

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar  
Állattenyésztési, Takarmányozási és Laborállattudományi Intézet és  
az MTA-SzIE Kutatócsoport



**A Nyugat-nílusi vírus okozta megbetegedés által előidézett  
elváltozások lovak agy- és gerincvelői folyadékában**

Fekete Mária Rita

(IV. évfolyam)

Témavezető: Dr. Korbacska-Kutasi Orsolya, egyetemi adjunktus

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Állattenyésztési, Takarmányozási és  
Laborállattudományi Intézet és az MTA-SzIE Kutatócsoport

**2015.**

# Tartalomjegyzék

---

<b>Bevezetés</b>	2.
<b>1. Irodalmi áttekintés</b>	4.
1.1. A Nyugat-nílusi vírus eredete és elterjedése	4.
1.1. A.) <i>A Nyugat-nílusi vírus szerkezet és genetikai vonalai</i>	4.
1.1. B.) <i>A vírus terjedése és természetes ciklusa</i>	5.
1.1. C.) <i>Alkalmi gazdák</i>	7.
1.1. D.) <i>A Nyugat-nílusi vírus földrajzi elterjedése</i>	7.
1.2. A Nyugat-nílusi vírus kórfejlődése	8.
1.2. A.) <i>A vírus okozta tünetek</i>	8.
1.2. B.) <i>A fertőződés diagnosztikája</i>	10.
1.3. Az agy- és gerincvelői folyadék	11.
1.3. A.) <i>A liquor élettana</i>	11.
1.3. B.) <i>A liquor vizsgálata</i>	11.
<u>1.3. B. a) Makroszkopikus vizsgálat</u>	12.
<u>1.3. B. b) Mikroszkopikus vizsgálat</u>	12.
<b>2. Anyag és módszer</b>	15.
2.1. A vizsgálatban szereplő lovak	15.
2.1. A.) <i>Beválasztási kritériumok</i>	15.
2.1. B.) <i>Kizárásos kritériumok</i>	15.
2.2. Az egészséges és beteg lovak csoportosítása	16.
2.3. Alkalmazott mintavételi technikák	17.
2.3. A.) <i>Atlanto-occipitálsi mintavétel</i>	17.
2.3. B.) <i>Lumbosacralis mintavétel</i>	19.
2.4. A liquor-minta elemzése	20.
2.5. A vírus genetikai vonalának meghatározása	20.
<b>3. Eredmények</b>	21.
<b>4. Megbeszélés</b>	22.
<b>5. Összefoglalás</b>	30.
<b>6. Summery</b>	31.
<b>7. Irodalom jegyzék</b>	32.
<b>8. Köszönetnyilvánítás</b>	37.

## Bevezetés

---

A Nyugat-nílusi vírus, angolul West Nile Virus (WNV), a *Flaviviridae* családba tartozó arbovírus (arthropod-borne). Ezt a vérszívó ízeltlábúak, elsősorban a *Culex* és *Aedes* nemzetségekbe tartozó igazi szúnyogok terjesztik. A vírus természetes ciklusa a szúnyogok és a vadon élő madarak között zajlik. Hazánkban a legjelentősebb rezervoárjai a vadmadarak. Széles gazdaspektrummal rendelkezik, így véletlenszerűen fertőződhetnek más melegvérű állatok is. Zoonotikus, ezért közegészségügyi jelentőséggel bír. Az első esetet, ahol a beteg egy 37 éves afrikai nő volt, 1937-ben Ugandában dokumentálták. A filogenetikai tanulmányok szerint a Nyugat-nílusi vírus több genetikai vonallal rendelkezik. Klinikai szempontból az egyes és a kettes vonal a jelentős humán és állatorvosi vonatkozásban is, melyeket egymástól a reverz transzkriptáz polimeráz-láncreakciós (RT-PCR) és vírusneutalizációs vizsgálatok segítségével lehet elkülöníteni.

Emberben ez a betegség a Nyugat-nílusi láz, ami Európában szórványosan már korábban is előfordult, de feltételezhetőleg a globális felmelegedés velejárójaként jelent meg hazánkban és egyre gyakrabban detektálható (Wamsley et al., 2002). A Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia-laboratóriumában 2008. augusztus 19-én regisztrálták az első két humán esetet. Még abban az évben 12 megbetegedés esetében nyert bizonyosságot a fertőzöttség. A legfiatalabb páciens 16, míg a legidősebb 80 éves volt (Epinfo, 2008). A legtöbb betegnél a láz, fejfájás, hányinger, zavartság, fénykerülés mellett idegrendszeri bántalmak is jelentkeztek. A tünetek alapján ez lehetett agyhártyagyulladás, agyvelőgyulladás vagy agyhártya- és agyvelőgyulladás illetve polioencephalomyelitis (Cantile et al., 2001) is, míg állatoknál ilyen szintű megkülönböztetést nem teszünk. A tünetek jelentkezésétől számítva a kezelést 24 órán belül meg kell kezdeni, mert a késedelem akár a beteg halálához vagy súlyos maradványtünetek kialakulásához is vezethet. Magyarországon a megbetegedéseknek eddig nem voltak halálos áldozatai. A fertőzés a madár- és embervért is kedvelő szúnyogok csípése révén terjed, de bizonyítást nyert a transzplacentáris és anyatejjel történő átadás is.

Lovaknál is esetleges a fertőződés, a szúnyogok az augusztustól novemberig terjedő időszakban terjesztik a vírust. Ez, valamint az enyhe fokú viraemia gátat szab a vírus terjedésének. Mégis a megbetegedés súlyos központi idegrendszeri problémákat, agyhártya- és agyvelőgyulladást, okozhat. A heveny tünetek, a megfigyeléstől számított 5 napon belül jelentkeznek, melyek között szerepelnek a mozgáskoordinációs zavarok (ataxia), az izomremegés, a parkinson-szerű remegés (parkinsonizmus), viselkedésbeli változások.

Néhány lóban leírtak még gyengeséget, petyhüdt bénulást. A pontos kórismerehez szükséges a heveny időszakban termelődő ellenanyag kimutatása vagy a vírus izolálása a szervezetből.

A Nyugat-nílusi vírus egy neurotrop vírus, mely közvetlenül az idegsejteket támadja. A vírus indukálta központi idegrendszeri károsodások, az agy- és gerincvelői folyadék közvetlen kapcsolata következtében, elváltozásokat idézhetnek elő a liquorban.

Az agy- és gerincvelői folyadék diagnosztikai jelentőséggel bír a kórfolyamatok feltérképezésében. Ezért a tanulmányunk célja ezen elváltozások jellemzése révén elősegíteni a kórjelzést és segítséget nyújtani a központi idegrendszert érintő neurodegeneratív betegségek sokféleségének jobb megértésében.

# 1. Irodalmi áttekintés

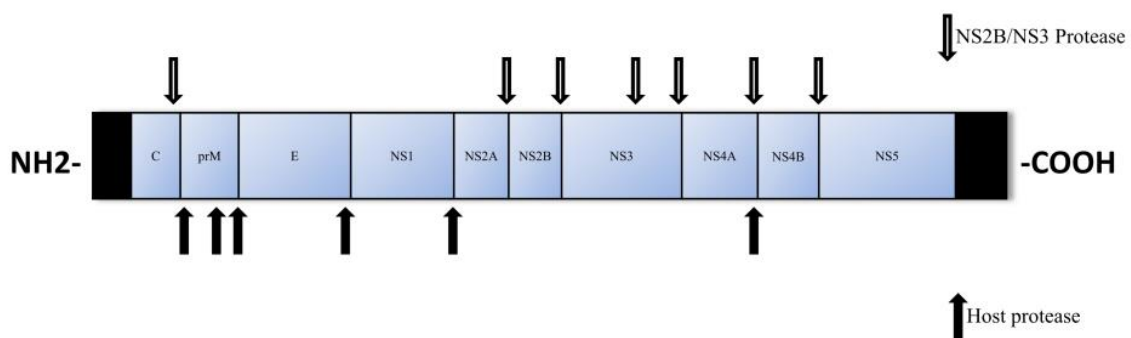
---

## 1.1 A Nyugat-nílusi vírus eredete és elterjedése

A Nyugat-nílusi vírus, NyNV, a *Flaviviridae* családba (Smithburn et al., 1940) tartozó neurotrop arbovírus (ízeltlábú vektorok általi terjedés jellemzi). Legjelentősebb hordozói a *Culex* nemzetségbe tartozó igazi szúnyogok, közülük is a *C. pipiens*. Emellett izolálták egyéb *Aedes*, *Anopheles* és *Ochlerotatus* fajokból is. Természetes ciklusa a vadon élő madarak és ízeltlábúak, vagy egyéb vérszívó rovarok, között zajlik. Esetlegesen fertőződnek az emberek és a lovak is, legalábbis a fertőzés emlősökön történő megjelenésekor klinikai betegségről ebben a két fajban számoltak be (Wamsley et al., 2002). A fertőződés szezonalitást mutat, a megbetegedés inkább a nyár végi és az őszi hónapokban (augusztus – november) jellemző. Klinikai tünetei emberekben és lovakban hasonlóak lehetnek. A Nyugat-nílusi vírussal fertőződött humán betegek esetében agyhártyagyulladást vagy agyvelőgyulladást diagnosztizáltak. Állatokban ilyen típusú megkülönböztetést nem teszünk. A Nyugat-nílusi vírus mutatja a legszélesebb földrajzi elterjedtséget a *Flaviviridae* családba tartozó vírusok közül.

### 1.1. A.) A Nyugat-nílusi vírus szerkezet és genetikai vonalai

A vírus genomja egy pozitív, szimplaszálú RNS, melyet az azonos családba tartozó vírusoktól vírus neutralizációs technikák és PCR vizsgálatok alapján tudunk elkülöníteni post mortem esetekben.



1. kép: A Nyugat-nílusi vírus RNS-genom szerkezete.

(Valiakos et al., 2013)

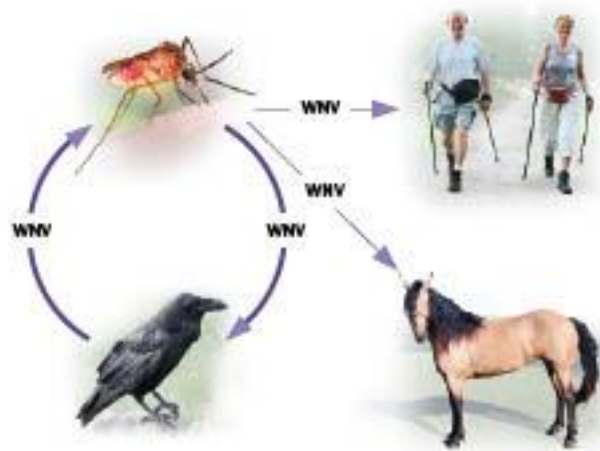
A filogenetikai tanulmányok szerint a Nyugat-nílusi vírus több genetikai vonallal (lineage) rendelkezik. Ebből hazánkban az egyes és a kettes vonal fordult eddig elő (Lanciotti et al., 2002).

Az 1-es vonal széles körben terjedt el, és a szerológiai vizsgálatoknak köszönhetően tovább bontható: NyNV 1a alosztályba tartozó törzsek szinte az egész világon előfordulnak, az 1b inkább Ausztráliában, míg az 1c Indiában jellemző. Mostanra, a filodinamikai módszereknek köszönhetően újraértelmezték a Nyugat-nílusi vírus 1a genetikai vonalának európai térben és időben való megjelenését. Ez alapján két fő irányra osztották a vírust, az 1-es lett a kelet-európai, míg a 2-es a nyugat-európai vonal. A NyNV-2 genetikai vonala Afrika szubszaharai régióiban, Madagaszkáron és 2012-ig Dél-Európában jelent meg: 2004-ben Magyarországon, 2010-től Romániában és Görögországban, 2011 óta Olaszországban. Ezen kívül még Ausztriában is izolálták a vírus 2-es vonalát fertőzött állatokból. A NyNV-3 vonalat a Cseh Köztársaságban található Rabensburg régiójában, elzártan, mutatták ki. A NyNV-4 genetikai vonalat Dél-Oroszországban, míg az 5-ös genetikai vonalat csak Indiában találták meg. De ezen kívül feltételezhetőleg még több vonal is van (Ciccozzi et al., 2013).

