

Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

**Macska-retrovírusok hazai előfordulásának
felmérése molekuláris biológiai módszerekkel,
egyed vírusok genetikai vizsgálata**

PhD értekezés

Dr. Szilasi Anna

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Balka Gyula

Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

témavezető

Dr. Bálint Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, Virologiai Laboratórium

témabizottság tagja

Reinhard Ertl

University of Veterinary Medicine Vienna

VetCore Facility for Research

consultant

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

.....

Dr. Szilasi Anna

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	3
2. Ábrák jegyzéke.....	5
3. Rövidítések jegyzéke	7
4. Összefoglalás.....	8
5. Bevezetés	10
5.1. Célkitűzések.....	11
6. Irodalmi áttekintés	13
6.1. Kóroktan, elterjedés	13
6.2. A vírusok terjedése.....	15
6.2.1. A FeLV terjedése	15
6.2.2. A FIV terjedése	16
6.3. Kórfejlődés	18
6.3.1. A FeLV-fertőzés kórfejlődése	18
6.3.2. A FIV-fertőzés kórfejlődése	20
6.4. Klinikum, tünetek.....	23
6.4.1. A FeLV-fertőzés klinikuma.....	23
6.4.2. A FIV-fertőzés klinikuma	29
6.5. Diagnosztikai lehetőségek.....	31
6.5.1. Szerológiai vizsgálatok.....	32
6.5.2. Víruskimutatás	35
6.6. Gyógykezelés.....	35
6.6.1. Vírusellenes kemoterápia.....	36
6.6.2. Ellenanyag-terápia	38
6.6.3. Immunmoduláns terápia.....	38
6.6.4. Kiegészítő terápia	40
6.7. Megelőzés.....	40
6.7.1. Szűrés és eltávolítás, vakcinázás.....	40
6.8. Együttélés a fertőzéssel	42
7. Anyag és módszer.....	44
7.1. Mintagyűjtés	44
7.2. Szerológiai vizsgálat.....	47
7.3. Polimeráz lánreakció	47
7.3.1. FeLV RT-PCR.....	47
7.3.2. FIV-PCR.....	49

7.4.	Statisztikai vizsgálat	50
7.5.	Szekvenciaelemzés és filogenetikai vizsgálat.....	51
7.6.	Kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálat.....	52
7.7.	<i>In situ</i> hibridizációs vizsgálat	53
8.	Eredmények.....	55
8.1.	Magyarországi prevalencia.....	57
8.2.	Magyarországi statisztikai elemzés	57
8.3.	Magyarországi szekvenciaelemzés és filogenetikai eredmények	58
8.4.	Az írországi mintavételből származó eredmények.....	61
8.5.	Írországi prevalencia	62
8.6.	Írországi statisztikai elemzés.....	62
8.7.	Írországi szekvenciaelemzés és filogenetikai eredmények.....	63
8.8.	Immunhisztokémiai és <i>in situ</i> hibridizációs eredmények.....	64
8.8.1.	Osteochondromatosis <i>in situ</i> hibridizációs vizsgálata	69
9.	Megbeszélés, következtetések.....	73
9.1.	Az alkalmazott vizsgálati módszerek eredményeinek általános összehasonlítása..	73
9.2.	A gyűjtött adatok elemzése	74
9.3.	Prevalencia adatok elemzése.....	76
9.4.	A szekvenciaelemzés és filogenetikai eredmények megtárgyalása	79
9.5.	Patológiai vizsgálatok értékelése.....	80
10.	Új tudományos eredmények	82
11.	Irodalomjegyzék.....	83
12.	A doktori kutatás eredményeinek közlései	105
12.1.	A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent közlemények	105
12.2.	A doktori értekezés témájában, lektorált, nem impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk.....	106
12.3.	A doktori értekezés témájában tartott előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon	106
12.4.	A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények, előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon.....	107
13.	Köszönetnyilvánítás.....	109

2. Ábrák jegyzéke

1. ábra: A FeLV és a FIV szerkezete, sematikus rajz.....	13
2. ábra: FeLV (A) és FIV (B) genom szerkezete.....	14
3. ábra: A FIV altípusok megoszlása a világban az eddig rendelkezésre álló adatok szerint	17
4. ábra: A FeLV-fertőzés kórfejlődése.....	20
5. ábra: Alimentaris típusú lymphoma kórbonctani képe, nyirokcsomó áttétellel.....	24
6. ábra: FeLV-fertőzés következtében kialakult icterus	26
7. ábra: Elhalásos colitis	30
8. ábra: A FIV kórfejlődése során fellépő vírus- és ellenanyagszintek, valamint CD4 ⁺ lymphocyták szám alakulása	34
9. ábra: A hazai kutatásban szereplő minták származási helyei és darabszáma.....	45
10. ábra: Az írországi kutatásban szereplő minták származási helyei és a rendelőkénti mintaszámok.....	46
11. ábra: FeLV kimutatására szolgáló PCR-vizsgálat eredménye gélelektroforézist követően	49
12. ábra: A FIV kimutatására szolgáló PCR-vizsgálat eredménye gélelektroforézist követően	50
13. ábra: RNAscope <i>in situ</i> hibridizáció, sematikus ábra.....	54
14. ábra: A mintavételt megelőzően feljegyzett egyes változók megoszlása a vizsgált macskákban Magyarországon	56
15. ábra: A mintagyűjtés helyszínei, kiemelve a szekvenálásra került FIV-pozitív mintáké.....	59
16. ábra: Filogenetikai törzsfa a Magyarországon kimutatott FIV-szekvenciákkal	60
17. ábra: A mintavételt megelőzően feljegyzett egyes változók megoszlása a vizsgált macskákban az írországi vizsgálat során.....	61
18. ábra: Filogenetikai törzsfa az írországi FIV-szekvenciákkal	64
19. ábra: Gerincvelő-lymphoma immunhisztokémiai festése	65

20. ábra: Pozitív kontroll macskaszövet, melyet az ISH-vizsgálatokhoz alkalmaztunk.....	66
21. ábra: Negatív kontroll kutyszövet, melyet az ISH-vizsgálatokhoz alkalmaztunk.....	66
22. ábra: Alimentaris lymphoma, macska, vékonybél, FeLV ISH.....	67
23. ábra: Alimentaris lymphoma, macska, vékonybél, FIV ISH.....	67
24. ábra: Primer extranodális idegszöveti B-sejtes lymphoma, macska, gerincvelő	68
25. ábra: Nem-regeneratív anaemia következtében elhullott macska, csontvelőminta ..	68
26. ábra: A csontos kinövések képe röntgenvizsgálattal osteochondromatosis során ...	70
27. ábra: Osteochondromatosisban látható elváltozások	71
28. ábra: Osteochondromatosisban látható elváltozás kórszövettani képe.....	71
29. ábra: Osteochondromatosis miatt véglegesen elaltatott macska szövetei, FeLV ISH.....	72
30. ábra: A mintavételt megelőzően feljegyzett egyes változók megoszlása a vizsgált macskákban, összehasonlítva Magyarország és Írország adatait	75
31. ábra: A jelenleg ismert és legfrissebb FIV (piros) és FeLV (kék) fertőzöttségi adatok Európában.....	78

3. Rövidítések jegyzéke

+ssRNS – pozitív szimpla szálú RNS	H&E – hematoxylin és eozin
AAFP – American Association of Feline Practitioners	HIV – human immunodeficiency virus (humán immundeficiencia vírus)
AIDS – szerzett immunhiányos szindróma	Ht – hematokrit
ARC – AIDS-related complex	HuINF- α – humán interferon-alfa
BCG – Bacillus Calmette-Guérin	IL-18 – interleukin-18
BLAST – National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool	IL-2 – interleukin-2
bp – bázispár	INF – interferon
CD – cluster of differentiation	INF- γ – interferon-gamma
CI – konfidencia intervallum	INF- τ – interferon-tau
CPV-1 – carnivore protoparvovirus 1 (húsevő-protoparvovírus 1)	IRIS – International Renal Interest Society
CXCR4 – C-X-C Motif Chemokine Receptor 4	ISH – <i>in situ</i> hibridizáció
DapB – dihidrodipikolinát-reduktáz	ISS – injection site sarcoma
DFA – direkt fluoreszcens ellenanyag	LTCI – lymphocyte T-cell immunomodulator
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay	LTR – long terminal repeat
enFeLV – endogén macska leukaemia vírus	MHC-II – major histocompatibility complex II
env – envelope (burok)	mRNS – messenger RNS
FA – fluoreszcens ellenanyag	Nab – neutralizáló ellenanyag
FAIDS – feline acquired immune deficiency syndrome (macska szerzett immunhiányos szindróma)	NK – natural killer
FeLV – feline leukaemia virus (macska leukaemiavírus)	PBS – foszfáttal pufferolt sóoldat
FeSV – feline sarcoma virus (macska sarcoma vírus)	PCR – polimeráz láncreakció
FIP – feline infectious peritonitis (macska fertőző hashártyagyulladás)	po – per os (szájon át)
FISH – fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	POC – point-of-care
FIV – feline immunodeficiency virus (macska immundeficiencia-vírus)	pol – polimeráz
FOCMA – feline oncornavirus cell membrane antigen	PPIB – peptidilpropil-izomeráz B
FORL – feline odontoclastic resorption lesion	reFeINF- ω – rekombináns macska interferon omega
FPV – feline panleukopenia virus (macska panleukopenia vírus)	RT-PCR – reverz transzkripció PCR
GM-CSF – granulocyta-macrophag kolóniastimuláló faktor	SPF – specific-pathogen free
	sc – subcutan (bőr alá)
	TBE – tris-borát-EDTA
	TR – tooth resorption (fogfelszívódás)
	T _{reg} – regulátor T-sejt
	WSAVA – World Small Animal Veterinary Association

4. Összefoglalás

A macskák immundeficiencia-vírusa (FIV) és a macskák leukaemiavírusa (FeLV) két olyan retrovírus, amik világszerte okoznak megbetegedéseket a macskafélék populációiban. Kutatásom célja az volt, hogy adatokat nyerjünk a két vírus magyarországi prevalenciájáról a házi macskák körében, illetve, hogy feltérképezzük az általunk izolált FIV-törzsek genetikai tulajdonságait és rokonsági viszonyait.

Összesen 335 alvadásában gátolt vérmintát gyűjtöttünk tünetmentes, illetve valamilyen betegség tüneteit mutató macskáktól, lefedve az ország összes nagyobb régióját. A mintagyűjtés 2016 és 2018 között zajlott. Menhelyi és kóbor állatok kizárásra kerültek a kutatásból. A két vírus vérben való jelenlétét először helyben, egy ELISA-teszttel vizsgáltuk, majd az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékén PCR-vizsgálattal is. Ezek után a kapott adatokat statisztikai módszerekkel elemeztük, amely az alábbi eredményeket hozta: hazánkban a kutatásba bevont macskákon elvégzett ELISA-vizsgálatok alapján a FIV valódi prevalenciája 9,89%, a FeLV-é 11,78% volt. A párhuzamosan elvégzett PCR eredményei alapján látszólagos prevalenciaértékeket számoltunk, amelyek FIV esetében 13,13%, FeLV esetében 17,31% volt. Összesen 22 FIV-pozitív mintán tudtuk a polimeráz gén részleges szekvenciáját meghatározni Sanger-módszerrel, és az azt követő filogenetikai vizsgálatok azt bizonyították, hogy Magyarországon a FIV-B altípus terjedt el. A törzsek több monofiletikus csoportot alkottak, amik általában jól mintázták a földrajzi származásukat is. Az átlagos genetikai azonosság a vizsgált szekvenciák között 98,2% volt.

Az eredeti célkitűzésen felül lehetőségünk volt szélesebb körben elvégezni ugyanezeket a vizsgálatokat 2017–2018 között, így Írországból összesen, további 183 alvadásában gátolt vért gyűjtöttük. A feltételek a magyarországi mintavétellel teljes mértékben egyeztek. Itt ELISA-vizsgálattal a látszólagos prevalencia 3,28% volt FeLV és 10,87% FIV esetén, a valódi prevalencia pedig 4,9% FIV esetében (FeLV-nél a valódi prevalencia nem volt mérhető). PCR-vizsgálattal a látszólagos prevalencia FeLV-nél 11,63%, FIV-nél 9,3% volt. A filogenetikai vizsgálatok során összesen 8 FIV-pozitív törzset tudtunk részlegesen megszekvenálni, ezekből 7 tartozott az A altípusba és 1 a B altípusba.

Kutatásunk során vizsgáltuk továbbá a FeLV és FIV szöveti jelenlétét RNAscope *in situ* hibridizációs technikával a Patológiai Tanszékre beérkező hullaanyagokon 2016 és 2020 között. Több esetben sikerült kimutatnunk a kórokozókat az általuk okozott elváltozásban, valamint a lymphoid, csontvelő és egyéb szövetekben. Egy ritka, extranodalis, gerincvelői lymphoma esetében részletes klinikopatológiai és immunfenotipizációs vizsgálatokat végeztünk, és bizonyítottuk a kórkép hátterében a FeLV-fertőzést. Egy másik, szintén

nagyon ritka kórkép, az osteochondromatosis esetében is sikerült igazolni annak FeLV-háttérét.

Vizsgálatainkat úgy tudjuk összefoglalni, hogy ez az első, szisztematikus, Magyarország közelítőleg teljes területére kiterjedő, átfogó vizsgálat a FeLV és FIV prevalenciájának feltárására. Eredményként a környező országokhoz képest kissé magasabb előfordulási gyakoriságot kaptunk, illetve betekintést nyertünk a kimutatott FIV-törzsek filogenetikai tulajdonságaiba.

5. Bevezetés

A *Retroviridae* családba (*Ortervirales* rendbe) tartozó vírusok közül két olyan kórokozót ismerünk, amelyek számottevő problémát okoznak napjainkban is mind a házi, mind a vadmacskafélék populációiban világszerte. Ezek a vírusok elsődlegesen immunszuppressziót okoznak, aminek hatására gyakran másodlagos kórképek alakulnak ki, azonban nem feledkezhetünk meg a daganatképző vagy akár a csontvelő-károsító hatásukról sem.

A házi macskák körében világszerte vezető elhullási okként tartották számon a macskák leukaemiavírusa (feline leukemia virus, FeLV) által okozott fertőzést (Essex et al. 1985, Dunham és Graham 2008), azonban napjainkra ez a szám csökkent, köszönhetően a szűrési protokolloknak és a hatékony vakcinák elterjedésének. Szintén nagyon széles körben elterjedt a macskák immundeficiencia-vírusa (feline immunodeficiency virus, FIV), amely hasonló szerzett immunhiányos szindrómát (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) alakít ki, mint a humán immundeficiencia-vírus (human immunodeficiency virus, HIV) emberekben. A lentivírusok nemzetségébe tartozó vírusok közül a FIV hasonlít leginkább a HIV-re genetikailag és az okozott kórképek szempontjából, így jelenleg is számos kutatásban szerepel, mint a HIV tanulmányozására alkalmas állati vírusmodell.

A fertőzöttség megállapítására jelenleg többféle módszer is rendelkezésünkre áll, amellyel kiszűrhetők az érintett állatok. A leggyakrabban használt módszerek ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) típusúak, ezek ún. „point-of-care” (POC) tesztek. FeLV esetén a p27 antigén, FIV esetén leggyakrabban a vírus p24 fehérjéje ellen képződött ellenanyagok jelenlétét jelzik fertőzöttség esetén. Megerősítő vizsgálatként polimeráz láncreakció (PCR) használata ajánlott.

A világon viszonylag alacsony előfordulási arányokat írtak le, és csak néhány esetben – leginkább kőbormacska-állományokban – állapítottak meg kiugróan magas prevalenciaértékeket: FeLV (1–59,6%) és FIV (0,3–33,9%) (Hosie et al. 1989, Ueland és Lutz 1992, Knotek et al. 1999, Arjona et al. 2000, Muirden 2002, Maruyama et al. 2003, Gleich et al. 2009, Akhtardanesh et al. 2010, Al-Kappany et al. 2011, Agger és Thomsen 2012, Sukhumavasi et al. 2012, Miró et al. 2014, Rypuła et al. 2014, Firth és Möstl 2015, Galdo Novo et al. 2016, Hwang et al. 2016, Attipa et al. 2017, Burling et al. 2017, Gates et al. 2017, Lacerda et al. 2017, Luckman és Gates 2017, Hofmann-Lehmann et al. 2018, Sarvani et al. 2018, Sivagurunathan et al. 2018, Biezus et al. 2019b, Tchamo et al. 2019, Iatta et al. 2019, Teixeira et al. 2019, Studer et al. 2019, Westman et al. 2019, Liu et al. 2020, Abayli et al. 2021, Kokkinaki et al. 2021). A főbb adatokat az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat: A FeLV és a FIV előfordulása házi macskákban 1989 és 2021 között

Az előfordulási értékek a jelenleg rendelkezésre álló legfrissebb adatokat tartalmazzák az adott régióra. Amennyiben több ilyen kutatást is publikáltak, ott egy tartományt adtunk meg. Ezek az adatok nem mindig a kóbor/menhelyi macskapopulációk kizárásával kerültek megállapításra, így előfordulnak kiugróan magas értékek is.

	FeLV (%)	FIV (%)	Referenciák
Észak-Amerika	3,1	3,6	Burling et al. 2017
Latin-Amerika	3–28,4	2,2–20,3	Galdo Novo et al. 2016, Lacerda et al. 2017, Biezus et al. 2019b, Teixeira et al. 2019
Ausztrália	2	15	Westman et al. 2019
Új-Zéland	1–2,6	13,7–18,5	Luckman és Gates 2017, Gates et al. 2017
Távol-Kelet	2,9–59,6	1,5–20,1	Maruyama et al. 2003, Akhtardanesh et al. 2010, Sukhumavasi et al. 2012, Hwang et al. 2016, Sivagurunathan et al. 2018, Liu et al. 2020
Európa	0,9–18	0,3–23,6	Hosie et al. 1989, Ueland és Lutz 1992, Knotek et al. 1999, Arjona et al. 2000, Muirden 2002, Gleich et al. 2009, Agger és Thomsen 2012, Miró et al. 2014, Rypuła et al. 2014, Firth és Möstl 2015, Attipa et al. 2017, Hofmann-Lehmann et al. 2018, Sarvani et al. 2018, Iatta et al. 2019, Studer et al. 2019, Abayli et al. 2021, Kokkinaki et al. 2021
Afrika	4,6–14,5	11–33,9	Al-Kappany et al. 2011, Tchamo et al. 2019

5.1. Célkitűzések

Magyarországon eddig nem zajlott átfogó molekuláris epidemiológiai kutatás a két vírus járványtani és genetikai tulajdonságait vizsgálva, csak kisebb, helyi felmérések készültek, vagy ugyan szélesebb körű, de nagyon régen folytatott szerológiai vizsgálati adataink vannak (Lakatos et al. 1992 és 1996, Gyetvai és Balogh 2013). Elsődlegesen ezt a hiányosságot szerettük volna pótolni ennek a PhD-kutatásnak a keretein belül.

Célunk az volt, hogy egy országos mintagyűjtést követően a vérmintákat többféle vizsgálati módszernek vessük alá (így biztosítva a mért adatok minél nagyobb pontosságát), majd a kapott eredmények statisztikai elemzése és az ezekből számított FeLV és FIV prevalenciaadatok meghatározása után elvégezzük a kimutatott FIV-törzsek részleges szekvenciavizsgálatát és filogenetikai jellemzését. FeLV esetében ilyen vizsgálatokat ritkán végeznek, hiszen a vírusnak csak az A-altípusa terjed a macskák között, a többi altípus

endogén mutáció vagy rekombináció eredményként jön létre a ferőzött állatban, így az egyes altípusok megoszlása nem hordoz filogenetikai többletinformációt.

A FIV-vírus vizsgálatával célunk volt, hogy információt nyerjünk a hazai törzsek eredetéről és rokonsági viszonyairól. További célunk volt, hogy új módszerekkel tegyük láthatóvá a vírusok előfordulását fertőzött macskákból származó szöveteken, ezzel is bővítve a diagnosztikai lehetőségek skáláját.

Az eredeti célkitűzésen felül a kutatás során lehetőségünk adódott írországi vérmintákon is ugyanazt a felmérést elvégezni, amit Magyarországon, így célunkká vált az ottani FeLV és FIV elterjedtséget is felmérni, valamint a FIV-pozitív törzsek részleges szekvenciavizsgálatát elvégezni.

Azért tűztük ki ezeket a célokat, mert a retrovírusok okozta fertőzések napjainkban is nagy veszélyt jelentenek a macskákra. Csak úgy lehet azonban hatékonyan védekezni a megbetegedések ellen, illetve megfelelő tájokoztatást nyújtani a szakmabeli és laikus közösség számára, ha ismerjük a hazai előfordulási adatokat, tartási- és vakcinázási szokásokat, adott esetben a jelen lévő vírus altípusokat.

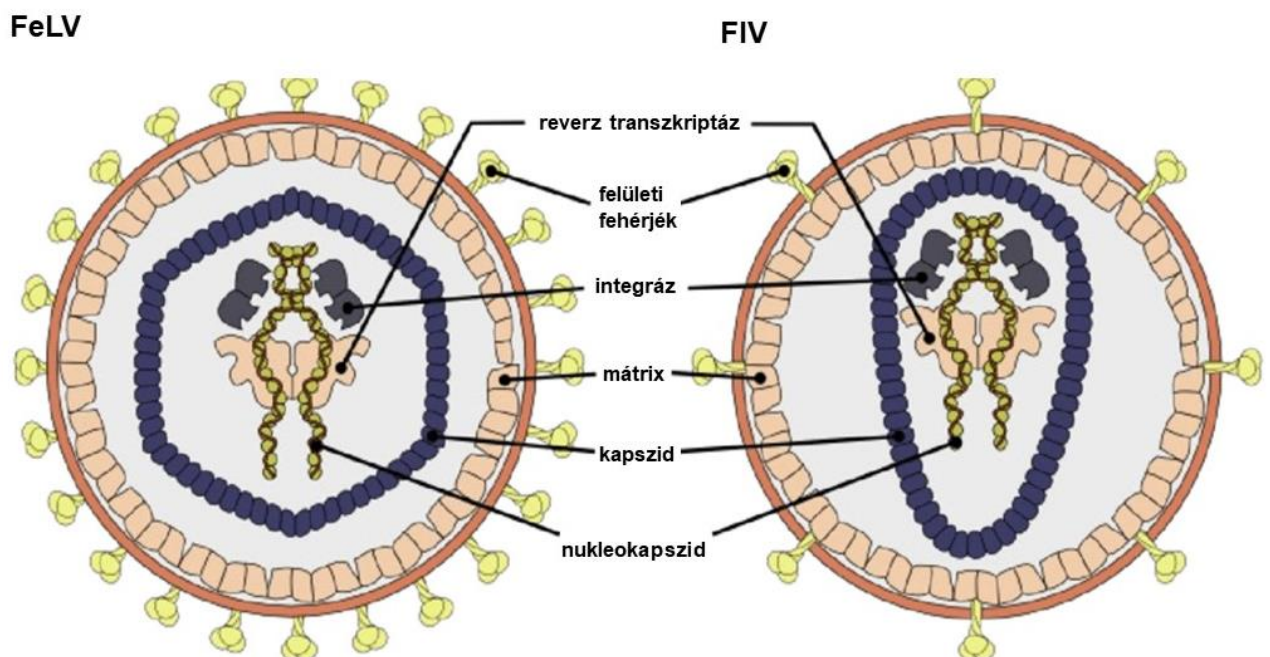
A következő célunk az, hogy a kutatási eredményeket széles körben ismertessük, ezáltal előmozdítva a FeLV- és FIV-fertőzések visszaszorítását Magyarországon.

6. Irodalmi áttekintés

6.1. Kóroktan, elterjedés

A macskák leukaemiavírusa (*Retroviridae*, *Orthoretrovirinae*, *Gammaretrovirus*) világszerte elterjedt a házi és vadon élő macskafajokban. A vírus felfedezése William Jarrett nevéhez köthető 1964-ben, aki mtsaival malignus lymphoblastok membránjához kapcsolódó víruspartikulákat figyelt meg egy lymphoma szövetmintában (Jarrett et al. 1964).

A macskák immundeficiencia-vírusa a retrovírusok családjába tartozó lentivírus, amely a világon szintén széles körben elterjedt a házi és vadon élő macskafélékben (Sparger 2012). Mindkét retrovírus örökítőanyaga pozitív szimpla szálú RNS (+ssRNS), amit egy helikális szimmetriájú nukleokapszid, egy második, köbös szimmetriájú kapszid és egy burok vesz körül, átlagosan 100 nm átmérőjűek (1. ábra).



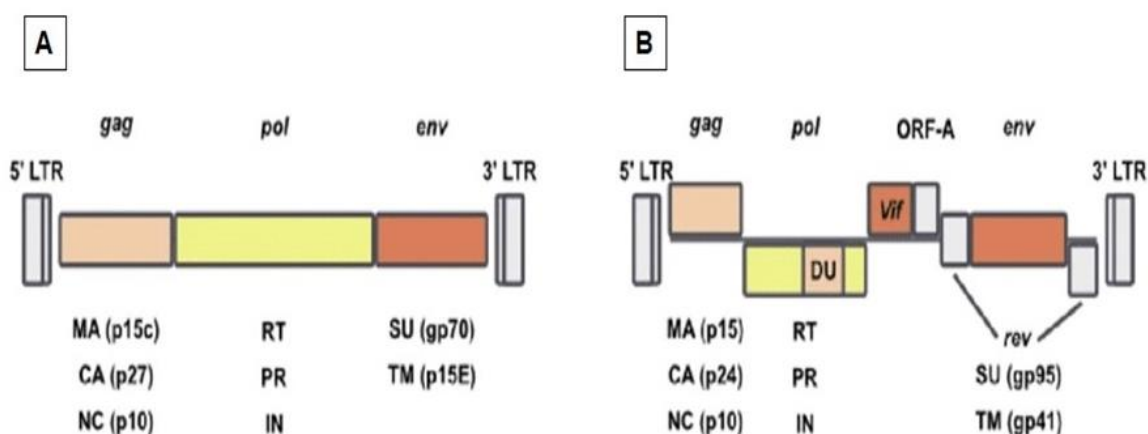
1. ábra: A FeLV és a FIV szerkezete, sematikus rajz (forrás: Grøndahl-Rosado 2009)

A vírusok genetikai elemzése alapján számos alcsoportot ismerünk. A FeLV genetikai térképezése alapján A, B, C és T altípusokat különítünk el, de egyedül a FeLV-A vihető át horizontális fertőzéssel macskáról macskára. A többi alcsoport (FeLV-B, FeLV-C, FeLV-T) ún. *de novo* szintézissel jön létre a FeLV-A-val fertőzött szervezetben. Ekkor a FeLV-A örökítőanyaga és a gazdaszervezet génjei vagy endogén retrovírusai (ún. enFeLV) rekombinálódnak (Phipps et al. 2000) vagy mutáción mennek keresztül, létrehozva az új vírust (Jarrett és Russel 1978, Phipps et al. 2000).

A FeLV-B és FeLV-C nagyobb megbetegítő képességű a FeLV-A jelenlétében, mint a FeLV-A önmagában. Ebben legnagyobb szerepe a burok (*env*) fehérjéknek van, legfőképp a gp70 fehérjének. A FeLV-B alcsoport gyakran játszik szerepet rosszindulatú daganatképzésben, a FeLV-C alcsoport pedig nem-regeneratív anaemia kialakításában. A célsejttropizmust és a fertőzőképességet az ún. long terminal repeat (LTR) szekvenciák határozzák meg a vírusban (Forman et al. 2009, Kawamura et al. 2015). A FeLV-T alcsoport esetén a célsejttropizmust és patogenitást főleg a burokfehérje határozza meg (Lauring et al. 2001).

A természetben szabadon terjedő FIV-vírust jelenleg hét altípusba sorolják be (A–F, U–NZenv) a burokfehérjét kódoló gén hipervariábilis szakaszának változatossága alapján (Sodora et al. 1994, Pancino et al. 1995, Hohdatsu et al. 1998, Kurosawa et al. 1999, Steinrigl és Klein 2004, Duarte és Tavares 2006, Kann et al. 2006, Troth et al. 2008, Hayward és Rodrigo 2008, Weaver 2010, Beczkowski et al. 2015, Cano-Ortiz et al. 2017).

Az FeLV és FIV genomszerkezetét a **2. ábra** szemlélteti.



Főbb gének: *gag* – csoport specifikus antigén, struktúrfehérje; *pol* – polimeráz; *env* – burok. Főbb fehérjék a vírusban: MA – mátrix; CA – kapszid; NC – nukleokapszid; RT – reverz-transzkriptáz; PR – proteáz; IN – integráz; SU – felületi fehérje; TM – transzmembrán fehérje; Vif – virion fertőzőképességi faktor; DU – deoxiuridin-pirofoszfátáz.

2. ábra: FeLV (A) és FIV (B) genom szerkezete (Dunham és Graham 2008. alapján)
A strukturális elemek (*gag*, *pol*, *env*, LTR) mellett látható az antigének elnevezése és elhelyezkedése is

6.2. A vírusok terjedése

6.2.1. A FeLV terjedése

A FeLV főleg házi macskában fordul elő, de kutatások bizonyítják folyamatos jelenlétét különböző vadmacskafélékben is (Sleeman et al. 2001, Luaces et al. 2008). Ez számos problémát vet fel mind a szabadon élő, mind a fogságban tartott macskafélék (pl. hiúzok, puma, vadmacska) populációjában, mivel a fertőzés komoly következményekkel járhat, mint például súlyos lázas állapot, vérszegénység vagy tumorképződés (Sarma et al. 1975, Daniels et al. 1999).

Kísérletes körülmények között kimutatták, hogy az egyes vírustörzsek fertőzhetnek nem macskából származó sejtvonalakat is, de természetes körülmények között nincs bizonyított átvitel más fajra (Jarrett et al. 1964 és 1969, Terry et al. 2017).

A FeLV világszerte elterjedt, de ellentétben a FIV-fertőzés prevalenciájával, amelynél szignifikáns eltérések mutatkoznak a populációk, országok, földrészek között, ez viszonylag állandó értékek (1–8%) között mozog, köszönhetően a szűréseknek és vakcinázásnak (Romatowski és Lubkin 1997, Levy et al. 2000 és 2006, Lutz et al. 2009, Li et al. 2017, Studer et al. 2019). Magasabb értékek előfordulhatnak olyan országokban (pl. Olaszország, Spanyolország), ahol sokkal nagyobb a kóbor macska populáció, így nagyobb az esélye a fertőzés elterjedésének és a kijáró macskák megfertőzésének (Lee et al. 2002, Bandecchi et al. 2006).

Bizonyos tényezők növelik a vírus terjedésének esélyét: ilyenek például házi macskáknál a kijárási lehetőség (hiszen az átvitelhez a fertőzött egyeddel közvetlen érintkezés szükséges) és az agresszív viselkedés (Goldkamp et al. 2008). Megdőlt az a nézet, hogy FeLV-fertőzésre leginkább a szociális tevékenységek (tisztálkodás, közös etető-itató tál használata, fertőzött anya és kölykeinek érintkezése) teszik fogékonnyá a macskákat, hiszen látható, milyen fontos szerep jut a régebben csak a FIV terjedését feltételező tényezőknek, mint agresszivitás, verekedés (Addie et al. 2000). Nem találtak fajtaprediszpozícióra utaló adatokat sem, bár általában a fajtatiszta egyedekben kisebb a fertőzöttség aránya, aminek az is lehet az oka, hogy ezeket az egyedeket szigorúbban felügyelik, zártan tartják (Hoover és Mullins 1991, Lutz et al. 2009).

