-W, Yip C-W, Jiang J-W, Leung FC-C (2010) Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 84:8700–8711
- Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TTY, Leung FCC (2010) The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 154:18–30
- Hornýák Á, Pálfi V, Karakas M (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome szerológiai felmérése Magyarországon [Serological investigation of porcine reproductive and respiratory syndrome in Hungary]. In Abstract Book of the Academic Reports of the Veterinary Committee of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest
- Szabó I, Molnár T, Nemes I, Abonyi T, Terjék Z, Bálint Á (2019) PRRSV eradication on large-scale fattening pig farms in Hungary between 2014 and 2019. *Acta Vet Hung* 67:529–542

9. Szabó PM, Szalay D, Kecskeméti S, Molnár T, Szabó I, Bálint Á (2020) Investigations on spreading of PRRSV among swine herds by improved minimum spanning network analysis. *Sci Rep* 10:19217
10. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, van Spaendonck-Zwarts KY, van Tintelen JP, Sijmons RH, Jongbloed JDH, Sinke RJ (2013) Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat* 34:1035–1042
11. Sato M, Hosoya S, Yoshikawa S, Ohki S, Kobayashi Y, Itou T, Kikuchi K (2019) A highly flexible and repeatable genotyping method for aquaculture studies based on target amplicon sequencing using next-generation sequencing technology. *Sci Rep* 9:1–9
12. Tsuda M, Kaga A, Anai T, Shimizu T, Sayama T, Takagi K, Machita K, Watanabe S, Nishimura M, Yamada N, Mori S, Sasaki H, Kanamori H, Katayose Y, Ishimoto M (2015) Construction of a high-density mutant library in soybean and development of a mutant retrieval method using amplicon sequencing. *BMC Genomics* 16:1–18
13. Arulandhu AJ, van Dijk J, Staats M, Hagelaar R, Voorhijzen M, Molenaar B, van Hoof R, Li R, Yang L, Shi J, Scholtens I, Kok E (2018) NGS-based amplicon sequencing approach; towards a new era in GMO screening and detection. *Food Control* 93:201–210
14. Maloney JG, Molokin A, Santin M (2019) Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infect Genet Evol* 73:119–125
15. Ogorzalý L, Walczak C, Galloux M, Etienne S, Gassilloud B, Cauchie H-M (2015) Human adenovirus diversity in water samples using a next-generation amplicon sequencing approach. *Food Environ Virol* 7:112–121
16. König K, Peifer M, Fassunke J, Ihle MA, Künstlinger H, Heydt C, Stamm K, Ueckeroth F, Vollbrecht C, Bos M, Gardizi M, Scheffler M, Nogova L, Leenders F, Albus K, Meder L, Becker K, Florin A, Rommerscheidt-Fuss U, Altmüller J, Kloth M, Nürnberg P, Henkel T, Bikár SE, Sos ML, Geese WJ, Strauss L, Ko YD, Gerigk U, Odenthal M, Zander T, Wolf J, Merkelbach-Bruse S, Buettner R, Heukamp LC (2015) Implementation of amplicon parallel sequencing leads to improvement of diagnosis and therapy of lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 10:1049–1057
17. Chang F, Li MM (2014) Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer. *Cancer Genet.* 206:413–419
18. Jo Y, Choi H, Kim S-M, Kim S-L, Lee BC, Cho WK (2017) The pepper virome: natural co-infection of diverse viruses and their quasispecies. *BMC Genomics* 18:453
19. Bull RA, Eltahla AA, Rodrigo C, Koekkoek SM, Walker M, Pirozyan MR, Betz-Stablein B, Toepfer A, Laird M, Oh S, Heiner C, Maher L, Schinkel J, Lloyd AR, Luciani F (2016) A method for near full-length amplification and sequencing for six hepatitis C virus genotypes. *BMC Genomics* 17:247
20. Papparini A, Gofton A, Yang R, White N, Bunce M, Ryan UM (2015) Comparison of Sanger and next generation sequencing performance for genotyping *Cryptosporidium* isolates at the 18S rRNA and actin loci. *Exp Parasitol* 151–152:21–27
21. Larsson A (2014) AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30:3276–3278
22. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549
23. Muhire BM, Varsani A, Martin DP (2014) SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One* 9:e108277
24. Martin DP, Varsani A, Roumagnac P, Botha G, Maslamoney S, Schwab T, Kelz Z, Kumar V, Murrell B (2021) RDP5: a computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evol* 7:87
25. Bálint Á, Molnár T, Kecskeméti S, Kulcsár G, Soós T, Szabó PM, Kaszab E, Fornyoos K, Zádori Z, Bányai K, Szabó I (2021) Genetic variability of prrsv vaccine strains used in the National Eradication Programme, Hungary. *Vaccines* 9:849
26. Mechanic LE, Chen HS, Amos CI, Chatterjee N, Cox NJ, Divi RL, Fan R, Harris EL, Jacobs K, Kraft P, Leal SM, McAllister K, Moore JH, Paltoo DN, Province MA, Ramos EM, Ritchie MD, Roeder K, Schaid DJ, Stephens M, Thomas DC, Weinberg CR, Witte JS, Zhang S, Zöllner S, Feuer EJ, Gillanders EM (2012) Next generation analytic tools for large scale genetic epidemiology studies of complex diseases. *Genet Epidemiol* 36:22–35
27. Belák S, Karlsson OE, Leijon M, Granberg F (2013) High-throughput sequencing in veterinary infection biology and diagnostics. *OIE Rev Sci Tech* 32:893–915
28. Yska HAF, Elsink K, Kuijpers TW, Frederix GWJ, van Gijn ME, van Montfrans JM (2019) Diagnostic yield of next generation sequencing in genetically undiagnosed patients with primary immunodeficiencies: a systematic review. *J Clin Immunol* 39:577–591
29. Dunne WM, Westblade LF, Ford B (2012) Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:1719–1726
30. Vinkškel M, Writzl K, Maver A, Peterlin B (2021) Improving diagnostics of rare genetic diseases with NGS approaches. *J Community Genet* 12:247–256
31. Balka G, Wang X, Olasz F, Bálint Á, Kiss I, Bányai K, Rusvai M, Stadejek T, Marthaler D, Murtaugh MP, Zádori Z (2015) Full genome sequence analysis of a wild, non-MLV-related type 2 Hungarian PRRSV variant isolated in Europe. *Virus Res* 200:1–8
32. Bálint Á, Balka G, Horváth P, Kecskeméti S, Dán Á, Farsang A, Szeredi L, Bányai K, Bartha D, Olasz F, Belák S, Zádori Z (2015) Full-length genome sequence analysis of a Hungarian porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated from a pig with severe respiratory disease. *Arch Virol* 160:417–422
33. Marton S, Szalay D, Kecskeméti S, Forró B, Olasz F, Zádori Z, Szabó I, Molnár T, Bányai K, Bálint Á (2019) Coding-complete sequence of a vaccine-derived recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain isolated in Hungary. *Arch Virol* 164:2605–2608
34. Barone JC, Saito K, Beutner K, Campo M, Dong W, Goswami CP, Johnson ES, Wang ZX, Hsu S (2015) HLA-genotyping of clinical specimens using Ion Torrent-based NGS. *Hum Immunol* 76:903–909
35. Monteiro M, Baptista MS, Séneca J, Torgo L, Lee CK, Cary SC, Magalhães C (2020) Understanding the response of nitrifying communities to disturbance in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microorganisms* 8:404
36. Nupponen-Puputti M, Kietäväinen R, Purkamo L, Rajala P, Itävaara M, Kukkonen I, Bomberg M (2021) Rock surface fungi in deep continental biosphere—exploration of microbial community formation with subsurface in situ biofilm trap. *Microorganisms* 9:64
37. Qiu P, Stevens R, Wei B, Lahser F, Howe AYM, Klappenbach JA, Marton MJ (2015) HCV genotyping from NGS short reads and