### *1.1. B.) A vírus terjedése és természetes ciklusa*

A vírus terjedéséhez elengedhetetlenül fontos, hogy az olyan szúnyogpopulációba kerüljön, ahol nem csak megtelepedni, hanem szaporodni is képes, ezáltal nagyfokú viraemiát ér el az adott szervezetben. A replikációhoz és a nyálmirigybe történő bejutáshoz, mint a legtöbb arbovírus esetében, szükség van egy 2 hétig tartó meleg, átmeneti időszakra, amit a páratartalom és a hőmérséklet is befolyásol (Castillaro-Olivares et al., 2004). A meleg a vírus és a szúnyogok szaporodása szempontjából is jelentős. Ezen vertikális terjedési forma (a nőstény révén a vírus transzovariálisan átjut az utódba, fenntartva így a fertőzöttséget nemzedékeken át) jelentős, és több szúnyogfaj esetében is megfigyelhető (Goddard et al., 2003). Ezen időszaknak a függvénye a vírus transzmissziója és a betegség kitörésének szezonálisitása is. Így hazánkban, de más országokban is, ahol hasonlóan mediterrán-égyövi, kontinentális a klíma, a nyár végi és őszi hónapokban alakul ki a legideálisabb hőmérséklet ahhoz, hogy a szúnyogpopulációk a legmagasabb egyedszámot ériék el, és nem utolsó szempont az sem, hogy ebben a periódusban a legaktívabbak (Hubalek et al., 1999). A viraemia foka nem egyezik a madaraknál és az emlősöknél. A lovakban és emberekben már az enyhe vírusfertőzés is komoly idegrendszeri problémákat okoz, míg bizonyos madárfajok esetében a nagyfokú viraemia esetében sem jelentkeznek klinikai tünetek (Hubalek et al., 1999). Ez a megállapítás is alátámasztja, miért jelentenek zsákcúrt az

emlősök a vírus terjedésében illetve fennmaradásában. A *Culex* fajok jelentősége is ebben rejlik, hiszen „bridge-vectorok”, azaz hidat képeznek a madarak és az emlősök között (Farajollahi et al., 2011). Fontosnak tartom megemlíteni azt a kutatást is, amikor egyéb vérszívó rovarokat teszteltek a vírus terjedése kapcsán, annak tisztázására, hogy a későbbiekben szerepet játszhatnak-e mint biológiai vektorok. Hayes és munkatársai laboratóriumában tesztelték az óvantagekat és a kullancsokat. A vírussal fertőzött óvantagek (*Argasidae* család) képesek voltak egyes baromfi fajokat megfertőzni, a kullancsok (*Ixodidae* család) esetében azonban ilyesmit nem találtak (Hayes et al., 2005).



**2. kép: A Nyugat-nilusi vírus természetes ciklusa.**

**(Masoner et al. 2008)**

A ciklus fenntartása és terjedése szempontjából jelenetős szerepet játszanak a vadmadarak. Fenntartják, hiszen a fertőzött egyedekben a magas titer szintnek köszönhetően (amplifikációs gazda) a belőlük táplálkozó szúnyogfajok könnyen fertőződhetnek, és terjesztik is, mivel nem egy esetben a vándormadarak a vándorlási periódusok miatt akár kontinensek között is képesek a vírust átvinni egyik populációból a másikba. A gazdák között említhetőek azon vadonélő madárfajok, melyek az embertől távol élnek. Ezen fajok közé sorolhatjuk a verébalakúakat (*Passeriformes*), a lilealakúakat (*Charadriiformes*), a bagolyalakúakat (*Strigiformes*), és a sólyomalakúakat (*Falconiformes*) (Hayes et al., 2005).

### *1.1. C.) Alkalmi gazdák*

A lovak és emberek esetlegesen fertőződnek a Nyugat-nílusi vírussal. A vírust hordozó madarakban (rezervoár-fajok) nagyfokú viraemiát tapasztalunk, ezért ha egy addig nem fertőződött szúnyog szív vért egy fertőződött egyedből, akkor a magas titer szám miatt fertőződik a rovar. Innentől kezdve a szúnyog már hordozónak számít. Amennyiben ez az egyed „bridge-vector”, azaz az emlősökből is szív vért, akkor nagy valószínűséggel oltja át a vírust a csípése révén emberekbe illetve lovakba egyaránt, mely esetekben már az enyhe viraemia is masszív klinikai tüneteket produkálhat. Az alacsony titer szám miatt a következő vírusmentes vérszívó szúnyog nagy valószínűséggel nem fog a táplálkozása révén fertőződni. A mikrobiológiai szakirodalomban ezen terjedési formát szilvatikus ciklusnak is nevezzük. Ezen összefüggések ismeretében kijelenthetjük, hogy ez zsákutcát jelent a vírusnak, hiszen a terjedési ciklusa zavart fog szenvedni (Monini et al., 2010).

### *1.1. D.) A Nyugat-nílusi vírus földrajzi elterjedtsége*

Először 1937-ben, egy afrikai származású női páciens véréből izolálták a vírust Ugandában. Az 1950-es évek korai szakaszáig csak Afrika egyes régióiban és a Közel-Keleten jelentettek szórványosan járványszerű kitöréseket (Zehender et al., 2011). Ezt követően a szub-szaharai régióban és Észak-Afrikában, illetve Európában, Ázsiában, Ausztráliában is azonosították a vírust (Zeller et al., 2004). 1999 nyara óta az Egyesült Államokban is megjelent a vírus (Hayes, 2001). 1996-ig csak szórványosan fordult elő Európában, azóta viszont rendszeresen mutatják ki madaraktól illetve a fertőződött lovak és emberek véréből (Ciccozzi et al., 2013). Még ugyanabban az évben volt egy hatalmas járványkitörés Románia déli részén, ami a fertőzött emberek majdnem 10%-nál halálos kimenetelű volt (Zeller et al., 2004). Emellett járványszerű kitöréseket jelentettek Dél-Oroszországból a Volga-delta környékéről és az Egyesült Államok északkeleti régióiból 1996 és 1999 között, ahol is több száz esetben a súlyos idegrendszeri megbetegedések és a halálos kimenetelű fertőzések teljesen váratlanok voltak (Hayes, 2001).



## 1.2. A Nyugat-nílusi vírus kórfejlődése

A fertőző betegségek lefolyását 3 szakaszba soroljuk. Az első az úgynevezett lappangási vagy inkubációs idő, amikor is a vírus bejut a bemeneti kapun keresztül a szervezetbe, és megtelepszik, illetve szaporodni kezd. A második szakaszban a vírus elkezd terjedni a vér- és a nyirokereken révén, ezt hívjuk generalizációs szakasznak. A harmadik szakaszban nyilvánulnak meg a betegségre jellemző, de nem specifikus tünet-együttesek (manifesztáció). A betegség kimenetele a vírus okozta szervi elváltozások és az általános kondíció függvénye, ami lehet gyógyulás, részleges gyógyulás és elhullás (Varga et al., 1999).

A Nyugat-nílusi vírust hordozó szúnyogok a csípések révén oltják be a vírust az emlősök keratocitáiba és a Langerhans-féle sejtekbe, amelyek révén a vírus a regionális nyirokcsomókba vándorol. Itt kezdődik meg az elsődleges replikáció. Innen a kórokozó a vér útján bejut a vizcerális szervekbe, elsősorban a veséket és a lépét támadva, ahol megindul a második szaporodási ciklus, feltételezhetőleg az epithelsejtekben és a makrofágokban. Valószínűsíthető, hogy a vírus képes átlépni a vér-agy gáton és megfertőzni az agyat, aminek következtében kialakulhat az agyhártya- és agyvelőgyulladás. A vírus agyba való bejutásának lehetséges mechanizmusai (Lim et al., 2011.):

- fertőzés vagy passzív transzport révén az endothél vagy a plexus chorioideus epithel sejtjeibe
- a szaglóidegek gyulladása révén a szaglóhagymába
- „Trójai-faló” mechanizmus révén, amikor is a fertőződött immunsejtek a gyulladással területhez vándorolnak
- direkt axon retrográd transzport révén a fertőződött perifériás idegpályákból.

### *1.2. A.) A vírus okozta tünetek*

Humán esetekben a lappangási idő egyéntől függően alakulhat ki. Az általános kondíció és az aktuális immunstátusz mellett, azonban még számtalan más tényező befolyásolja azt. Erre az időre gyakorta a láz a jellemző, ami a szúnyogcsípéstől számított 2 naptól 2 hétig terjedő időszakban jelenik meg. A fertőzött személyek körülbelül 80%-a tünetmentes marad (Epinfo, 2008).

**1. Táblázat: A Nyugat-nílusi vírus tünetei kórházban ellátott betegekben.  
(Petersen et al., 2002.)**

Tünetek	Helyszín		
	New York állam (n=59)	Románia (n=393)	Izrael (n=233)
	%		
Láz	90	91	98
Gyengeség	56	-	-
Émelygés	53	-	-
Hányás	51	53	31
Fejfájás	47	77	58
Mentális státuszban bekövetkezett változások	46	34	40
Hasmenés	27	-	19
Kiütés	19	-	21
Köhögés	19	-	-
Merev nyak	19	57	29
Izomfájdalom	17	-	15
Izületi fájdalom	15	-	-
Lymphadenopathia	2	-	10

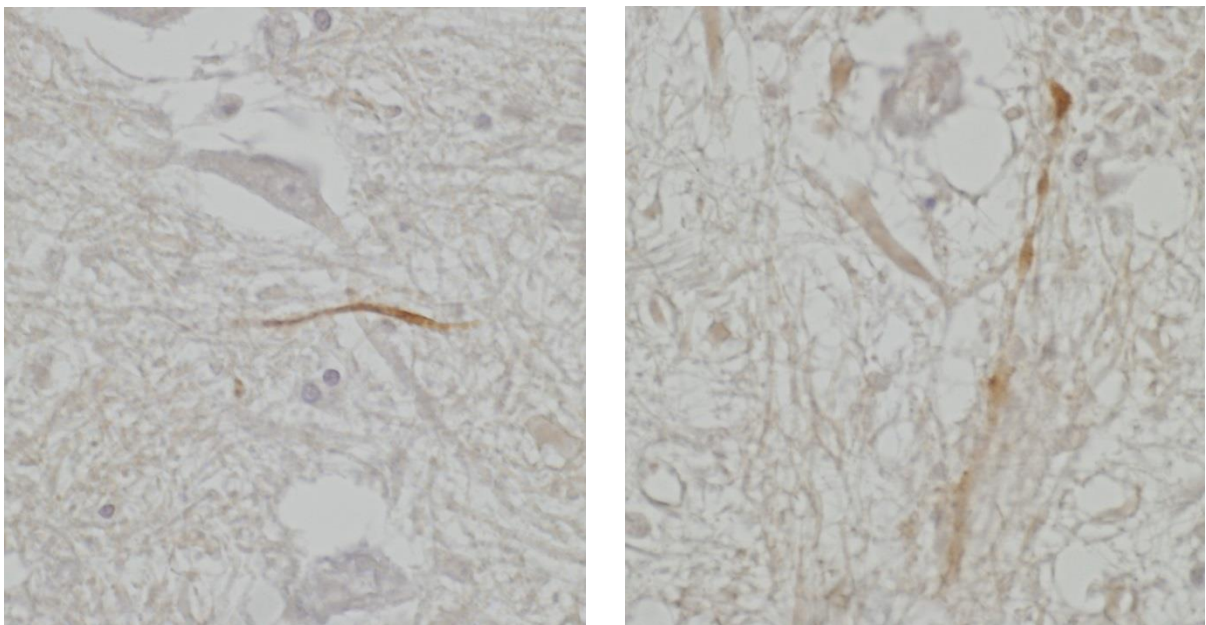
Az Amerikai Egyesült Államokban regisztráltak még agyhártyagyulladást, agyvelőgyulladást, de csak az esetek elenyésző részében. A megbetegedés rövid időn belül, általában 2 hét alatt lezajlik. Szövődménye lehet májgyulladás, hasnyálmirigy gyulladás, esetleg különféle szívproblémák is jelentkezhetnek. Magyarországon eddig, azonosítottnak a Nyugat-nílusi vírussal fertőzött betegek közül senki nem halt meg. A gyermekek, az 50 év feletti felnőttek illetve valamilyen alapbetegségben szenvedőknél lehet nagyobb kockázattal számolni. Kóroki terápia még nincs. Nem indokolt a betegek elkülönítése sem (ÁNTSZ).