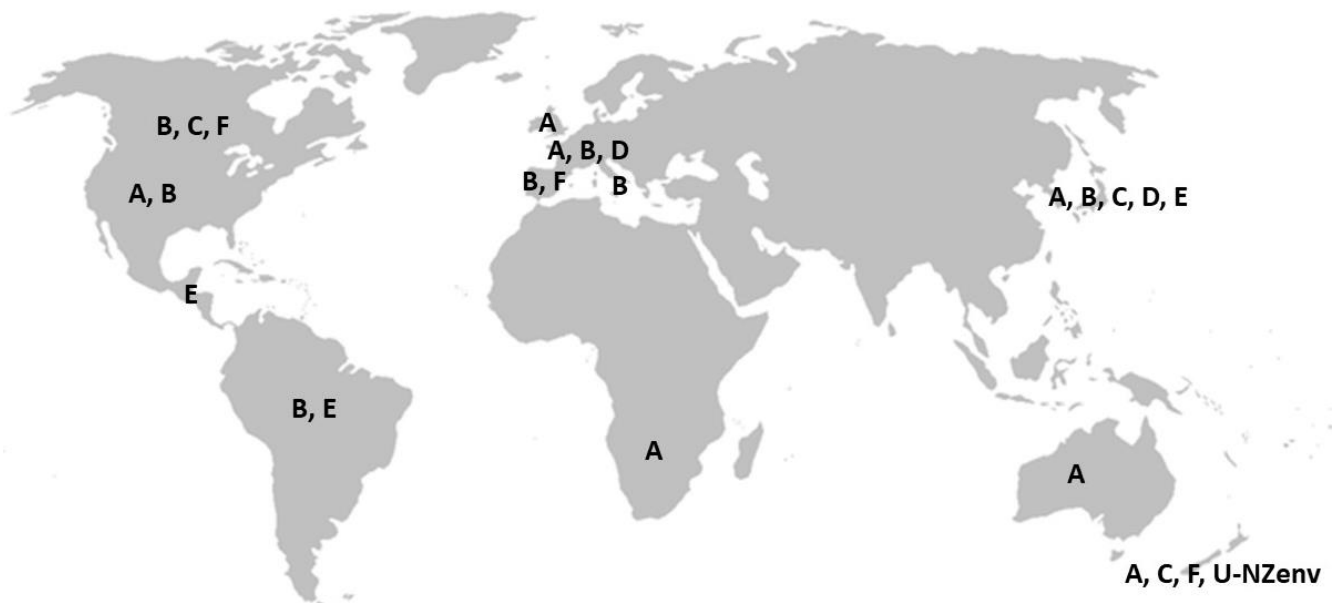
Ezek az adatok általában a p27 antigén vérben való jelenlétének vizsgálatán alapulnak ELISA vagy ennek megfelelő immunkromatográfias eljárásokkal, így nem, vagy csak kis eséllyel kerülnek be az ún. regresszív fertőzött egyedek, ahol már nincs produktív viraemia, a vírus csak a csontvelőben van jelen, a vérben csak az előalak (ún. provirális DNS) kering. Ez alapján feltételezhető, hogy a FeLV valódi prevalenciája nagyobb. Egy

svájci kutatás kimutatta például, hogy a meglévő 7% p27 antigén-pozitivitás mellett a macskák 10%-a p27 antigénre negatív, de provírális DNS jelenlétére pozitív volt (Hofmann-Lehmann et al. 2001).

A FeLV átvitele csak a vírust ürítő egyeddel való szoros érintkezéssel lehetséges mind horizontális, mind vertikális úton, mivel a vírus a külvilágra kerülve percekben belül inaktiválódik, valamint a fertőtlenítőszerre is igen érzékeny. Az átvitel legtöbbször nyállal valósul meg, amiben átlagosan ötször nagyobb a vírustiter, mint a vérben (Francis et al. 1977, Hawkins 1991, Gomes-Keller et al. 2006a és 2006b). Egyes kutatások kimutatták azt is, hogy viraemiás macskák aktívan ürítenek FeLV RNS-t és DNS-t a vizeletükkel és bélsarukkal, valamint, hogy ezek a partikulák fertőzőképesek is, habár feltehetően ennek az útnak kisebb szerep jut a vírus terjesztésében. Megfigyelték, hogy a vizelettel/bélsárral érintkező egészséges macskák termeltek ugyan ellenanyagot a vírus ellen, de antigén- és provírus tekintetében negatívak maradtak (Cattori et al. 2009, Gomes-Keller et al. 2009). Ugyanígy elenyésző, bár nem elhanyagolható a fertőzés terjesztésében a bolhák, a vértranszfúzió és ragályfogó tárgyak szerepe sem (Vobis et al. 2003, Nesina et al. 2015). Fontos átviteli mód a vertikális fertőzés is: ez megtörténhet transzplacentális úton vagy később, az anyai gondozás során (tisztálkodás, szoptatás). A vemhesség alatt a regresszív fertőzött macskában is reaktiválódhat a vírus az endogén progeszteron hatására, így a kölyökre való átvitelnek még nagyobb lesz az esélye (Rojko et al. 1982).

6.2.2. A FIV terjedése

Kiterjedt szerológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az Egyesült Államokban és Kanadában az A és B altípusok terjedtek el, valamint alkalmanként izolálnak C és F altípust is (Bachmann et al. 1997, Weaver et al. 2004, Broche-Pierre et al. 2005, Weaver 2010). Az A altípust inkább nyugaton találták gyakorinak, míg a B altípust a keleti parton. Ausztráliában és Afrikában az A altípust írták le legtöbbször, Új-Zélandon az A, C, F és U-NZenv (Hayward et al. 2007, Kann et al. 2007, Hayward et al. 2010), Dél-Amerikában pedig a B és E altípusokat (Pecoraro et al. 1996, Caxito et al. 2006). Európában kimutattak A, B, C és D altípusokat is. A területi megoszlásra jellemző, hogy az északi országokban, mint például Hollandia, vagy az Egyesült Királyságban, az A altípus elterjedtebb, a déli országokban, például Olaszországban, a B altípus prevalenciája magasabb (Hosie et al. 1989, Pistello et al. 1997, Steinrigl és Klein 2004, Steinrigl et al. 2010), Portugáliában pedig az F altípust is leírták (Duarte és Tavares 2006). Az ázsiai kontinensen B, C és D altípusokat mutattak ki, de A és E altípust is megfigyeltek (Kurosawa et al. 1999, Nakamura et al. 2003 és 2010). Tajvanon például kifejezetten magas a C altípus előfordulási aránya (Inada et al. 1997) (**3. ábra**).



3. ábra: A FIV altípusok megoszlása a világban az eddig rendelkezésre álló adatok szerint (térkép: www.outline-world-map.com)
Az A és B altípus világszerte elterjedt, míg a C, D, E, F és U-NZenv altípusok főleg regionálisan jelennek meg

A FIV természetes körülmények között leggyakrabban parenteralis úton, harapással és karmolással, valamint egyéb harci sérülésekkel terjed. Erre utal az, hogy a két évesnél idősebb kandúroknál a legmagasabb a prevalencia. A FIV jelen van a nyálmirigyek epitheliumában heveny fertőzés során, valamint a nyálban, a lymphocytákban, a plazmában és a szérumban (Matteucci et al. 1993, Park et al. 1995). Kísérletesen egyéb parenteralis fertőzési utak (intravénás, subcutan, intramuscularis, intraperitonealis) is sikeresnek bizonyultak, csakúgy, mint az oralis, intrarectalis és intravaginalis utak sejtmentes vagy sejthez kötött vírussal. Fontos még említést tenni az *in utero* és a születést követő fertőződésről is, amelyek több mint 50%-ban voltak eredményesek kísérletes körülmények között (Callanan et al. 1991, O'Neil et al. 1996). Ezt a jelentős fertőzési arányt magyarázhatja, hogy a nőstény macskák nemi traktusa tartalmaz CD4⁺ (cluster of differentiation) és CD8⁺ T-sejteket, B-sejteket, macrophagokat és dendritikus sejteket, amelyek mind a FIV gazdasejtjei (Butterworth et al. 2001, Obert és Hoover 2002). A nyálkahártyával való érintkezés utáni szisztémás terjedést ezek miatt is modellként használják a HIV vizsgálata során (Obert és Hoover 2002). Születés után a kölykök tejjel és az ápolás során az anya nyálával fertőződnek. Kutatások szerint a vírus nagyobb mennyiségben fordul elő a tejben, mint a tejet szekretáló sejtekben vagy a vérplazmában (Allison és Hoover 2003). A kandúrok akár az ondóval is terjeszthetik a vírust, amely megtalálható mind a sejtmentes, mind a sejtes frakcióban a heveny és a krónikus fertőzés

során is. Jelenleg azonban nem ismert az ondo által terjesztett vírusfertőzés megoszlása a többi inokulációs móddal szemben (Jordan et al. 1999). Egyéb kísérleti úton történő, vírusáviteli módokat is leírtak már, mint például FIV-pozitív vérrel szennyezett varrófonállal történő átvitel vagy provirális DNS-t tartalmazó vérrel történő fertőzés, de igen kicsi a valószínűsége, hogy ezek természetes úton előforduljanak (Moench et al. 1993, Druce et al. 1997).

A horizontális átvitelt megfigyelték többmacskás háztartásokban is, bár ez viszonylag ritka esemény (Addie et al. 2000). Fontos megemlíteni, hogy többször előfordul az is, amikor a macskák között van a vérben FIV-specifikus ellenanyagot hordozó (ún. aktív fertőzött), és van csak vírus DNS-pozitív (ún. látens fertőzött) egyed is. A látens fertőzött macskák tünetmentesek maradtak kísérletes körülmények között ellenanyag pozitív macskákkal együtt tartva, több éven keresztül, de ennek a jelenségnek még nem ismerjük a klinikai konzekvenciáit (Dandekar et al. 1992).

6.3. Kórfejlődés

6.3.1. A FeLV-fertőzés kórfejlődése

A FeLV-fertőzés kimenetelének több útja is lehetséges, ahogy azt a **4. ábra** is mutatja.

1. Progresszív fertőzöttség

Ebben a szakaszban jellemző a folyamatosan fennálló (16 hétnél tovább tartó) viraemia, vírusürítés és fertőzőképesség, valamint a neutralizáló ellenanyagok alacsony szintű jelenléte. Korábban ezt a formát „perzisztens viraemiának” nevezték. Az egyed nem rendelkezik megfelelő FeLV-specifikus immunitással, a fertőzésre adott immunválasz nem elég hatékony. A vírus replikációja a nyirokszövetekben, később a csontvelőben, a nyálkahártyák és a mirigyek hámszöveteiben zajlik. Ezekben az állatokban általában másodlagos fertőzések, illetve ún. FeLV-asszociált kórképek alakulnak ki, amelyek miatt a macskák 3 éven belül elpusztulhatnak (Rojko et al. 1979 és 1994, Hartmann 2012a), habár megfelelő állatorvosi ellátás biztosításával ez a túlélési idő akár jelentősen meg is hosszabbítható.

2. Regresszív fertőzöttség

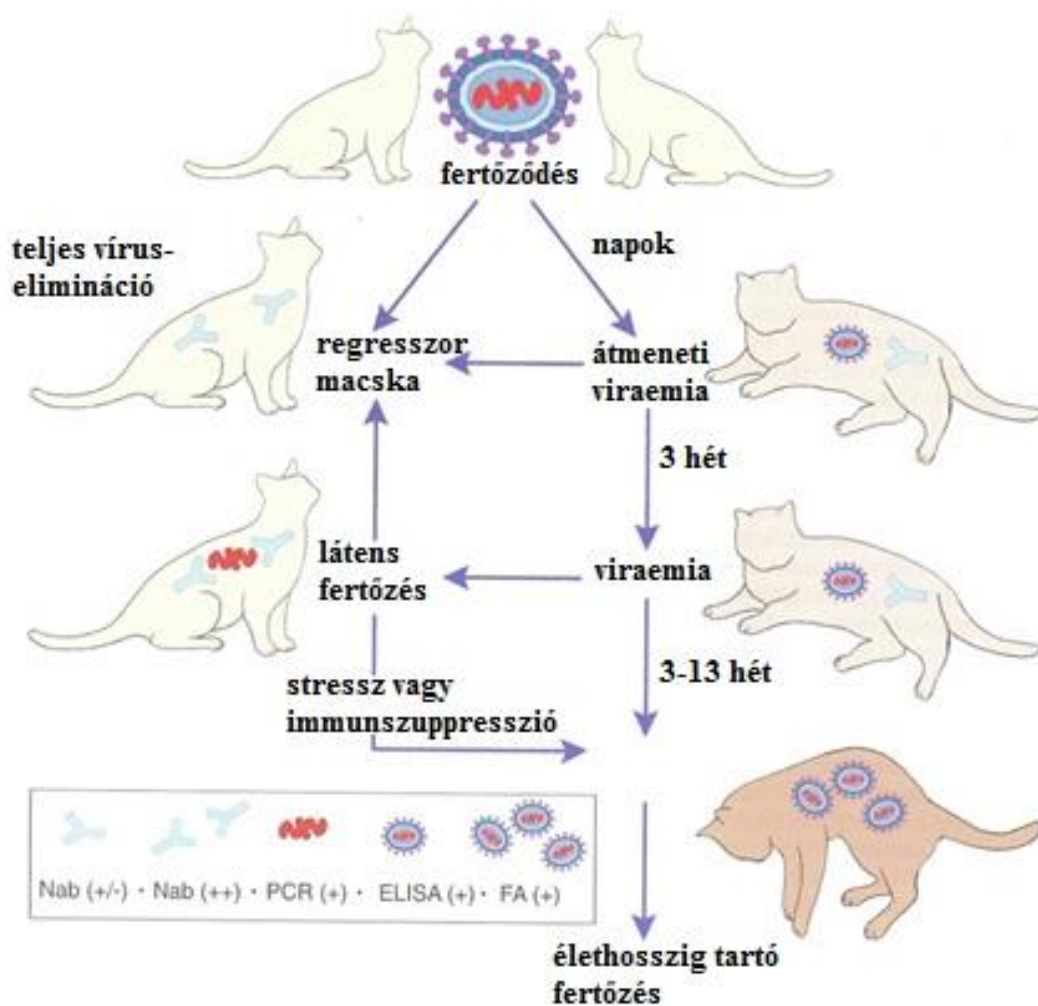
Ebben a fertőzési formában kulcsszerepe van a csontvelő érintettség időpontjának. Akkor alakul ki regresszív fertőzés, ha a macska hatékony immunválaszt alakít ki, mielőtt a vírus elérné a csontvelőt, vagy közvetlenül azután, hogy a csontvelő fertőződött. A replikálódó vírus a mononuclearis sejtekkel (monocytákkal, lymphocytákkal) terjed a

szervezetben, a viraemia általában hetek vagy hónapok alatt lezajlik (leggyakrabban ez 3–6 hét, maximum 16 hét). A vírusürítés szakaszában a macska fertőzőképes, illetve mutathat nem specifikus tüneteket (lázat, levertséget, nyirokcsomó-megnagyobbodást). Korábban ez a forma viselte az „átmeneti viraemia” nevet (Hartmann 2012a). Amennyiben a viraemia tovább tart, mint 3 hét, a csontvelő sejtjei is megfertőződnek, és a hematopoiitikus prekursor sejtek is tartalmazni fogják a vírust, amely így jut a keringésbe. Minél tovább tart a viraemia, annál nagyobb az esélye annak, hogy a macska immunrendszere nem fogja tudni teljes mértékben legyőzni a vírust, így az állat fertőzött marad, a csontvelő őssejtjeiben jelen lesz a provirális DNS (Pacitti és Jarrett 1985, Pepin et al. 2007). Korábban ezt „látens fertőzésnek” hívták, de ma már ezt a regresszív fertőzöttség egy szakaszának tekintjük.

A regresszív fertőzött egyedek, habár nem ürítik a vírust (és így nem is fertőzik a többi macskát), de a provirális DNS jelen van a vérkeringésben, így immunszuppresszió, stressz, vemhesség vagy iatrogén behatás (pl. glükokortikoid adása) következményeként újra viraemiás állapotba kerülhetnek, és erre jellemző kórképek alakulhatnak ki (Rojko et al. 1982, Hofmann-Lehmann et al. 2008).

3. Abortív fertőzés

Az esetek igen kis százalékában fordul elő ez a fertőzési típus. Ekkor általában a macska nagyon kis mennyiségű vírussal kerül kapcsolatba, és részben a humorális, részben a celluláris immunitás hatására a szervezet képes teljes mértékben eliminálni a vírust, mielőtt kialakulna a viraemiás fázis. A vérből nagy titerben mutathatók ki neutralizáló ellenanyagok (kivéve az érintett egyedek kb. 2%-át, ahol nem található ilyen ellenanyag), de az összes többi diagnosztikai teszt negatív lesz – ami tovább nehezíti az abortív fertőzés felderítését. A várható élettartam nem tér el azoktól az egyedektől, amik soha nem voltak kitéve a fertőzésnek (Hartmann 2012a).



4. ábra: A FeLV-fertőzés kórfejlődése (forrás: Cotter 1998)

4. Fokális (atipikus) fertőzés

Természetes fertőződés során az atipikus forma szintén ritkán kialakuló kórkép. Ekkor a FeLV lokális perzisztens replikációja jellemző az adott szövetben/szervben (pl. szemben, emlőmirigyben), ennek megfelelően az ellenanyag-termelés intermittáló vagy alacsony intenzitású (Hayes et al. 1989).

6.3.2. A FIV-fertőzés kórfejlődése

FIV-vel történt kísérletes fertőzés során megfigyelték, hogy a vírus a macrophagokban gazdag szövetekbe jut, a replikáció célsejtjei pedig a macrophagokban

gazdag nyirokszervekben (csecsemőmirigyben, lépben, nyirokcsomókban), valamint a többi macrophagban és lymphoid sejtben gazdag szervben található (Bingen et al. 2002). A viraemiás fázis a fertőzés után akár már két héttel vagy kicsivel még korábban kimutatható polimeráz láncreakcióval és vírustenyésztéssel plazmából vagy a perifériás vér lymphocytáiból, azonban a csúcsát néhány héttel a fertőződés után éri csak el. Más szövetek mononuclearis sejtjeiben is felfedezhető a FIV jelenléte, mint a csontvelő, a tüdő, a gasztrointesztinális traktus, az agy és a vese (Johnston et al. 2000). *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy a dendritikus sejtek közvetlenül is át tudják adni a fertőzést a CD4⁺ sejteknek azok nyirokcsomón keresztüli migrációja során (Freer et al. 2007, Sprague et al. 2008). Később a viraemia csökkenését figyelték meg, ami a szervezetben kialakult immunválasznak volt köszönhető. Élénk, bár igen kis határfokú humorális immunválaszt tapasztaltak, amely főleg a vírus burok, kapszid és transzmembrán fehérjéi ellen irányul. Az első ellenanyagok a fertőzést követő 2–4 héten jelennek meg a vérben, habár kis mennyiségű vírussal történő beoltás eredményezheti az immunválasz későbbi manifesztálódását. Kimutatták, hogy a korai CD8⁺ T-sejtek által mediált, nem specifikus, nem sejtkárosító immunválasz célja elnyomni a korai vírusreplikációt, amely a virális mRNS-transzkripciógátlását jelenti (Leutenegger et al. 2000, Hohdatsu et al. 2002, Li et al. 2005). Ilyen gátló funkciók már egy héttel a fertőzés után megfigyelhetők a szervezetben, mielőtt detektálható lenne a vírusspecifikus, cytotoxikus T-sejtaktivitás, amely csak hetekkel később éri el tetőpontját. A replikáció gátlása a tünetmentes időszakban is tart, csak a krónikus fázisban csökken.

A heveny fertőzés után a szervezet klinikailag tünetmentes fázisba lép, bár ez nem tipikus látens fertőzés, amely során nem figyelhető meg számottevő vírusszaporodás. Épp ellenkezőleg, a FIV patomechanizmusa során a tünetmentes időszakban is történik replikáció, a vírus kimutatható a vérben keringő lymphocytákból, a szérumból, a plazmából, a liquorból, az ondóból és a nyirokszövetekből. A virális RNS mennyisége a fertőzés terminális szakaszában fog ismét emelkedni.

A FIV számos sejtípust támad meg a fertőzés során, de ellentétben a HIV-vel, nem a CD4 molekulákat használja kötődési receptorként, hanem a CD134 fehérjét és egy CXCR4 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 4) nevű kemokin receptort (de Parseval et al. 2004 és 2006). A CD134 fehérje többségében a CD4⁺ sejteken expresszálódik, aktiváció hatására pedig a kifejeződés mértéke fokozódik, így a vírusbejutás és következményesen a vírusprodukciónak is. A CXCR4-receptor több sejtípuson is megjelenik, többek között lymphocytákon, monocytákon, macrophagokon, dendritikus sejteken és astrocytákon is. Troth és mtsai kimutatták azonban, hogy nem mindegyik sejt rendelkezik ezzel a receptorral, amit a vírus mégis megfertőz, és fordítva: nem minden sejtípushoz kapcsolódik a vírus, amin

van CXCR4-receptor. A fertőzött sejteket fluoreszcenciás jelöléssel és real-time PCR-rel csoportosították aszerint, hogy expresszálnak-e CXCR4 molekulát. A legnagyobb pozitivitást a nyirokcsomóból nyert fertőzött sejtekkel érték el, míg a legkevesebb ilyen molekulát a csontvelőből vett sejtek tartalmazták (Troth et al. 2008).

A FIV-fertőzés kórfejlődésére legjellemzőbb változás a normál immunválasz progresszív zavara, amelynek során a perifériás vérben és nyirokcsomókban csökken a CD4⁺ sejtek száma. A sejttség csökkenésének különböző okai lehetnek, mint a csontvelő vagy a csecsemőmirigy fertőzése miatti csökkent termelés, a fertőzött sejtek szétesése vagy immunsejtek általi bontása, illetve apoptózis. Fertőzött macskákban megfigyelték a CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocyták és B-lymphocyták apoptózisát a nyirokcsomókban, a lépben és a thymusban (Garg et al. 2004). Az apoptózis mértéke fordított arányban áll a CD4⁺ sejttség csökkenésével és a CD4⁺/CD8⁺ arány változásával. Molekuláris vizsgálatokkal kimutatták, hogy az apoptózis kiváltásában legfőbb szerepe az *env* gén által kódolt fehérjének van, amihez szükséges a CXCR4-kötés is. Ennek a reakciónak a hatására a közvetlen közeli sejtek is apoptotizálnak (ún. „bystander hatás”) (Garg et al. 2004).

Újabb kutatások rávilágítottak az immunválasz csökkent mértékének egy másik okára (Fogle et al. 2010). A CD4⁺ sejtek egy csoportjának, az ún. T_{reg}-lymphocytáknak (a T-regulatory elnevezésből) az aktivitását figyelték meg. Normál körülmények között ezek a sejtek képesek mind az antigén-specifikus, mind a nem-specifikus immunszuppresszióra. FIV-fertőzött egyedekben azt találták, hogy a T_{reg}-sejtek aktivitása elsősorban az akut és a terminális szakaszban figyelhető meg. Gátolják a CD8⁺ sejtek INF- γ -termelését, ezzel rontva az immunrendszer hatékony reakcióját a FIV-fertőzésre, illetve egyéb kórokozók jelenlétére. Többek között ez is oka a betegség során gyakran megjelenő opportunistá patogének térnyerésének. Ezt mutatja az a kísérlet is, amelyben a T_{reg} sejtek felületi CD25^{hi} fehérjéje ellen termelt monoklonális ellenanyaggal gátolták ezen sejtek aktivitását, így a szervezet képes volt egy erősebb humorális immunválasz kifejtésére idegen antigének megjelenése esetén (Mikkelsen et al. 2010).

A HIV-hez hasonlóan, a FIV-fertőzés egyik jellemző vonása a CD4⁺/CD8⁺ arány eltolódása, amely bekövetkezhet hetek vagy akár hónapok alatt is. Ez az eltolódás a CD8⁺ sejtek arányának növekedésével jár a CD4⁺ sejtek pusztulása miatt. Habár a HIV-fertőzés esetében ezt az arányeltolódást sikeresen alkalmazzák diagnosztikai/prognosztikai tényezőként, a FIV-fertőzés során ezt nem lehet figyelembe venni (Diehl et al. 1996). Nincs összefüggés ezen sejtek aránya és a klinikai fázis vagy a viraemia mértéke között, illetve súlyos fokú eltolódás mellett is sokszor tünetmentes az egyed (Goto et al. 2002).

Számos egyéb immunológiai rendellenességet tapasztaltak FIV-fertőzés esetén, ilyen például a lymphocyták csökkent funkciója az idő előrehaladtával. Elvesztik a képességüket a proliferációra mitogén hatás esetén, illetve csökken egyes felületi fehérjék (CD3, CD4, MHC-II-antigének, egyéb cytokinreceptorok) expressziója. Ennek során zavart szenved az antigénprezentáció és az immunválasz kontrollálása (Beebe et al. 1994).

További változásokat figyeltek meg a nem-specifikus védekezőrendszer működésében, például romlik a neutrophil granulocyták bakteriális termékek által kiváltott adhézíós és migrációs képessége. Ez a funkció javult GM-CSF (granulocyt-macrophag kolóniastimuláló faktor) kezelés hatására. A natural killer (NK) sejtek aktivitásában is változás következett be, ami a heveny szakaszban csökkent, a tünetmentes fázisban pedig fokozódott (Heit et al. 2006).

A fertőzött egyedekben ugyancsak észleltek hypergammaglobulinaemiát, amely főleg az emelkedett IgG-szint miatt következett be. Habár ez az IgG-szintnövekedés nem teljesen FIV-specifikus, tanulmányok kimutatták FIV-vel fertőzött specific-pathogen free (SPF) egyedekben is az emelkedést, így az bizonyíthatóan a FIV hatására következett be. Tapasztalták még a keringő immunkomplexek mennyiségének növekedését is, valamint az IgM-IgG izotípus váltás időbeni eltolódását (Sparger 2012).

6.4. Klinikum, tünetek

A klinikum tárgyalása során is érdemes a két vírust különválasztani.

6.4.1. A FeLV-fertőzés klinikuma

Tünetek széles skáláját figyelhetjük meg a FeLV-fertőzés kapcsán, amelyek kialakulását több tényező is befolyásolhatja. A vírusfertőzés kimenetele függ az állat életkorától: minél fiatalabb a macska, annál fogékonyabb a progresszív kórfejlődésre. Ha az állat még kölyök a vírussal való találkozáskor, akkor súlyos thymussorvadást és immunszuppressziót (ún. „fading kitten syndrome”) figyelhetünk meg (Levy 2000). Az életkor előrehaladtával rezisztenciára tesz szert az egyed, nagyobb az esélye abortív vagy regresszív fertőzésnek, vagy kevésbé markáns tünetek kialakulásának progresszív fertőzés során.

A FeLV-hez kapcsolódó tüneteket általában az alábbiak szerint csoportosítjuk:

- *Daganatos betegségek*

Leggyakrabban lymphomával vagy leukaemiával találkozhatunk, de előfordulnak egyéb hematopoietikus daganatok is, amelyeknél kimutatható a FeLV jelenléte (Hardy 1978,

Cotter 1998) (5. ábra). A daganatok kialakulása magyarázható a vírusnak a gazdasejt genomjába történő integrálódásával (ún. „inzerációs mutagenesis”): ha ez egy proto-onkogén régió mellett történik, akkor létrejöhet a gén aktivációja és hyperexpressziója, ezzel a gazdasejt kontrollálatlan proliferációja (Fujino et al. 2008). Ha a vírussal az onkogén szakasz is replikálódik, akkor rekombináns vírus jöhet létre (pl. FeLV-B), és ez más gazdasejtet fertőzve szintén tumorképződést válthat ki.



5. ábra: Alimentaris típusú lymphoma kórbonctani képe, nyirokcsomóáttétellel

A: Daganat a jejunum bélszakaszon [zöld nyíl], metastasis a mesenterialis nyirokcsomóban [sárga nyíl]; B: Látható, hogy a tumoros bélszakaszon a bélfal arrodálódott, így béltartalom jutott ki a hasüregbe hashártyagyulladást előidézve; C: A tumoros bélszakasz felnyitása után, látható a bélfal jelentős megvastagodása

Macskákban a lymphoma és leukaemia különböző formái a daganatos betegségek 30%-át teszik ki. Korábban ezek háttérében 80%-ban fordult elő FeLV-fertőzés, de mára ez – főleg a vakcinázás elterjedése és a szűrőprogramok szélesebb körűvé válása miatt –

jelentősen csökkent (Hardy 1978 és 1981, Kronic et al. 2015). Ezen tumorok eredetének interpretálása azonban nehéz, mivel néhány esetben negatív teszteredményt kapunk, mégis a FeLV-fertőzés áll a daganatképződés hátterében: ilyenek a regresszív fertőzés (ilyenkor nincs viraemia), vagy az egyéb sejtek FeLV-fertőzése miatti cytokin-kibocsátás, vagy krónikus immunstimuláció kiváltotta onkogenezis (Hartmann et al. 1998).

Macskák esetén a lymphoma általában high-grade (nagy malignitási fokozatú), immunoblastos vagy lymphoblastos jellegű, néhány esetben kevert lymphoblastos-lymphocytás, ritkán low-grade (kis malignitási fokozatú) lymphocytás karakterű. Az is megállapítható, hogy a FeLV-asszociált lymphomák általában T-sejteredetűek, míg a FeLV-negatív lymphomák általában B-sejteredetűek (Valli et al. 2000, Wang et al. 2001, Kiselow et al. 2008).

A leukaemia általában a lymphoid sejtvonalat érinti, de előfordulhat bármelyik hematopoietikus vonal érintettsége, ezzel myeloproliferatív betegség vagy myelodysplastikus szindróma kialakulása is (Hisause et al. 2001). A lymphoid vagy myeloid leukaemia prognózisa rossz: a csontvelőt éretlen sejtalakok töltik ki, és a normál vérsejtképződés zavart szenved (Kiselow et al. 2008). A tünetek ennek megfelelően levertség, anaemia, vérzékenység thrombocytopenia miatt, vagy szepszis neutropeniás jelleggel. Az extramedullaris hematopoiesis vagy malignus sejtinfiltráció miatt gyakran jelentkezik májmegnagyobbodás (és icterus), valamint lépmegenagyobbodás (**6. ábra**).



6. ábra: FeLV-fertőzés következtében kialakult icterus

(A) szájnyalkahártyán, (B) kötőhártyán, (C) fülkagylón, valamint splenomegalia (zöld nyíl) és hepatomegalia (kék nyilak) az extramedullaris hematopoiesis következtében (D)

1973-ban felfedeztek egy antigént („feline oncornavirus cell membrane antigen”, FOCMA), ami a tumoros transzformáción átesett sejtek felületén helyezkedik el, míg a normál macska-lymphocyták felületéről hiányzik. Azonban a FOCMA jelenlétének vizsgálata, annak diagnosztikai jelentősége kétséges, mert bár jelen van például a macska sarcomavírusa (feline sarcoma virus, FeSV) által fertőzött sejtek felületén is, de nem minden esetben található meg FeLV miatti daganatképződés során. A FOCMA jelenléte vagy hiánya nagy részben független a FeLV-fertőzöttségtől (Essex és Snyder 1973, Essex 1975, Hardy et al. 1977, Snyder et al. 1978).

Egyéb daganatok is előfordulhatnak azonban FeLV-háttérrel: a FeLV-A rekombinációja a gazdasejt celluláris onkogénjével létrehozza a FeSV-t, és fibrosarcoma-képződést indukál (Ellis et al. 1996). Ez a tumortípus lokálisan invazív, általában multiplex

megjelenésű a bőrben, bőr alatti kötőszövetben, és gyorsan képez áttétet egyéb szövetekbe (pl. tüdőbe). Nem összetévesztendő a solitaer fibrosarcomával idősebb macskáknál. A vakcinák (és egyéb injekciók) által kiváltott forma az ún. „injection site sarcoma” (ISS; korábbi nevükön „vaccine associated sarcomák”), amely a beadás helyén jön létre granulomatózus gyulladásos háttérrel, nem pedig FeLV és/vagy FeSV jelenléte miatt (Roccabianca et al. 2016).