its application in genotype detection from HCV mixed infected plasma. PLoS One 10:e0122082

38. McNaughton AL, Sreenu VB, Wilkie G, Gunson R, Templeton K, Leitch ECM (2018) Prevalence of mixed genotype hepatitis C virus infections in the UK as determined by genotype-specific PCR and deep sequencing. J Viral Hepat 25:524–534

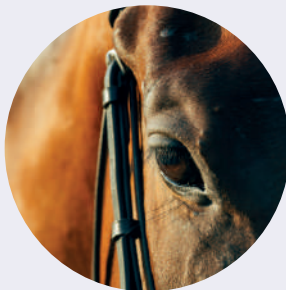
39. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, Matteson NL, De Jesus JG, Main BJ, Tan AL, Paul LM, Brackney DE, Grewal S, Gurfield N, Van Rompay KKA, Isern S, Michael SF, Coffey LL, Loman NJ, Andersen KG (2019) An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using Primal-Seq and iVar. Genome Biol 20:8

40. Hebler-Barbosa F, Wolf IR, Valente GT, Mello FC do A, Lampe E, Pardini MI de MC, Grotto RMT (2020) A new method for next-generation sequencing of the full hepatitis b virus genome from a clinical specimen: impact for virus genotyping. Microorganisms 8:1391

41. Eclercy J, Renson P, Lebreton A, Hirchaud E, Normand V, Andraud M, Paboeuf F, Blanchard Y, Rose N, Bourry O (2019) A field recombinant strain derived from two type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) modified live vaccines shows increased viremia and transmission in SPF pigs. Viruses 11:296

42. Kvisgaard LK, Kristensen CS, Ryt-Hansen P, Pedersen K, Stadeljeck T, Trebbien R, Andresen LO, Larsen LE (2020) A recombination between two Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs. Transbound Emerg Dis 67:1786–1796

Közlésre érke.: 2021. okt. 15.