A Nyugat-nílusi vírus a megfertőzött lovak közel 10%-ban okoz idegrendszeri problémákat (embereknél ez közel 1%). Lovakban a lázas állapotot leszámítva a tünetek neurológiai eredetűek, melyek tükrözik a központi idegrendszer patológiás állapotát (Cantile et al., 2001). Az átmeneti lázas állapot nem minden esetben fordul elő. A leggyakoribb tünetek a gerincvelő károsodásához társulnak, úgymint ataxia, bénulás (parézis vagy paralízis), amely jelentkezhet egy vagy akár mind a négy végtagon is. Ezekhez gyakran társul még izomremegés vagy éppen izommerevség, de megfigyeltek mentális problémákat is, mint étvágytalanság, aluszékonyság, túlérzékenység (Castillo-Olivares et al., 2004). Emellett megfigyelhető a fejen a pofák, az arcizmok remegése (parkinsonizmus) esetleg egyes agyvelői idegek, mint a n. facialis bénulása is (Kutasi, 2011).

### *1.1. B.) A fertőződés diagnosztikája*

A Nyugat-nílusi vírus kimutatásának és a heveny fertőzöttség feltárásának leghatékonyabb módszere a vérsavóból vagy liquor-mintából történő IgM antitestek kimutatása. Ennek a legoptimálisabb eszköze az IgM ELISA kit, mert a nagyon érzékeny mintákat kémeli, ráadásul mind szérum, mind pedig liquor minta esetén alkalmazható (MacDonald et al., 2005). Az IgM a klinikai tünetek megjelenésétől számított 8 napon belüli intervallumban alkalmas a betegség kimutatására. Az IgM után röviddel megjelenik az IgG antitest is, de ez diagnosztikai célokra nem alkalmas, mert akár évekkel a fertőzés után is jelen lehet a szervezetben (Centers for Disease Control and Prevention). Az agy- és gerincvelői minta azért jó és specifikus, mert a szervezetben képződött IgM a nagy molekulatömege miatt nem képes átlépni a vér-agy gáton, így feltételezhetjük, hogy azt a gyulladás következtében a központi idegrendszer sejtjei termelik. (Petersen et al., 2002).

Post mortem esetekben a vírus jelenlétének igazolására szövettani metszeteket, RT-PCR és vírusneutralizáló módszereket is igénybe vehetünk. Szövettanilag a fertőzés lovagnál léziót (elváltozást) eredményez a központi idegrendszerben, ami a bazális ganglionoktól a gerincvelőig terjed, és amit multifokális, nem gennyes polioencephalomyelitis jellemez a perivaszkuláris (ér körüli) területeken T-limfocitás és makrofágos beszűrődéssel (Wamsley et al., 2002).



### **3. Kép: Ló gerincvelőjének Nyugat-nílusi vírussal fertőződött idegsejtjei.**

**Immunhistokémiai festés 40x nagyításban, prof Herbert Weißenböck kórboncnok és törvényszéki állatorvos, Állatorvos-tudományi Egyetem Bécs**

### 1.3. Az agy- és gerincvelői folyadék

#### 1.3. A.) *A liquor élettana*

Az agy- és gerincvelői folyadék nélkülözhetetlen a központi idegrendszer védelmének és szeparáltságának a fenntartásában. Termelődése nagyrészt a két laterális, a harmadik és negyedik agykamrai érfonatok (plexus chorioideusok) feladata, de nem hanyagolható el az ependimális sejtek 30% körüli liquor-kiválasztása sem (Johnson et al., 2000). Elvezetése az aktuális intracerebrális nyomás függvénye, és amely a sinus venosusban található arachnoidális setjek szűrőmechanizmusának köszönhető. Funkcióját tekintve a liquor, mint közvetítő, a neuroendokrin hormonok illetve transzmitterek transzportjaként is működik. Fontos szerepe van emellett az agy- és a gerincvelő védelmében, a koponyaúri nyomás szabályozásában, valamint a fiziológiás ionháztartás és sav-bázis egyensúly fenntartásában. Mindez mutatja a liquor jelentőségét, és előrevetíti azt is, hogy bármelyik összetevőjének megváltozása komoly problémákat okozhat (Fehér, 2006).

Az agy- és gerincvelői folyadék egy ultrafiltrált plazma, amely az agyféltekek felől caudális irányban áramlik, körbevéve a gerincvelőt. Ez az irányított áramlás jól észrevehető különbségeket eredményez ugyanazon állat atlanto-occipitális és a lumbosacralis területeiről vett mintái között, különösen olyan állat esetében, amely gerincvelő betegségben szenved. Noha a liquor eredmények ritkán specifikusak, és a központi idegrendszer előrehaladottan megbetegedett állapotában is kerülhet a referenciatartományon belülre, az eredmények azonnali információval szolgálhatnak terápiás döntések meghozatalánál, jövőbeli diagnosztikai tesztek meghatározásánál és a segítenek a prognózis megállapításában (MacWilliams et al., 2002 és Johnson et al., 2000).

#### 1.2. B.) *A liquor vizsgálata*

Az agy- és gerincvelői folyadék levétele után célszerű elbírálni annak külső megjelenését is. Ügyelni kell arra is, hogy a mintákban lévő sejtek nagyon rövid idő alatt (akár 30 perc alatt is) degenerálódnak, a legérzékenyebbek a neutrofil granulociták. Ez, az alacsony fehérje koncentrációnak és a plazmától eltérő elektrolit-tartalomnak a következménye. Amennyiben a natív mintát mikroszkóp alatt is meg szeretnénk vizsgálni, akkor 8-10 csepp liquorhoz célszerű 40%-os etanolból 1 ml-t adni. (MacWilliams et al., 2002).

### 1.3. B. a) Makroszkopikus vizsgálatok

Az agy- és gerincvelői mintákon végzett vizsgálatok első lépése a fizikai paraméterek meghatározása. Az agy- és gerincvelői folyadék ezen jellemzőinek meghatározása azért fontos, mert az itt szembevető elváltozások alapján következtetni tudunk néhány a gerinccsatornában vagy a koponyaüregben zajló kóros folyamatra. A leggyakrabban vizsgált paraméterek a szín, a zavarosság, az alvadóképesség és a sűrűség.

#### *1. Szín*

Az élettani liquor-minta színét tekintve színtelennek mondható, emellett kristálytisza és áttetsző (MacWilliams et al., 2002). Az ettől eltérő megjelenést E. M. Green (1993) cikkében foglalja össze.

#### *2. Zavarosság*

A zavarosság egy 0-tól 4-ig terjedő skálán határozható meg, mely a turbiditás mértékének függvénye. A nulla a tiszta és átlátszó, míg a négyes szint a teljesen zavaros, átláthatatlan mintát jelöli (Green et al., 1993).

#### *3. Alvadóképesség*

A liquor élettani körülmények között nem alvad meg. Vérrel való kontamináció esetén vagy gyulladáshoz vezető folyamatokban ugyan alvadékony lehet, de teljes koaguláció csak nagymértékű gyulladás esetén fordulhat elő (Gaál, 1999).

#### *4. Sűrűség*

A szakirodalmi adatok szerint a liquor sűrűsége lovakban 1004-1008 g/l között változik (Green et al., 1993). Az ennél sűrűbb és a nagy viszkozitású minta általában gyulladást vagy esetleg daganatos elváltozást jelenthet (Gaál, 1999).

### 1.3. B. b) Mikroszkopikus vizsgálat

Az agy- és gerincvelői folyadék fiziológiás esetben nem tartalmazhat vörösvérsejteket, és a többi sejtalkotót is csak nagyon alacsony koncentrációban. A sejtszám meghatározására a legideálisabb a Fuchs-Rosenthal vagy a Neubauer kamra (Gaál, 1999). Külön kell számolni a fehérvérsejteket és a vörösvérsejteket. A limfociták morfológiailag hasonlítanak a vörösvérsejtekre (Di Terlizzi et al., 2009), ami nehezíti a mikroszkóp alatti elkülönítést.

A liquor vérrel való szennyezettsége jelenthet mintavétel közben bekövetkezett hibát, de jelentheti a szubarachnoidális térben vagy térbe való vérzést is.

A citológiai vizsgálatokhoz az alacsony sejtszám miatt a mintákat koncentrálni kell. Ez történhet centrifugálással, szedimentációval, filtrációval vagy citocentrifugálással (Green et al., 2003). A minták feldolgozását a lehető leggyorsabban el kell kezdeni, mert a sejtek degenerációs folyamata miatt a diagnosztikai célból levett minta értékelhetetlenné válik. A mintából, a koncentráálásuk után, egy tárgylemezen kenetet készítünk (MacWilliams et al., 2002), amihez a leggyakrabban a Wright-Giemsa, Diff-Quick vagy May-Grünwald-Giemsa féle festési eljárásokat használjuk. Különböző betegségek gyanúja esetén eltérő festési technikákat alkalmazunk (Di Terlizzi et al., 2009). Amikor a liquorban antigén jelenik meg, a sejtek reaktívvá válnak. Méretbeli változásokat figyelhetünk a sejttesten és sejtmagon is. Erősebben festődnek. A monociták a fagocitózisuk révén vörösvérsejteket is bekebelezhetnek (Mayhew et al., 1980).

Az agy- és gerincvelői folyadék fehérjetartalma a plazmából származik, mely elsődlegesen diffúzióval a vér-liquor gáton keresztül jut be. Valószínűsíthetőleg kapcsolat áll fenn a fehérje koncentrációjának változása és a központi idegrendszerben bekövetkezett elváltozások között, így a fehérjetartalom mennyiségéből következtethetünk esetleges gyulladási folyamatok vagy daganatos betegségek jelenlétére (Gaál, 1999). Eltérés mutatkozhat akkor is, ha a mintát eltérő régióból vesszük (Andrews et al., 1990).

Szakirodalmi adatok szerint az emberek és a lovak liquorjának glükóz koncentrációja a vérglükóz-tartalom 60-80%-a. Ennek a paraméternek a változása jelentős diagnosztikai értékkel bír. A glükóz szintjének csökkenése fokozott felhasználására utalhat (Gaál, 1999), míg növekedése a plazma vércukorszintjének emelkedésével hozható összefüggésbe. A liquor glükóz mennyisége a mintavételi helytől is függ, és befolyásolhatják egyéb külső tényezők is, mint például a gyógyszerek, de a hatásuk csak lassan, körülbelül 1-3 óra elteltével fog csak megjelenni (Mayhew et al., 1980).

A glükóz anaerob metabolizmusa révén tejsav képződik a szervezetben. A laktát a molekulatömegénél fogva nem képes átjutni a vér-agy gáton, de a sója már képes átdiffundálni a vér-liquor barrieren (Furr et al., 2008). A liquor és a vér tejsav koncentrációja függetlenek egymástól, ezért a tejsav koncentrációja esetleg diagnosztikai paraméterként szolgálhat a központi idegrendszert érintő betegségekben.