További két daganattípust írtak le még a vírusfertőzés kapcsán, amelyek nagyobb prevalenciával jelentek meg FeLV-fertőzött macskákban: a multiplex osteochondromát (feline osteochondromatosis, lásd később), illetve a szaglószerű (olfactorius) neuroblastomát, habár ezek kórfejlődése nem tisztázott (Lott-Stolz 1988, Schrenzel et al. 1990).

• *Hematológiai rendellenességek*

A korábban említett leukaemia mellett a FeLV-fertőzéshez gyakran társul nem neoplasztikus jellegű vérképzési zavar a csontvelő szuppressziója miatt. A myelodysplastikus szindróma vagy myelofibrosis létrejöttéhez az esetek többségében aktív vírusreplikáció szükséges, de ritkán előfordulhat csontvelőszuppresszió regresszív fertőzés kapcsán is.

A leggyakrabban anaemia tapasztalható a beteg macskákban, amely az esetek kb. 10%-ában regeneratív típusú, ilyen pl. az immunszuppresszió miatti *Mycoplasma haemofelis* okozta haemolytikus anaemia és az immun-haemolytikus anaemia (George et al. 2002, Solano-Gallego et al. 2006). Az esetek 90%-ában nem-regeneratív anaemiáról beszélünk, ahol vagy a vérképző őssejtek fertőződnek a vírussal (pl. „pure red cell aplasia” FeLV-C fertőzés során, ahol az erythroid progenitor sejtek érintettek), vagy egyéb okok állnak a háttérben (pl. idült gyulladás miatti citokinfelhalmozódás, ún. „anaemia of chronic disease”). Előfordulhat még thrombocytopenia vagy thrombocytopathia, lymphopenia, perzisztens, tranziens vagy ciklikus neutropenia, pancytopenia (aplasztikus anaemia) és panleukopenia-szerű (panleukopenia-like) szindróma (Shelton és Linenberger 1995, Shimoda et al. 2000, Gleich és Hartmann 2009, Southard et al. 2016).

A panleukopenia-like szindróma (másik nevén FeLV-asszociált enteritis vagy myeloblastopenia) során súlyos fehérvérsejtszám-csökkenéssel, bélgyulladással és a bélhámsejt-kripták pusztulásával találkozunk. A legújabb kutatások azonban kimutatták a carnivore protoparvovirus 1 (CPV-1; korábbi nevén feline panleukopenia virus [FPV]) jelenlétét a bélhámsejtekben, így a mai feltételezés szerint nem egyedül a FeLV-fertőzés áll a szindróma mögött, hanem az egy FeLV és CPV-1 közötti társfertőzés eredménye. A

tünetek között szerepel véres hasmenés, anorexia, levertség, hányás, szájüregi gyulladás és fekélyképződés, testsúlycsökkenés (Lutz et al. 1995, Hartmann 2012a).

- *Immunszuppresszió*

Az FeLV-fertőzés egyik legfontosabb klinikai következménye a FIV-fertőzésnél is súlyosabb immunszuppresszió, aminek következtében fogékonyabb lesz az egyed szervezete másodlagos fertőzésekre (Rojko et al. 1988, Solano-Gallego et al. 2006). Számos bakteriális, virális, parazitás és gombás megbetegedést leírtak, azonban fontos tudni, hogy ezek legnagyobb hányada kezelhető.

Az immunrendszer működéscsökkenésének mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, az immunszuppresszió mértéke rendkívül változatos lehet a beteg macskák közt. Feltételezik a FeLV-T szerepét, ami egy membránreceptor molekula (Pit1) és egy koreceptor fehérje (FeLIX) segítségével támadja a T-lymphocytákat (Lauring et al. 2002, Shalev et al. 2009). Ennek során előfordulhat thymusatropia, a nyirokcsomók paracortikális zónájának lymphoid depletioja, lymphopenia, neutropenia, megváltozott CD4⁺/CD8⁺ sejtarány (a CD4⁺ sejtszám csökkenése miatt) (Quackenbush et al. 1990, Hoffmann-Fezer et al. 1996, Lauring et al. 2001).

- *Egyéb megbetegedések*

Az immunmediált kórképek közül fontos megemlíteni az autoimmun haemolytikus anaemiát és a hypergammaglobulinaemiát (bár kevésbé jellemző, mint FIV esetén), ami az immunrendszer túlműködése következtében jön létre válaszul az idült fertőzésre (Miró et al. 2007). Az itt keletkező ellenanyagok nem neutralizáló jellegűek, és így gyakran immunkomplex-képződést indukálnak. Az immunkomplexek lerakódása miatt glomerulonephritist, uveitist, polyarthritist és vasculitist tapasztalhatunk a kórbonctani és kórszövettani vizsgálat során (Pedersen 1988, Kohn et al. 2006).

Neuropathiát is viszonylag sokszor megfigyelhetünk, aminek leggyakoribb oka a lymphoma vagy lymphocytás infiltráció az agy- és gerincvelőben, valamint következményes nyomásfokozódás (compressio), másik oka lehet a FeLV-indukálta neurotoxicitás. Egyes burok-glycoproteinek képesek intracellularisan a szabad kalcium mennyiségét növelni, ezáltal neuronelhalást előidézni (Fails et al. 1997, Mitchell et al. 1997). A tünetek közé tartozik az ataxia, anisocoria, mydriasis, vakság, nystagmus, Horner-szindróma, hyperaesthesia, paresis. Kórszövettani vizsgálattal megfigyelhető a fehérállomány degenerációja, a myelinhüvely kitágulása és az axonok duzzanata az agy- és gerincvelőben, immunhisztokémiailag pedig látható a p27 antigén jelenléte az idegsejtekben, gliasejtekben és endothelsejtekben (Carmichael et al. 2002). Viselkedésbeli változások is tetten érhetők

olykor, a tünetek közt szerepel a pszichotikus viselkedés, megszállott kóborlás, demencia, zavart alvásminőség.

FelLV-fertőzött anyák transzplacentaris úton fertőzhetik a magzatokat, így számos reprodukciós zavart megemlíthetünk, mint embriófelszívódás, vetélés, korai magzatelhalás, de a bakteriális endometritis sem ritka, főleg a neutropeniás állatokban (Cotter 1998).

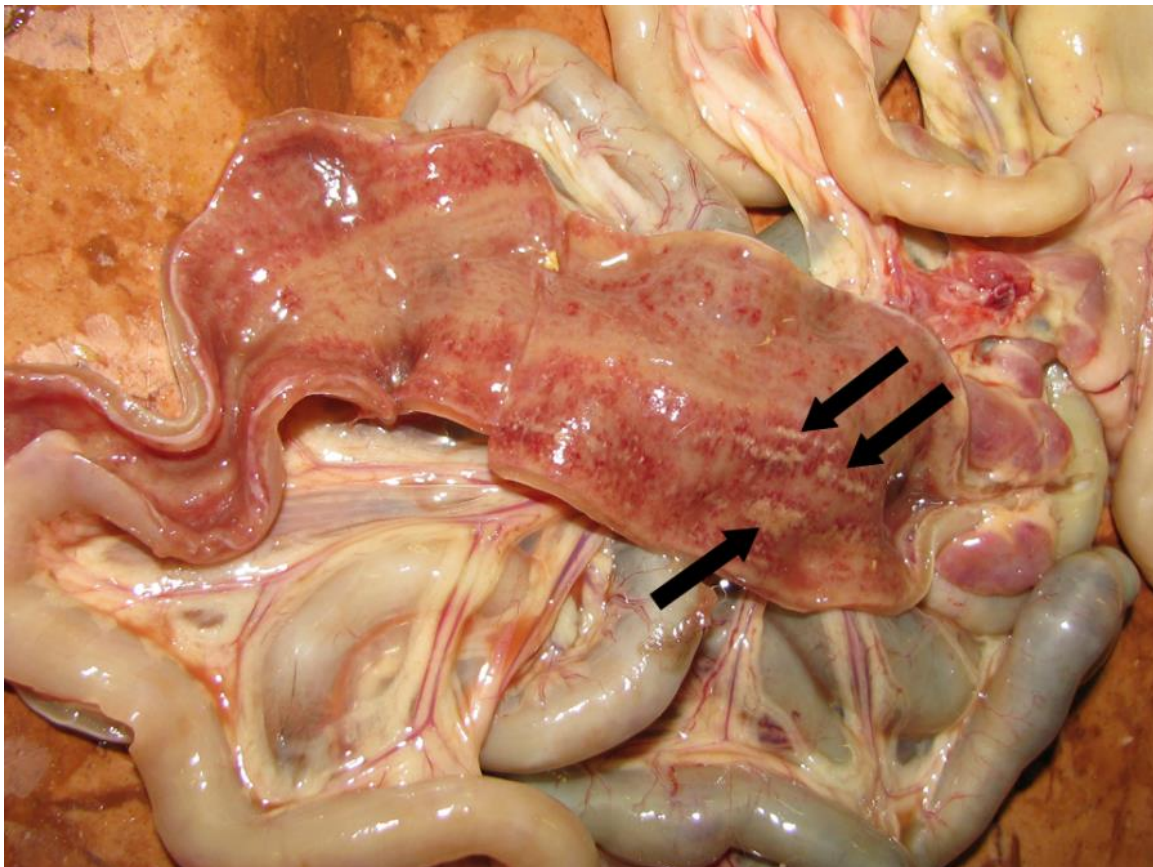
6.4.2. A FIV-fertőzés klinikuma

A FIV klinikai lefolyása során számos stádium különíthető el. Megkülönböztetnek akut fázist, tünetmentes fázist és terminális szakaszt, amelyre mint a „macska szerzett immunhiányos szindrómájára” (FAIDS, feline acquired immune deficiency syndrome) hivatkoznak. Egyes kutatók további szakaszokat különítenek el a HIV terminológiáját alapul véve: a tünetmentes fázis után lévő progresszív generalizált nyirokcsomó-megnagyobbodást, és az utána következő AIDS-hez kapcsolódó tünetcsoportot (AIDS-related complex, ARC) (Ishida és Tomoda 1990). További kutatók még egy hatodik szakaszt is megkülönböztetnek, amely magában foglalja a különböző másodlagos betegségeket a FIV lefolyása során.

Habár didaktikailag jól nyomonkövethetők ezek a fázisok, a kórlefordulás során nem lehet őket egyértelműen elkülöníteni, sőt néhány esetben egyes szakaszok ki is maradhatnak. Prognosztikai értéke kétes, de megfigyelték, hogy minél nagyobb mértékű a viraemia az akut fázisban, annál gyorsabban progrediál a fertőzés a terminális szakaszba (Goto et al. 2002). A HIV-fertőzéssel ellentétben azt találták, hogy azok az egyedek, amelyek az FAIDS-fázisban vannak (jelentős vírusterheltség és súlyos klinikai tünetek), még felépülhetnek, és újra tünetmentes szakba léphetnek, amelynek során csökken a vérben keringő vírus mennyisége is.

A klinikai tünetek változatosak és nem specifikusak, gyakran nagyon enyhék, illetve átmenetiek, így észrevétlenek is maradhatnak a heveny fázisban. A leggyakrabban előforduló tünetek többek között a láz, bágyadtság, testtömegvesztés, szájgyulladás (stomatitis), ínygyulladás (gingivitis), heveny bélgyulladás és hasmenés, bőrgyulladás (dermatitis), kötőhártya-gyulladás (conjunctivitis), tályogok, légzőszervi problémák, veseelégtelenség, idegrendszeri tünetek. A stomatitis a fertőzés bármely szakaszában előfordulhat, sokszor kíséri fogfelszívódás (tooth resorption, TR; korábban feline odontoclastic resorption syndrome, FORL). Ez azonban nem specifikus tünet, mivel a vírusfertőzések számos alkalommal idéznek elő különböző fokú száj- és ínygyulladást (gingivostomatitist). Hasmenés is előfordul, bár bakteriális kórokozót nem lehet általában kitenyészteni. Másodlagosan azonban előfordulhat bakteriális túlszaporodás, illetve enyhe

fokú bélgyulladás, több esetben azonban megfigyeltek súlyos fokú, elhalással kísért colitist is (7. ábra) (Stover és Watson 2015).



7. ábra: Elhalásos colitis (a nyilak az elhalt nyálkahártya területeket mutatják)
Dr. Jakab Csaba felvétele

Az akut szakaszban, ami pár naptól akár hetekig is húzódhat, nagyon gyakori a generalizált nyirokcsomó-megnagyobbodás.

A tünetmentes időszak hossza több tényezőtől is függ, úgy, mint a fertőzőskori életkor, a vírus patogenitása, vagy az egyed egyéb patogéneknek való kitettsége. Általában évek telnek el tünetek mutatkozása nélkül.

A fertőzés későbbi szakaszában, a terminális fázisban, a klinikai tünetek megfelelnek a különböző oportunisták kórokozók által okozott betegségeknek, daganatos megbetegedéseknek, myeloszuppresszióknak és idegrendszeri betegségeknek. A betegség végső stádiumában gyakran tapasztalható az ún. „wasting syndrome”, azaz az egyed krónikus fogyása és izomsorvadás megjelenése (Matsumura et al. 1993).

Az idegrendszeri tünetek megjelenése függ a vírus típusától (Phillips et al. 1994). Legtöbbször viselkedésváltozást tapasztalnak, de megjelenhetnek még görcsök, bénulás,

multifokális motoros funkciózavar, rosszabb tanulási készség és zavart alvásritmizációt. Ezek a tünetek idővel javulhatnak, ha az akut szakaszban jelentkeztek, de lehetnek visszamaradó elváltozások is. Noha ezek a neurológiai tünetek általában a FIV következményei, dokumentáltak eseteket, amelyeknél egyéb fertőzések (macskák fertőző peritonitise [feline infectious peritonitis, FIP], toxoplasmosis, cryptococcosis) okozták a tüneteket (Phillips et al. 1994).

FIV-fertőzés során közvetlenül vagy szekunder kórokozók által kialakulhat elváltozás a szemben is (English et al. 1990). Leírtak többek között anterior uveitist, glaucomát, pars planitist, fokális retina degenerációt és retinavérzéseket is.

A leggyakrabban megjelenő opportunist fertőzéseket előidéző kórokozók a következők: FeLV, calicivírus, papillomavírus, bornavírus, *Mycoplasma haemofelis*, egyéb *Mycoplasma* spp., *Dermatophyta* spp., *Babesia felis*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. A sűrűn előforduló daganattípusok: lymphoma, leukaemia, myeloproliferatív betegségek, laphámrák, emlőmirigy-adenocarcinoma, mastocytoma, bronchoalveolaris carcinoma.

A FIV-asszociált lymphomákról általában elmondható, hogy high-grade B-sejtes típusúak, extranodalisak, és a FIV-nek lehet közvetlen onkogén szerepe vagy közvetett (krónikus B-sejt hyperplasia, csökkent sejtes immunválasz) behatása a kialakulásukban (Beatty 2014).

6.5. Diagnosztikai lehetőségek

Számos klinikopatológiai tünetet és elváltozást figyelhetünk meg közvetlenül vagy közvetve retrovírusfertőzés kapcsán, ám egyik sem specifikus vagy patognomisztikus a vírusokra nézve.

FeLV-fertőzés során nem specifikus hematológiai eltérésekkel találkozunk, ezek közül a leggyakoribb (az esetek több mint felében fordul elő) az anaemia és thrombocytopenia, valamint a fertőzött macskák hajlamosabbak a neutropeniára, lymphocytosisra (Gleich és Hartmann 2009, Biezu et al. 2019a).

FIV-nél a heveny szakaszban leggyakrabban megfigyelhető a neutropenia és lymphopenia, melyek rendeződnek, mire a macska a tünetmentes fázisba lép (Linenberger és Abkowitz 1995). Ebben a szakaszban tehát általában fiziológiás vérlabor értékeket tapasztalnak, de előfordulhat leukopenia, ritkábban anaemia és neutropenia. A kutatások alapján a neutropenia volt szignifikáns, a fertőzött macskák 25%-a mutatta. Az anaemia általában nem-regeneratív jellegű, és megjelenhetnek a normálistól eltérő morfológiájú vörösvérsejtek is. Kevésbé gyakran, de előfordulhat thrombocytopenia vagy pancytopenia.

Ezek a változások feltehetően a csontvelő korlátozott működése és károsodása miatt figyelhetők meg (Fujino et al. 2009). A biokémiai paraméterek általában nem mutatnak eltérést, de tapasztalhatunk emelkedett összfehérjeértéket hyperglobulinaemia miatt, illetve azotaemiát (Linenberger és Abkowitz 1995). A többi eltérés feltehetőleg a konkurrens betegségek következménye, nem közvetlenül a FIV okozza azokat (Reggeti és Bienzle 2004). Ritka esetekben (neurológiai tünetek mellett) a liquorban a sejtek pleiocytosisa, valamint az IgG-koncentráció emelkedése fordul elő. FIV RNS liquorban való jelenléte esetén valószínűsíthető az agyvelő érintettsége.

Az eddigi tudásunk alapján elmondható, hogy FeLV-fertőzés esetén gyakrabban figyelhető meg hematológiai eltérés a laborvizsgálatok során, mint FIV okozta megbetegedésben (Gleich és Hartmann 2009).

6.5.1. Szerológiai vizsgálatok

Jelenleg többféle módszer is rendelkezésünkre áll, amellyel kiszűrhető az állat retrovírus-fertőzöttsége. A leggyakrabban használt módszerek ELISA-típusúak. Ezek közül léteznek egyszerre több minta vizsgálatára alkalmas ún. microwell rendszerek, illetve egyedi tesztlésre alkalmas ún. migrációs gyorsteszték. Az ELISA-teszték előnye, hogy gyorsan és könnyen kivitelezhetők (főleg a migrációs gyorsteszték), akár a vizsgálóasztal mellett is elvégezhetők, és olcsók.

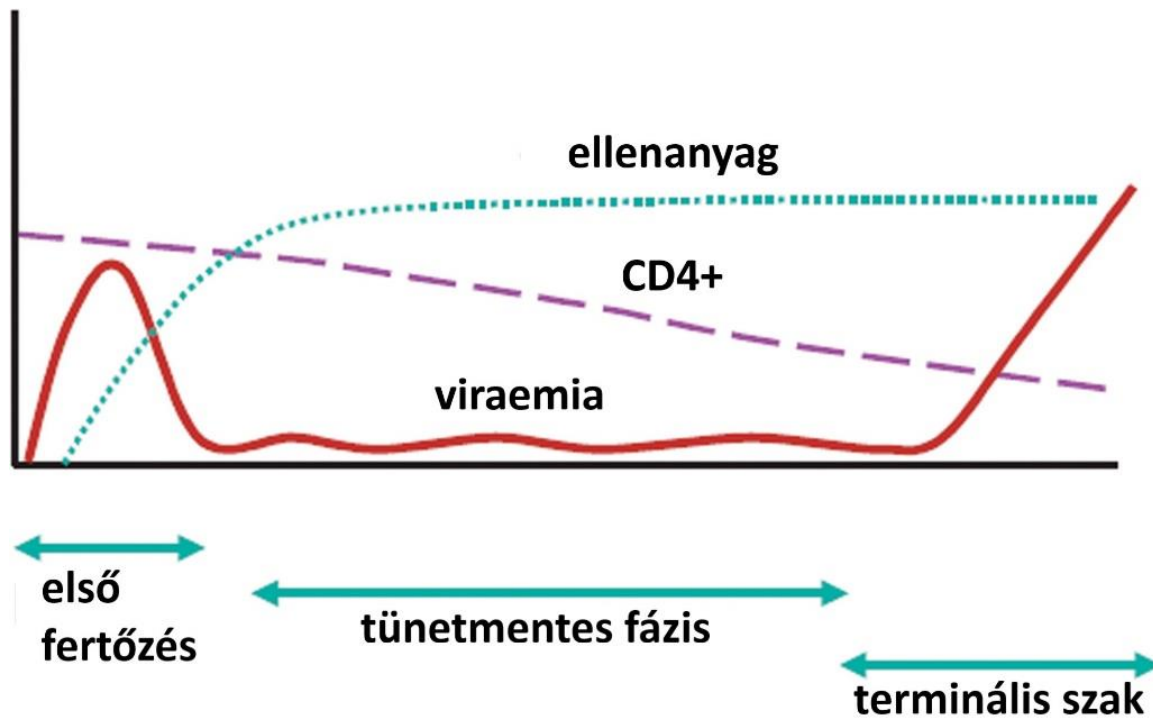
Ezekkel a módszerekkel FeLV esetén általában a p27 burokantigén jelenlétét tudjuk kimutatni vérből, aminek előnye, hogy nem befolyásolja a macska vakcinázottsága vagy akár a maternális immunitás, hátránya ellenben, hogy így csak a viraemiás szakaszban lévő állatokat tudjuk kiszűrni. A tesztek már a fertőzés korai szakaszában pozitív eredményt adnak (akár 1 héttel a fertőzés után), még a csontvelő érintettsége előtt, emiatt nagy megbízhatósággal alkalmazhatók (Borsberry 2002). Érdeemes figyelembe venni, hogy míg a teljes vérből elvégzett gyorstesztéknél a téves eredmény lehetősége fokozottabban fennáll a haemolysis miatt, ez nem áll fenn plazma vagy szérum használata esetén, megfontolandó tehát ezeknek a használata. Ugyanígy jóval nagyobb a téves eredmény esélye (a tesztek csökkent szenzitivitása miatt) könny- vagy nyálminta vizsgálata esetén, amik így sokszor téves pozitív eredményt generálnak (Liu et al. 2016, Levy et al. 2017, Westman et al. 2017).

FIV-nél az ELISA-teszték többsége a p24 antigén ellen képződött ellenanyagok jelenlétét vizsgálja a mintában (Bienzle et al. 2004), kisebb hányada a gp40 vagy p15 antigén ellen képződött ellenanyagok meglétét. Általában elmondható, hogy az ellenanyagok a fertőzést követően 8 héten belül megjelennek, ez alól igen ritka a kivétel (MacDonald et al. 2004). Előfordulhat téves pozitív vagy negatív teszteredmény is, ha erre gyanú merül fel,

akkor javasolt a minta újbóli vizsgálata akár másik gyártmányú gyorseszttel, akár Western blot vagy egyéb megerősítő technikával (Hartmann et al. 2007). FIV-fertőzés esetében a szerológiai tesztek használata megbízható, mivel a vírus perzisztens fertőzést alakít ki, így a keringő ellenanyagok is állandóan jelen vannak a vérben, megfelelő mennyiségben. Ami esetleg problémákat vethet fel, az az Ausztráliában, Új-Zélandon és Japánban (korábban az USA-ban és Kanadában is) használatban lévő inaktivált vakcina (Fel-O-Vax FIV; Boehringer Ingelheim, Németország), amely fals pozitív eredményt adhat a szerológiai vizsgálat során, így ha nem ismert az egyed vakcinázási státusza, nehéz elkülöníteni a vadvírus fertőzéstől. Szerológiai vizsgálattal egyelőre csak néhány gyorseszttel lehetséges megkülönböztetni a vadvírus kiváltotta ellenanyagválaszt a vakcina indukálta ellenanyagoktól, de a többségükkel ez nem lehetséges (Crawford és Levy 2007, Westman et al. 2019, Westman et al. 2021). Ilyen esetben PCR-vizsgálat szükséges, mivel a vakcina nem generál provírustermelést a szervezetben, így a vadvírusfertőzés és vakcinaeredetű pozitívítás elkülöníthetővé válik (Andersen és Tyrrell 2004, Westman et al. 2019). További problémát vet fel az egyes altípusok általi felülfertőződés (Okada et al. 1994), amelynek során akár a vakcina (ami A és D altípust tartalmaz) mellett is megjelenhet egy másik szubtípus által kiváltott fertőzés. Jelenleg Magyarországon nem használnak vakcinát többek között annak megbízhatatlansága és a diagnosztikában okozott nehézségek miatt.

FIV-fertőzöttség szempontjából téves pozitív eredményt adhat az is, ha hat hónaposnál fiatalabb kölyköt vizsgálunk, mivel a maternális ellenanyagok 12 hétig perzisztálhatnak (MacDonald et al. 2004). Ha ennél korábban vizsgáljuk az egyedet, akkor javasolt annak ismétlése 8–12 hét elteltével, hiszen ritkán ugyan, de a kölykök fertőződhetnek az anyától. Ha az ismételt vizsgálat is pozitív eredményt ad, akkor szinte biztosak lehetünk a fertőzésben. Ha ez a teszt negatív, akkor az előző vizsgálatnál valószínűleg csak az anyai ellenanyagok váltották ki a pozitív eredményt.

Egy másik felmerülő probléma, hogy a fertőzés heveny szakaszában az egyed még lehet szerológiailag negatív, így nem múló tünetek/fertőzésnek való kitettség esetén ajánlatos az újabb vizsgálat elvégzése 6–8 hét elteltével (**8. ábra**), vagy a PCR.



8. ábra: A FIV kórfejlődése során fellépő vírus- és ellenanyagszintek, valamint CD4⁺ lymphocyták szám alakulása (Westman et al. 2019 alapján)

Hasonló helyzet állhat elő a fertőzés terminális szakaszában, amikor az immunrendszer annyira legyengülhet, hogy már nincs megfelelő mértékű ellenanyagtermelés. Ekkor javasolt Western blot vagy PCR-vizsgálat elvégzése, melyek sokkal érzékenyebbek, így a kisebb mennyiségű vírust/ellenanyagot is kimutatják (Hartmann et al. 2007).

Javasolt a fertőzés kockázatának megfelelően rendszeresen tesztelni a macskákat, illetve, ha új állat érkezik egy retrovírus-negatív állományba, akkor az új állatot szűrni kell megérkezésükkor, majd 60 nappal később (addig lehetőleg a többiekétől elkülönítve kell tartani). A pozitív eredményű tesztet javasolt a későbbiekben megismételni megerősítés céljából (AAFP 2020).

További kimutatási lehetőség a direkt fluoreszcens ellenanyag (DFA) kimutatás, amit vér- vagy csontvelő keneten lehet elvégezni. Ehhez speciális felszereltség és fluoreszcens mikroszkóp szükséges, illetve minimum 3 hetes fertőzöttség, amikor már a csontvelő is érintett. Ezek miatt ez a módszer szűrővizsgálatként nem alkalmas.

Antigén kimutatására alkalmas ELISA-teszt nem alkalmazható a FIV esetében, mivel a fertőződés után az állat élete végéig csak csekély antigénmennyiség kering a vérben (Uhl et al. 2002). FeLV esetén pedig az ellenanyagvizsgálat ütközik korlátokba, mivel széles

körben használnak vakcinákat, illetve progresszív fertőzés esetén sokszor nincs jelen megfelelő mennyiségű ellenanyag a keringésben.

6.5.2. Víruskimutatás

Amennyiben megerősítő vizsgálatra van szükség valamilyen okból kifolyólag (pl. a gyorsteszt kétes eredménye), úgy az ELISA-tesztek mellett egy szintén viszonylag könnyen elérhető lehetőség a PCR-vizsgálat (Arjona et al. 2007). Ez idő- és költségigényesebb, speciális felszereltséget és munkaerőt kíván, de az ELISA-vizsgálattal ellentétben itt nem csak a viraemiás szakban lévő macska szűrhető ki, hanem akár a regresszív vagy látens fertőzöttség is megállapítható a provirális DNS jelenléte miatt. Ez a módszer emiatt igen érzékeny és specifikus (Cattori et al. 2008, Wilkes et al. 2018). FeLV-nél nem áll fenn olyan mértékű változékonyság a genomban, mint FIV esetén, így viszonylag nagy biztonsággal tervezhető megbízható diagnosztikai primerek, de FIV-nél sem lehetetlen ennek a kivitelezése. További előnye a vizsgálatnak, hogy nem csak vérből végezhető, hanem szövetből (pl. lymphoid szövetből, csontvelőből, tumorból) és akár bélsárból is. Hátránya, hogy ha nagyon kevés a keringő virális RNS vagy provirális DNS, akkor a vérből történő kimutatás fals negatív eredményt adhat, csak a real-time PCR mutatná ki ezt a mennyiséget.

Másik kimutatási lehetőség a vírusizolálás, ami azonban nem gyakorlatias, bonyolult, időigényes és szintén speciális felszereltséget igényel. Egyre inkább előtérbe kerül a vírusok sejtszintű kimutatása szövetmintákban immunhisztokémiai módszerekkel vagy *in situ* hybridizációs technikával (FISH, RNAscope) (Fujino et al. 2003).

Összefoglalva elmondható, hogy minden esetben érdemes vizsgálni a macskák fertőzöttségét, mivel az esetleges pozitív eredmény kihat az egyed és társai életére, későbbi gyógykezelésére (akár egyéb megbetegedés során is) és az egyed tartására is. Ha a szerológiai vizsgálat eredménye kétes, akkor javasolt megerősítő vizsgálatként a PCR használata (AAFP 2020).

6.6. Gyógykezelés

A FeLV esetében a fertőzött állat az esetek egy részében több évig tünetmentesen élhet, és a fő veszélyt a vírus által kiváltott immunszuppresszió jelenti, ám egyes esetekben, főleg progresszív fertőzésnél, a már korábban említett klinikai tünetek, megbetegedések lépnek fel, amelyeket kezelünk kell. A daganatos megbetegedések és hematológiai eltérések onkológiai kezelésére a terjedelmi korlátok miatt itt nem térünk ki, csak kifejezetten a FeLV- és FIV-fertőzést célzó terápiákra. A legtöbb esetben a FIV-fertőzött állat gyógykezelés nélkül is több évig tünetmentesen él, az elhullást sok esetben az egyéb opportunisták fertőzései okozzák.

Túlnyomórészt igaz, hogy a fellépő másodlagos megbetegedéseket ugyanúgy kell kezelni, mint egy retrovírus-negatív állat esetében, habár általában hosszabb és intenzívebb terápiát igényelnek. Glükokortikoidokat vagy egyéb immunszuppresszív szereket csak nagyon körültekintően, megfelelő indikációval szabad alkalmazni, a myeloszuppresszív szereket minden esetben kerülni kell (mert megkönnyíthetik a myeloszuppresszív szindróma kialakulását). Fertőzött macskával együtt tartott macskát sem szabadna glükokortikoidokkal kezelni a fellépő immunszuppresszió miatt, mert így fellángolhat egy esetleges regresszív fertőzés vagy könnyebb lehet a vírusok átjutása az addig egészséges macskába (Rojko et al. 1982, Major et al. 2010, Scherk et al. 2013, Helfer-Hungerbuehler et al. 2015b).

A továbbiakban a FeLV- és FIV-fertőzés elleni speciális terápiás lehetőségeket ismertetjük röviden, mivel a legtöbb esetben ezek a hatóanyagok vagy toxikusak terápiás dózisban, vagy nem kellően hatékonyak, illetve többségük kereskedelmi forgalomban nem beszerezhető. Részletesebben mutatjuk be a kereskedelmi forgalomban elérhető, és használható készítmények hatásmechanizmusát és alkalmazását.

6.6.1. Vírusellenes kemoterápia

A legtöbb itt említésre kerülő vírusellenes szert a HIV kezelésére használják, emiatt számos hatóanyag elméletileg alkalmazható a FIV kezelésére is, mivel a két vírus nagyon hasonló tulajdonságú. A FeLV esetében kevésbé találtak hatékonyak egyes hatóanyagokat, feltételezhetően a HIV és FeLV közötti nagyobb különbségek miatt (Greggs et al. 2011 és 2012).