Szolgáltatásaink:

- ✓ társ- és haszonállatok laboratóriumi vizsgálata
- ✓ ingyenes mintavételi csövek biztosítása
- ✓ ingyenes mintaszállítás az ország nagy részéről
- ✓ folyamatosan bővülő vizsgálati paletta
- ✓ gyors eredményközlés
- ✓ havi kedvezmények
- ✓ terápiás szaktanácsadás
- ✓ mikrobiológiai vizsgálatok

**Keresse bizalommal
szakembereinket**

+36 30 287 2991

www.cordenvet.hu

vet@cordenvet.hu



A szuper állatlaboratórium receptje

Hogy mi kell egy kiváló állatorvosi laboratórium működéséhez? Kiemelt szaktekintélyekből álló orvosi stáb, több évtizedes labordiagnosztikai tudás és tapasztalat, elhivatott, dinamikus, lelkes és nagy szakmai gyakorlattal bíró csapat. Mivel a Corden International /Magyarország/ Kft. 18 éve működik a humán labordiagnosztika piacának meghatározó szereplőjeként, így laboratóriumi szakértelem birtokában és rendkívüli orvosgárdával 5 évvel ezelőtt új üzletágként állatorvosok és állatklinikák számára nyújtott laborszolgáltatást indítottak el.



A labordiagnosztika az állatgyógyászat szerves része, ugyanúgy, ahogy a humán gyógyászatban is létfontosságú. A jól felállított diagnózishoz elengedhetetlen a pontos és gyors laboratóriumi vizsgálat. 2017. júliusában DR. JERZSELE ÁKOS Ph.D. egyetemi docens és DR. SZABÓ NIKOLETTA irányításával elindult a CordenVET. A vizsgálati paletta az elmúlt években szépen bővült, ugyanígy fejlődött és korszerűsödött a géppark is. Az innovatív fejlődés mellett a laboratórium szerves része maradt a mikroszkóp használata. A mikroszkópos vizsgálatokat SZABÓ doktornő saját maga végzi. A legtöbb ezzel a módszerrel vizsgált minta feldolgozása állatorvosi vonalon nincs automatizálva, ezért állatoknál a vér, bélsár, vizelet, bőrkaparek vizsgálatára a legjobb módszer még mindig a mikroszkóp.

Az évek során nemcsak az infrastruktúra fejlődött és növekedett a kérhető vizsgálatok száma, hanem a vizsgálható állatfajok száma is bővült. A kisállatok mintáin kívül egzotikus állatok és haszonállatok vér- és vizeletvizsgálata is lehetséges. A CordenVET a Magyar Lovas Szövetséggel is kapcsolatban áll, így a Nemzeti Lovardából rendszeresen érkezik vizsgálatkérés.

A már két éve húzódó világjárvány miatt a CordenVETnek is változtatni kellett a megszokott, ismeretek bővítését segítő programjain és a korábban nagy népszerűségnek örvendő személyes továbbképzések a világhálón keresztül, webinárium keretein belül folytatódtak. JERZSELE doktor Úr és SZABÓ doktornőn kívül más vendégelőadók is tartottak előadásokat különféle témakörökben, mint a lovak lázas betegségei, a kutyákat érintő szívfergesség aktuális vizsgálatait és gyógyszerelési ajánlása, vagy az atópiás dermatitis kezelése. A webinárok is közkedveltek az állatorvosok, állatorvostanhallgatók körében. Az itt elhangzó hasznos információk nagy segítséget nyújtanak a diagnózis felállításában, a helyes gyógykezelés kiválasztásában.



A CordenVET a laborszolgáltatások mellé számos kényelmi kedvezményt is biztosít, ami nagy segítség az állatorvosok számára. Nemcsak a szükséges mintavételi eszközökkel látják el a partnereket, de igény esetén a mintavételhez szakmai tanácsot is nyújtanak. A rugalmas logisztikai szolgáltatásnak köszönhetően könnyedén gyűjtik be a mintákat az ország nagy részéről, így azok mielőbb feldolgozásra is kerülnek. Céljuk, hogy a gyors leletkiadással minél előbb pontos diagnózishoz segítsék az állatorvosokat és megkezdődhessen a kezelés. A leletek értékeléséhez pedig leletkonzultáció is kérhető DR. JERZSELE Ákostól.

A lendület töretlen. Erre az évre is terveben van számos új vizsgálat bevezetése, webináriumok szervezése és a konferenciákon való személyes jelenlét, ahol minden felmerülő kérdésre választ kaphatnak a laboratóriummal kapcsolatban.

VAN MÉG MIT MONDANUNK:



LAPOZZON BELE
TOVÁBBI FOLYÓIRATAINKBA IS!

Archív lapszámok és előfizetési információk a www.agrarlapok.hu oldalon.