Élettani körülmények között a vérből enzimek nem juthatnak át a liquorba (MacWilliams et al., 2002), mégis kimutathatóak belőle bizonyos enzimek. Diagnosztikai jelentősége a kreatin kináznak (CK), a laktát dehidrogenáznak (LDH), az alkalin foszfátáznak (AP) és az aszpartát-transzamináznak (AST) van. A felsorolt enzimek közül az egyik legfontosabb a kreatin-kináz, mely katalizálja az adenzin-difoszfát átalakulását adenzin-trifoszfáttá (szükséges foszfát csoportot a keratin foszfát biztosítja). Nem specifikus enzim, de érzékeny a feltételezhetőleg a központi idegrendszerben bekövetkezett változásokra.

A liquorból kimutatható elektrolitok közül a klór, a nátrium és a magnézium szintje enyhén magasabb vagy közel azonos, míg a foszfor és a kalcium szintje alacsonyabb a plazmában mért koncentrációkhoz képest (Schwarz et al., 2006). Elektrolitok esetében a differenciál diagnózis felállításához további kiegészítő vizsgálatokra van szükség (Furr et al., 2008).

## 2. Anyag és módszertan

---

A vizsgálatok alapjául szolgáló adatokat retrospektív eset-kontroll vizsgálatok alapján gyűjtöttük 2008 és 2011 között, az egyetem akkori Nagyállat Klinikáján (2013. szeptember 1. óta Lógyógyászati Tanszék és Klinika). Az adatgyűjtés módja teljességgel megfelelt a nemzetközi és a nemzeti élelmiszerbiztonsági hivatal (NÉBIH) állategészségügyi és állatjóléti direktíváknak (engedély szám: 22.1./1606/003/2009). A Nyugat-nílusi vírus neuroinvasív esetei őszi szezonálisitást mutatnak, így a mintavétel ideje az augusztus és november közötti időintervallumot ölelte fel.

### 2.1. A vizsgálatban szereplő lovak:

A klinikára érkezett klinikai tüneteket mutató és egészséges lovakat az úgynevezett beválasztási és kizárási kritériumok szerint válogattuk ki.

#### 2.1. A.) *Beválasztási kritériumok:*

A kontroll csoportba csak egészséges, azaz idegrendszeri tüneteket nem mutató és a vizsgálat napján negatív biokémiai és szerológiai eredménnyel rendelkező, 5 évnél idősebb ló kerülhetett.

A Nyugat-nílusi vírussal fertőződött lovak csoportjába csak azon egyedek kerülhettek, melyek bizonyítottan Nyugat-nílusi vírus okozta heveny idegrendszeri tüneteket produkáltak. A nemzetközi szakirodalomban már korábban leírt tünetek a parkinsonos remegés, izomrángás, a mozgás összerendezettségének zavara, agyvelői idegek bénulása. Ezek 5 napon belül jelentkeztek. A heveny időszak kimutatására IgM ELISA tesztet alkalmaztunk, mert ezen időintervallumban emelkedett a vér IgM szintje. A vírusos fertőződés mellett szólt az is, hogy ezen egyedek a vírus terjedésének időszakában betegedtek meg.

#### 2.1. B.) *Kizárási kritériumok:*

A kontroll csoportból kizártuk mindazon lovakat, melyek bármilyen okból kifolyólag neurológiai tüneteket mutattak, Nyugat-nílusi vírus ellen vakcinázták, nem érték el a minimum korhatárt, illetve a labor eredményei eltértek a fiziológiástól (pl. aktuális betegség miatti limfocita sejt szám emelkedés). Pozitív lett az IgM ELISA tesztjük.

A Nyugat-nílusi vírussal fertőződött lovak csoportjából kizártuk azokat az egyedeket, amelyeknél több mint 5 napja jelentek meg a tünetek, negatív lett a gyors tesztjük, korábban vakcinázták őket.



## 2.2 Az egészséges és beteg lovak csoportjai

### Kontroll csoport

A csoportba két helyszínről választottuk be a lovakat. Az egyik a Nagyállat Klinika saját lovai (Dóra Major, Üllő), a másik a Készenléti Rendőrség állományába tartozó szolgálati lovak. Összesen 20 állatot válogattunk be a csoportba.

### **Klinikai lovak**

Az egyetem saját lovait a vizsgálat idejére egyedi boxállásokba helyeztük el, melyeknek alapterülete egyenként 15m<sup>2</sup>. Az állatokat ezután 12 órán át koplaltattuk és ugyanennyi időre megvontuk tőlük a folyadékot is.

### **Készenléti Rendőrség szolgálati lovai**

A lovak külső helyszínről érkeztek, ezért ebben az esetben a vizsgálat megkezdése előtt 3 napnyi úgynevezett akklimatizációs időt biztosítottunk az állatok számára, mely időszakban célja volt, hogy hozzászoktattuk őket az új környezethez. Erre az időre ezeket a lovakat is egyedi boxos állásokban helyeztük el. A hozzászoktatási idő elteltével ezektől a lovaktól is megvontuk mind a takarmányt, mind a folyadékot 12 órán át.

A csoportba bekerült lovaktól a 0. napon vettünk vért, melyet továbbküldtünk biokémiai vizsgálatra, majd elvégeztük a fizikális vizsgálatot. A következő napon történt a mintavétel. A lovakat ekkor további 2 csoportba osztottuk: 10 lónál atlanto-occipitális, míg a másik 10 ló esetén lumbosacralis mintavételt irányoztunk elő. A csoportba sorolás véletlenszerűen történt, azonban 2 esetben a tulajdonos nem járult hozzá az altatáshoz. Így végeredményben 12 esetben lumbosacralis és 8 esetben atlanto-occipitális liquorvétel történt.

### Nyugat-nílusi vírussal fertőződött lovak csoportja

Minden esetben, amikor a heveny idegrendszeri tüneteket bizonyítottan a Nyugat-níusi vírus okozta, a megbetegedés I. fázisában, amikor az alábbi tünetek 5 napon belül jelentkeztek: mozgásszervi zavarok, izomremegés és bénultság, szérumból IgM ELISA tesztet (IDEXX IgM WNV Ab Test, Hoofddorp, Hollandia) végeztünk. Ilyenkor a klinikai felvételt követő 36 órán belül megtörtént a mintavétel. A liquor lecsapolásának helyét az alapján határoztuk meg, hogy mutatott-e idegrendszeri bántalomra utaló jellegzetes tünet a ló, és ha igen, akkor az milyen típusú, azaz hogy lumbosacralis vagy agyvelői eredetű volt. A vizsgált időszakban 13 ló esetében volt bizonyított Nyugat-níusi fertőzöttség, melyből 5 ló esetében atlanto-occipitális, 6 lónál pedig lumbosacralis mintavétel történt. 2 ló mutatott masszívan

diffúz tünetek, így amellet döntöttünk, hogy mind a lumbosacralis, mind pedig az atlanto-occipitális régióból vettünk agy- és gerincvelői folyadékot a központi idegrendszer érintettségének felmérése céljából.

## 2. Táblázat: A vizsgálatban szereplő állatok adatait.

Csoport	Kor	Fajta	Nem	Mintavételi régió
<b>NyNV által fertőződöttek</b>	M: 7,53 év SD: 2,84	12 melegvérű 1 póni	9 kanc 4 herélt 0 mén	7 atlanto-occipitális 8 lumbosacralis
<b>Kontroll</b>	M: 8,94 év SD: 3,57	16 melegvérű 3 igás ló 1 telivér	10 kanca 10 herélt 0 mén	8 atlanto-occipitális 12 lumbosacralis

### 2.3. Alkalmazott mintavételi technikák

Az agy- és gerincvelői folyadékot két helyről gyűjthetjük. Az egyik az atlanto-occipitális, a másik a lumbosacralis régió. A beavatkozás előtt minden esetben elvégeztük a szemfenék és az általános neurológiai vizsgálatokat, a fokozott koponyaűri nyomás kizárása céljából. A liquor-mintavételi eljárásokat B. Schwarz és R. J. Piercy irányelvei szerint végeztük.

#### 2.3. A.) Az atlanto-occipitális mintavétel

Az atlanto-occipitális mintavételhez a lovaknál általános anesztéziát alkalmaztunk. Altatáshoz intravénásan xylazint (hatóanyag: xylazin; adagolás: 1 mg/ttkg; gyártó: Medicus Partner Kft), Alvegesic (hatóanyag: butorphanol; adagolás: 0,02 mg/ttkg; gyártó: Werfft-Pharma Kft.) és Ketanest (hatóanyag: ketamin; adagolás: 2 mg/ttkg; gyártó: Bela-pharm GmbH) használtunk. Az altatás után előkészítettük a területet a liquor vételhez. Először lemostuk 1 % betadine oldattal a felületet, majd leborotváltuk a szőrt a tarkótájék és a 3. nakesigolya között, körülbelül 20x20 cm-es felületen. Leukoplaszttal bejelöltük az anatómiai képleteket: az atlas két szárnyának carniális vonalait és a nyakszirtecsont protuberancia occipitalis externa-t. Alkohollal, majd betadine oldattal csiramentesítettük a bőrfelületet. A műveletet végrehajtó orvos eközben bemosakodott, és egy steril, egyszer használatos kesztyűt vett fel. A beavatkozás előtt egy fehér fóliát terítettünk az állat alá. A fejet a nyakcsigolyák tengelyéhez képest 90 fokban rögzítettük. A leukoplaszttal kijelölt háromszögletű terület középpontjába

egy steril legalább 10 cm hosszú egyszer 18G-s, a többi esetben 20G-s, egyszer használatos, mandrinos mintavételi tűt szűrtünk. A liquor gyűjtése nem egyszerű művelet, mivel egy apró hiba esetén vérrel kontaminálódhat a minta, aminek következtében további vizsgálatok elvégzésére alkalmatlanná válik. Az állatorvos a tűt a kijelölt területen, a képzeletbeli középvonal mentén az ajak irányába szúrta be. A szubarachnoidális teret (lovakban faj, ivar, tápláltsági állapottól függően) 5-7 cm mélyen találtuk meg, de pár centiméter megtétele után, ellenőriztük milliméterenként, hogy beléptünk-e már a szubarachnoidális részbe; a legjobb módszernek azt találtuk, hogy a mintavételi tű mandrinos részét kihúztuk, és pár pillanatig várva figyeltük, hogy csöpög-e a liquor. A percenkénti cseppszám mellett az aktuális koponyaűri nyomásról is tájékoztat minket (élettani értéke a tű vastagságának függvényében 5-20 csepp/perc (Gaál, 1999)). Az első néhány cseppet minden esetben félretettük, mert ez vérrel kontaminált lehet, és így a labor eredményeket fals irányba tolhatja el. A megfelelő biokémiai vizsgálatokhoz körülbelül 2-3 ml-nyi minta elégséges, melyet steril, előre felcímkézett mintavételi csőbe gyűjtöttük, melyet az egyetemi laborba küldtünk elemzésre. Az ébredés már az ébresztő boxban történt. Ébresztésnél és felállításkor, szaksegédek segítségére, csak a központi idegrendszeri tüneteket mutató lovaknál volt szükség.

Az altatás előtt a tulajdonosokat tájékoztattuk arról, hogy a bódítás a neurológiai tüneteket mutató lovak esetében veszélyesebb, de szükségszerű, és nem feltétlenül halálos kimenetelű.