Ezek az antivirális szerek beavatkoznak a vírus replikációs ciklusába. Az alapján csoportosíthatók, hogy hol, illetve milyen mechanizmus által fejtik ki hatásukat. Ezek szerint megkülönböztethetünk **reverztranszkripció-gátlókat**, ezen a csoporton belül pedig három osztályt. Az első ilyen a *nukleozidanalógok* osztálya (zidovudin, stavudin, didanozin, zalcitabin, lamivudin és foszfonilmetoxietil-adenin [PMEA], foszfonilmetoxipropil-diaminopurint [PMPDAP], amdoxovir, racivir, dexelvucitabin), amik közül legszélesebb körben a zidovudint alkalmazzák. Egy kutatásban kísérletesen fertőzött macskáknál profilaktikusan alkalmazva a zidovudint (20 mg/ttkg 12 óránként), megakadályozható volt a perzisztens FeLV-viraemia (szignifikánsan csökkent a keringő p27 antigén) és a csontvelőfertőzés, azonban súlyosfokú anaemia alakult ki több esetben (Tavares et al. 1987). Természetes módon fertőződött macskáknál kezelésként alkalmazva (5 mg/ttkg 12 óránként, hogy elkerüljék a mellékhatások kialakulását) ezt a hatást azonban már nem tudták elérni (még interferon-kezeléssel kombinálva sem, ld. később). Szintén a zidovudin kezelés hatására írtak le javulást egyes klinikai tünetekben (szájgyulladás), illetve változást a CD4⁺, CD8⁺ lymphocyták számában FIV-fertőzésben (van der Meer et al. 2007), de FeLV-nél itt

sem kaptak hasonló eredményeket (feltehetően a kissé eltérő enzimszisztéma miatt). FeLV-fertőzésnél amúgy sem annyira használható az immunfunkció megítélésére a CD4⁺, CD8⁺ lymphocyták száma, vagy a CD4⁺/CD8⁺ arány, valószínűleg a nem szelektív sejtpusztítás miatt (Greggs et al. 2011, Stuetzer et al. 2013, Hartmann 2015). *nukleotidanalóg reverztranszkriptáz-gátlók* (adefovir, tenofovir), amelyek szintén nem túl hatékonyak, és legtöbbször toxikus mellékhatásúak. Az adefovirt hepatitis B fertőzés kezelésére használják, a tenofovir pedig a jelenleg egyik legelterjedtebben használt HIV elleni szer. *In vitro* hatásukat kimutatták mind FIV, mind FeLV ellen, de *in vivo* nem történtek még eredményes kísérletek (Greggs et al. 2012, Hartmann 2015). A következő osztály a *non-nukleozid reverztranszkriptáz-gátlók* (pl. suramin), amikről nem állnak rendelkezésre megbízható kutatási adatok, a harmadik pedig az *egyéb enzimgátlók* osztálya (pl. DNS/RNS-polimeráz gátlók, proteáz gátlók), amik a ciklus egyéb szakaszaiba avatkoznak bele, így gátolva a vírus replikációját, megakadályozva a nukleotidok képzését. Ide tartoznak a foscarnet és ribavirin, amik *in vitro* hatásosnak bizonyultak, de igen toxikusak (nephrotoxicitás, myeloszuppresszió, nyálkahártyák károsítása, kelátképzés, haemolysis, májtoxicitás) (Hartmann 2015).

A reverz transzkripció gátlók mellett a másik csoportba a különböző **receptor-homológok** tartoznak, mint a plerixafor, ami a FIV kezelésében egy kutatás szerint hatékonyan bizonyult (0,5 mg/ttkg sc. 12 óránként) (Hartmann 2015).

Az utolsó csoportba az **integráz-inhibitorok** tartoznak (raltegravir). Ezt a hatóanyagot még a nagyobb dózistartományban is (20–25 mg/ttkg napi kétszer po.) jól tolerálták az állatok (Cattori et al. 2011, Boesch et al. 2015).

Bármelyik antivirális kezelést is alkalmazzák, javasolt a rendszeres kontroll vérlabor vizsgálat a nem-regeneratív anaemia, mint gyakori mellékhatás miatt. A kezelés első hónapjában ajánlott a heti vérvizsgálat. Egyes egyedek az első 1–3 hétben mutathatnak enyhe hematokrit (Ht) csökkenést, ami később rendeződik. Ha a Ht 20% alá csökken, akkor a terápiát abba kell hagyni, az anaemia pedig általában magától elmúlik pár nap alatt. Ha az első hónapban nem mutatkozik nagyobb eltérés a vérképben, akkor a továbbiakban ajánlott a havi rendszerességű vérvizsgálat.

Az eleve myeloszuppresszióval küzdő egyedeket nem szabad kezelni az életveszélyes anaemia kialakulásának veszélye miatt. A krónikus veseelégtelenséget mutató macskáknál csökkentett dózisban kell alkalmazni ezeket a hatóanyagokat az akkumuláció és gyógyszer toxicitás elkerülése végett.

6.6.2. Ellenanyag-terápia

Jelenleg nincs használatban ez a kezelési forma. Az ellenanyagokat vagy immunválaszt kialakító macskákttól lehet nyerni, vagy egéredetű monoklonális ellenanyagok a FeLV gp70 epitópja ellen. Ezek az anyagok hatásosnak bizonyultak friss FeLV-fertőzés esetén (kísérleti fertőzés első három hetében alkalmazva), de természetes fertőzésnél hatástalanok voltak (Hartmann 2012b).

6.6.3. Immunmoduláns terápia

Az állatgyógyászatban leggyakrabban a FeLV-fertőzés ellen használják az immunstimuláns kezelést, bár itt is limitált a nagy egyedszámmal végzett ellenőrzött kísérletek száma.

Több hatóanyag is létezik, amit ilyen céllal próbáltak használni, ezekből kettő interferon-típus vált be többé-kevésbé terápiás céllal: a *humán interferon- α* (HuINF- α) és a *rekombináns macska interferon- ω* (reFeINF- ω) (McCaw et al. 2001). A HuINF- α -nak vírusellenes és immunmoduláns hatása van, *in vitro* gátolja a vírus replikációját a reverz transzkriptáz gátlásával. A vírusfehérjék expressziójára nincs hatással, de csökkenti a fertőzött sejtek életképességét, és növeli azok apoptózisát (a nem fertőzött sejtekre nincs ilyen hatással). Kétféle alkalmazását vizsgálták, egy nagy dózisban bőr alá (sc.) adott kezelést (10^4 – 10^6 NE/ttkg 24 óránként), illetve egy kisebb dózisban szájon át (po.) adott metódust (1–50 NE/ttkg 24 óránként). A parenteralis alkalmazás hátránya volt, hogy a fehérje elleni neutralizáló ellenanyagok kialakulásához vezetett 3–7 héttel a terápia megkezdése után. A szájon át adagolt HuINF- α szintén nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, mivel inaktiválták a gyomorsav és a duodenumban lévő proteázok, de helyileg (a szájüregben), feltételezhetően a nyálkahártyán keresztül hatva, stimulálta a helyi lymphoid szöveteket, és cytokin felszabaduláshoz vezetett, ami hasonló a természetes védekezési mechanizmushoz. Ezt a hatást nem erősítette a dózis növelése (Hartmann 2012b). Kísérletesen fertőzött macskáknál szignifikáns csökkenés érhető el a keringő p27 antigén mennyiségében nagy dózisu ($1,6 \times 10^4$ – $1,6 \times 10^6$ NE/ttkg napi egyszer) HuINF- α -kezeléssel önmagában vagy zidovudinnal kombinálva, de ugyanezt nem érték el természetes fertőzöttség során ezzel megegyező kezeléssel. Szájon át történő alkalmazás során a viraemia kialakulásában nem volt különbség placebo csoporttal összevetve, de a terápia hatására kevesebb klinikai tünetet mutattak a fertőzött macskák, és hosszabb volt a túlélési idő is (McCaw et al. 2001, Hartmann 2015).

A reFeINF- ω esetében nem kell számolni a hatóanyaggal szembeni ellenanyagválasz kialakulásával, emiatt a hosszú távú parenteralis alkalmazás is lehetséges. *In vitro* esetekben is tapasztalták a fertőzött sejtek csökkent túlélését és a megnövekedett

apoptóziskészséget a kezelés hatására. Egy vizsgálat során tapasztalták az akut fázis fehérjék (szérum amyloid-A, α -1-glycoprotein, C-reaktív protein) szintjének szignifikáns növekedését is, amely eredmény szintén mutatja a reFeINF- ω természetes immunválaszt erősítő hatását. A jelenleg ajánlott kezelési protokoll a 10^6 NE/ttkg napi egyszer sc. 5 napig, ezt kell ismételni még kétszer (beadás a 0., 14. és 60. napon). Mellékhatásként hányást, beadás utáni hyperthermiát, enyhe hasmenést, illetve a vörös- és fehérvérsejtek, thrombocyták számának rövidtávú csökkenését írták le. A túlélés szignifikánsan hosszabb, mint kezelés nélkül (Doménech et al. 2011, Leal et al. 2014, Hartmann 2015, Li et al. 2017). *In vitro* a FIV replikációját is hatásosan gátolja, de *in vivo* még nem bizonyították antivirális hatását (Tanabe és Yamamoto 2001). Egyes kísérletekben csökkentek a FIV-pozitív állatokban látott tünetek, de a mortalitásra nem volt hatással a kezelés (Virbagen Omega, Virbac, Franciaország). Hasonló *in vitro* hatást értek el INF- τ (interferon-tau) alkalmazásával.

Igen jó eredményeket értek el klinikai megfigyelések alapján a lymphocyte T-cell immunomodulator (LTCI) alkalmazásával, de 2020 óta a készítmény már az USA-ban sem elérhető.

Vannak további immunmoduláns hatóanyagok, amiket vizsgáltak retrovírusfertőzés kapcsán, de egyikkel sem értek el szignifikáns hatást. Ezek a *Staphylococcus* protein A (feltételezett antitumor hatás), *Propionibacterium acnes* (macrophagaktivitás növelésével cytokinfelszabadulás), Bacillus Calmette–Guérin (BCG; feltételezett antitumor hatás), *Serratia marcescens* kivonat (macrophag-aktivitás növelésével INF-felszabadulás), attenuált juh- és madár-parapoxvírus (INF- és kolónia stimuláló faktor képződés, NK sejtek aktivitásának növelése), acemannán, levamizol, dietil-karbamazin (Mehrotra et al. 2003, Greggs et al. 2011, Hartmann 2012b).

Kezelésként korábban felmerült még FeLV-fertőzött egyedeknél a FeLV-elleni vakcina használata, de bizonyíthatóan semmilyen klinikai vagy hematológiai javulás nem érhető el vele, nem változtak számottevően sem a keringő provirális DNS, sem virális RNS szintek (Greggs et al. 2011, Helfer-Hungerbuehler et al. 2015a). Bizonyos gyártói vizsgálatok szerint csökkenhet a vérben keringő vírusok száma beteg állat oltását követően az egyik vakcinát használva (Leucofeligen FeLV/RCP, Virbac, Franciaország 2020).

Kísérletesen alkalmaztak fermentált búzacsíra-kivonatot (Avermar, Immunovet, Biopharma, Kunfehértó) is *in vitro* FIV-modellben, ahol mind a heveny, mind az idült fertőzési szakaszban a szer sikeresen gátolta a vírus replikációját, valamint jelentősen fokozódott a FIV-fertőzött sejtek apoptózisának mértéke. Két eltérő FIV-törzset használtak különböző sejt kultúrákban, és a két törzs között kisebb eltéréseket találtak az alkalmazott kezelési dózisok hatásossága között (Tarcsei et al. 2020).

Egy feltevés szerint jó eredményeket lehet elérni antioxidánsok használatával, mivel a krónikus fertőzés során lecsökken a glutation-peroxidáz vérbeli aktivitása, és így

valószínűsíthető az oxidatív sokk megjelenése. Szuperoxid-dizmutáz per os alkalmazásával emelkedett a CD4⁺/CD8⁺ arány FIV-fertőzés során, de nem következett be szignifikáns változás a vírusterheltségben (Webb et al. 2006).

6.6.4. Kiegészítő terápia

Mivel nem csak magát a vírusfertőzést kell kezelni, hanem a betegség során felmerülő egyéb fertőző és nem fertőző eredetű tüneteket és elváltozásokat, így számos egyéb hatóanyagot használhatnak a terápiák során. Ilyenek az anaemiára adott erythropoietin (100 NE/ttkg), egyéb cytopeniákban a granulocytá kolónia-stimuláló faktor (5µg/ttkg), stomatitis esetén metronidazol (5 mg/ttkg), clindamycin (5–11 mg/ttkg), prednizolon (1–2 mg/ttkg) és bovin lactoferrin (40 mg/ttkg). Ezen gyógyszerek alkalmazásával javítható a macskák életminősége, és megnyújtható az élethosszuk.

6.7. Megelőzés

A vírusok jelen vannak a testnedvekben (a FeLV legmagasabb koncentrációban a nyálban), terjedésük ezekkel közvetlenül érintkezve vagy ragályfogó tárgyakkal lehetséges (Hartmann 2005, Cattori et al. 2009). A környezetben nem ellenálló, az általános fertőtlenítőszerrel könnyen inaktiválják azokat, de ezek nélkül is csak percekig maradnak fertőzőképesek. Perzisztensen fertőzött egyedeket lehetőleg el kell különíteni a vele egy háztartásban tartott macskáktól, illetve nem szabad kiengedni őt a szabadba (elkerülve másik macska fertőzését). Hospitalizáció esetén tartható nem fertőzött macskákkal egy légtérben, de külön ketrecben, betartva az alapvető higiénés szabályokat. Soha nem szabad őket a ragályos betegségek miatti elkülönítő részlegbe tenni az immunszuppresszió miatt. Műtéti, fogászati beavatkozás esetén ügyelni kell az eszközök, tubusok megfelelő fertőtlenítésére a műtét előtt és után, illetve fokozottan figyelni kell az egyszer használatos eszközök, infúziós szerelékek alkalmazási szabályainak betartására. A FIV és FeLV potenciális jelenléte miatt minden vér- és szaruhártyadonor macskát szűrni kell (Hartmann 2005 és 2012a, Lutz et al. 2009, AAFP 2013 és 2020, Helfer-Hungerbuehler et al. 2015b, Nesina et al. 2015).

6.7.1. Szűrés és eltávolítás, vakcinázás

Járványtani kutatások alapján a leghatásosabb módszernek a *szűrés és eltávolítás* bizonyult, aminek során az állományokat szűrővizsgálatnak vetik alá, a fertőzött egyedeket pedig elkülönítve tartják tovább (ez főleg tenyészetekben mutatott látványos eredményeket).

A HIV-vírushoz hasonlóan FIV és FeLV esetében is a vakcinafejlesztés nagy kihívások elé állította a szakembereket. Az első oltóanyagok nagyobb eséllyel okoztak

anafilaxiát, mint más vakcinák. Az inaktivált vakcinák hatástalannak bizonyultak, az élő vírusos oltóanyagok pedig jó immunitást adtak, de sokszor visszanyerték patogenitásukat a szervezetben klinikai megbetegedést okozva. A FeLV-nél további aggodalmat keltett, hogy az élő vírusos vakcinából a FeLV integrálódhat a gazdaszervezet genomjába, később ezzel FeLV-antigén negatív lymphomát indukálva. Ezek miatt a fő kutatási fókusz az elölt, teljes vírust tartalmazó vakcina kialakítására irányult. Az első ilyen FeLV elleni oltás 1985-ben került forgalomba, ami aztán jó pár módosításon ment keresztül azóta. Napjainkban létezik elölt teljes vírust (és többnyire valamilyen adjuvánst) tartalmazó vagy rekombináns vakcina. Javasolt a macska előzetes szűrése után beadni az oltást (legkorábban 8 hetes korban), majd 3–4 hét múlva egy megerősítő oltást. Ezek után a vakcina használati utasítása szerint évente vagy három évente ismételni kell az oltást a megfelelő védelem fenntartása érdekében. Minden macskát érdemes oltani, főleg fiatal korban, amelyek ki vannak téve a fertőzés kockázatának (kijáró életmód, fertőzött társ), de megfontolandó az összes állat oltása, hiszen később változhat a kockázati besorolás (tartási mód váltás, csoportba kerülés stb.). Egyik vakcina sem befolyásolja a szűrővizsgálatok eredményét (hacsak nem rögtön oltás után veszünk vért a vizsgálatra) (AAFP 2013 és 2020, Hofmann-Lehmann 2013, Scherk et al. 2013). Immunszuppresszált állatok nem biztos, hogy kellő immunitást alakítanak ki a vakcinázás hatására, ezt mutatta ki egy FIV-pozitív macskákkal végzett vizsgálat is (Boretti et al. 2004).

Jelenleg fejlesztés alatt áll egy DNS-vakcina, amely tartalmaz minden FeLV-gént és adjuvánsként macska eredetű interleukin-18 gént (IL-18). Az eddigi kutatások alapján igen hatékony, de még nem került forgalomba (Cotter 1998, Hanlon et al. 2001, Hofmann-Lehmann 2013).

Egy ártalmatlan és hatásos FIV-vakcina gyártására a HIV-kutatások miatt számos próbálkozás történt, többek között vizsgáltak DNS- és alegység vakcinákat adjuvánssal vagy anélkül, valamint peptid vagy rekombináns vektor vakcinákat. Számos beadási módot is kipróbáltak a nyálkahártyára való cseppentéstől a nyirokcsomóba adandó injekcióig (Finerty et al. 2000 és 2001). Az egyik eredményesebb, inaktivált oltóanyagot törzskönyvezték az Amerikai Egyesült Államokban. A legnagyobb gondot a vakcinagyártásban a FIV rendkívül változékony genomja jelenti (Carpenter et al. 1998, Courchamp et al. 1998). Számottevő az eltérés egy szubtípuson belül is (2–15%), és akár 26% is lehet az altípusok közötti genetikai különbözőség (Steinrigl et al. 2010). A forgalomba hozott oltóanyag A és D szubtípust tartalmaz (teljes vírust inaktiválva, sejthez kötve), kísérletesen kimutatták az általa kiváltott erős celluláris immunitást, de *in vivo* nem bizonyított a kellő protektív hatás. *In vitro* körülmények között némi keresztvédelmet tapasztáltak B szubtípus ellen, de nem jellemző a heterológ típus elleni megfelelő védelem kialakítási képessége a nagy genetikai változatosság miatt. Ezt a vakcinát és a prototípusát (A és D szubtípus inaktiválva, de nem

sejthez kötve) egy széleskörű kísérletben összehasonlították a heterológ altípusok és rekombináns változatok elleni védelem alapján. Az eredmények szerint több variáns ellen a prototípus vakcina hatékonyabb volt, mint a kereskedelemben kapható változat (Broche-Pierre et al. 2005). A felmerülő problémák felvetették, hogy realisabb célkitűzés lenne vakcina által az immunrendszer funkciójának megtartása vagy klinikai tünetekben megnyilvánuló betegség kialakulásának megelőzése a már fertőzött egyedekben. A FIV elleni vakcina jelenleg Ausztráliában, Új-Zélandon és Japánban van forgalomban Fel-O-Vax FIV néven. Ausztráliában egy átfogó tanulmány is készült az oltott macskák immunválaszát vizsgálva, ahol többek között megmérték a képződött és keringő FIV elleni ellenanyag mennyiséget a vakcinázást követő időszakban, illetve a booster oltásoknál (Westman et al. 2021). A kutatás alapján megfelelő mennyiségű ellenanyag képződött minden vizsgált macska szervezetében, legtöbb az első oltássort követően.

További kutatás tárgyát képezte a passzív immunizálás, amely során megfelelő védelmet értek el homológ törzssel szemben (Pu et al. 1999).

A vakcinázás kapcsán felmerült további kérdések az injection site sarcomák elterjedésével kerültek előtérbe: az AAFP (American Association of Feline Practitioners) emiatt kidolgozott egy új stratégiát a macskák oltására, elkerülve a felesleges vakcinázást (pl. fertőzési kockázatnak nem kitett, egyedül és lakásban tartott macska FeLV elleni oltása). Az injekciók helyét pedig érdemes úgy megválasztani, hogy ha később mégis tumor alakulna ki, az könnyen hozzáférhető helyen legyen (AAFP 2013 és 2020). Így a lapockák közötti területen nem ajánlott az injekció beadása, helyette javasolt a bal hátsó láb distalis szakaszát választani FeLV elleni vakcinázás során („left for leukemia, right for rabies”). Az izomba adott oltás szintén kerülendő. Minden olyan szövetszaporulatot, ami több mint 3 hónapig jelen van az állaton, sebészileg ki kell metszeni és kórszövetteni vizsgálatnak kell alávetni. Az ISS típusú tumorokat nehéz teljesen, ép széllel eltávolítani, illetve gyakori a helyi recidíva (AAFP 2013 és 2020, Hartmann 2012b).

6.8. Együttélés a fertőzéssel

Minden macska esetében javasolt a retrovírus státuszának ismerete, hogy ennek megfelelően cselekedhessen a tulajdonos és az állatorvos is, mivel ez hosszútávú kezelést igénylő feladat, illetve kihat a macska további életére (AAFP 2020).

Az elsődleges cél fertőzöttség esetén, hogy az életminőség javításával meghosszabbítsák az egyed életét. Fontos, hogy szigorúan lakásban legyen tartva az állat, ezáltal elkerülhető az egyéb kórokozók által okozott betegség és a vírusok terjesztése más macskák körében. A megfelelő életminőség fenntartásában fontos tényezők a megfelelő tartás és táplálás. Javasolt a kiegyensúlyozott tápanyagtartalmú és teljes diéta a fertőzött macskák számára, valamint nem ajánlott a nyers hús és tejtermékek adása a bakteriális és

parazitás megbetegedéseket elkerülendő. A továbbiakban érdemes rendszeresen kontrollálni és megelőzni az endo- és ektoparazitás fertőzöttséget. Ajánlott a félévenkénti állatorvosi fizikális vizsgálat, a legalább évenkénti vérlabor-ellenőrzés és vizeletvizsgálat, hogy minél hamarabb fény derüljön egy esetleges fertőzésre. Ha erre sor kerül, akkor azonnal el kell kezdeni a kóroknak megfelelő kezelést. További kiegészítő vizsgálatokat is rendszeresen el lehet végezni, mint a mellkasi és hasi röntgen, hasi ultrahang, cytológia és tenyésztés egyes mintákból (például vér, vizelet, váladékok). A különböző cytopeniák esetén sor kerülhet csontvelő aspirációra vagy biopsziás csontvelő-mintavételre.

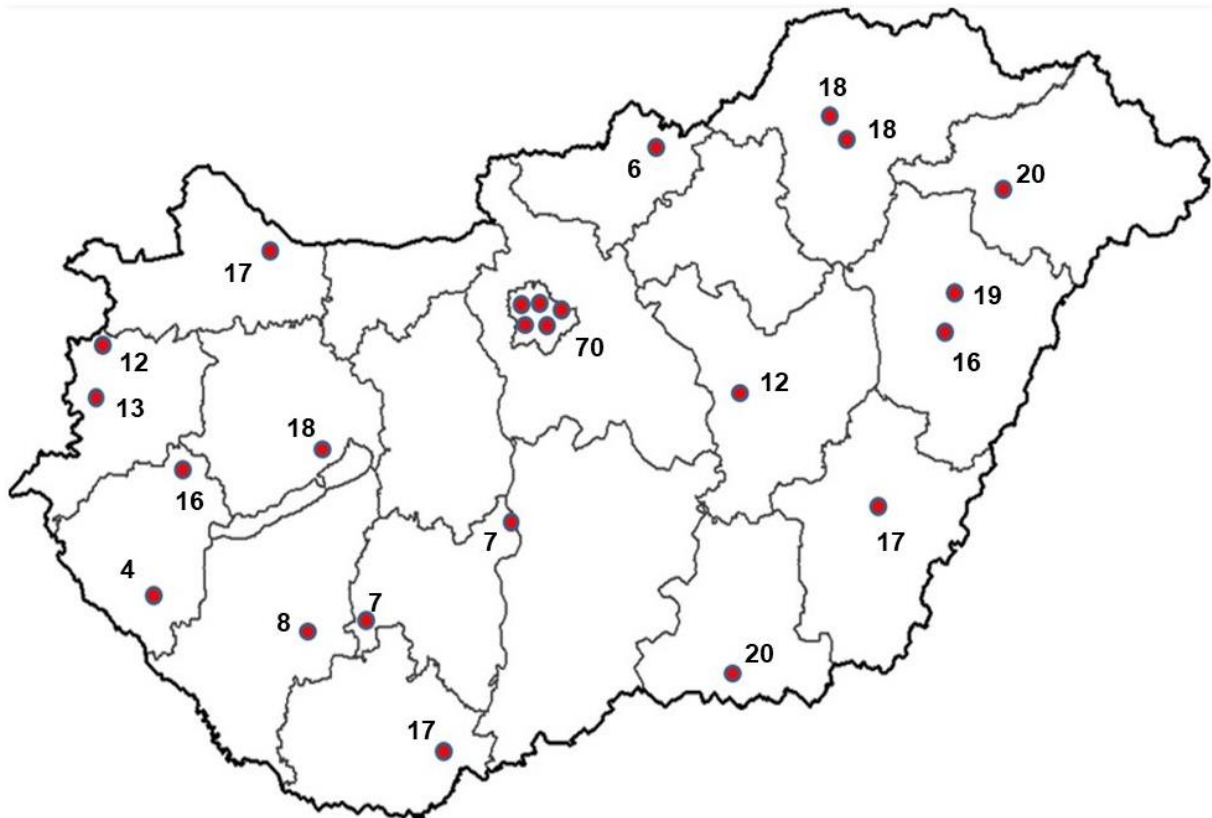
A fertőzött állatot mindenképpen ivartalanítani kell, hogy csökkenteni lehessen az ösztrusz és párzási viselkedés okozta stresszt, valamint a kóborlásra és agresszív harci viselkedésre való hajlamot. Ajánlott a perioperatív antibiotikus terápia a másodlagos fertőzéseknek való nagyobb kitettség miatt. A hospitalizáció során törekedni kell az elkülönített tartásra (külön ketrec).

Kutatások kimutatták, hogy a retrovírus-pozitív macskák is tudnak immunválaszt kialakítani egyéb vakcinázásra, bár ez az immunválasz kifejezetten gyenge lehet pl. a FIV terminális stádiumban. Ajánlott inaktivált oltóanyagot használni, máskülönben megbetegedés alakulhat ki, ahogy azt már panleukopenia esetén megfigyelték (Richards et al. 2006). A vakcinázás kiváltotta immunstimuláció káros lehet a betegség progressziójára nézve, így érdemes megfontolni bármilyen oltás beadását, ha az egyed szigorúan lakásban tartható, nem érintkezik más macskákkal, elkerülhető az egyéb fertőzés. Amennyiben nem zárható ki potenciális kórokozókkal való érintkezés, javasolt az általános vakcinázási protokoll követése, ha lehet, inaktivált oltóanyagokkal.

7. Anyag és módszer

7.1. Mintagyűjtés

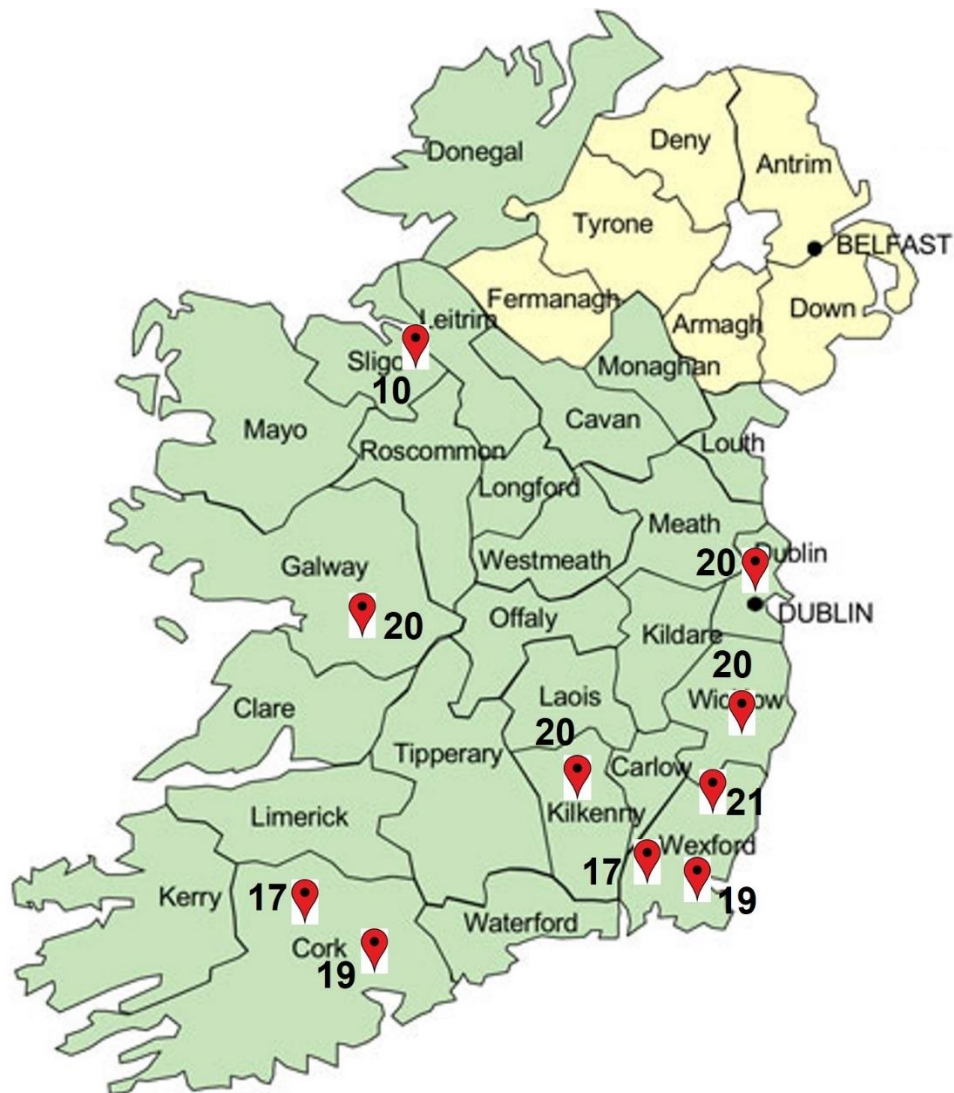
Kutatásunk során összesen 335 véletlenszerűen kiválasztott, tulajdonossal rendelkező házi macskát vontunk vizsgálat alá, melyektől összesen 24 klinikán és kisebb állatorvosi rendelőben vettek vért 2016 és 2018 között (**9. ábra**). A rendelők úgy kerültek kiválasztásra, hogy lehetőleg egész Magyarország területét lefedjük, így próbáltunk viszonylag teljes képet alkotni a hazai macskapopulációról (amely egy 2020-as felmérés alapján 2.330.000 egyedre számlált: a háztartások kb. 34%-ban van legalább egy macska, lakosságarányosan pedig 0,23 macska jut egy főre [European Pet Food Industry Federation 2020]). A vizsgálatok során menhelyi vagy kóbor állatokból nem vettünk mintát. Klinikailag egészséges, illetve klinikai tüneteket mutató macskáktól is vettünk mintát. A vérvétel mellett rögzítették a macskák korát, ivarát, vakcinázottsági státuszát, tartási körülményeit és az esetleges korábbi betegségeket. A vérvételre (ivartalanítás vagy fogászati beavatkozás előtti vérvizsgálat vagy az állat kivizsgálása miatti szűrő- vagy vérvizsgálat, minden esetben tulajdonosi beleegyezéssel) egy részletes fizikális vizsgálat után került sor. A levett vérből helyben Witness FeLV-FIV ELISA (Zoetis, Parsippany-Troy Hills, NJ, U.S.A.) gyorseszteszt készült (ld. 6.5.1. Szerológiai vizsgálatok alfejezet), az eredményt regisztrálták a többi információval együtt, a maradék vért pedig EDTA-s csőben az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékére küldték további felhasználásra. A későbbi vizsgálatokig a vérmintákat -80 °C -on tároltuk.



9. ábra: A hazai kutatásban szereplő minták származási helyei és darabszáma

A pontok azt a 24 helységet jelölik, ahonnan a kutatásba bevont vérminták származnak. Majdnem az összes magyarországi megyéből gyűjtöttünk mintákat. A pontok mellett az adott helységben begyűjtött minták darabszáma látható.