**4. Kép: Generál anesztéziában lévő ló atlanto-occipitális mintavétele**

### 2.3. B.) A lumbosacralis mintavétel

Lumbosacralis punkcióval is nyerhető diagnosztikai célokra gerincvelői folyadék, sőt ezt álló helyzetben is elvégezhetjük, és biztonságosabb is a nyaki szakaszon történő liquorvételezést képest. A mintát kalodában rögzített állatból nyertük. Mivel invazív eljárásról van szó, ezért először szedálnunk kellett a lovakat intravénásan Xylazin (hatóanyag: xylazin; adagolás: 0,3-1,4 mg/ttkg; gyártó: Medicus Partner Kft) és Alvegesic (hatóanyag: butorphanol; adagolás: 0,02 mg/ttkg; gyártó: Werfft-Pharma Kft.) kombinációjával, majd lokálanesztéziát alkalmaztunk, amihez lidocaint használtunk. A punkció helye az utolsó lumbális és első sacrális csigolya között lelhető fel, melyeket az atlanto-occipitalis punkcióhoz hasonlóan, leukoplasztal jelöltük meg. A bódítás és az infiltrációs érzéstelenítés után előkészítettük, azaz lemostuk 1%-os betadine oldattal a bőrfelületet, majd leborotváltuk a szőrt. Ezután a csapolási területet először alkohollal, majd betadine-nal is lemostuk. A csírátlantás után a beavatkozást végző orvos steril kesztyűben egy egyszer használatos 18G-s liquorvételi tűvel a csigolyák tengelyére merőlegesen, lefelé szúrta. A behatolási mélység itt is több tényező függvénye, de 10 cm után érdemes pár milliméterenként ellenőrizni, hogy elértük-e a liquort. A szűrés könnyen elvégezhető, egészen a dura materig, ahol az érzéstelenítés dacára, esetleg fájdalmat indukálhatunk. A mandrint eltávolítva, egy steril fecskendőbe 5-15 ml liquor-t szívunk ki, ügyelve arra, hogy az első fél-1 ml-nyi folyadékot itt is félretegyük a kontamináció lehetősége miatt. Amennyiben nem volt megfelelő a CSF folyási sebessége, akkor leszorítottuk 10-12 másodperc erejéig a v. jugularist, mert így növelni tudtuk a folyási sebességet (Queckenstedt-féle jelenség). A mintavétel után a felületet steril kötéssel lezártuk.



5. Kép: Kalodában rögzített ló lumbosacralis liquor-mintavétele

Annak eldöntésére, hogy melyik módszert használtuk a központi idegrendszer érintettsége játszott a döntő szerepet. Az esetek többségében a lumbosacralis punkció mellett döntöttünk, mert a valószínűsíthetőleg károsodott idegrendszer esetén a használt altatószerek mellékhatásai miatt, mint a koponyaúri nyomás fokozása, a már kialakult kórképet tovább súlyosbítottuk volna. Ennek ellenére két heveny masszívan diffúz idegrendszeri tüneteket mutató ló esetében kellett amellet döntöttünk, hogy atlanto-occipitalis és lumbosacralis mintát is veszünk.

#### 2.4. A liquor-minta elemzése

A gerincvelői folyadék levétele után először egy fehér papír előtt makroszkóposan is megvizsgáltuk azok színét és tisztaságát. A citológiai vizsgálathoz is levett agy- és gerincvelői folyadékot a mintavételtől számított 6 órán belül centrifugáltuk és Wright-Giemsa festéssel megfestettük. A citológiai leleteket Dr. Balogh Nándor Dipl. ECVCP bírálta el. Az ultraszenzitív liquor fehérjetartalom meghatározására spektrofotométert (Olympus AU400, Beckman Coulter, Hamburg) használtunk. A biokémiai paraméterek mérésére, úgy mint az aszpartát-aminotranszferáz (AST), az alkalikus foszfatáz (ALP), a glükóz, a laktát, az urea, a kreatin-kináz (CK), a laktát dehidrogenáz (LDH), a nátrium, a kálium, a kalcium, a kloridion, az anorganikus foszfát és a magnézium az Olympus AU640 kémiai analizátort vettük igénybe. Sűrűségre vonatkozó vizsgálatokat nem végeztünk, mert bár élettani értéke meghatározott: 1004-1006 g/l, de sem a hazai, sem pedig a külföldi szakirodalom nem fogadja el teljes mértékben a diagnosztikai relevanciáját.

#### 2.5. A vírus genetikai vonalának meghatározása

Minden elpusztult ló esetében a központi idegrendszerből több helyről vettünk mintát PCR vizsgálatokra és vírusizolálásra. A PCR vizsgálatokat és a vírusizolálást a korábban már, Kutasi et al. (2011) által, ismertetett módon történt.

## Eredmények

---

Mind a 35 ló esetében, függetlenül attól, hogy egészséges vagy beteg volt-e az egyed, a liquor-mintavétel komplikáció mentesen zajlott. A kontroll csoportban résztvevő egészséges lovaknál sem az altatás alatt, sem pedig az ébredési fázisban nem jelentkeztek komplikációk. A 15 Nyugat-nílusi vírussal fertőződött ló közül már a kezelések megkezdése előtt 2 esetben döntött a kezelő orvos eutanázia mellett a mintavételi procedúra után a kiterjedt és visszafordíthatatlan idegrendszeri károsodás következtében. A többi 13 beteg közül 7 ló élte túl a neuroinvaszív betegséget, és ebből 2 ló teljesen felépült, 5 esetben azonban idegrendszeri maradványtünetek maradtak vissza. A másik 6 egyed esetben 3-at a mintavétel után a kezelések megkezdése után nem sokkal, 3-at pedig a kezelések közben kellett eutanáziában részesíteni. Az elpusztult állatokból vett PCR minták eredménye alapján minden esetben a Nyugat-nílusi vírus 2-es genetikai vonalát lehetett kimutatni.

A liquor mintákat minden esetben a korábban már leírt módon mind makroszkópiusan mind pedig mikroszkópiusan is elbíráltuk. A makroszkópius vizsgálatok során a kontroll csoport állományába tartozó lovaknál a minta víztiszta és átlátszó volt, zavarosságot nem észleltünk. A vírussal fertőződött lovaknál 9 esetben ugyanerre a megállapításra jutottunk, míg a másik 9 esetben ugyan enyhén, de homályosnak ítéltük a mintát.

A citológiai vizsgálatok során az egészséges lovak mintáiban, hasonlóan a nemzetközi standardhez, kizárólagosan kis és nagy mononukleáris (limfocita és monocita) sejteket találtunk. A fertőződött lovak csoportjában viszont nem volt ennyire homogén a lelet. Az agy- és gerincvelői folyadék vizsgálata során 3 esetben megegyezett a lelet a kontroll csoportéval, és az esetek 4/15 részében mononukleáris, 8/15 részében pedig neutrofil pleocitózisra utaltak a látottak.

A neuroinvaszív betegséggel kezelt egyedeknél a legtöbb adat alapján azt figyeltük meg, hogy azok nem mutattak normál eloszlást, ezért a kontroll csoport eredményeinek t-teszt alapú összehasonlítása a másik csoport eredményeivel nem volt megoldható. Ehelyett inkább egy lehetséges referenciatartományt választottunk (95%-os becslési intervallum) a kontroll csoport alapjául és összeszámoltuk azokat az eseteket, amelyek a referenciatartományon kívülre estek.

### **3. Táblázat: A kapott eredményeink összefoglalása.**

	<b>Gyullad- ásos fehérjék</b>	<b>Albu- min</b>	<b>Teljes fehérjé mg/l</b>	<b>AST IU/l</b>	<b>ALP IU/l</b>	<b>GGT IU/l</b>	<b>Glükóz mmol/l</b>	<b>Laktát mmol/l</b>	<b>CK IU/l</b>	<b>LDH IU/l</b>	<b>Urea mmol/l</b>	<b>Na mmol/l</b>	<b>K mmol/l</b>	<b>Ca mmol/l</b>	<b>Cl mmo- l/l</b>	<b>P mmol/l</b>	<b>Mg mmol/l</b>
<b>Kontroll referencia</b>	0,0-0,56	0,1-0,5	32,16-75,55	6,0-14,0	0,1-3,5	0,0-4,0	2,54-3,81	1,89-3,07	0,0-4,6	14,7-44,1	4,6-8,8	140,0-151,8	2,8-3,1	1,13-1,41	113-128,2	0,02-0,38	0,53-1,34
<b>Normál értékekkel rendelkező lovak</b>	4	3	6	6	1	12	6	3	5	6	9	8	11	6	7	9	7
<b>Abnormális értékekkel rendelkező lovak</b>	8	9	7	6	11	0	6	7	7	6	3	4	1	0	5	3	5
<b>Nyugat-nílusi vírussal fertőződött lovak átlaga</b>	0,59	0,11	98,36	12,85	8,16	1,10	3,89	3,81	20,07	46,57	4,80	136,96	2,92	1,24	120,53	0,43	1,15
<b>SD</b>	0,32	0,10	54,76	5,45	4,80	0,93	1,54	1,88	24,32	31,20	1,61	40,25	0,85	0,51	36,22	0,24	0,55
<b>Kontroll csoport lovaknak átlaga</b>	0,27	0,26	50,32	9,9235	1,9	1,62	2,98	2,45	2,17	29,49	6,73	145,08	2,95	1,26	121,575	0,3095	0,89
<b>SD</b>	0,15	0,12	11,85	2,22	1,01	1,65	0,32	0,30	1,46	13,02	1,29	3,10	0,08	0,07	3,49	0,24	0,19
<b>Egyéb referencia érték</b>			5-100 <sup>(M)</sup> 20-124(A) 20-80(W)	15-50(M) 0-16(A) 7-24(W)			1,67-3,89(M, W) vérglükó- z 30-70%-a(A)	1,92-2,3(A)	0-8(AW, M)	0-8(MA)		140-150(M, W)	2,5-3,5(M, W)		95-123(MW)		

A tanulmányunk alapjául a liquorban mért változók szolgáltak, amelyek vizsgálata révén arra voltunk kíváncsiak, mennyire lehetnek jó kórjelzők ezen paraméterek a betegség kimenetele tekintetében.

A legfigyelemreméltóbb paraméternek a glükózt találtuk, mert a vírussal fertőződött csoportján belül az a 6 ló, amelyeknek magas volt a glükóz szintje, nem élte túl a betegséget (0/6,  $\leq 0.36$ , módosított Wald módszer 90%-os konfidencia intervallummal), viszont azok az egyedek, amelyeknek a glükóz szintje referenciaértéken belül volt (6/6,  $\geq 0.64$ , módosított Wald módszer 90%-os konfidencia intervallummal), túléltek. A glükóz szint függvényében felállított kórjóslatot a Fisher-féle egzakt próba alapján igazoltuk (két-irányú t-próba,  $p=0.0022$ ).

A mért adatok azonban azt is mutatták, hogy az agy- és gerincvelői folyadék mintáiban a neutrofil pleocitózis szignifikáns összefüggést mutatott a magas összfehérje szinttel (Fisher-féle egzakt teszt, két-irányú t-próba,  $p = 0.1026$ ).

A Nyugat-nílusi vírussal fertőződött csoportban két ló esetben, ahol a diffúz idegrendszeri tünetek miatt az atlanto-occipitális és lumbosacralis régióból is kellett vennünk mintát, az eredmények eltértek a mintavételi-helytől függően. Egy esetben az atlanto-occipitális helyről vett mintánál negatív lett a citológiai eredmény, pedig ugyanannál a lónál a lumbosacralis punkció esetében limfocitás pleocitózist találtunk, magas összfehérje, glükóz és tejsav szinttel együtt. A másik ló esetében az atlanto-occipitális punkció révén nyert minta az előző egyeddel szemben citológiailag pozitív eredményt adott, neutrofil pleocitózist mutattunk ki. A lumbosacralis régióból vett mintában a limfociták aránya volt magasabb a neutrofilokéhoz képest. Az agy- és gerincvelői folyadékmintában magas volt a fehérje koncentráció, a keratin-kináz, az LDH és az AST értéke. A glükóz szint hasonló volt mindkét régióból vett liquor-mintában. A masszívan diffúz idegrendszeri tüneteket mutató lovak egyike sem élte túl a betegséget.



## Megbeszélés

---

Tanulmányunk hiánypótló jellegű: először írtuk le lovakban a Nyugat-nílusi vírus lineage 2 vírustörzs által okozott neuroinvaszív megbetegedések következtében megváltozott liquor-paramétereket. A szakirodalomban összesen egy közlemény foglalkozik a lovak agy- és gerincvelői folyadékában kialakult elváltozásokkal, de az említett tanulmány egy lineage 1-es kitörés során készült.

Fontosnak tartom megemlíteni, hogy a tanulmányomnak vannak korlátai. Ezek többek között az alacsony mintaszám, de ez gyakori problémának számít más lovakkal foglalkozó tanulmányokban is, különösképpen, ha a vizsgálat, mint például a liquor-minta vétel, invazív beavatkozást igényel. Emellett nem tudtunk minden esetben mind a két régióban punkciót venni, mert a mintavételi eljárás egyrészt a klinikai tünetek függvényében történik, de befolyásolja az is, hogy mennyire magas a rizikója a beavatkozásnak, és nem utolsósorban a tulajdonos beleegyezése is szükséges. A tanulmányunk másik hiányossága, hogy a biokémiai és hematológiai paraméterek párhuzamos értékelése további információkat szolgáltatott volna, abból a szempontból, hogy a CSF paraméter eltérései a vér-agy gát sérülése következtében vagy pedig a központi idegrendszer sejtjeinek változásai miatt következtek be. A beteg lovak esetében azonban a vérvételek már a betegfelvétel során azonnal megtörténtek.

A kontroll csoportunk referencia értékei nagyrészt megfeleltek a Mayhew et al. (1980), Andrews et al. (1990) és MacWilliams et al. (2002) munkáiban leírt referencia tartományoknak, azonban két értékben eltérnek

Az általunk felállított kontroll csoportban mért laktát és az LDH koncentrációja magasabb volt, a mások által megállapított referencia értéknél. Ezek az eltérések feltehetően az alkalmazott eltérő laboratóriumi vizsgálati módszer miatt alakulhattak ki. A kontroll csoport felállítására azért volt szükség, mert a liquor paraméterek vizsgálata során alkalmazott laboratóriumi módszerek érzékenysége eltérhet másokétól és ezért a nemzetközi szakirodalom minden laboratórium esetén saját referenciatartomány felállítását javasolja (Vernau et al., 2008).

Korábban a humán orvosi szakirodalomban megjelent tanulmány szerint a Nyugat-nílusi vírus okozta neuroinvaszív betegségekben szenvedő betegek agy- és gerincvelői folyadékból vett minták nem specifikusak, bennük neutrofil vagy limfociták predominanciát mutató pleocitózist mutattak ki, amihez még magas fehérje szint és fiziológiás glükóz szint társult (Tyler et al, 2006). A saját liquor-mintáink révén is nagyon hasonló eredményekre

jutottunk, kivéve azt a tényt, hogy mi magas glükóz szinteket mértünk azon egyedekben, amelyek nem éltek túl a fertőzést.

Érdekes, hogy abban az egy tanulmányban, amely során lovakban értékelték az agy- és gerincvelői folyadékot, legtöbbször limfociták predominanciával rendelkező mononukleáris pleocitózist találtak neutrofilok jelenlétét nem írták le (Wamsley et al., 2002). Ez ellentétben áll a mi eredményeinkkel, mert mi mind a kéttípusú pleocitózist meg tudtuk figyelni. Lehetséges, hogy az eltérés oka az, hogy a mi esetünkben a lovak a 2-es genetikai vonallal fertőződtek, a fentebb említett szerzők által feldolgozott estekben pedig a vizsgált lovaknál az 1-es genetikai vonalat mutatták ki. Ennél valószínűbb, hogy a korábbi lovas és a jelen tanulmány eredményei közötti eltérés oka másban rejlik. Erre utal, hogy emberi megbetegedések során végzett agy- és gerincvelői folyadék minták vizsgálatai során szintén változatos citológiai eredményeket kaptak. Néhány tanulmányban a betegek vizsgálata során nem a vírusos meningo-encephalitisre jellemző és az oly gyakran emlegetett mononukleáris pleocitózist találták, hanem neutrofilát (Rawal et al., 2006; Tyler et al. 2006, Crichlow et al., 2004). Egerekben mért eredmények azt mutatják, hogy az első időszakban a neutrofil granulociták az uralkodók az immunsejtek között, és hogy ezek érnek elsők és a leggyorsabban a szervezet Nyugat-nílusi vírussal fertőződött területére (Lim et al, 2011). Rawal és munkatársai (2006) szerint, az összes fehérvérsejt számának átlaga és a neutrofil granulociták számának átlaga magasabb volt azon betegek agy- és gerincvelői folyadék-mintáiban, akiknél a liquor a betegség első három napjában vették le, mint azoknál, akiknél ez több mint 3 nappal a klinikai tünetek jelentkezése után történt. Feltételezhetjük, hogy a mintavétel ideje igenis okozhat eltérést a leletek egyes változóiban. A klinikára érkezett lovak többségében sikerült a megbetegedés korai szakaszában, azaz a tünetek megjelenésétől számított 5 napon belül, mintát venni. A neutrofil sejtek a veleszületett immunrendszer védekező mechanizmusának effektor sejtjei, amely a szervezetet ért külső behatások hatására mindig azonnal és ugyanúgy reagálnak. Az effektor funkciói a kórokozóra nézve nem fajlagosak. (Erdei et al., 2000). A különböző citológiai eredményeket vizsgálva más tanulmányok szerzői viszont azt találták, hogy a Nyugat-nílusi vírussal fertőződött idősebb emberek liquorjában sokkal nagyobb valószínűséggel mutathatóak ki neutrofil granulociták, mint a fiatalabb korosztály esetében (Jordan et al., 2012). Az általunk vizsgált lovak közül azon egyedek átlag életkora, amelyekben magas volt a neutrofil granulociták száma, 8 év volt (4-13 éves), amelyekben viszont limfociták mononukleáris pleocitózist tapasztaltunk, azok átlag életkora 6,6 év volt (4-9 éves). Bár nálunk is a némileg idősebb korosztálynál volt gyakrabban neutrofilia, ennek jelentősége az alacsony mintaelem-szám miatt mégis

megkérdőjelezhető. Feltételezhető, hogy inkább a fertőződés stádiuma és az immunrendszer állapota vagy bizonyos genetikai tulajdonságok állnak a mért adatok háttérben, mintsem a kor szerinti eloszlás. Valószínűleg kulcsszerepet játszanak a neutrofilok, hiszen ezen sejtek száma nagymértékben nő a szervezetnek a gyulladásra adott válaszreakciójában, és az agyat károsító folyamatokban (Fraisier, 2014). Feltehetőleg a vírusos fertőződés szintje és a limfocita sejtek beszűrődése a központi idegrendszerben korrelál az idegsejt pusztulással, azonban azt már nehéz eldönteni, hogy a vírus vagy a gyulladást okozó sejtek okozzák a neuronok sérülését és a motoros idegsejtek diszfunkcióit (Shrestha et al., 2003). A neutrofilok szerepére utal az a megfigyelésünk is, hogy a liquor-mintáinkban észlelt neutrofilia sokkal nagyobb valószínűséggel fordul elő magas fehérje koncentrációval párhuzamosan. Az albumin szint alacsony volt a legtöbb esetben, az összfehérje szint pedig megemelkedett, ezzel közvetve bizonyítva a gyulladást okozó proteinek mennyiségének növekedését.

Néhány korábbi adattal szemben, mi normál vagy magas glükóz szintet mértünk a liquor-mintákban, hasonlóan egy korábbi humán orvosi tanulmányhoz (Rawal et al., 2006). A glükóz a laktáttal szemben szabadon diffundál az agy- gerincvelői folyadékba. Az agy- és gerincvelői folyadék glükóz szintje összefügg a vér glükóz szintjével (ez a vér glükóz 60-80%-át is jelentheti), ami emelkedhet a súlyos betegség okozta stressz velejárójaként (Andrews et al., 1990; Seehusen et al., 2003). Mind a humán, mind pedig az állatorvosi tanulmányok arra engednek következtetni, hogy a stressz indukálta hyperglycaemia (a vér emelkedett glükóz szintje) összefüggésbe hozható az elhalálozás esélyének növekedésével (Guo et al. 2014; Capes et al. 2001).

A legtöbb esetben emelkedett tejsav szinteket mértünk, valamint ugyancsak emelkedett LDH szinteket a Nyugat-nílusi vírussal fertőződött lovak csoportjának a felében. Természetesen L-laktát képződik az élettani anaerob folyamatokban a glükóz piruváttá történő átalakulása révén az LDH működésén keresztül (Irani, 2009). Főleg az agy- és gerincvelői folyadék tejsav szintje tükrözi az agyi tevékenységek mértékét, de emelkedett lehet alacsony glükóz szintek mellett is, hiszen ezen esetekben az energiatermelő rendszerek anaerob módon próbálják fedezni a szükségleteket (Irani, 2009). Hypoglycaemiás (alacsony glükóz szint a vérben) esetekkel nem találkoztunk a mintavételünk során. Ezen kívül a liquor laktát koncentrációja emelkedhet a központi idegrendszer bakteriális fertőződése esetén is (Schwarz et al., 2006). Másrészt az agy- és gerincvelői folyadékban tejsavsint emelkedést tapasztalunk olyan esetekben, ahol az agy oxigénellátottsága csökken és/vagy növekszik a koponyaűri nyomás. A központi idegrendszer szöveteiben kialakult hypoxia (a vér alacsony

O<sub>2</sub> szintje) a Nyugat-nílusi vírussal fertőződött egyedekben másodlagosan kialakult gyulladási folyamatok kísérőjelensége lehet.

A legtöbb enzim nagyméretű molekula, és csak a nagyon kis molekula tömegű anyagok juthatnak át diffúzióval az ép és fiziológiás vér-agygáton. Mivel a Nyugat-nílusi vírussal való fertőzés esetén nem jellemző a vér-agy gát kiterjedt sérülése, így valószínű, hogy az emelkedett koncentrációjú enzimek nem a vérből, hanem a központi idegrendszer sérülései nyomán kerülnek a liquorba (Furr, 2008). Az emelkedett enzim aktivitás potenciális forrása lehet a Nyugat-nílusi vírussal fertőződött lovak esetében az, hogy vagy a gyulladási folyamatok révén ezen enzimek kiszabadulnak a gyulladást mediáló sejtekből, vagy egyenesen a károsodott idegsejtekből illetve a myelin hüvelyből származnak. Nemrégiben kimutatták, hogy a Nyugat-nílusi vírus indukálja egyes interleukinok (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) és a tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) genetikai kifejeződést az idegsejteken, mely neuronok feltételezhetőleg az egyik forrásai az itt megjelenő proinflammatorikus citokineknek (a gyulladást elősegítő kisméretű fehérjemolekula). Ezen gyulladási mediátorok a Nyugat-nílusi vírus okozta neurotoxikózishoz, sejthalálhoz és a központi idegrendszer szöveteinek a károsodásához vezethetnek (Lim et al., 2011).

A korábbi szövettani vizsgálatok alapján azt mondhatjuk, hogy a vírus okozta agyvelőgyulladás esetében, beleértve a perivaszkuláris gyulladásokat, mikrogliaesetes gyulladásokat, változatos nekrosisokat és az idegsejt vesztést is, sokkal valószínűbb, hogy az idegsejt sérülése és nem a vér-agy gát károsodása vagy a vérliquor-gát sérülése az oka az emelkedett enzimszintnek az agy- és gerincvelői folyadékban.

A legmegbízhatóbb emelkedést az alkalikus foszfatáz enzim értékei mutatták. A klinikai tüneteket nem mutató betegek agy- és gerincvelői folyadékában nincs, vagy csak alig mérhető az ALP aktivitás, ami miatt az nem mutatható ki (McComb et al., 1979). Ezt a mi kontroll csoport méréseink is igazolták. A korábbi humán tanulmány szerint az agyhártyagyulladásos vagy egyéb idegrendszeri problémákkal rendelkező beteg liquorjának ALP aktivitása együtt változott a polimorfonukleáris sejtek és a gyulladási fehérjék szintjének növekedésével. (McComb et al., 1979). Nem tudtuk bizonyítani az egyértelmű kapcsolatot a neutrofilok száma, a fehérje szintek és az alkalikus foszfatáz szintjei között. Ennek az oka valószínűleg a kevés mintaszám miatt keresendő.