A hazai felmérés mellett 2017 és 2018 között egy szakdolgozat keretein belül Írország 10, véletlenszerűen kiválasztott klinikájáról származó vérmintákat is gyűjtöttünk a korábban leírt módon és feltételekkel (klinikailag egészséges és tüneteket mutató állatokat egyaránt bevontunk, de kóbor vagy menhelyi állatot nem vontunk be a mintagyűjtésbe). Az említett adatok (állat kora, ivara, vakcinázottsági státusza, tartási körülményei és esetleges korábbi betegségek) itt is rögzítésre kerültek. Az Egyesült Királyság területéről nem gyűjtöttünk mintát. Erre a kutatásra azért került sor, mert bár a legtöbb nyugat-európai országból ismerünk macska-retrovírusok előfordulására vonatkozó adatokat, de az Ír Köztársaság ezalól kivétel volt. A minták Dublin, Wicklow, Kilkenny, Sligo, Galway Cork és Wexford megyékből érkeztek (**10. ábra**). A 2020-as European Pet Food Industry Federation által készített felmérés alapján Írországban kb. 325.000 macskát tartanak, ami a háztartások 25%-ában oszlik meg, lakosságárányosan tehát 0,07 macska jut egy főre. Ezek a számok jelentős különbséget mutatnak a magyarországi adatokkal. A felmérés során nyert eredményeket felhasználtuk a hazai és európai adatok összehasonlításához.



10. ábra: Az írországi kutatásban szereplő minták származási helyei és a rendelónkénti mintaszámok

A kutatási időszak során a vérminták mellett a Patológiai Tanszékre 2016 és 2020 közötti időszakban érkező hullanyag feldolgozása során különös figyelmet fordítottunk az ismert retrovírus-fertőzött macskákra, illetve azokra, amelyek a fertőzöttség nyomán jellemzően kialakuló kórképek (pl. lymphoma/leukaemia) következtében pusztultak el. Összesen 782 macskatetem került a Tanszékre ebben az öt évben, ezek közül a kórbonctani vizsgálatra alkalmasakat minden esetben felboncoltuk. A vizsgálat során figyelembe vettük a macska kórelőzményi adatait is (pl. már bizonyított FeLV- vagy FIV-fertőzés), de ha a boncolás során lymphomás esettel találkoztunk, abból is végeztünk FeLV és FIV jelenlétére irányuló PCR-vizsgálatot, még ha a kórelőzményben nem is szerepelt a retrovírus

fertőzöttségi státusz. A későbbiek során a formalin-fixált paraffinba ágyazott szervmintákat használtuk további vizsgálatokra.

7.2. Szerológiai vizsgálat

A kutatás során használt point-of-care ELISA-teszt a friss vagy EDTA-val alvadásában gátolt vérből a FeLV p27 antigént (szenzitivitás 92,9% és specificitás 96,5%) és a FIV p24 antigén ellen képzett ellenanyagokat (szenzitivitás 93,8% és specificitás 93,4%) mutatja ki (Zoetis 2014a és 2014b). A szenzitivitás és specificitás értékei a gyártó által megadott adatok (és ezeket használtuk a statisztikai elemzés során), bár néhány későbbi, Zoetistől független kutatásban ezektől kissé eltérő értékek születtek (pl. rendre 89,0%/95,5% FeLV esetén és 94,7%/100% FIV esetén) (Levy et al. 2017). A Witness-tesztet minden esetben közvetlenül vérvételt követően, helyben végezték el egy csepp (0,5 ml) teljes vérből a gyártó utasításai szerint. Ez az immunmigráción alapuló gyors teszt jól alkalmazható mindkét vírus által okozott fertőzés diagnosztikájában, mert már a (viszonylag) korai szakaszban pozitív eredményt mutatnak. Ez FeLV-nél akár a fertőződés utáni 1 hét, FIV-nél 10–14 napot jelent.

7.3. Polimeráz láncreakció

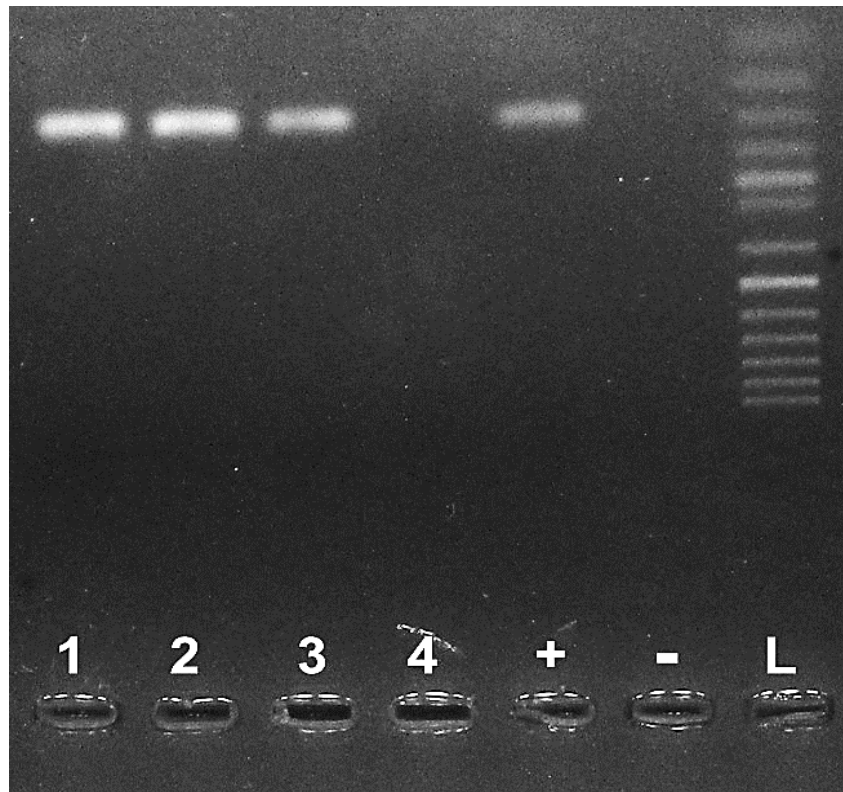
A -80°C -on tárolt, EDTA-val alvadásában gátolt és egyedi azonosítóval ellátott vérmintákból a PCR-vizsgálathoz először a nukleinsavat vontuk ki QIAcube automatában (Qiagen, Hilden, Németország), QIAmp cador Pathogen Mini Kit (Qiagen) használatával, a gyártó utasításai szerint. A nukleinsavat 60 μl RNáz-mentes elúciós pufferben (Qiagen) oldva tároltuk -80°C -on. A kontamináció elkerülése érdekében az egyes munkafázisokat külön helyiségben végeztük a szakma szabályai szerint.

7.3.1. FeLV RT-PCR

Reverz transzkripció PCR-t (RT-PCR) használtunk, mert FeLV esetén virális RNS jelenlétét vizsgáltuk a keringő vérben. A kivont nukleinsavval reakcióelegyet készítettünk One Step RT-PCR Kit (Qiagen) alkalmazásával. A reakcióelegy mintánként 5,7 μl RNáz-mentes desztillált vizet, 2 μl 5 \times puffert, 0,4 μl dNTP-t, 0,4 μl enzim mixet, 0,1 μl RNáz inhibitor, 0,2 μl forward primert (40 μM) és 0,2 μl reverse primert (40 μM) tartalmaz minden csőben, ehhez adunk 0,5 μl nukleinsavat összesen 10 μl végtérfogatban. Az amplifikáció az alábbi lépésekből állt: 50°C 30 perc és 94°C 3 perc (reverz transzkripció és denaturáció); 95°C 15 mp, 60°C 1 perc és 72°C 1 perc (45 ciklus); és 72°C 10 perc. Az alkalmazott primerek egy korábbi publikációból származnak (Tandon et al. 2005), a FeLV-genom long terminal repeat szakaszának U3 régiójában tapadnak, és 150 bázispár (bp) hosszú termék

amplifikációját teszik lehetővé. Ezek a primerek: forward 5' AACAGCAGAAGTTTCAAGGCC 3' és reverse 5' TTATAGCAGAAAGCGCGCG 3'. Diagnosztikai alkalmazásuk azért lehetséges, mert a három leggyakrabban előforduló altípus (FeLV-A, FeLV-B és FeLV-C) kimutatható velük. A folyamatot Genesy PCR Thermal Cycler (Tianlong, Xi'an, Kína) automatában végeztük. Minden PCR esetén használtunk pozitív, illetve negatív kontrollt (ismert FeLV-fertőzött macskából származó, szekvenciameghatározással megerősített nukleinsav-izolátumot, illetve RNáz-mentes desztillált vizet).

A PCR-reakciók végeztével az ampliconok láthatóvá tétele agarózgél-elektroforézissel történt. Ehhez készítettünk 100 ml végtérfogatú 1,5%-os agarózgél nukleinsav festékkel (GR Green nucleic acid stain [InnoVita, Gaithersburg, MD, U.S.A.]) keverve, amelyet a futtatókádban hagytunk megszilárdulni. A futtatáshoz a szilárd géltre 1%-os TBE puffert (tris-borát-EDTA) öntöttünk. Az ampliconokból 7,5 µl mennyiséget pipettával kimérve elkevertünk 1,5 µl festékkel (6X Orange DNA Loading Dye, [ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.]), majd ezt az elegyet pipettáztuk a kialakított zsebekbe. Az elektroforézist ME15-7-10-15 and Mini-300 (Major Science, Saratoga, CA, U.S.A.) horizontális futtatórendszerben 140V feszültség mellett végeztük 40–50 percen át. A termékek méretének vizsgálatához az elektroforézis során egy molekulatömeg-markert használtunk, ezek után következtek a vizsgálatban szereplő, fertőzöttség szempontjából ismeretlen minták, a már említett pozitív és negatív kontroll mintákkal együtt. A fotodokumentációt Gel documentation system Basic rendszerrel (VWR, Leicestershire, Anglia) végeztük (**11. ábra**).

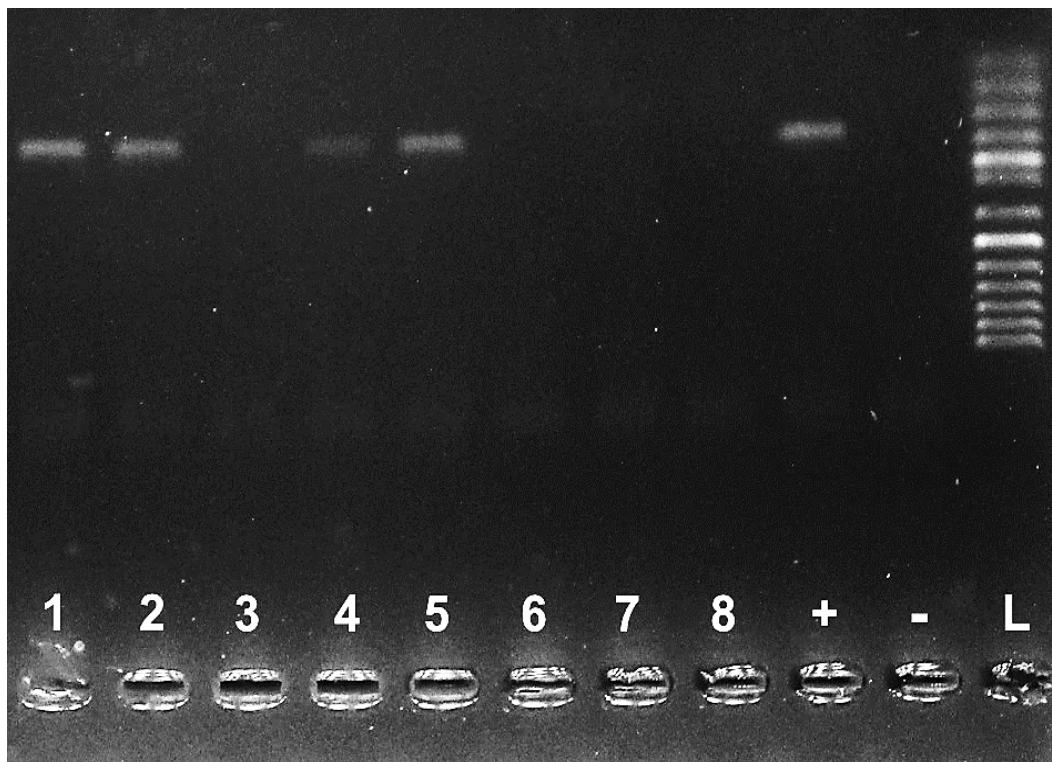


11. ábra: FeLV kimutatására szolgáló PCR-vizsgálat eredménye gélelektroforézist követően
 L: molekulatömeg-marker; -: negatív kontroll; +: pozitív kontroll (150 bp), 1–3: FeLV-pozitív
 minták; 4: FeLV-negatív minta

7.3.2. FIV-PCR

FIV esetén a vérben keringő provirális DNS jelenlétét mutattuk ki, így nem volt szükség RT-PCR protokoll használatára. A reakcióelegy ebben az esetben TopTaq Master Mix Kittel (Qiagen) készült, az elegy tartalma 25 µl master mix, 0,5 µl forward primer (40 µM), 0,5 µl reverse primer (40 µM), 5 µl CoralLoad koncentrátum, 18 µl RNáz-mentes desztillált víz és 1 µl templát-DNS. Az amplifikációt ebben az esetben is Genesy PCR Thermal Cycler automatában végeztük, amelynek lépései: 95°C 15 perc; 95°C 45 mp, 60°C 45 mp és 72°C 1 perc (40 ciklusban); majd 72°C 15 perc. Az alkalmazott primerek – LTR-sense 5'-GCG CTA GCA GCT GCC TAA CCG CAA AAC CAC-3' és LTR-antisense 5'-GTA TCT GTG GGA GCC TCA AGG GAG AAC TC-3' (Sutton 2007) – a reverz transzkripció korai termékének amplifikációját teszik lehetővé, szintén a vírusgenom LTR-szakaszán tapadnak, így alkalmasak alacsony dózisu fertőzés és/vagy korai fertőzési stádium kimutatására (primer szenzitivitás 10^2 – 10^3 sejt-asszociált vírus) (Sutton 2007). Ebben a PCR-vizsgálatban a keresett amplicon 163 bp hosszúságú volt. A vizualizációhoz a gélelektroforézist ugyanolyan módszerrel végeztük, mint a FeLV RT-PCR esetén leírtak, azzal a kivétellel, hogy ebben az

esetben a master mixben lévő CoralLoad koncentrátum szolgál festékként, azt nem kellett külön a PCR-termékhez keverni futtatás előtt (12. ábra).



12. ábra: A FIV kimutatására szolgáló PCR-vizsgálat eredménye gélelektroforézist követően
L: molekulatömeg-marker; -: negatív kontroll; +: pozitív kontroll (163 bp), 1, 2, 4, 5: FIV-pozitív minták; 3, 6–8: FIV-negatív minták

7.4. Statisztikai vizsgálat

A macskákról az adatrögzítés során nyert adatokat táblázatos formában rögzítettük. A numerikus változókból minimális, maximális és medián értékeket számoltunk. A nominális változók esetén a statisztikai elemzés R 3. 3. 2. szoftverrel történt (R Core Team, Bécs, Ausztria). A vizsgált változók és a fertőzöttség kapcsolatát logisztikus regressziós modellel, illetve korrelációanalízissel végeztük. A prevalenciára (a vizsgált populációban létező esetek gyakoriságát méri egy adott időpontban) vonatkozó adatokat az Epi.prev funkcióval nyertük (Sullivan et al. 2009). Számoltunk *látszólagos prevalenciát* (a látszólagos prevalencia az adott vizsgálati módszerrel pozitívnak talált minták aránya a célpopulációban), illetve *valódi prevalenciát*, amely figyelembe veszi a módszer szenzitivitását és specificitását is, amennyiben az ismert. A lehetséges megfeleltethetőséget az alkalmazott ELISA- és PCR-

módszerek között a Cohen-féle kapa (κ) érték számolásával vizsgáltuk (Dinya és Solymosi 2016).

7.5. Szekvenciaelemzés és filogenetikai vizsgálat

A vírus magyarországi prevalenciájának vizsgálatán túl a FIV-pozitív esetekben részleges szekvenciameghatározást végeztünk a polimeráz (*pol*) gén reverz transzkripcióért felelős szakaszán egy korábbi leírásban szereplő módszerrel (Adams et al. 2010). Ugyanezt a módszert alkalmaztuk az írországi FIV-pozitív minták vizsgálatához. A javított, nyers szekvenciákat minden esetben ellenőriztük a National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) segítségével, hogy valóban FIV-ből származó mintát vizsgálunk-e.

Vizsgálatunkhoz azért a *pol* génszakaszt használtuk, mert kissé kevésbé változékony, mint az *env* gén, ezáltal nagyobb eséllyel felerősíthető, ugyanakkor megfelelő mértékű változékonyság jellemzi, ami lehetővé teszi az egyes törzsek elkülönítését, vizsgálatát. Ez különösen fontos egy olyan változékony vírus esetében, mint a FIV. Számos vizsgálat azt bizonyítja, hogy mind a *pol*, mind az *env* génszakasz jól használható filogenetikai vizsgálatokra, és az eredmények egymásnak jól megfeleltethetők (Carpenter et al. 1998, Steinrigl és Klein 2004, Steinrigl et al. 2010).

A diagnosztikai PCR-vizsgálatokban pozitívnak bizonyuló nukleinsavmintákon egy kétkörös, ún. nested PCR-t végeztünk. Az alkalmazott, több helyen degenerált primerekkel a *pol* gén reverz transzkripció régiójának amplifikációját végeztük el, ami egy 576 bp hosszúságú amplikont eredményezett. Az alkalmazott primerek a **2. táblázatban** láthatók. A szekvenáló PCR-t szintén TopTaq Master Mix Kit-tel (Qiagen) végeztük, a reakcióelegyet is ugyanazokkal az arányokkal készítettük el, mint a diagnosztikai PCR-vizsgálat esetén. A második reakcióhoz templátként az első után kapott reakcióelegyből vettük ki a megfelelő mennyiséget. Az amplikonokat gélelektroforézissel 1,8%-os agaróz-gélen megfuttattuk, majd a megfelelő molekulatömegű termékeket a gélből steril pengével kivágtuk, és Qiagen Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) megtisztítottuk a gyártó utasításai szerint. Ezek után a mintákat egy szolgáltató kétirányú Sanger-módszerrel, a fenti primerek használatával szekvenálta, majd kapilláris elektroforézist végeztek (Microsynth, Balgach, Svájc). Két esetben (I/14/16 és II/7/8 minták) a megismételt szekvenálás sem eredményezett megfelelően tiszta szekvenciát, így azokat pJET1.2 vektorba klónozták, majd ezt követően *Escherichia coli* baktériumba oltották CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific) segítségével. A szekvenciameghatározások egy részét a Lipcsei Egyetem Állatorvostudományi Karának Virologiai Intézetében, Prof. Thomas Vahlenkamp csoportjával együttműködésben végeztük.

2. táblázat: FIV-pozitív minták szekvenálásához használt nested PCR-vizsgálatban alkalmazott primerek.

külső primer For1	5' TGGCCWYTAWCWAATGAAAARATWGAAGC 3'
külső primer Rev1	5' GTAATTTTCTTCHGGNGTYTCAAATCCCC 3'
belső primer For2	5' TGAAAARATWGAAGCHTTAACAGAMATAG 3'
belső primer Rev2	5' GTAATTTTCTTCHGGNGTYTCAAATCCCC 3'

A kapott szekvenciák ellenőrzését követően a MAFFT szoftver 7-es verziójának E-INS-i módszerével megfordítottuk őket (Katoh és Toh 2008), majd összevetettük őket a GenBankban található reprezentatív FIV-szekvenciákkal. Maximum likelihood analízist készítettünk, majd a filogenetikai fát a MEGA7 (Kumar et al. 2016.) programmal szerkesztettük a Tamura-Nei modellt alkalmazva (Tamura et al. 2013), 1000 bootstrap értékkel, gamma eloszlásban. A páros genetikai összehasonlítást a Kimura 2-parameter modellel készítettük a MEGA7 programban (Kimura 1980).

7.6. Kórszövetteni és immunhisztokémiai vizsgálat

A Patológiai Tanszékre beérkező macskatetemek kórbonctani vizsgálata során több esetben derült fény FIV- és/vagy FeLV-fertőzöttségre, valamint párhuzamosan lymphoma vagy egyéb daganat jelenlétére a szervezet valamely részén. Miután PCR-vizsgálattal ellenőriztük, hogy az állat valóban retrovírus-fertőzött volt-e, elvégeztük az elváltozást mutató szervek részletes kórszövetteni vizsgálatát és a lymphoma immunfenotipizálását immunhisztokémiai (IHC) módszerekkel (CD20 [Thermo Fischer Scientific] és CD3 [DAKO, Glostrup, Dánia] markerekkel).

A kórszövetteni vizsgálat rutin hematoxylin és eozin (H&E) festéssel készült metszeteken történt a releváns szövetekből. Ahol lymphoma volt megállapítható, ott immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a tumor immunfenotípusát. Ehhez a szöveteket 3–5 µm vastagságban SuperFrost tárgylemezre (Thermo Fischer Scientific) húztuk, majd első lépésben feltártuk. Az egyes lépések között mindig öblítést végeztünk PBS oldattal. A feltárást CD20 antitest esetén 500 ml 10× hígítású citrát pufferben (pH = 6,0), kuktában, forrástól számítva 10 percen át végeztük magas nyomáson. CD3 antitest esetén a lemezeket a gyártó utasításai alapján 400 ml-re hígított EnVision FLEX Target Retrieval oldatba (DAKO) helyeztük, majd mikrohullámú sütőben 5 percig 800 W-on és 10 percig 180 W-on kezeltük. A feltárást követően a blokkolást és peroxidgátlást EnVision FLEX Peroxidase-blocking

reagenssel (DAKO) végeztük 5 percen keresztül. A blokkolást követően az elsődleges ellenanyagot (CD20 – 1:200 hígításban, CD3 – 1:100 hígításban) 30 percig hagytuk a tárgylemezeken, majd ezután 20 percig a másodlagos ellenanyag (EnVision FLEX HRP, DAKO) volt rajtuk. Az előhíváshoz 3–5 percig 1 ml EnVision FLEX Substrate pufferbe (DAKO) cseppentett 1 cseppnyi EnVision FLEX DAB+ chromogént (DAKO) használtunk. A háttérfestést Gill II szerint módosított hematoxylin oldattal készítettük (6–7 mp-ig). Az utolsó öblítést követően a víztelenítés következett: 5 perc 96%-os alkoholban, 5 perc abszolút alkoholban, majd 2×3 perc xilolban. A tárgylemezeket fedést követően fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.

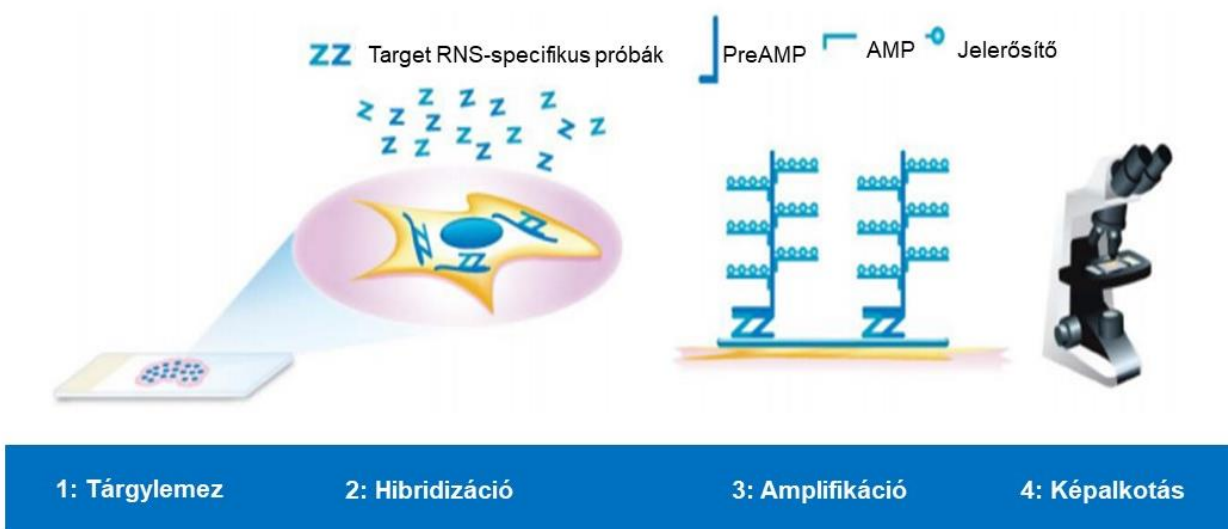
Mindkét ellenanyag esetében erős barna, membránasszociált festődést tapasztaltunk pozitív esetben.

7.7. *In situ* hibridizációs vizsgálat

A FIV- vagy FeLV-pozitív PCR vizsgálati eredményű mintákon az immunhisztokémiai reakción kívül megkíséreltük a szövetből a virális RNS kimutatását RNAscope (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, U.S.A.) *in situ* hibridizációs (ISH) módszerrel.

Az RNAscope *in situ* hibridizáció lényege, hogy a szövetmintákban specifikus virális, bakteriális, vagy messenger RNS jelenlétét tudjuk láthatóvá tenni kórszöveti metszeteken. Esetünkben az Advanced Cell Diagnostics szolgáltatóval a FeLV és FIV genom 1–1 szakaszára készítettünk speciális próbákat. A vizsgálatot RNAscope 2.5 High Definition (HD) Red Kittel végeztük, a gyártó utasításai szerint. Az ISH-hoz SuperFrost tárgylemezre húzott, 5 µm vastagságú, formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákat deparaffinizáltuk xilollal, valamint rehidráltuk etil-alkohol sorozatban. Ezután a metszetek 10 perces szobahőmérsékleten történő, hidrogén-peroxidos inkubációt követően 15 percre speciális feltáró pufferoldatba kerültek (95–102 °C), majd ezt 40 °C-on 30 percig proteázos feltárás követte. A hibridizáció FIV- vagy FeLV-specifikus (egyenként 18–25 bp hosszúságú) oligonukleotid próbákkal történt 40 °C-on, 2 órán keresztül. Az RNAscope próbák Z alakúak, és úgy tervezték őket, hogy a célzott RNS-szekvenciára közvetlenül egymás mellé hibridizálódjanak. Az így bekötődött próbák ellentétes oldala szintén egymás mellé kerül, ami lehetővé teszi, hogy oda egy L alakú erősítő molekula rövidebb szárával betapadjon. Ennek a hosszú szárára számos oldalláncon jelerősítő enzimek kapcsolódnak, amelyek a szubsztrátot színreakciót eredményezve hasítják, létrehozva a fénymikroszkóppal látható, esetünkben piros színjelet. A háttérfestést Gill II-es hematoxylinnel végeztük. Minden egyes cél RNS molekula egy pontként jelenik meg a fénymikroszkópos vizsgálat során, ami mutatja a vizsgálat szenzitivitását, valamint így egy szoftver segítségével akár kvantitatív vizsgálatra is lehetőség van a hibridizációt követően. A rendszer érzékenységét mutatja, hogy már

három Z alakú próbapár hibridizációja felismerhető jelet ad a többlépcsős erősítő rendszernek köszönhetően. Ugyanez teszi lehetővé az autolizált mintából származó és emiatt fragmentálódott, vagy más okból kifolyólag kis méretű RNS kimutatását. Ez jelenti a rendszer legnagyobb előnyét a hagyományos *in situ* hibridizációs rendszerekben alkalmazott, legtöbbször egyetlen, hosszú oligonukleotid használatával szemben. A folyamatot a **13. ábra** szemlélteti.



13. ábra: RNAscope *in situ* hibridizáció, sematikus ábra (forrás: www.acdbio.hu)

1: Szövetminta előkezelése, feltárás; 2: Hibridizációs lépés; 3: Amplifikáció a speciális próbákkal, jelerősítés, chromogén hozzáadása; 4: Fénymikroszkópos vizsgálat

A vizsgálatokhoz a következő próbákat használtuk: RNAscope Probe-V-FELV-env (a FeLV *env* génszakaszához kötődik, a 41–1281 nukleotid szakaszhoz), RNAscope Probe V-FIV (5161–6466 nukleotid szakaszhoz kötődik a FIV genomon), RNAscope Positive Control Probe Fc-PPIB (pozitív kontroll, a házi macska peptidylpropyl isomerase B génjéhez kötődik), RNAscope Negative Control Probe-DapB (negatív kontroll, bakteriális *dapB* génhez kapcsolódik).

Az *in situ* hibridizációt követően a metszeteket Panoramic Midi (3DHistech, Budapest) metszetszkennelvel digitalizáltuk, majd azokat CaseViewer programmal vizsgáltuk és reprezentatív felvételeket készítettünk róluk.

8. Eredmények

Magyarországról származó vérminták

Magyarországról összesen 335 db vérminta került vizsgálatra ELISA- és PCR-módszerekkel, ezeket az eredményeket külön és egymáshoz viszonyítva is értékeltük, valamint statisztikai módszerekkel kiszámoltuk a Magyarországra vonatkozó prevalenciaadatokat mindkét vírus esetében.

A macskákról a vérvétel előtt minden esetben részletes adatrögzítés történt. Ezeknek a változóknak a vizsgálata során az alábbiakat számoltuk ki: a vizsgálatban részt vevő állatok átlagos életkora 4,9 év volt (6 hónapostól 18 évesig), összesen 155 nőstény (46,3%) és 180 kandúr (53,7%) szerepelt benne. A 155 nőstényből 90 (58,1%) volt ivaros, és 65 (41,9%) ivartalanított. A 180 kandúrból 119 (66,1%) volt ivaros, és csak 61 (33,9%) ivartalanított. A tartási körülményekről rögzített adatok szerint 77 (23,0%) macska szigorúan benti tartású, 258 (77,01%) állat pedig vagy teljes mértékben kinti tartású, vagy rendszeresen van lehetősége kimenni. A fizikális vizsgálat során 136 (40,6%) macska volt klinikailag egészséges és 199 (59,4%) mutatott valamilyen klinikai tünetet. A vakcinázottsági státusz vizsgálatánál viszonylag kicsi oltottsági arányt lehetett megfigyelni: összesen 98 (29,3%) állatot oltottak be az élete során valamikor (általában kombinált oltással, néhány esetben veszettség ellen), ezek közül pedig csak 39 (11,6%) volt beoltva FeLV ellen is (a vizsgálat időpontjában nem mind volt „érvényes” az adott oltás használati utasítása szerint, azaz kimaradt már legalább egy booster-oltás). A FeLV elleni vakcinázási protokoll betartásának helytelenségét (esetleg a vakcina nyújtotta védelem elmaradását az adott állatban) mutatja, hogy 2 (5,1%) macska az oltás ellenére is FeLV-fertőzöttnek bizonyult. Az eredményeket összefoglalóan a **14. ábra** szemlélteti.



14. ábra: A mintavételt megelőzően feljegyzett egyes változók megoszlása a vizsgált macskákban Magyarországon

A 335 vérmintából összesen 44 (13,1%) volt pozitív FeLV-antigén, és 51 (15,2%) FIV-ellenanyag jelenlétére. Ugyanezen minták PCR-vizsgálata során 58 (17,3%) volt FeLV-pozitív, és 47 (14,0%) FIV-pozitív. Egyazon állatban a FeLV és a FIV okozta társfertőzést 10 esetben (0,03%) figyeltük meg. Egyes esetekben csak az ELISA-, vagy csak a PCR-vizsgálat mutatott pozitív eredményt. FeLV esetén 4/44 ELISA és 14/58 PCR volt pozitív úgy, hogy a másik vizsgálat ezzel párhuzamosan negatív eredményt mutatott. FIV-nél ugyanez 11/51 ELISA és 4/47 PCR volt. Az eredményeket a **3. táblázat** szemlélteti.

3. táblázat: A retrovírus-fertőzések összesítése. Számmal és százalékkal az összes pozitív minta látható, zárójelben azok az adatok szerepelnek, ahol csak az egyik vizsgálati módszerrel lett pozitív az eredmény.

	FIV	FeLV
ELISA	51 (11) 14.4%	44 (4) 12.4%
PCR	47 (4) 13.2%	58 (14) 16.3%

8.1. Magyarországi prevalencia

Az ELISA-eredményekből látszólagos és valódi, a PCR-eredményekből látszólagos prevalenciát számoltunk. A valódi prevalencia kiszámításánál a korábban leírt, a gyártó által megadott szenzitivitási és specifikitási adatokat használtuk. A PCR-eredmények esetén a valódi prevalenciaértéket nem tudtuk kiszámolni a vizsgálatok specifikitás és szenzitivitás értékeinek hiányában. FeLV ELISA-eredmények alapján, Magyarországon a látszólagos prevalencia 14,03% (95% konfidencia-intervallum [CI] mellett 10,72–18,16), a valódi prevalencia 11,78% (95% CI: 8,08–16,4). FIV-nél az ELISA-eredményekből számítva a látszólagos prevalencia 15,22% (95% CI 11,77–19,46), a valódi prevalencia 9,89% (95% CI: 5,93–14,75). A PCR-eredményekből számítva a látszólagos prevalencia értékek az alábbiak szerint alakultak: a FeLV esetében 17,31% (95% CI: 13,64–21,73), FIV esetében pedig 13,13% (95% CI: 9,93–17,17).

Az ELISA- és PCR-eredmények kölcsönös megfeleltethetőségének vizsgálata során a Cohen-féle κ -koefficiens a FeLV esetében 0,786 (95% CI: 0,68–0,87; $p < 0,05$), FIV-nél 0,816 (95% CI: 0,72–0,9; $p < 0,05$). Mindkét eredmény szignifikáns összefüggést mutat a Witness ELISA- és a PCR-eredmények között.

8.2. Magyarországi statisztikai elemzés

Logisztikus regressziós modell alkalmazásával vizsgáltuk egyes változók kapcsolatát a vírusfertőzöttség valószínűségével. 2,85-szor (95% CI: 1,19–8,49; $p = 0,033$) nagyobb eséllyel volt FeLV-, illetve 4,14-szer (95% CI 1,62–14,07; $p = 0,0083$) nagyobb eséllyel FIV-fertőzött egy macska az ELISA-eredmények alapján, amennyiben kinti tartású, vagy bentről ki szokták engedni alkalmanként. Ugyanez az összefüggés látható a PCR-eredményeket vizsgálva is, ahol 2,51-szer (95% CI: 1,156–6,29; $p = 0,0306$) és 3,41-szer (95% CI: 1,32–11,64; $p = 0,0235$) nagyobb a fertőzöttség esélye FeLV- és FIV-vírusokat tekintve. Ezek az eredmények szignifikánsnak tekinthetők a kapott p -értékek alapján.

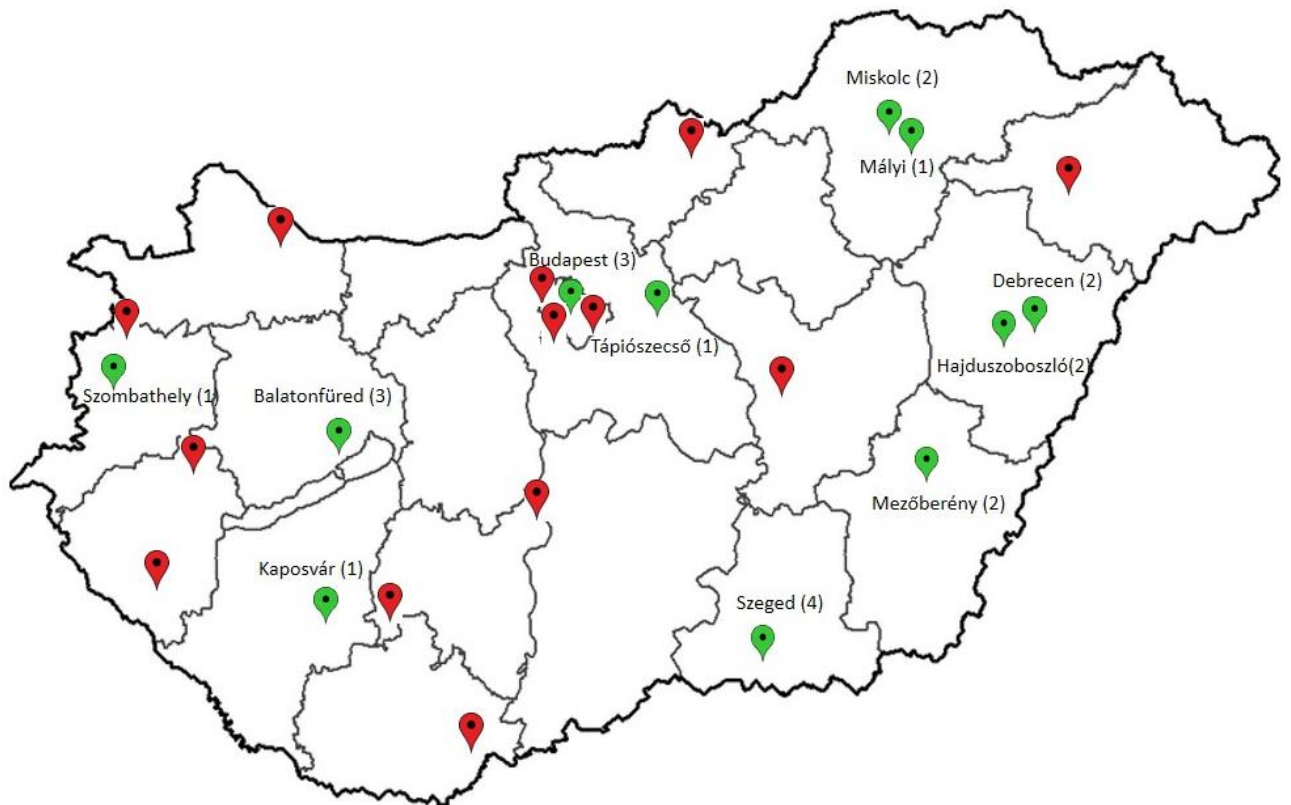
Az alábbi változók vizsgálata során ugyan nem mindig kaptunk statisztikailag szignifikáns eredményeket, de mégis jól mutatják azokat a tendenciákat, amik a szakirodalomban is említésre kerülnek. Ilyen például az állat kora és a retrovírus-fertőzöttség közötti kapcsolat: FeLV esetén sem az ELISA-, sem a PCR-vizsgálatok eredményei nem mutattak érdemi összefüggést a korrallal, azonban FIV-nél megfigyelhető, hogy minden év elteltével, szignifikáns módon, 1,12-szer (95% CI 1,04–1,19; $p = 0,0012$ ELISA és 95% CI 1,04–1,19; $p = 0,0014$ PCR) nagyobb az esély, hogy a macska vizsgálata pozitív eredményt mutasson. Ugyanígy az ivar esetében, a kandúrok 1,32-szer (95% CI: 0,71–2,5; $p = 0,3872$) nagyobb eséllyel fertőződnek FeLV-és/vagy FIV-vírussal, valamint az ivaros kandúrok 1,34-

szer (95% CI: 0,57–3,42; $p = 0,5187$), az ivaros nőstények 0,78-szor (95% CI 0,3–2,08; $p = 0,609$) nagyobb eséllyel fertőződnek eredményeink alapján.

8.3. Magyarországi szekvenciaelemzés és filogenetikai eredmények

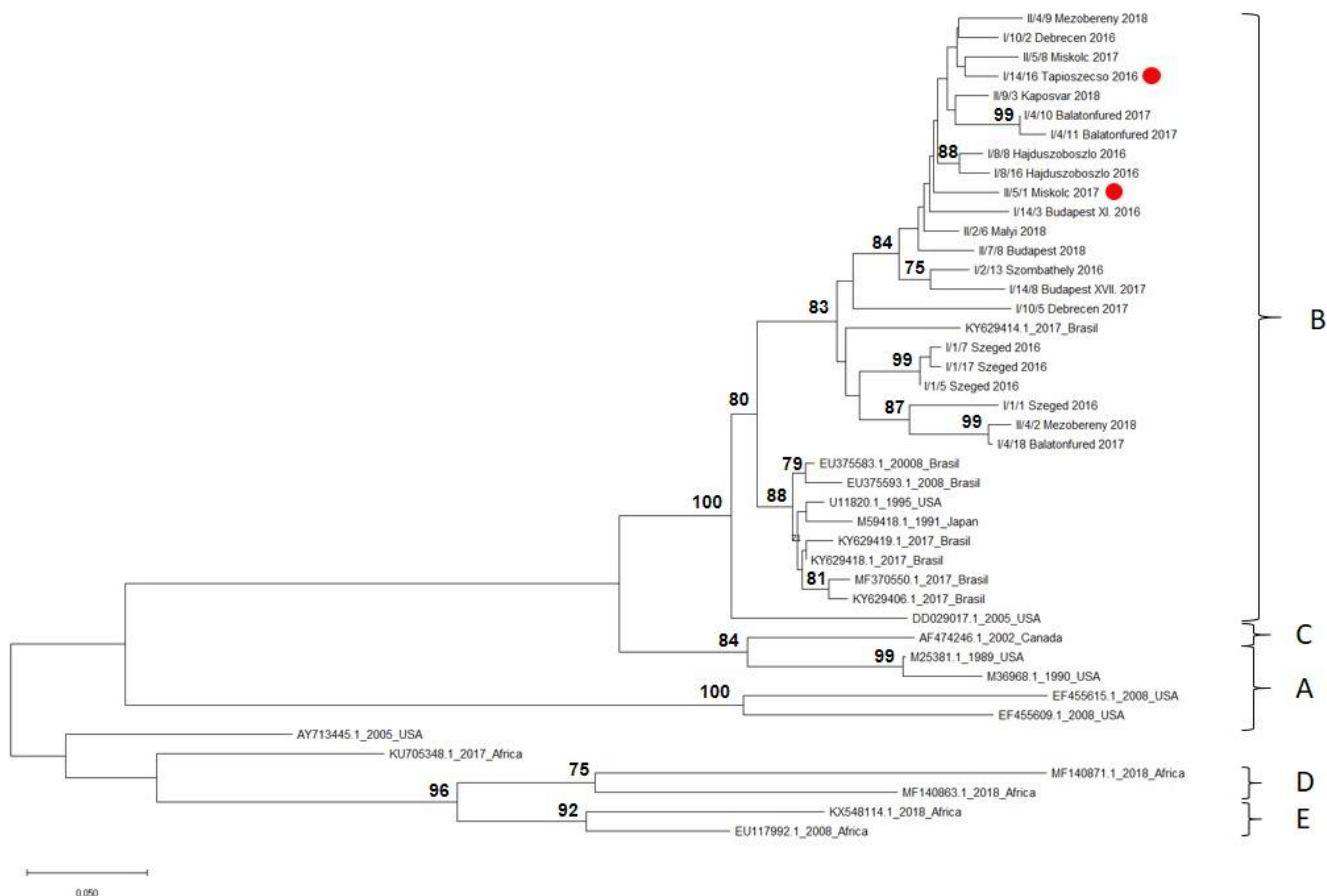
Az összes, PCR-vizsgálattal FIV-pozitív mintából 22 esetében sikerült meghatározni a *pol* gén részleges szekvenciáját. A **15. ábra** mutatja a szekvenciák származási helyeit. A többi minta esetén feltételezhető, hogy túl kevés vagy rossz minőségű nukleinsavat tartalmaztak, ezért nem volt lehetséges a Sanger-szekvenálás. A kapott szekvenciák összehasonlítását a GenBank-ban található referenciaszekvenciákkal végeztük többszörös illesztés és maximum-likelihood analízissel. Ezek alapján a hazai minták mind a B szubtypusba tartoztak. A magyarországi minták egy monofiletikus csoportba tartoztak az altípuson belül, amibe belekerült egy olyan törzs is, amit 2017-ben Joinville-ben (Brazília, akcessziós szám: KY629414.1) írtak le (**16. ábra**).

A szekvenciák páronkénti genetikai elemzése és összehasonlítása során látható, hogy az átlagos genetikai hasonlóság a törzsek között 98,2% volt (a legkisebb hasonlósági érték 88,1%, a legnagyobb 99,8%). A minták Magyarország legtöbb földrajzi régióját képviselik. A GenBank-ban a szekvenciák a következő akcessziós számok alatt találhatóak: MN401425–MN401446.



15. ábra: A mintagyűjtés helyszínei, kiemelve a szekvenálásra került FIV-pozitív mintáké (térkép: www.terkepek.net)

Magyarország térképén jelöltük mind a 24 mintavételi helyszínt, ahonnan a kutatásban szereplő vérminták származnak (piros és zöld pontok). A zöld pontok helységnevével jelölik a 22 részlegesen megszekvenált FIV-pozitív minta származási helyeit. A helységnevé mellett zárójelben látható az onnan származó szekvenciák száma.



16. ábra: Filogenetikai törzsfa a Magyarországon kimutatott FIV-szekvenciákkal

A filogenetikai fa a magyarországi részleges *pol* szekvenciákból (FIV) és a GenBank-ban található referenciaszekvenciákból készült. A maximum likelihood bootstrap-értékek (≥ 70) százalékokként láthatók az ágak fölött. Piros pont jelöli a két benti tartású macskából származó szekvenciákat. A kutatásban szereplő mintákat a kutatásbeli kódjuk, illetve a származási hely neve jelöli, míg a GenBank-ból származó referenciaszekvenciákat akcessziós számuk, a publikálás dátuma és a származási ország. Jobb oldalon a szekvenciák altípusbeli besorolása látható.

8.4. Az írországi mintavételből származó eredmények

Összesen 183 db vérmintát gyűjtöttünk a 10 rendelőből. A vizsgálat során ugyanazokat a szempontokat vettük figyelembe, mint a hazai kutatás során.

A macskák átlagéletkora 4,9 év (a legfiatalabb 3 hónapos, a legidősebb 21 éves). Összesen 88 nőstény (48,1%) és 95 kandúr (51,9%) került a kutatásba, ezek közül 32 nőstény (36,4%) és 38 kandúr (40,0%) ivaros, 56 nőstény (63,6%) és 57 kandúr (60,0%) pedig ivartalanított. A tartási körülményekre adott válaszok alapján 40 állatot (21,9%) tartanak szigorúan lakáson belül, 143 macskát (78,1%) pedig vagy teljes mértékben kint tartanak, vagy rendszeresen van lehetősége kimenni. A fizikális vizsgálat alapján 85 macska (46,5%) klinikailag egészségesnek bizonyult, míg 98 állat (53,5%) mutatott valamilyen tünetet. A vakcinázottság szempontjából csak 63 állat (34,4%) rendelkezett valamilyen oltással az élete során (általában kombinált oltás), és ezek közül csak 45 (24,6%) volt FeLV ellen is beoltva. Habár szinte az összes FeLV elleni oltás érvényes volt a vizsgálat időpontjában, mégis találtunk 2 db PCR-pozitív esetet (ebből egy oltás érvényességi ideje lejárt) és 1 db ELISA-pozitív esetet. Ezeket az adatokat a **17. ábra** szemlélteti.



17. ábra: A mintavételt megelőzően feljegyzett egyes változók megoszlása a vizsgált macskákban az írországi vizsgálat során

Az ELISA-tesztek eredményei alapján az összes mintából 6 (3,3%) lett FeLV-pozitív és 19 (10,4%) FIV-pozitív. PCR-vizsgálattal ettől kissé eltérő eredményeket kaptunk: 20 (10,9%) FeLV-pozitív és 16 (8,7%) FIV-pozitív esetet találtunk. Egy esetben (0,55%) FeLV- és FIV-társfertőzést állapítottunk meg, amit az ELISA- és PCR-eredmény is igazolt. Itt is voltak olyan esetek, ahol csak az egyik vizsgálati módszer eredménye volt pozitív, míg a másik negatív. FeLV-nél ez így alakult 2/6 ELISA és 16/20 PCR eredmény kapcsán, FIV-nél pedig 9/19 ELISA és 6/16 PCR során (**4. táblázat**).

4. táblázat: A retrovírus-fertőzések összesítése az írországi mintákból. Számmal és százalékkal az összes pozitív minta látható, zárójelben azok az adatok szerepelnek, ahol csak az egyik vizsgálati módszerrel lett pozitív az eredmény.

	FIV	FeLV
ELISA	19 (9) 10,38%	6 (2) 3,28%
PCR	16 (6) 8,74%	20 (16) 10,93%

8.5. Írországi prevalencia

A prevalenciaadatok megállapítása során a látszólagos prevalencia FeLV esetén 3,28% (95% CI: 1,51–6,97) ELISA-módszerrel, 11,63% (95% CI: 7,65–17,28) PCR-rel; míg FIV esetén ELISA-vizsgálattal ez 10,87% (95% CI: 7,15–16,19), PCR-rel 9,30% (95% CI: 5,81–14,58). A valódi prevalenciát az ELISA-eredmények kapcsán tudtuk megállapítani a rendelkezésre álló fajlagossági és érzékenységi adatok segítségével FIV-nél, ez 4,90% (95% CI: 0,63–11,00) volt. FeLV esetén a valódi prevalencia nem volt meghatározható.

A vizsgálati módszerek eredményeinek egymásnak való megfeleltethetőségét itt is a Cohen-féle kappa együttható kiszámításával vizsgáltuk, ami 0,287 (95% CI: 0,08–0,55, $p < 0,05$) volt FeLV és 0,523 (95% CI: 0,30–0,73, $p < 0,0001$) FIV esetén. Mindkét érték szignifikáns összefüggést mutat a kapott ELISA- és PCR-eredmények között.

8.6. Írországi statisztikai elemzés

Az egyes változók és a retrovírus-fertőzöttség kapcsolatának vizsgálatát korrelációanalízissel végeztük. Ennek során azt találtuk, hogy a kijáró életmódú macskák körében nagyobb valószínűséggel fordul elő FeLV- (Pearson-féle korrelációs együttható 0,61, $p = 0,342$) és FIV-fertőzés (Pearson-együttható 0,82, $p = 0,08$). Mindkét értéket az ELISA-eredményekből számítottuk. A PCR-vizsgálattal kapott eredményekből szintén ez

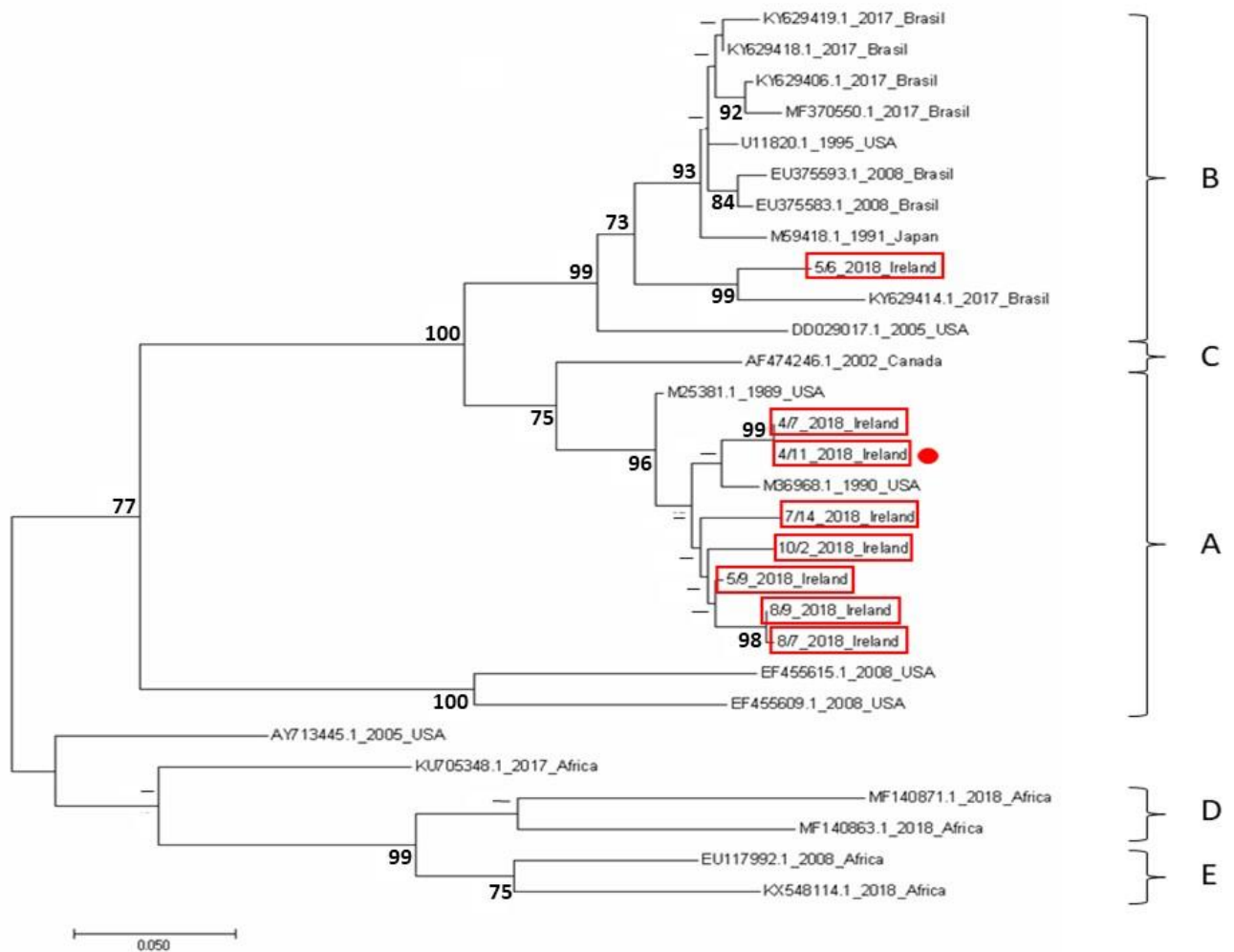
látható: FeLV esetén a Pearson-együttható 0,8, $p = 0,08$, míg FIV esetén az együttható 0,66, $p = 0,28$. Ez a tendencia megegyezik a magyar, illetve nemzetközi megfigyelésekkel, bár a kapott értékek jelen esetben nem voltak statisztikailag szignifikánsak.

Szintén nem találtunk szignifikáns összefüggést az állatok kora és fertőzöttségi státusza között. A macskák ivara és fertőzöttsége között azonban ismét a korábban már mások által is alátámasztott kapcsolatot figyeltük meg: FIV-nél ELISA-módszerrel ($p = 0,15$) és PCR-vizsgálattal ($p = 0,19$) is a kandúrok nagyobb eséllyel voltak fertőzöttek, mint a nőstények. Ugyanez a tendencia volt látható FeLV esetén is ELISA-vizsgálattal ($p = 0,68$), bár ez nem volt szignifikáns. A FeLV PCR eredmények nem mutattak összefüggést az ivar és a fertőzöttségi státusz között.

8.7. Írországi szekvenciaelemzés és filogenetikai eredmények

A FIV-pozitív minták filogenetikai vizsgálata során 8 esetben tudunk részleges *pol* szekvenciát meghatározni a 16 mintából. A többi minta esetén feltételezhető, hogy túl kevés vagy rossz minőségű nukleinsavat tartalmaztak, ezért nem volt lehetséges a Sanger-szekvenálás. A többszörös illesztés és maximum likelihood analízis vizsgálat kimutatta, hogy 7 törzs az A altípusba, míg 1 a B altípusba tartozik. A FIV-A altípuson belül a vizsgált szekvenciák egy monofiletikus csoportot alkotnak. A B szubtípusba tartozó törzs genetikai hasonlóságot (93,7%) mutat a magyarországi törzsekkel is kapcsolatba hozott brazil törzsszel (Joinville, 2017; akcessziós szám: KY629414). A vizsgálat során rekonstruált filogenetikai fát a **18. ábra** szemlélteti.

A szekvenciák páronkénti genetikai elemzése és összehasonlítása során látható, hogy az átlagos genetikai hasonlóság a törzsek között 91,15% volt (a legkisebb hasonlósági érték 82,48%, a legnagyobb 99,81%). A GenBankban a szekvenciák a következő akcessziós számok alatt találhatóak: MT782321–MT782328.



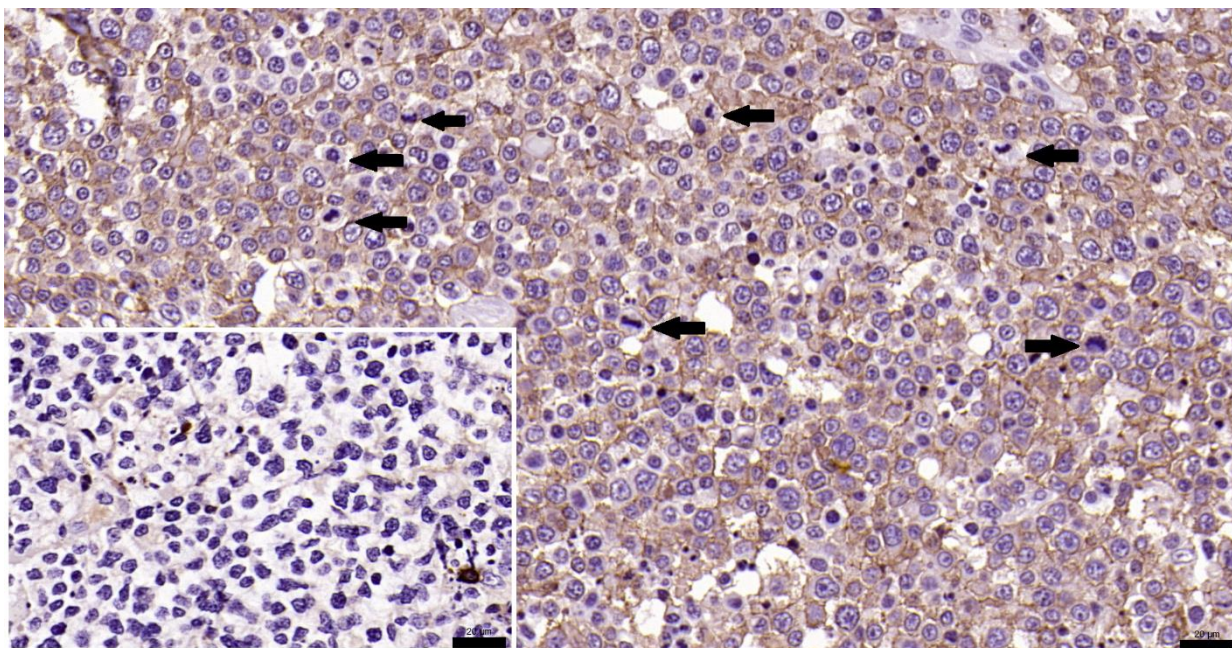
18. ábra: Filogenetikai törzsfa az írországi FIV-szekvenciákkal

A kapott szekvenciaadatokat a GenBank-ban található referencia szekvenciákkal vetettük össze. A maximum likelihood bootstrap értékek (≥ 73) százalékokként láthatók az ágak fölött.

Piros pont jelöli a benti tartású macska szekvenciáját. A kutatásban szereplő mintákat a kutatásbeli kódjuk, illetve a származási hely neve jelöli, és bekeretezve szerepelnek, míg a GenBank-ból származó referencia szekvenciákat akcessziós számuk, a publikálás dátuma és a származási ország jelöli. Jobb oldalon a szekvenciák altípusbeli besorolása látható.

8.8. Immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs eredmények

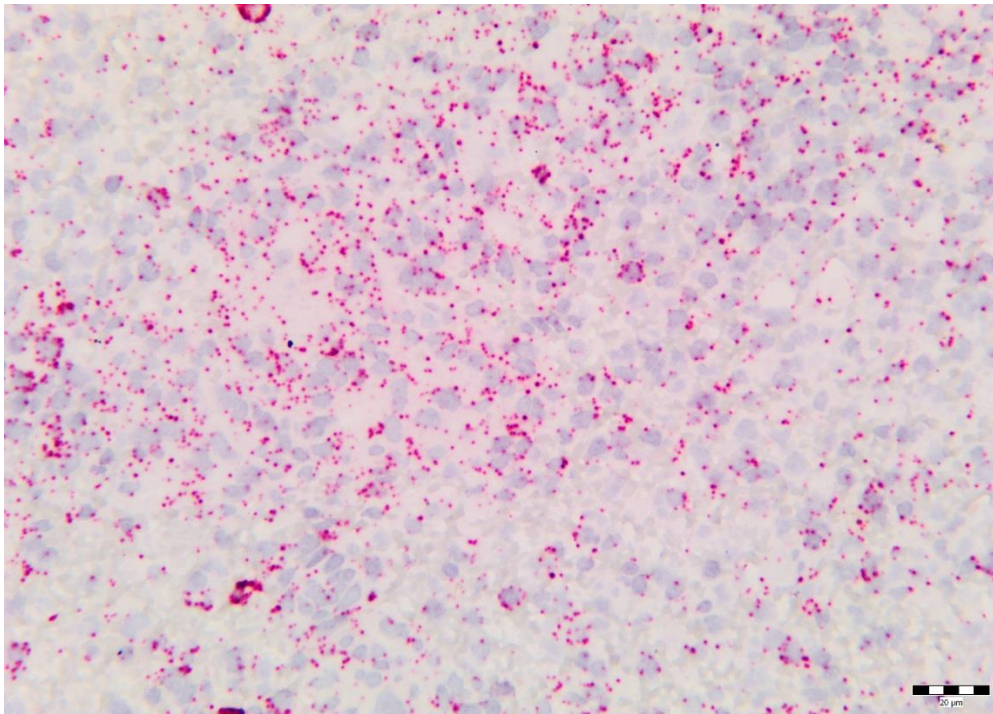
A rutin kórszövetteni vizsgálatok során számos daganatos elváltozást találtunk a tanszékre került macska tetemek szöveteiben, ezek közül különös figyelmet fordítottunk a különböző lymphomákra és csontvelő-elváltozásokra. Lymphoma esetén a szöveteken minden esetben immunhisztokémiai vizsgálatot is végeztünk a daganat-immunfenotípus megállapításának céljából (19. ábra).



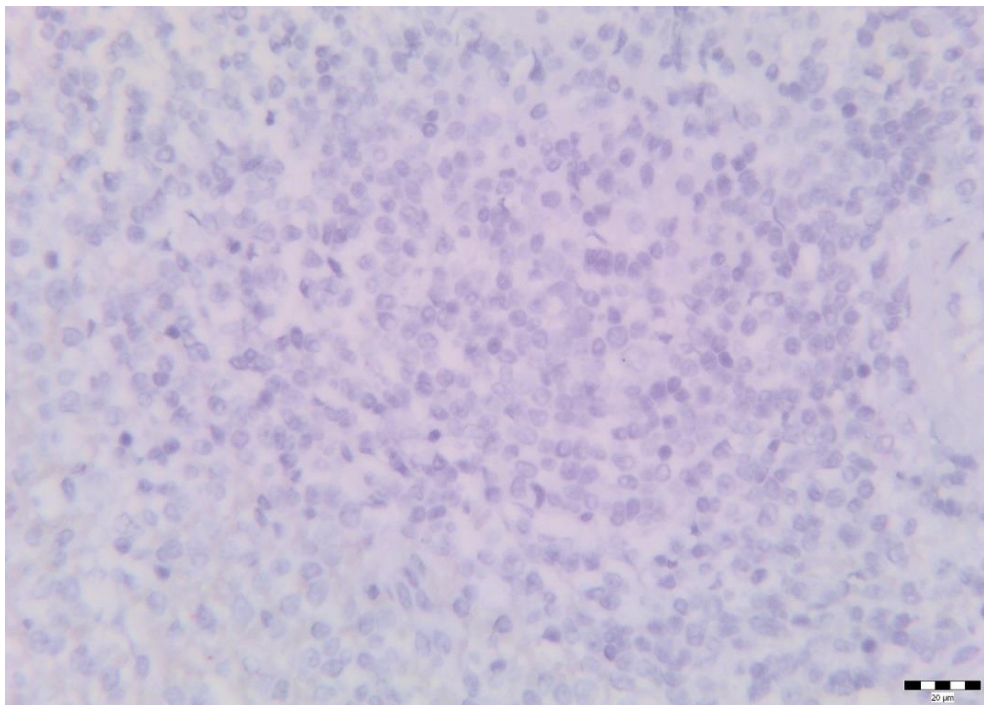
19. ábra: Gerincvelő-lymphoma immunhisztokémiai festése (CD20, CD3 IHC, 400× nagyítás, bar = 20µm)

A képen CD20 B lymphocytamerkerrel szinte 100%-os, erős membránasszociált festődés látható a daganatos lymphoid sejtekben, nyilakkal jelöltük az osztódó sejtalakokat. A bal alsó sarokban a CD3 ellenanyaggal végzett festés eredménye látható: alig néhány sejt membránján figyelhető meg pozitív színreakció. Ezek alapján kimondható a B-sejtes lymphoma diagnózisa.