A nemzetközi szakirodalomban meglehetősen kevés információ található a liquor fiziológiás karbamid szintjeiről, habár emelkedése kórjelző lehetne az uraemiás encephalopátiákban. Mivel a karbamid könnyen diffundáló anyag, a liquorban és a szérumban közel azonosnak kellene lennie a karbamid szinteknek (Irani, 2009). Mi ugyanakkor néhány

Nyugat-nílusi fertőzés következtében megbetegedett ló esetében alacsony karbamid szintet tapasztaltunk. Mivel a karbamid szabadon diffundál a vér-agy gáton át, azt feltételezzük, hogy párhuzamosan a vérben is alacsony a szintje. Ennek pontos elemzése csak a liquorvétellel egyidejűleg történő vérvétel során lenne lehetséges. Az alacsony karbamid csökkent májfunkcióra utal. A máj és más parenchymás szervek is érintettek az emberi Nyugat-nílusi vírus okozta megbetegedések során, hiszen a vírus szórványos és göcos nekrozist okozhat a hepatocitákban, ami gyulladást indukál. A máj működése az általános gyulladáshoz hasonlóan a következtében szintén csökkent lehet, a májsejtek nekrozisát kísérő neutrofil infiltráció miatt (Paddock et al., 2006).

A liquor elektrolit összetételéről csak kevés adatunk van, de általában a liquor-mintáinkban a nátrium és a kloridion hasonló vagy enyhén magasabb, a kálium koncentrációja azonos vagy csak kicsit kisebb és végül a magnézium szintje enyhén emelkedett a szérumból mért azonos paraméterekkel összehasonlítva (Mayhew et al. 1980, Mac Williems et al. 2002). A kontroll csoportunkban felállított referencia értékek megegyeztek a fentebb említett szerzők publikációiban leírt adatokkal. Néhány Nyugat-nílusi vírussal fertőződött lóban alacsony nátrium és emelkedett magnézium szinteket mértünk. Az elektrolit-tartalomban bekövetkezett abnormalitások hátterében feltételezhetőleg a központi idegrendszer sejtjeinek károsodása állhat, aminek következtében a sejt intracelluláris teréből kiszivárognak az oldott sók. Fokozódik a membránok átteresztőképessége és változás következik be az elektrolit-összetételben is: csökken a nátrium és nő a magnézium szint. Élettanilag is elfogadott a foszfor jelenléte az agy- és gerincvelői folyadékban, ami a szérumban fellelhető mennyiség 50-60%-a volt. Korábban már megfigyelték, hogy a liquor foszfor koncentrációjának emelkedése egyenes arányban áll a liquor összfehérje szintjével (Irani, 2009). Habár 3 esetben mértünk emelkedett foszfor szintet, de hasonló összefüggést nem tudtunk megfigyelni.

Két esetben volt lehetőségünk egy lovon belül mind a két mintavételi helyen liquort gyűjteni, és ennek kapcsán eltérő eredményekhez jutottunk. Ez lehet a központi idegrendszer eltérő érintettségének a következménye is, hiszen a súlyos elváltozások eltérő helyeződésének függvényében nagy eltéréseket tapasztalhatunk a különböző punkciós helyen vett mintákban. Habár a Nyugat-nílusi vírus egyidejűleg megjelenhet az agy- és a gerincvelő több területén és az érintett területeken korbonctani elváltozások is megfigyelhetők, de az adott régióban észlelt elváltozások mértéke változó lehet. Ezeket a különböző súlyosságú elváltozásokat a klinikai kép is gyakran tükrözi. Másrészt a lumbosacralis és az atlanto-occipitais minták egyes értékei eltérhetnek a mintavételi helytől függően egészséges lovakban is. Mayhew a glükóz, Andrews pedig a tejsav, az AST és az összfehérje koncentrációt vizsgálta külön. Az eddigi

megfigyelések szerint a különbségek a vér-liquor gát eltérő átteresztőképességének és az atlanto-occipitális és lumbosacralis régió között cranio-caudalis irányban áramló liquor átáramlási sebességének is a függvénye (Vernau et al., 2008).

Vizsgálatunk eredményeit felhasználhatjuk az elkülönítő kórjelzés felállításánál. Lovak herpeszvírus okozta agy- és gerincvelői folyadék esetén a liquor gyakran xanthochromiás, benne emelkedett a fehérje szint és nem jellemző a gyulladáshoz sejtek megjelenése (Pusterla et al., 2009). Más vírusos megbetegedések lovak esetében Európában ritkán fordulnak elő. Az amerikai kontinensen előforduló nyugati és keleti lóencephalitis esetén a liquorban limfociták pleocitózist tapasztalunk normális glükóz szinttel és enyhén emelkedett fehérje koncentrációval (Chaudhuri et al., 2002).

Az agy- és gerincvelői folyadék elemzése révén pontosabb képet kaphatunk a központi idegrendszerben zajló kóros folyamatokról és ez gyakran tájékoztat minket a betegség súlyosságáról is. A központi idegrendszer változatos betegségei során, hasonlóan a teljes vérképhez, a liquor elemzése révén is észrevehetjük a legkisebb elváltozásokat is, de ezek az eltérések az esetek többségében nem specifikusak, nem kórjelző értékűek. A Nyugat-nílusi vírus okozta neuroinvaszív megbetegedés esetén az agy- és gerincvelői folyadékból nyert minták nem specifikusak, változatoság jellemzi őket, és az eredmények a beteg állat korától, a mintavétel helyétől, és az itt kialakult elváltozások milyenségétől, a mintavétel technikájától és annak idejétől is függenek. A neutrofil granulociták valószínűsíthetőleg szerepet játszanak a gyulladáshoz folyamatok kifejlődésében és az agyat károsító folyamatok súlyosságában is, de további vizsgálatokra lenne szükség, hogy tisztázhassuk a Nyugat-nílusi vírus okozta neuroinvaszív megbetegedésekben játszott pontos szerepüket. A megnövekedett enzim szintek és a liquor elektrolit-háztartásában bekövetkezett változások hasznos információt szolgáltathatnak a központi idegrendszer sejtjei sérülésének mértékéről, mivel az vér-agy gát a kóros folyamatok alapján kevésbé károsodik. További vizsgálatok szükségesek arra vonatkozólag, hogy bizonyíthatassuk az összefüggéseket a gyulladáshoz, a központi idegrendszer károsodásához és a liquor-paraméterekben bekövetkezett változások között. Habár az emelkedett glükóz szintek megbízhatóan jósolják a kórlefordulás végkimenetelét, ezek az értékek másodlagosan, az emelkedett plazmaszintek következményeként alakulhatnak ki, és sokkal inkább a súlyos betegség okán kialakult általános stressz állapotokat tükrözik, mintsem a központi idegrendszer kóros állapotát. Összességében elmondhatjuk, hogy a liquor-vizsgálatok akkor a leghasznosabbak, ha az eredmények korrelálnak a klinikai leletekkel és a további kiegészítő laborvizsgálatok eredményeivel.

## Összefoglalás

---

A Nyugat-nílusi vírus (NyNV) szúnyogok által terjesztett zoonotikus arbovírus, természetes ciklusa a vadmadarak és szúnyogok között zajlik. Az emberek és lovak esetlegesen fertőződnek, ám ez zsákutca a vírus számára, mivel ezen fajokban tapasztalható enyhe fokú virémiás szak nem teszi lehetővé a terjedést. Mindezek ellenére a fertőzés bennük súlyos központi idegrendszeri (KIR) problémákat okozhat. A vírus okozta KIR károsodások, az agy- és gerincvelői folyadék (AGF) közvetlen kapcsolata következtében, elváltozásokat idézhetnek elő a liquorban, mely változások jellemzése elősegíti a kórjelzést és segíti a KIR-t érintő neurodegeneratív betegségek sokféleségének jobb megértését. A tanulmány célja a NyNV által a liquorban okozott elváltozások jellemzése.

15 AGF-mintát gyűjtöttünk heveny idegrendszeri tüneteket mutató lovakból. A tünetek NyNV eredetét a betegségre jellemző szezonális és a lovak vérsavójából végzett pozitív IgM ELISA teszt alapján határoztuk meg. Ezen kívül még 20 egészséges, idegrendszeri tünetet nem mutató, a vírus ellen IgM ellenanyagot nem termelő ló AGF-mintáját használtuk kontrollként. A liquor-minták biokémiai és citológiai paramétereit megvizsgáltuk, és összehasonlítottuk.

A vírus által fertőződött lovakból nyert adatok többségénél azt tapasztaltuk, hogy azok nem a normális eloszlást követték. A beteg állatok mintáinak jelentős részében a fehérje, kreatin kináz, aszpartát aminotranszferáz, laktát dehidrogenáz, alkalikus foszfatáz, magnézium, glükóz és a tejsav abnormális szinteket mutatott. Szignifikáns összefüggést találtunk az AGF magas glükóz szintje és a betegség következtében történő elhullások között ( $\leq 0,36$  modifikált Wald módszer 90%-os KI). A témában korábban megjelent egyetlen tanulmánnyal ellentétben mi az esetek 54%-ban neutrofil pleocitózist találtunk. Adataink alapján a liquorban a neutrofilok magas aránya jelentős összefüggést mutatott a magasabb fehérje szinttel (Fischer egzakt teszt, kétirányú t-próba,  $p=0,1026$ ).

A NyNV okozta neuroinvasív megbetegedés esetén az AGF leletek önmagukban nem kórjelző értékűek. A magasabb gyulladásoz fehérje szint alapján feltételezhető, hogy a neutrofil granulociták fontos szerepet játszanak az agyat károsító gyulladásoz folyamatok kialakulásában. Az emelkedett enzim szintet inkább a neurotrop vírus kiváltott KIR sejtek károsodása okozta, mintsem a vér-agy gát átteresztőképességének növekedése. Az AGF-ben mért emelkedett glükóz szint alapján a rossz kórjóslat valószínűsíthető, de a magas glükóz ebben az esetben feltételezhetően csak a magas szérum glükóz szint következménye. Eredményeink elősegítik a vírus által a KIR-ben kiváltott kórfolyamat pontosabb megértését és a kórjóslat megítélését.

## Summery

---

West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne zoonotic arbovirus transmitted in natural cycles between mosquitoes and wild birds. Horses and humans are incidental, dead-end hosts, but can develop severe neurological disorders. By its close contact with the extracellular fluid of the brain, analysis of cerebrospinal fluid (CSF) composition can reflect biological central nervous system (CNS) impairments enabling the diagnosis and understanding of various neurodegenerative CNS disorders.

Fifteen CSF samples were collected from horses with acute neurologic symptoms and positive WNV IgM ELISA on their sera. CSF samples of twenty healthy horses without any neurologic disease were used as controls. Biochemical and cytological parameters were evaluated and compared.

Most of the data obtained from the WNV affected horses did not seem to follow a normal distribution, but protein, creatine-kinase, aspartate-aminotransferase, lactate-dehydrogenase, alkaline-phosphatase, magnesium, glucose, and lactate showed abnormal levels in a number of cases. None of the 6 horses with elevated glucose levels survived ( $\leq 0.36$ , modified Wald method with 90% CI). Opposite to previous equine studies we have found neutrophilic pleocytosis in 54% of cases. Measured data also indicates that CSF neutrophilia is more likely to be found parallel with high protein content (Fisher exact test, two tailed,  $p = 0.1026$ ). The CSF findings with WNV neuroinvasive disease are nonspecific and variable. Neutrophils are likely play a role in the development of inflammatory response and brain damage. Increased enzyme levels reflect rather CNS injury than blood-brain barrier damage. Elevated glucose levels might be secondary to increased plasma levels and predict outcome.