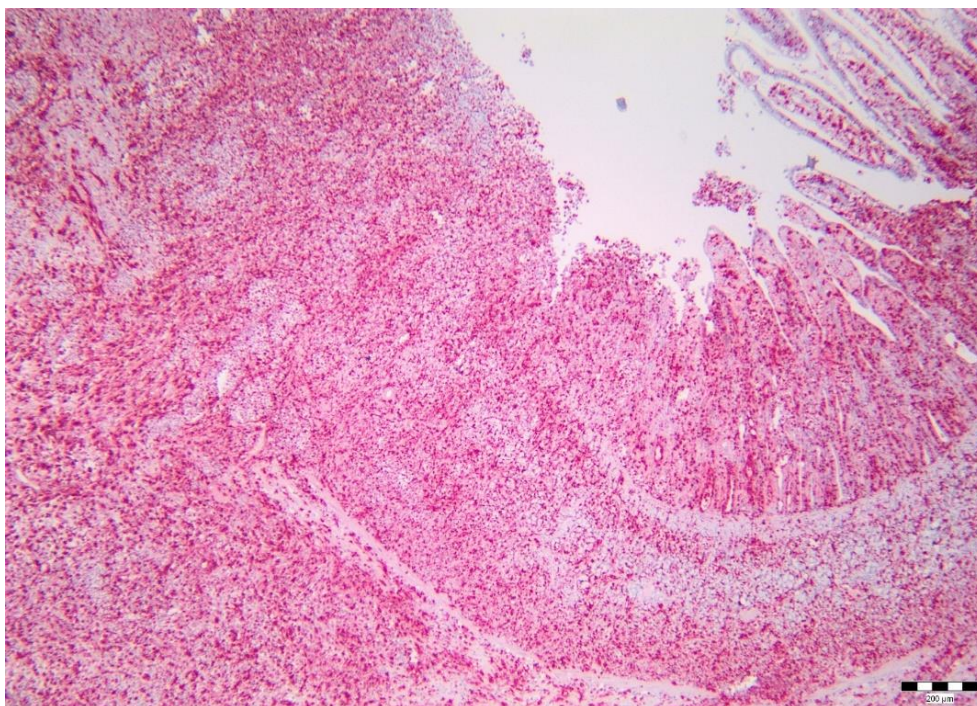
A szövetekből ezután végzett PCR-vizsgálatokat követően, amennyiben azok pozitívak lettek FeLV és/vagy FIV jelenlétére, *in situ* hibridizációval próbáltuk láthatóvá tenni a virális RNS jelenlétét az elváltozásban, illetve reprezentatív szövetekben. Számos esetben sikerrel jártunk, pl. egy alimentaris lymphoma (**22. és 23. ábra**), egy primer gerincvelői lymphoma (**24. ábra**) és egy nem-regeneratív anaemiás macska (**25. ábra**) mintáin. A digitalizált szövettani képeken látható, hogy minden macskaeredetű szövet pozitív festődést mutatott a háztartási PPIB-referenciagénnel, amit pozitív kontrollként alkalmaztunk (**20. ábra**). A szöveti negatív kontrollként felhasznált kutyaeredetű minták nem mutattak festődést (**21. ábra**). Negatív kontrollként *Bacillus subtilis* DapB (dihidrodipikolinát-reduktáz) metszetet, egy esetben pedig FeLV PCR-negatív lymphomás szöveteket is használtunk, ezekben a lymphoid sejtekben sem volt piros festődés a virális RNS hiánya miatt. Fertőzés esetén a FeLV- vagy FIV-partikulákat a sejtek cytoplazmájában látható intenzív piros pontok/halmazok jelezték. Minél nagyobb piros halmazok láthatók, annál nagyobb mennyiségű virális RNS volt a cytoplazmában. A daganatos sejteken vagy csontvelői hematopoietikus sejteken kívül pozitív festődést láttunk általában a lymphoid sejtekben (lép, nyirokcsomók) is.



20. ábra: Pozitív kontroll macskaszövet, melyet az ISH-vizsgálatokhoz alkalmaztunk (PPIB-referenciagén ISH, 400× nagyítás, bar = 20μm)

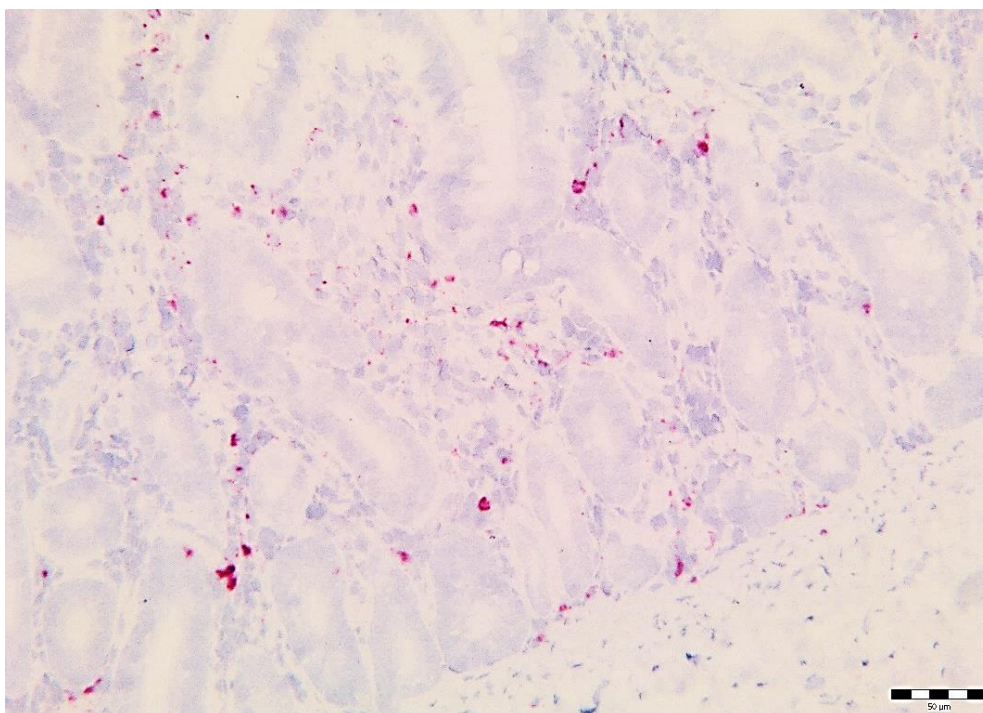


21. ábra: Negatív kontroll kutyaszövet, amelyet az ISH-vizsgálatokhoz alkalmaztunk (DapB ISH, 400× nagyítás, bar = 20μm)



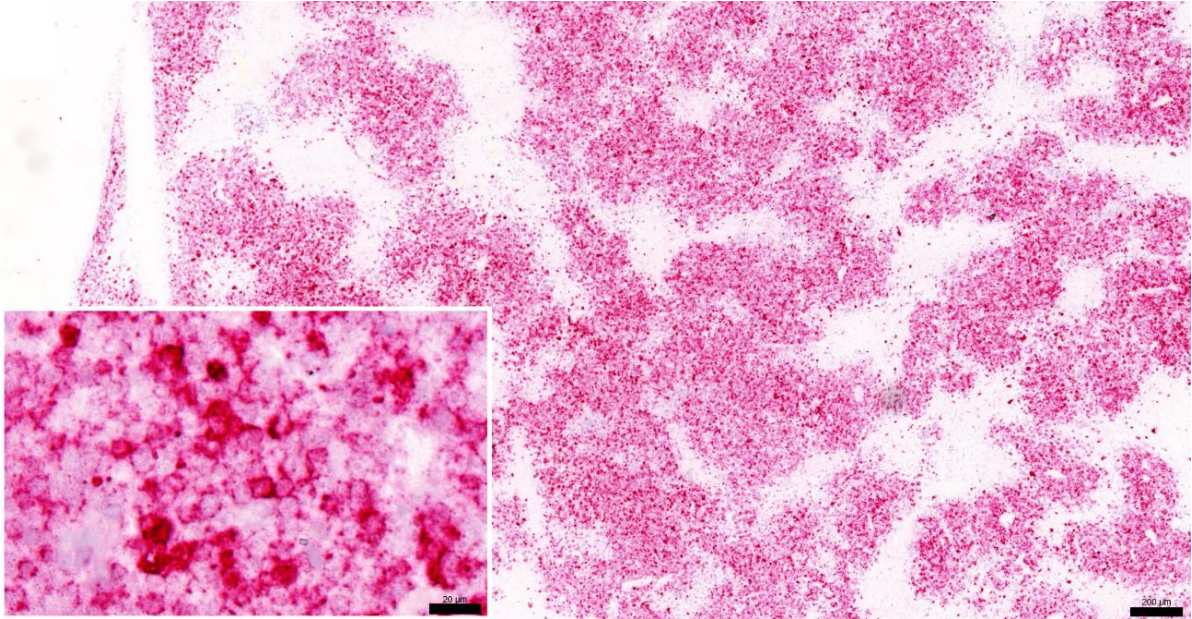
22. ábra: Alimentaris lymphoma, macska, vékonybél (FeLV ISH, 40× nagyítás, bar = 200μm)

FeLV-pozitív PCR-vizsgálat után elvégeztük a FeLV-RNS jelenlétére irányuló ISH vizsgálatot. Jól látható a vékonybél szövetében lévő lymphoid sejtek fertőzöttsége, így valószínűsíthető a FeLV-asszociált kórkép.



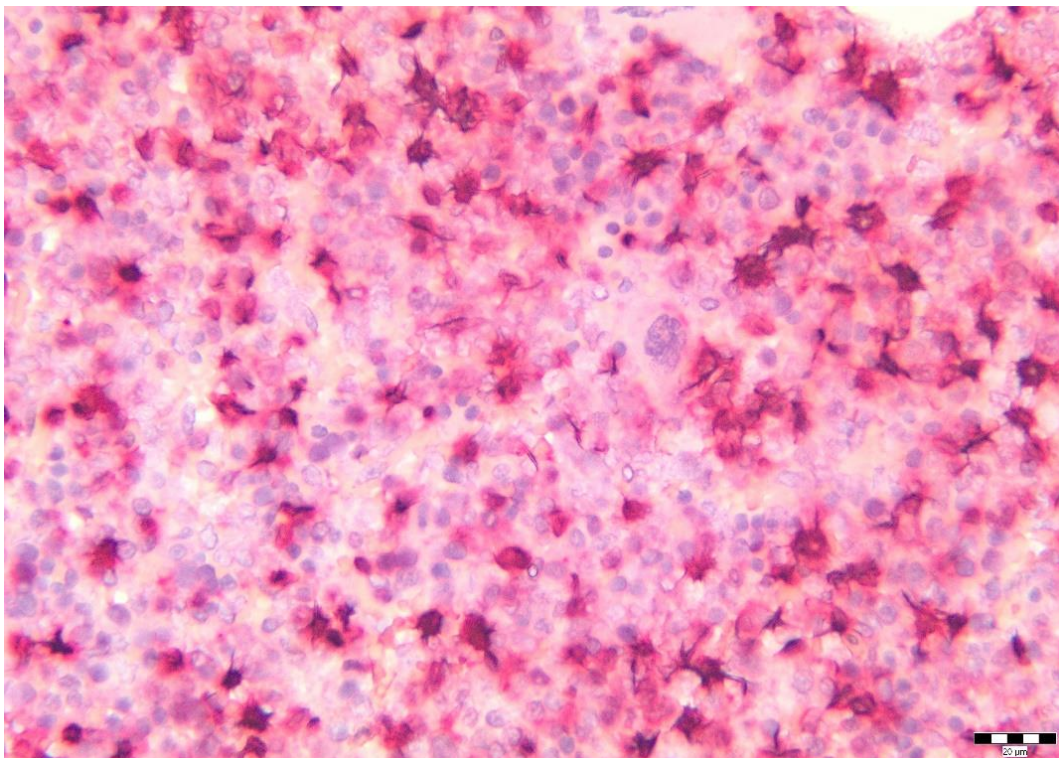
23. ábra: Alimentaris lymphoma, macska, vékonybél (FIV ISH, 200× nagyítás, bar = 50μm)

Az alimentaris lymphomában elhullott macska PCR-vizsgálata során FeLV- és FIV-konkurrens fertőzés igazolódott, így FIV ISH-vizsgálatot is végeztünk az ebből az állatból származó szöveteken. Látható a vékonybél érintett szakaszán, hogy a FeLV-RNS-sel ellentétben (20. ábra) milyen kevés FIV-RNS található a lymphoid sejtekben.



24. ábra: Primer extranodális idegszöveti B-sejtes lymphoma, macska, gerincvelő (FeLV ISH, 40× nagyítás, bar = 200µm)

A képen a gerincvelő szövetét infiltráló daganatos lymphoid sejtek tömege látható FeLV ISH-vizsgálat után. Beágyazott kép: Látható az egyedi pontokon kívül nagyobb chromogén-halmazok kialakulása, ami a nagymennyiségű virális RNS jelenlétét mutatja



25. ábra: Nem-regeneratív anaemia következtében elhullott macska, csontvelőminta (FIV ISH, 400× nagyítás, bar = 20µm)

Ebben az esetben a csontvelőből készült FIV-pozitív PCR-t követően FIV ISH-vizsgálatot végeztünk, ahol számos hematopoietikus sejt mutatott pozitívást.

8.8.1. Osteochondromatosis *in situ* hibridizációs vizsgálata

A macskák osteochondromatosisa nagyon ritka megbetegedés, a szakirodalomban is csak kevés leírás található (Pool és Carrig 1972, Rosa és Kirberger 2012, de Oliveira Reis et al. 2017, Thompson és Pool 2017). Mivel hazánkban a kórkép még nem került leírásra és az elérhető nemzetközi szakirodalomban a FeLV genetikai állományát eddig csak PCR-vizsgálattal azonosították, az esetet részletesen mutatjuk be.

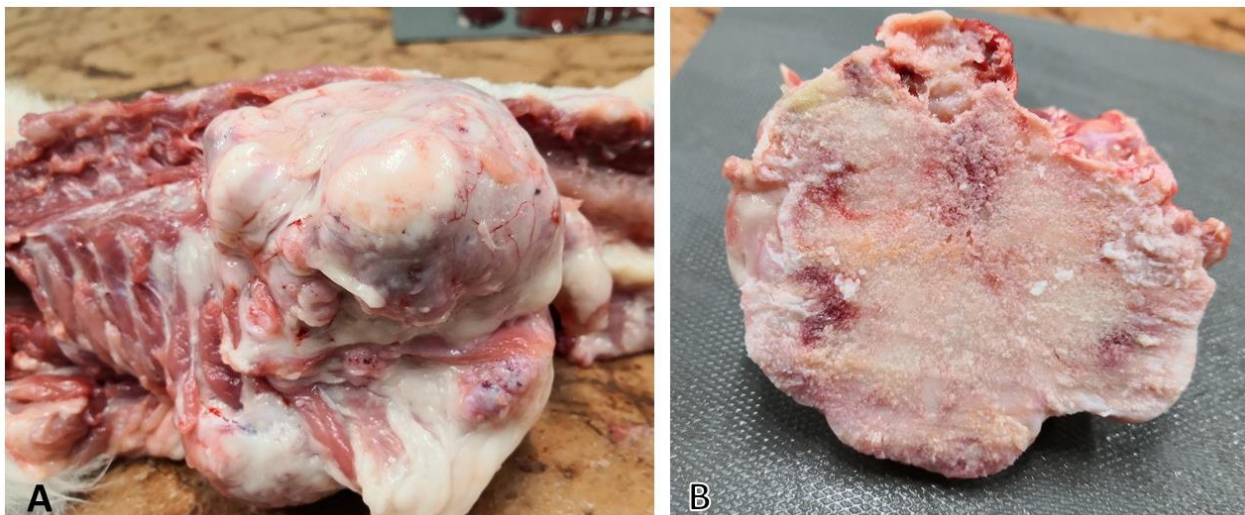
Egy 3,5 éves, európai rövidszőrű, ivartalanított kandúr macska teteme került Tanszékünkre patológiai-diagnosztikai vizsgálat céljából (Dr. Koltai Zsófia jóvoltából). Az állaton kb. 9 hónap alatt több, csontkemény duzzanat nőtt a gerincközeli és szegycsonti tájékokon, továbbá a kórelőzményben ELISA-gyorstesztel alátámasztott FeLV-pozitivitás szerepelt.

Az állat életében történt első fizikális vizsgálat során nem tapasztaltak tüneteket, csak a lapocka mögött éreztek egy kisebb csontkemény duzzanatot, amely röntgenvizsgálattal is jól látható, csontszerű képletnek bizonyult. Nyolc hónappal később már enyhén beszűkült mozgást figyeltek meg, mivel több másik, az előzőhöz hasonló duzzanat nőtt a macskán. Röntgenvizsgálattal több, elmeszesedett kinövés volt látható a korábban említett csontokhoz kapcsolódva, néhány kinövés a mellkas üregébe is benyúlt (**26. ábra**). A vérlaborvizsgálat során kissé alacsonyabb fehérvérsejtszámot és IRIS2-es (International Renal Interest Society) besorolású idült vesebetegségre utaló karbamid- és kreatinin-értékeket figyeltek meg. A hasi ultrahangvizsgálat során elváltozást, áttetre utaló leletet nem találtak. Az állatot a rossz kórjóslatra való tekintettel véglegesen elaltatták.



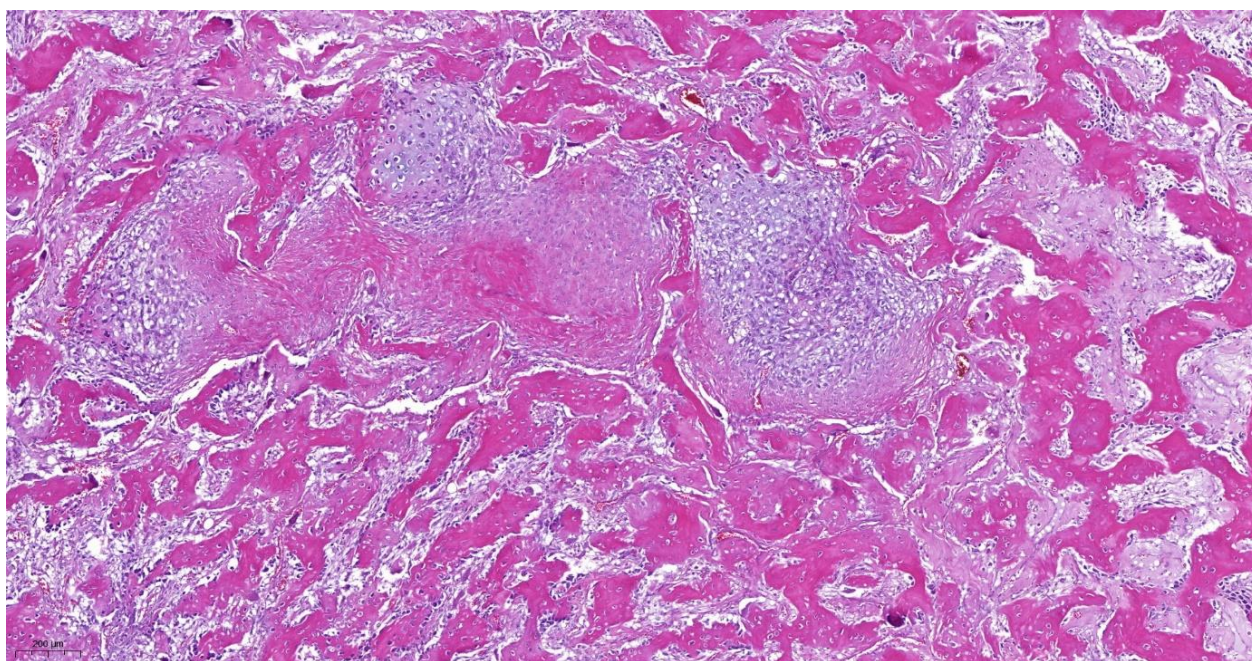
26. ábra: A csontos kinövések (csillagok) képe röntgenvizsgálattal osteochondromatosis során

A kórbonctani vizsgálat során a szegycsontot, bordákat és gerincet érintő, nagyméretű (a legkisebb 3 cm, a legnagyobb 8 cm átmérőjű) csontos kinövéseket találtunk (**27. ábra**), valamint zsíros infiltrációra utaló, enyhén duzzadt, sárgásbarna színű májat. A reprezentatív minták rutin kórszövetteni vizsgálata során a csontos jellegű elváltozásokban proliferatív jellegű folyamatokat figyeltünk meg, amelyekben endochondralis jellegű csontosodás volt látható, kiterjedt osteoidszövet-képződéssel, amit nagy szigetekben porcszövet vett körül (**28. ábra**). A csontos képleteket a vizsgálat előtt hangyasavas oldatban dekalcináltuk.



27. ábra: Osteochondromatosisban látható elváltozások

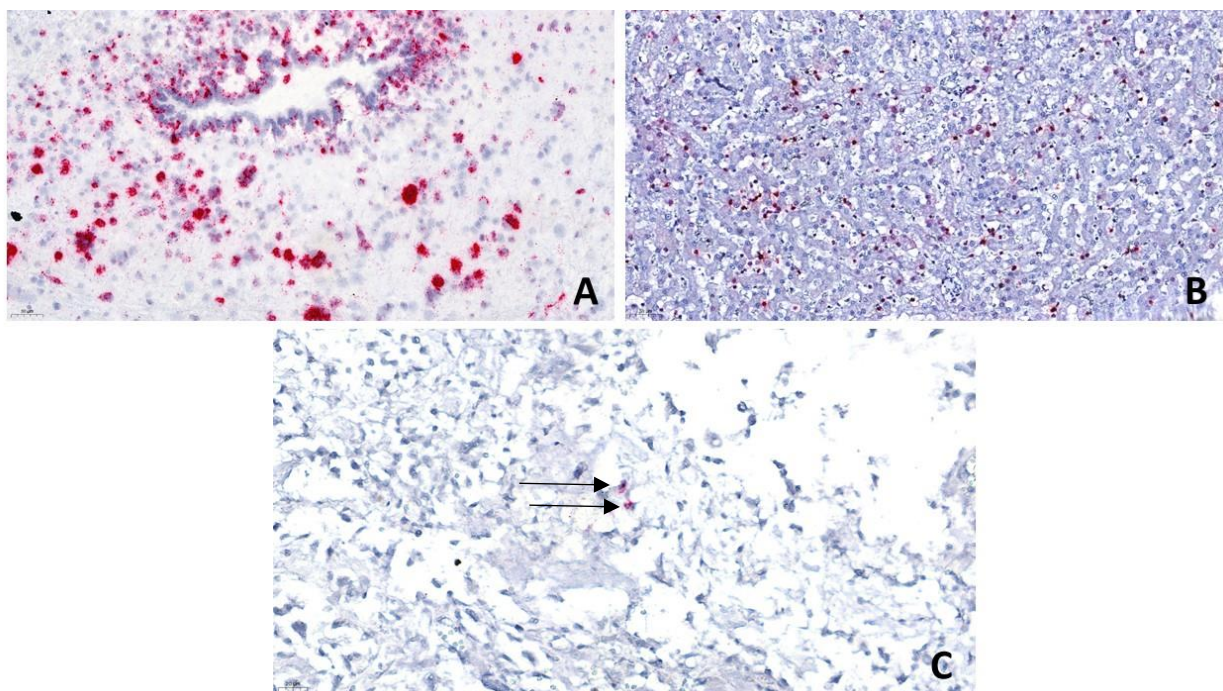
A csontból kiinduló proliferatív elváltozások (A), valamint az egyik elváltozás metszészlapja (B)



28. ábra: Osteochondromatosisban látható elváltozás kórszövettani képe (H-E festés, 40× nagyítás, bar = 200 µm)

A FeLV-státusz ellenőrzésére a lépből, a mesenterialis nyirokcsomóból és a májból készített szervpoolból, valamint külön-külön a csontvelőből és a proliferatív elváltozásból PCR-vizsgálatot végeztünk, ami minden minta esetében igazolta a FeLV-fertőzöttséget (ezzel párhuzamosan mindegyik FIV-negatív lett). A FeLV szöveti jelenlétének igazolására *in situ* hibridizációs vizsgálatot végeztünk, amelynek során nagy mennyiségben találtuk meg

a vírus genetikai állományát a lépben, a további nyirokszövetekben, a májban, ill. kisebb mennyiségben az agyvelő frontalis területén (29. ábra). A daganatos szövetekben is, a nyirokszervekhez és a májhoz képest kisebb mennyiségben, de sikerült láthatóvá tennünk a FeLV-vírust ezzel a módszerrel. Ez utóbbira magyarázat lehet a szövet-előkészítéséhez elengedhetetlen dekalcináció bizonyítottan káros hatása az ISH-kimutatásra.



29. ábra: Osteochondromatosis miatt véglegesen elaltatott macska szövetei, FeLV ISH (nagyítás 200× [A, B], 400× [C]; bar = 50 µm [A, B], 200 µm [C])

A képen piros chromogén jelöli a macska (A) agyvelő-, (B) máj- és (C) tumorszöveteiben (nyilak) lévő FeLV-fertőzött sejteket

A kórelőzményi adatok, a kórbonctani elváltozások és az állat FeLV-pozitív státusza alapján az osteochondromatosis (másnéven multiplex porcos exostosis) gyanúja már előzetesen is felmerült. Az általunk – a szakirodalomban talált adatok alapján a világon elsőként – végzett FeLV ISH-vizsgálat sikeresen igazolta a vírus jelenlétét az elváltozásban is, ami egyértelműen megerősítette a diagnózist. Ez a ritka elváltozás az elsődleges csonteredetű daganatok csoportjába tartozik (Thompson és Pool 2017), macskában FeLV-fertőzéshez kötött (Pool és Carrig 1972, Thompson és Pool 2017, Rosa és Kirberger 2012). A betegség 1 és 8 éves kor között válik láthatóvá általában, de legtöbbször 2–4 éves korban diagnosztizálják (Thompson és Pool 2017). Pontos kórfejlődése nem ismert, kezelésére nincsenek elérhető protokollok a szakirodalomban.

9. Megbeszélés, következtetések

Manapság a házi macskák többsége már társállatként, szinte családtagként szerepel a tulajdonosaik életében. Emiatt megnövekedett az igény betegségeik behatóbb vizsgálatára, korszerűbb diagnosztikai módszerek és hatékonyabb gyógykezelési eljárások kidolgozására, legfőképpen pedig a betegségek megelőzésére. Előtérbe kerültek ismét olyan fontos fertőző betegségek, mint a retrovírusok által okozott kórképek. Ezt jól mutatja az is, hogy a legfrissebb, macskák retrovírusaival foglalkozó szakmai kiadvány 2020-ban került kiadásra az American Association of Feline Practitioners gondozásában (AAFP 2020), megújítva a 2008-as Retrovirus Testing and Management Guidelines című kiadványt (Levy et al. 2008). További segítség a megelőzéssel kapcsolatos kérdésekben a World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) által kiadott vakcinázási útmutató (Day et al. 2016), amiben szintén szerepelnek a retrovírusok elleni védekezés lehetőségei.

Magyarországon eddig csak kisebb, helyi jelentőségű vagy kis elemszámú vizsgálat született a FeLV és a FIV elterjedtségéről, ezért legfőbb célunk egy szisztematikus, átfogó jellegű és országos szintű felmérés volt, illetve a hazai törzsek filogenetikai jellemzése. A dolgozatban bemutatott további eredmények segíthetik a későbbiekben a diagnosztikai eljárások finomítását, a retrovírusok által okozott kórképek patomechanizmusának jobb megértését, illetve a fertőzés kapcsán kialakult, sokszor téves hagyományokon alapuló klinikai szemlélet és hozzáállás javítását.

Az eredeti célkitűzésen felül lehetőségünk adódott egy szintén eddig nem vizsgált országban is hasonló vizsgálatokat lefolytatni, aminek az eredményeit összehasonlíthattuk a már ismert adatokkal (mind magyar–ír viszonylatban, mind saját–európai eredmények viszonylatában).

9.1. Az alkalmazott vizsgálati módszerek eredményeinek általános összehasonlítása

Néhány esetben egymástól eltérő eredményeket kaptunk ugyanazon mintából az ELISA- és PCR-vizsgálati módszerekkel, amire számos magyarázat fennállhat. FeLV esetében az ELISA a p27 antigén jelenlétét, a PCR a genom LTR régió U3 szakaszát mutatja ki a vérből, tehát mindkettő direkt víruskimutatási módszernek tekinthető. Negatív ELISA- és pozitív PCR-eredmény jelentkezhetsz a fertőződés korai szakaszában, vagy a betegség regresszív fázisában, amikor csak nagyon kismennyiségű provirális DNS/virális RNS van jelen a keringésben, és az antigénszint még a kimutatható küszöbérték alatt van. A FeLV elleni vakcinázás vagy maternális immunitás megléte jelen kutatásban nem jelentett

problémát, mivel az alkalmazott diagnosztikai módszerek ennél a vírusnál nem ellenanyagok jelenlétét vizsgálják.

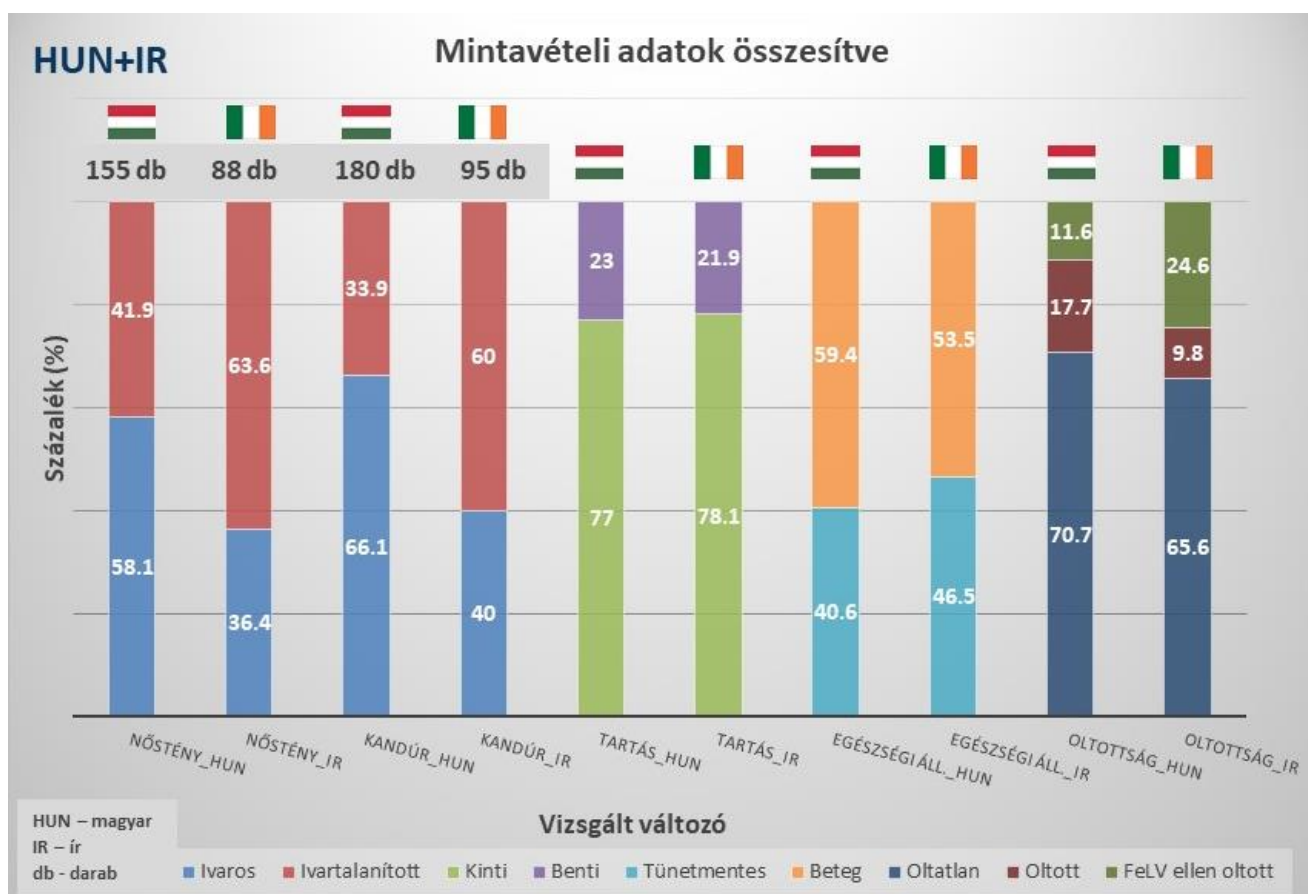
Az írországi minták esetében a FeLV ELISA- (3,28%) és a PCR-vizsgálatok 11,63% (95% CI: 7,65–17,28) közötti jelentős különbség, azaz a módszerek egymáshoz mért kifejezetten gyenge – Cohen-féle kappá 0,287 (95% CI: 0,08–0,55, $p < 0,05$) – megfeleltethetőségére magyarázat lehet a vizsgált macskák esetleges regresszív stádiumú fertőzöttsége, ahol nagyon alacsony fokú az antigénszint, de a virális RNS/provirális DNS még kimutatható PCR-vizsgálattal. Ennek alátámasztására megfelelő módszer lehet a real-time PCR metódus, de jelen kutatásban ezt nem alkalmaztuk. A hazai minták esetében ilyen mértékű eltéréseket nem találtunk a direkt víruskimutatáson alapuló FeLV-diagnosztikai módszerek között.