## Hivatkozások jegyzéke

---

- 1 A fertőző betegségek lefolyása. In: Varga J., Tuboly S., Mészáros J.: A háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II.), *Mezőgazda Kiadó* Budapest (1999) pp. 22-24.
- 2 Andrews F. M., Matthews H. K., Reed S. M.: The ancillary techniques and tests for diagnosing equine neurologic disease. *Veterinary medicine* (1990) vol. 85, pp. 1325-1330.
- 3 Cantile C., Del Piero F., Di Guardo G., Arispici M.: Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses. *Veterinary Pathology* (2001) vol. 38, pp. 414-421.
- 4 Capes S. E., Hunt D., Malmberg K., Pathak P., Gerstein H. C.: Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* (2001) vol. 32, no. 10, pp 2426-2432.
- 5 Castillo-Olivares J., Wood J.: West Nile virus infection of horses. *Veterinary Research* (2004) vol. 35, no. 4, pp. 467–483.
- 6 Centers for Disease Control and Prevention,  
<http://www.cdc.gov/westnile/healthcareproviders/healthcareproviders-diagnostic.html> - 2015.10.07.
- 7 Chaudhuri A., Kennedy P. G. E.: Diagnosis and treatment of viral encephalitis. *Postgraduate Medical Journal* (2002) vol. 78, no. 927, pp. 575-583.
- 8 Ciccozzi M., Gabanelli E., Lo Presti A., Peletto S., Acutis P. L., Zehender G., Cella E., Modesto P., Giovanetti M., Rezza G., Lai A., Platonov A. E.: Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infection, Genetics and Evolution* (2013) vol. 17, pp. 46–50.
- 9 Crichlow R., Bailey J., and Gardner C.: Cerebrospinal Fluid Neutrophilic Pleocytosis in Hospitalized West Nile virus Patients. *The Journal of American Board of Family Practice* (2004) vol. 17, pp. 470-472.
- 10 Di Terlizzi R., Platt, S. R.: The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II – Analysis. *The Veterinary Journal* (2009) vol. 180, pp. 15-32.
- 11 Erdei A., Gergely J.: A természetes és adaptív immunitás kapcsolata. In: Erdei A., Gergely J.: *Immunbiológia*, 1. kiadás. *Medicina Könyvkiadó Győr* (2000) pp. 56-57.

- 12 Farajollahi A., Fonseca D. M., Kramer L. D., Kilpatrick A. M.: „Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* (2011) vol. 11, no. 7, pp. 1577-1585.
- 13 Fehér Gy.: A központi idegrendszer, systema nervosum centrale. In: Fehér Gy.: Háziállatok funkcionális anatómiája. *Mezőgazda Kiadó* Budapest (2001) pp. 509-601.
- 14 Fraissier C., Papa A., Granjeaud S., Hintzen R., Martina B., et al.: Cerebrospinal Fluid Biomarker Candidates Associated with Human WNV Neuroinvasive Disease. (2014) *PLoS ONE* 9(4): e93637. doi:10.1371/journal.pone.0093637
- 15 Furr, M. and Andrews, F.: Cerebrospinal Fluid and the Blood- Brain Barrier. In: FURR, M., REED, S.: *Equine Neurology*. USA: Blackwell Publishing Professional, 2008. p. 33-47.
- 16 Valiakos G., Athanasiou L. V., Touloudi A., Papatsiros V., Spyrou V., Petrovska L. and Billins C.: West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence, INTECH, 2013. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/43242.pdf> - 2015.09.28.
- 17 Goddard L. B., Roth A. E., Reisen W. K., Scott T. W.: Vertical Transmission of West Nile Virus by Three California *Culex* (Diptera: Culicidae) Species. *Journal of Medical Entomology* (2003) vol. 40, no. 6, pp. 743-746.
- 18 Green E. M., Constantinescu G. M., Kroll R. A.: Equine cerebrospinal fluid: Analysis. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* (1993) vol. 15, no. 2, pp. 288-302.
- 19 Hayes C. G.: West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Annals of the New York Academy of Science* (2001) vol. 951, pp. 25-37.
- 20 Hayes E. B., Komar N., Nasci R. S., Montgomery S., O'Leary D. R., and Campbell G. L.: Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerging Infectious Diseases Journal* (2005) vol. 11, no. 8, pp. 1167-1173.
- 21 Hubalek Z., Halouzka J.: West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases Journal* (1999) vol. 5, pp. 643–650.
- 22 Irani D. N.: Properties and composition of normal cerebrospinal fluid. In: Irani D.N. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Practice*. Elsevier Health Sciences, USA, 2009. pp. 69-93.
- 23 Johnson P. J. and Constantinescu G. M.: Collection of cerebrospinal fluid in horses. *Equine Veterinary Education* (2000) vol. 12, no. 1, pp. 7-12.

- 24 Jordan M., Nagpal A., Newman W., Thompson P. A., Carson P. J.: Plasma cell cerebrospinal fluid pleocytosis does not predict West Nile virus infection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2012) vol. 2012., Article ID 697418.
- 25 Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, Biksi I, Ferenczi E, Bahuon C, Sardi S, Zientara S, Szenci O. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *Journal of Veterinary Internal Medicine* (2011) vol. 25, No. 3, pp. 586-591.
- 26 Lanciotti R. S., Ebel G. D., Deubel V., Kerst A. J., Murri S., Meyer R., Bowen M., McKinney N., Morrill W. E., Crabtree M. B., Kramer L. D., and Roehrig J. T.: Complete Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of West Nile Virus Strains Isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* (2002) vol. 298, no. 1, pp. 96-105.
- 27 Lim S. M., Koraka P., Osterhaus A. D. M. E. and Martina B. E. E.: West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis. *Viruses* (2011) vol. 3, no 6, pp. 811-828.
- 28 MacDonald R. D., Krym V. F.: West Nile virus Primer for family physicians. *Canadian Family Physician* (2005) vol. 51, no. 6, pp. 833–837.
- 29 MacWilliams P. S. Cerebrospinal Fluid. In: COWEL, R.L., TYLER, R.D.: Diagnostic cytology and hematology of the horse. USA: Mosby, 2002. p. 171-179.
- 30 Masoner D. E., Dale J. C., Binnicker M. J.: West Nile Virus Update. Mayo Clinic, 2008. <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2008/07.html> - 2015.10.03.
- 31 Mayhew I. G. and Beal C. L.: Techniques of analysis of cerebrospinal fluid. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* (1980) vol. 10, pp. 155-176.
- 32 McComb R. B., Bowers Jr. G. N. and Posen S.: Clinical Utilization of Alkaline Phosphatase Measurements. In: McComb R. B., Bowers Jr. G. N. and Posen S.: Alkaline phosphatase. *Plenum Press* New York and London (1979) pp. 525-786.
- 33 Monini M., Falcone E., Busani L., Romi R. and Ruggeri F. M.: West Nile Virus: Characteristics of an African Virus Adapting to the Third Millennium World. *The Open Virology Journal* (2010) vol. 4, pp. 42–51.
- 34 Országos Epidemiológiai Központ. A Nyugat-nílusi láz megbetegedések Magyarországon, 2008. augusztus-szeptember 41: 489-500. <http://www.oek.hu/oek.web?to=5,1865,1419,1828&nid=931&pid=1&lang=hun> - 2015.09.12.

- 35 Paddock C. D., Nicholson W. L., Bhatnagar J., Goldsmith C. S., Greer P. W., Hayes E. B., Risko J. S., Henderson C., Blackmore C. G., Lanciotti R. S., Campbell G. L., and Zaki S. R.: Fatal Hemorrhagic Fever Caused by West Nile Virus in the United States. *Clinical Infectious Diseases* (2006) vol. 42, no. 11, pp. 1527-1535.
- 36 Petersen L. R., Marfin A. A.: West Nile virus: a primer for the clinician. *Annals of Internal Medicine* (2002) vol. 137, no. 3, pp. 173-179.
- 37 Pusterla N., Wilson W. D., Madigan J. E., Ferraro G. L.: Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. *The Veterinary Journal* (2009) vol 180, no. 3, pp. 279-289.
- 38 Rawal A., Gavin P. J., Sturgis C. D.: Cerebrospinal fluid cytology in seasonal epidemic West Nile virus meningo-encephalitis. *Diagnostic Cytopathology* (2006) vol. 34, no. 2, pp. 127-129.
- 39 Schwarz B. and Piercy R. J.: Cerebrospinal fluid collection and its analysis in equine neurological disease. *Equine Veterinary Education* (2006) vol. 18, no. 5, pp. 243-248.
- 40 Seehusen D. A., M.D., Reeves M. M., M.D., and Fomin D. A., M.D.: Cerebrospinal fluid analysis. *American Family Physician* (2003) vol. 68, no. 6, pp. 1103-1109.
- 41 Shahim P., Mansson J.E., Darin N., Zetterberg H., Mattsson N.: Cerebrospinal fluid biomarkers in neurological diseases in children. *European Journal of Paediatric Neurology* (2013) vol. 17, no. 1, pp. 7–13.
- 42 Smithburn K. C., Hughes T. P., Burke A.W. and Paul J. H.: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (1940) vol. 20, pp. 471-492.
- 43 Shrestha B., Gottlieb D. and Diamond M. S.: Infection and Injury of Neurons by West Nile Encephalitis Virus. *Journal of Virology* (2003) vol. 77, pp. 13203-13213.
- 44 Szentpáli-Gavallér K., Antal L., Tóth M., Kemenesi G., Soltész Z., Dán A., Erdélyi K., Bányai K., Bálint A., Jakab F., Bakonyi T.: Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011-2012 in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (2014) vol. 14, no. 9, pp. 648-655.
- 45 Tyler K. L., Pape J., Goody R. J., Corkill M., Kleinschmidt-DeMasters B. K.: CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis. *Neurology* (2006) vol. 66, no 3, pp. 361–365.
- 46 Vajdovich P., Ribiczeyné Sz. P.: Az agy-gerincvelő folyadék (liquor cerebrospinalis) vizsgálata. In: Gaál T.: Állatorvosi klinikai laboratóriumi diagnosztika. *Sík Kiadó Budapest* (1999) pp. 406-415.

- 47 Vernau W., Vernau K. A., Bailey C. S.: Cerebrospinal Fluid. In: Kaneko J. J, Harvey J. W., Bruss M. L.: Clinical biochemistry of domestic animals, 6th edition. *Elsevier Inc.* USA (2008) pp. 769-819.
- 48 Wamsley H. L., Alleman A. R., Porter M. B., Long M. T.: Findings in cerebrospinal fluids of horses infected with West Nile virus: 30 cases (2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association* (2002) vol. 221, no. 9, pp. 1303-1305.
- 49 Guo Y., Zhou Y., Zhang S., Wei O., Huang Y., Xia W., Wang S.: Optimal target range for blood glucose in hyperglycaemic patients in a neurocritical care unit. *Diabetes and Vascular Disease Research* (2014) vol. 11, no 5, pp. 352-358.
- 50 Zehender G., Ebranati E., Bernini F., Lo Presti A., Rezza G., Delogu M., Galli M., Ciccozzi M.: Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin. *Infection, Genetics and Evolution* (2011) vol. 11, no. 3, pp. 646-653.
- 51 Zeller H. G., Schuffenecker I.: West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (2004) vol. 23, no. 3, pp. 147-156.

## Köszönetnyilvánítás

---

Hálás köszönettel tartozom, Dr. Korbacska-Kutasi Orsolyának, témavezetőmnek, a szakmai segítségért, a javításokért, és támogatásért. Az ő segítségével a dolgozat létrejöttéhez szükséges minták, és a vizsgálati eredmények nem álltak volna a rendelkezésemre.

Köszönettel tartozom továbbiakban Dr. Balogh Nándornak a laboratóriumi vizsgálatok kivitelezésében nyújtott odaadó munkájáért, és a szakmai konzultációkért.

Szeretném megköszönni a Lógyógyászati Tanszék és Klinikán illetve elődintézményében dolgozóknak az elméleti és szakmai segítséget, különösképpen azoknak, akik a mintagyűjtést segítették.

Ezúton szeretném megköszönni a Készenléti Rendőrség hozzájárulását is ahhoz, hogy a szolgálati lovakat bevonhattuk a vizsgálatokba.