FIV-nél a gyorseszteszt ellenanyagok jelenlétét vizsgálja a vérben (indirekt víruskimutatás), a PCR a provirális DNS-t mutatja ki (direkt víruskimutatás). A fertőzés korai szakaszában még nem képződik ellenanyag a vírussal szemben (a legtöbb macska ezeket a fertőzést követő 8 hétben termeli, átlagosan a 2. hétre már található a keringésben antitest) (Sykes és Greene 2012), illetve a betegség terminális szakaszában szintén elenyésző lehet a keringő ellenanyagok mennyisége. Ezekben az esetekben az állat aktuális vírusfertőzöttségére nézve az ELISA fals negatív, de a PCR valódi pozitív eredményt mutat (Westman 2019). Másrészt, pozitív ELISA- és negatív PCR-eredmény jelenthet extrém alacsony keringő provirális DNS-/virális RNS-szintet (ami előfordulhat a FIV-fertőzés tünetmentes szakaszában) vagy a nagy genetikai változékonyság miatti primer kötődési nehézséget (Westman 2019). Jelen kutatásban a maternális ellenanyagok okozta fals pozitív ELISA-eredmény kizárható, ugyanis a legfiatalabb vizsgált macska 6 hónapos volt a vérvétel idejében (a maternális ellenanyagok akár 6 hónapos korig jelen lehetnek a kölyök keringésében, [MacDonald et al. 2004]), esetében viszont mindkét módszerrel negatív lett az eredmény. A FIV elleni vakcinázás sem jelentett problémát a korábban már ismertetett okok miatt (Magyarországon nincs kereskedelmi forgalomban, egyik vizsgált macskánál sem jegyezték fel a vakcina használatát a korábbi évekből, illetve az alkalmazott megerősítő vizsgálati módszer, a PCR, kiszűrte volna a valódi fertőzést kétes esetben).

9.2. A gyűjtött adatok elemzése

Lehetőségünk volt összehasonlítani a vizsgált változókból nyert adatokat Magyarország és Írország viszonylatában (**30. ábra**). A magyar és ír adatok szerint a vizsgált macskapopuláció átlagos életkora (mindkét esetben 4,9 év), ivari megoszlása, tartási körülményei és egészségügyi státusza közel azonos volt, míg az ivartalanítási státusz terén Magyarországon gyakrabban láttunk intakt állatokat mind a nőstények (58,1% vs. 36,4%),

mind a kandúrok (66,1% vs. 40%) között. Ez egyfelől magyarázatot adhat a hazánkban előforduló sokkal nagyobb látszólagos és valódi FeLV- és FIV-prevalenciaértékekre, hiszen mindkét vírus esetében a terjedésében fontos szerepet játszik a kijárási lehetőség, ivarosság miatti esetleges agresszívabb viselkedés (ami pedig leginkább a kandúrokra jellemző). Mindkét ország esetében elmondható, hogy igen nagy a kijáró életmódú macskák aránya, ami általában véve is kedvez a fertőző betegségek terjedésének, valamint növeli a háziállatok okozta kártételt a környezetben. A macskák oltottsága terén látszólag nincs nagy különbség a két ország között (oltatlanok aránya 70,7% vs. 65,6%), de ha a FeLV ellen is oltott állatok arányát vizsgáljuk, ott nagyfokú eltérés látható (11,6% vs. 24,6%) Írország javára. Érdeemes azt is megemlíteni azonban, hogy nem mindegyik állatnak volt naprakész a FeLV-elleni oltása, és ezek között találtunk is fertőzött macskát. Ez felhívja a figyelmet mind az állatorvosok, mind a tulajdonosok esetében az optimális oltási protokoll hiányos követésére, ami sokszor hamis biztonságérzetet kelt mindkét félben.



30. ábra: A mintavételt megelőzően feljegyzett egyes változók megoszlása a vizsgált macskákban, összehasonlítva Magyarországot és Írországot

A diagramon egymás mellett láthatók az egyes vizsgált változók magyar és ír adatai százalékból megadva (az ivar esetén az oszlopok felett a darabszám is szerepel), így könnyen összehasonlíthatók a két országban kapott eredmények

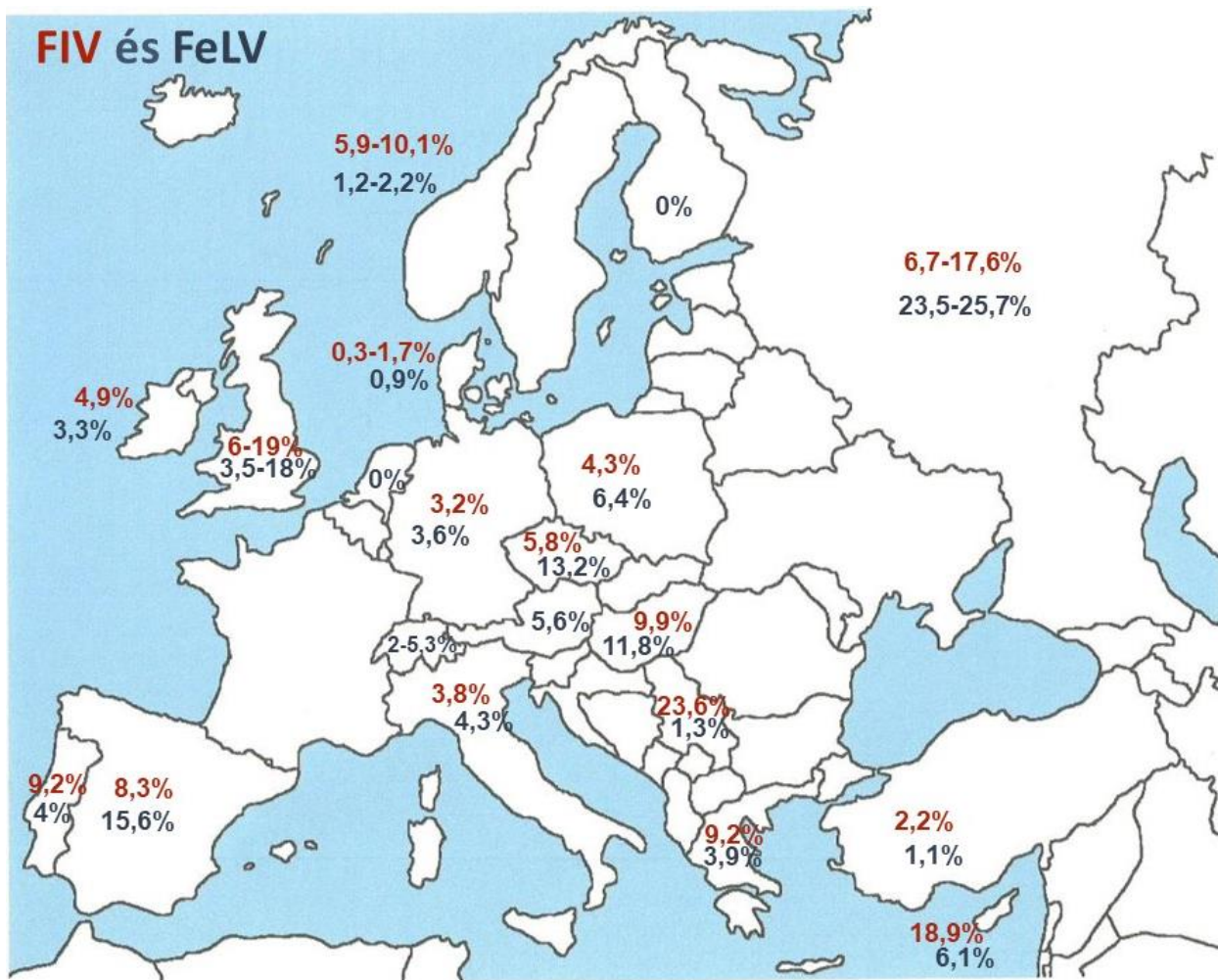
9.3. Prevalencia adatok elemzése

Magyarországon 1992-ben Lakatos és mtsai publikálták az első hazai felmérést a FIV elterjedtségére vonatkozóan. A vizsgálatba vont savómintákat az Országos Állategészségügyi Intézetbe 1991-ben vizsgálatra küldött macskasavókból választották ki véletlenszerűen. Összesen 90 egészséges és 13 klinikai tüneteket mutató macskát vontak be a kutatásba: a savókat először saját fejlesztésű ELISA-módszerrel vizsgálták, majd a FIV-pozitív mintákból Western blot eljárással megerősítő vizsgálatot is végeztek. Az egészséges macskák savói mind negatívak lettek, a klinikai tüneteket mutató állatok savóiból pedig 4 lett pozitív (ezekből 3 macska volt kandúr) – ez összesítve 3,88%-os előfordulást jelent. FeLV jelenlétére ekkor nem történt vizsgálat. Összehasonlítva ezt az általunk kapott látszólagos (ELISA 15,22%; PCR 13,13%) és valódi (ELISA 9,89%) FIV-prevalenciaértékekkel elmondható, hogy hazánkban 30 év alatt megnőtt a FIV-fertőzés előfordulási aránya, bár érdemes megjegyezni, hogy azóta a vizsgálati módszerek is változtak, illetve nagyobb populáción zajlott a jelen kutatás, több klinikai tüneteket mutató egyed bevonva. Ez befolyásolja a két eredmény összehasonlíthatóságát.

Az általunk vizsgált macskapopulációk esetében mért magyarországi és írországi látszólagos FeLV-prevalenciaértékek (PCR esetében 17,31, ill. 11,63%) kissé nagyobbak az Észak-Amerikában (3,1% [Burling et al. 2017]) és Európában mértékhez képest (Hosie et al. 1989, Ueland és Lutz 1992, Knotek et al. 1999, Arjona et al. 2000, Muirden 2002, Gleich et al. 2009, Agger és Thomsen 2012, Miró et al. 2014, Rypuła et al. 2014, Firth és Möstl 2015, Attipa et al. 2017, Hofmann-Lehmann et al. 2018, Sarvani et al. 2018, Iatta et al. 2019, Studer et al. 2019, Abayli et al. 2021, Demkin et al. 2021, Kokkinaki et al. 2021; ld **1. táblázat**). Valódi prevalenciaértéket csak Magyarországon tudunk mérni FeLV ELISA-eredmények esetén (11,78%), ami szintén az átlagosnál nagyobbak mondható. Azokat a kutatásokat alapul véve, ahol a kóbor/menhelyi macskák nem kerültek bevonásra, az európai előfordulási arányok FeLV esetén 0–6,4% közé tehetők. Az európai országokból ismert adatokat térképen szemléltetjük a jobb átláthatóság végett (**31. ábra**), itt azonban azokat a kiugróan magas prevalenciaértékeket is feltüntettük, amik kóbor/menhelyi macskák bevonásával készült vizsgálatokból származnak (sok esetben csak ilyen kutatási adatok voltak elérhetőek). A fejlettebb országokban mérhető kisebb mértékű FeLV-prevalencia hátterében valószínűleg a szélesebb körben és hosszabb ideje alkalmazott vakcinázás állhat, amit hatékony szűrési protokollokkal egészítenek ki

A FIV esetében mért fertőzöttség nagyjából illeszkedik a környező országokban mértékhez az írországi vizsgálataink (valódi prevalencia 4,9%) eredményei alapján, azonban a magyarországi valódi prevalenciaérték (9,89%) ebben az esetben is kissé nagyobb volt

(Hosie et al. 1989, Ueland és Lutz 1992, Knotek et al. 1999, Arjona et al. 2000, Muirden 2002, Gleich et al. 2009, Agger és Thomsen 2012, Miró et al. 2014, Rypula et al. 2014, Firth és Möstl 2015, Attipa et al. 2017, Hofmann-Lehmann et al. 2018, Sarvani et al. 2018, Iatta et al. 2019, Studer et al. 2019, Abayli et al. 2021, Demkin et al. 2021, Kokkinaki et al. 2021). Azokat a kutatásokat alapul véve, ahol a kóbor/menhelyi macskák nem kerültek bevonásra, az európai előfordulási arányok FIV esetén 0,3–9,2% között voltak. Itt a vakcinázás hiánya miatt csak az optimálisabb szűrési eljárások és kedvezőbb tartási szokások említhetők a kisebb előfordulási arány háttérében. További szakirodalmi adatok egyes mediterrán országokból (pl. Spanyolország, Olaszország) akár 30%-os előfordulást is említenek FIV-nél (Lee et al. 2002, Bandecchi et al. 2006), de itt fontos megjegyezni, hogy ezekben az országokban jelentősen nagyobb a kóbor macska-populáció, amit az idézett tanulmányokban be is vontak a vizsgálatokba. A legfrissebb fertőzöttségi adatokat a FIV esetében is a **31. ábra** szemlélteti. A mi felmérésünkből kizártuk a kóbor és menhelyi állatokat mind a magyar, mind az ír mintagyűjtés során, hogy az adatokat jobban lehessen értelmezni, ne torzuljanak, és a praktizáló állatorvosok számára relevánsabb eredményt tehesünk közzé.



31. ábra: A jelenleg ismert és legfrissebb FIV (piros) és FeLV (kék) fertőzöttségi adatok Európában

A kiugróan magas adatok általában olyan kutatásból származnak, ahol a kóbor vagy menhelyi macskapopulációt nem zárták ki a vizsgálatból, így ezek torzították a kapott prevalenciaértékeket.

A lakosság számára vetítve Írországban 0,07, míg Magyarországon háromszor annyi, 0,23 macska jut egy főre. FeLV esetén viszonylag logikus összefüggés lenne, hogy kevesebb macska között kevesebb fertőzöttet találtunk (látszólagos prevalencia Írországban 3,28%, míg Magyarországon 14,03%), de FIV esetén mindkét országban viszonylag jelentős előfordulási arányt mértünk, ami alól csak az ír valós prevalencia kivétel (9,3% Írországban és 13,13% Magyarországon a látszólagos prevalencia, 4,9% és 9,89% a valódi prevalencia). Ez azt erősíti, hogy a fertőzöttség nem kizárólag azon múlik, hogy adott térségben hány macska él, hanem azt sok más tényező is befolyásolja (pl. tartási körülmények, ivartalanítás, illetve FeLV esetén a vakcinás prevenció).

Másik lehetséges magyarázat a nagyobb prevalenciaértékekre a diagnosztikai tesztek gyenge pozitív prediktív értéke abban az esetben, ha nem 100%-os a teszt specificitása, és kicsi a fertőzés prevalenciája egy populációban. Ebben az esetben nagyobb az esélye a fals pozitív eredménynek egy vizsgálat során, mint egy valódi pozitívnek (ez az ún. *fals pozitív paradoxon*). Ez azonban jelentős mértékben kiküszöbölhető, ha nem csak egy diagnosztikai módszert használunk, hanem – mint jelen kutatásban is – az ELISA után pl. PCR-vizsgálatot is végzünk megerősítésként. Ez növeli a prediktív értéket és az eredmények megbízhatóságát egyedi szinten is.

9.4. A szekvenciaelemzés és filogenetikai eredmények megtárgyalása

Munkánk során a *pol* gén reverz transzkripcióért felelős, 576 bp hosszúságú szakaszának a szekvenciáját határoztuk meg, mivel ez egy jól vizsgálható de filogenetikai szempontból megfelelően változékony régiója a genomnak. A FIV-törzsek vizsgálata során a *pol*, a *gag* és az *env* génszakaszokat is szokták szekvenciaelemzésnek alávetni, így számos szekvencia található már a GenBankban, mindegyik altípushoz van így megfelelő összehasonlítási alap, bármelyik szakaszt is nézzük. Átlagosan 400–650 bp hosszúságú szakaszokat vizsgálnak, géntől függetlenül (Pistello et al. 1997, Steinrigl és Klein 2004, Duarte és Tavares 2006, Steinrigl et al. 2010, Roukaerts et al. 2015, Perharić et al. 2016, Koç és Oğuzoğlu 2020), így az általunk vizsgált 576 bp megfelelő felbontóképességűnek tekinthető. A Sanger-szekvenálás eredményeként átlagosan 495 bp hosszúságú tiszta és értelmezhető szekvenciákat kaptunk (nem számít értelmezhetőnek a primerek tapadási helye, illetve általában még a közvetlenül mellettük található néhány bázis sem ad „tiszta” jelet).

A munkánk során meghatározott, részleges FIV-szekvenciák filogenetikai vizsgálata nyomán megállapítható, hogy mindegyik magyar minta a B altípusba tartozott, amelyen belül az egymáshoz közeli rokonságban álló törzsek monofiletikus csoportot alkottak, amik jól szemléltették a minták földrajzi származási helyeit is. Az alcsoportok viszonylag nagy bootstrap-értékekkel különültek el egymástól. Ebben a csoportban a hazai törzsek mellett egy brazíliai szekvencia is megtalálható – ugyanezt a szekvenciát találtuk viszonylag közeli rokonságban az egyetlen ír FIV B törzzsel. A monofiletikus jelleg arra utal, hogy ezek a szekvenciák (beleértve a Brazíliában leírtat is) egy közös őstől származnak. A vizsgálataink alapján tehát feltételezhető, hogy a múltban egyszeri alkalommal került a FIV hazánkba, majd az a törzs kezdett terjedni az országon belül. A különböző régiókban jelen lévő genetikai diverzitás az azóta eltelt időben bekövetkezett divergens jellegű evolúciós változások miatt jöhetett létre. A csoportban megjelenő brazil szekvencia epidemiológiai

kapcsolatot jelenthet a két ország macskái között, pl. macskaimport vagy -utaztatás. Ennek fennáll a valószínűsége Írország esetén is (ahol egyébként többségében az A altípus van jelen). Bár szigetországról beszélünk, a kisállatok utaztatása igen elterjedt (hazánkban is). Az országokba történő bevitel során azonban nem feltétel a macskák retrovírus-fertőzöttségi státuszának kizárása (<https://portal.nebih.gov.hu/-/kedvtelesbol-tartott-allatok-utaztatasa-vonatkozó-tajekoztato>), a fertőzött állatokra semmilyen korlátozás nem vonatkozik, így lehetséges a FeLV- és/vagy FIV-törzsek bevitel, illetve utána a macskával érintkezésbe kerülő többi „helyi” állat fertőződése.

A jelen eredmények jól harmonizálnak a környező országokból publikált adatokkal, ahol leginkább A és B altípus előfordulását írták le Magyarországon környezetében (Pistello et al. 1997, Steinrigl és Klein 2004, Duarte és Tavares 2006, Steinrigl et al. 2010, Roukaerts et al. 2015, Perharić et al. 2016, Koç és Oğuzoğlu 2020), illetve Szerbiában nagy arányban FIV-D is előfordult (Sarvani et al. 2018). Ezek a kutatások osztrák, német, svájci, belga, holland, olasz, spanyol, portugál, horvát, szerb és török területekről származó vérmintákon történtek.

Írországhoz közel, az Egyesült Királyság területén, az A altípus dominál, a kutatások során ez került csak leírásra, illetve egy valószínűsíthető A/C rekombináns törzs (Hosie et al. 1989, Juvet et al. 2011, Samman et al. 2011). Ezzel jól párhuzamba állítható a mi vizsgálatunk eredménye, ahol szintén a FIV-A altípus volt jelen legtöbb esetben, azonban sikerült kimutatnunk egyetlen FIV-B törzset is. Itt is, ahogy a magyar B altípusú szekvenciáknál megfigyelhető, az A altípushoz tartozó szekvenciák monofiletikus csoportokat alkottak.

Jelen kutatás ahhoz is segítséget nyújt, hogy érdemes lenne-e hazánkban bevezetni a FIV elleni vakcinázást is: tudjuk, hogy az oltás a benne lévő altípusokkal (A-val és D-vel) szemben nyújtja a legnagyobb fokú védelmet, a heterológ szubtypusok ellen már kevésbé hatékony. Tehát Magyarországon, ahol eredményeink alapján a FIV-B van többségében jelen a macskapopulációkban, nem valószínű, hogy nagy előnnyel járna a vakcina bevezetése. Továbbá azt is figyelembe kell venni, hogy macskák esetén minden injekció potenciálisan injection site sarcoma kialakulását válthatja ki, így még kevésbé javasolható egy olyan oltás bevezetése, ami nem rendelkezik kellő hatékonysággal.

9.5. Patológiai vizsgálatok értékelése

Az *in situ* hibridizációs vizsgálatok során sikerült kimutatnunk a FeLV és/vagy FIV jelenlétét a fertőzött állatok tetemeiből származó, formalinban fixált, paraffinba ágyazott lymphoid szövetekben, valamint egyes esetekben kimagasló vírusterheltség volt látható a

kórbonctani elváltozásokat mutató egyéb szervekben is (pl. lymphoma a vékonybélben vagy a gerincvelőben). A vizsgálat specifikusságát az biztosítja, hogy a célzott RNS szakaszhoz két, egymástól független próbának kell tudnia kapcsolódni egyidőben, hogy az jelamplifikációs lépések megfelelően végbemehessenek. Kizárólag ebben az esetben alakul ki szemmel látható színreakció a szövetben. A próbák „Z” alakúak, az alsó rész 18–25 bp nagyságú, komplementer a célzott RNS szakaszhoz, a felső rész 14 bp hosszúságú. A dupla kapcsolódásnál 28 bp hosszúságú szakaszt nyerünk, ahova az amplifikáló molekulák tudnak kötni. Az általunk használt célszakaszok változó régióban, FeLV esetében az *env* génen, FIV esetén variabilis szakaszon helyeződnek, így tovább növelve a vizsgálat specifikusságát. A jelerősítő molekulákhoz később kromogén enzimmel jelölt próbák tudnak kapcsolódni, így annál erősebb jelet kapunk, minél több „Z” próba kötött be a célzott RNS-szakaszra. Az RNAscope *in situ* hibridizáció igen érzékeny, már egyetlen RNS-molekulát képes kimutatni a szövetben.

Az *in situ* hibridizáció alkalmazásának előnyére másik kiváló példa volt az osteochondromatosis esetének feldolgozása is, ahol a korábbi leírások szerint a FeLV-et nem tudták PCR-vizsgálattal vagy immunhisztokémiai módszerekkel a daganatos szövetekből kimutatni (csak az érintett macskák egyéb szöveteiből, pl. csontvelő, lymphoid szövetek) (de Oliveira Reis et al. 2017). Az általunk kifejlesztett és azóta szabadon hozzáférhető RNAscope-módszerrel sikeresen mutattuk ki a vírus jelenlétét a tumorban is. A kimutathatóság nagy valószínűséggel romlott a tumorszövetek hangyasavas dekalcinálása (így a bennük lévő FeLV-RNS roncsolódása) miatt, de ez a lépés elengedhetetlen egy csontos képlet szövettani feldolgozása során.

Ezek az esetek arra engednek következtetni, hogy retrovírus-asszociált kórképekről van szó. A daganatok esetében a vírusok pontos onkogén szerepének tisztázására a tumorsejtek genomszekvenciájának meghatározása és a retrovirális genom beépülésének feltérképezése lenne szükséges, bár az is nagy előrelépés pl. az osteochondromatosis esetében, – ahol a patomechanizmus és a FeLV-asszociált státusz eddig részben tisztázatlan – hogy egyáltalán kimutatható a vírus jelenléte a daganatos szövetben. Habár jelenleg az általunk használt RNAscope, RNS *in situ* hibridizációs módszer a rutin diagnosztikában még nem jól alkalmazható annak költségessége és infrastrukturális igénye miatt, a kutatásban kimagasló szerephez jut – ezt jól mutatja jelen vizsgálat is, de méginkább azok az esetek, ahol még alig ismert kórokozó kimutatására van így lehetőségünk.

10. Új tudományos eredmények

1. Elsőként végeztünk reprezentatív FeLV- és FIV-prevalenciavizsgálatokat országos szinten, két vizsgálati módszerrel (ELISA és PCR), nagy mintaszámmal, két országban: Magyarországon és Írországon.
2. Elsőként határoztuk meg a Magyarországon és Írországon kimutatott FIV-törzsek részleges genomszekvenciáját, illetve összehasonlító filogenetikai vizsgálatokat végeztünk. Megállapítottuk, hogy hazánkban a B altípus, míg Írországon az A altípus van leginkább jelen.
3. RNAscope *in situ* hibridizációs technikát dolgoztunk ki macska retrovírusok specifikus kimutatására, valamint Magyarországon elsőként írtuk le macska osteochondromatosisát, és mutattuk ki a FeLV jelenlétét a parenchymás szövetekben és daganatsejtekben *in situ* hibridizációval is.

11. Irodalomjegyzék

- Abayli, H., Can-Sahna, K., Ozbek R. et al.: **Detection and molecular characterisation of feline herpesvirus-1 from swab samples**, *Acta Vet. Hung.*, 2. 194-203, 2021.
- Adams, H., van Vuuren, M., Kania, S. et al.: **Sensitivity and specificity of a nested polymerase chain reaction for detection of lentivirus infection in lions (*Panthera leo*)**, *J. Zoo. Wildl. Med.*, 41. 608-615, 2010.
- Addie, D. D., Dennis, J. M., Toth, S. et al.: **Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus**, *Vet. Rec.*, 146. 419-424, 2000.
- Agger, J. F., Thomsen, R. L.: **Risk factors and control of FIV and FeLV infections in Danish cats**, International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Belgium, Netherlands, Session 23 - Companion animals epidemiology, p 143, 2012.
- Akhtardanesh, B., Ziaali, N., Sharifi, H. et al.: **Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman–Iran: Seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings**, *Res. Vet. Sci.*, 89. 306-310, 2010.
- Al-Kappany, Y. M., Lappin, M. R., Kwok, O. C. H. et al.: **Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and concurrent *Bartonella* spp., feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, and *Dirofilaria immitis* infections in Egyptian cats**, *J. Parasitol.*, 97. 256-258, 2011.
- Allison, R. W., Hoover, E. A.: **Feline immunodeficiency virus is concentrated in milk early in lactation**, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 19. 245-253, 2003.
- American Association of Feline Practitioners: **2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines**, *J. Feline. Med. Surg.*, 22. 5-30, 2020.
- American Association of Feline Practitioners: **Feline Vaccination Advisory Panel Report**, *J. Feline Med. Surg.*, 15. 785-808, 2013.
- Andersen, P. R., Tyrrell, P.: **Feline immunodeficiency virus diagnosis after vaccination**, *Anim. Health. Res. Rev.*, 5. 327-330, 2004.
- Arjona, A., Barquero, N., Doménech, A. et al.: **Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV)**, *J. Feline Med. Surg.*, 9. 14-22, 2007.

- Arjona, A., Escolar, E., Soto, I. et al.: **Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects**, J. Clin. Microbiol., 38. 3448-3449, 2000.
- Attipa, C., Papasouliotis, K., Solano-Gallego, L. et al.: **Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vector-borne, pathogens in cats from Cyprus**, Parasit. Vectors, 10. 130, 2017.
- Bachmann, M. H., Mathiason-Dubard, C., Learn, G. H. et al.: **Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades**, J. Virol., 71. 4241-4253, 1997.
- Bandecchi, P., Dell'Omodarme, M., Magi, M. et al.: **Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination**, Vet. Rec., 16. 555-557, 2006.
- Beatty, J.: **Viral causes of feline lymphoma: Retroviruses and beyond**, Vet. J., 201. 174-180, 2014.
- Beczkowski, P. M., Hughes, J., Biek, R. et al.: **Rapid evolution of the env gene leader sequence in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus**, J. Gen. Virol., 96. 893-903, 2015.
- Beebe, A. M., Dua, N., Faith, T. G. et al.: **Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets**, J. Virol., 68. 3080-3091, 1994.
- Bienzle, D., Reggeti, F., Wen, X. et al.: **The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection**, Can. Vet. J., 45. 753-757, 2004.
- Biezus, G., Ferian, P. E., Hasckel da Silva Pereira, L. H. et al.: **Clinical and Haematological Disorders in Cats with Natural and Progressive Infection by Feline Leukemia Virus (FeLV)**, Acta Sci. Vet., 47. 1629, 2019a.
- Biezus, G., Machado, G., Ferian, P. E. et al.: **Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil**, Comp. Immunol. Microb., 63. 17-21, 2019b.
- Bingen, A., Nonnenmacher, H., Bastien-Valle, M. et al.: **Tissues rich in macrophagic cells are the major sites of feline immunodeficiency virus uptake after intravenous inoculation into cats**, Microbes. Infect., 4. 795-803, 2002.

- Boesch, A., Cattori, V., Riond, B. et al.: **Evaluation of the effect of short-term treatment with the integrase inhibitor raltegravir (Isentress™) on the course of progressive feline leukemia virus infection**, *Vet. Microbiol.*, 175. 167-178, 2015.
- Boretti, F. S., Ossent, P., Bauer-Pham, K. et al.: **Recurrence of feline leukemia virus (FeLV) and development of fatal lymphoma concurrent with feline immunodeficiency virus (FIV) induced immune suppression**, 7th International Feline Retrovirus Research Symposium Sept 11-15, Pisa, Italy. 2004.
- Borsberry, S.: **In-house diagnostic test kits**, *Vet. Rec.*, 150. 55, 2002.
- Broche-Pierre, S., Richardson, J., Morailon, A. et al.: **Evaluation of live feline immunodeficiency virus vaccines with modified antigenic properties**, *J. Gen. Virol.*, 86. 2495-2506, 2005.
- Burling, A. N., Levy, J. K., Scott, H. M., et al.: **Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in cats in the United States and Canada and risk factors for seropositivity**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 251. 187-194, 2017.
- Butterworth, J. L., English, R. V., Jordan, H. L. et al.: **Distribution of immune cells in the female reproductive tract in uninfected and FIV infected cats**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 83. 37-51, 2001.
- Callanan, J. J., Hosie, M. J., Jarrett, O.: **Transmission of feline immunodeficiency virus from mother to kitten**, *Vet. Rec.*, 128. 332-333, 1991.
- Cano-Ortiz, L., Junqueira, D. M., Comerlato, J. et al.: **Phylogenetics of the Brazilian feline immunodeficiency virus, infection, genetics and evolution**, *Infect. Genet. Evol.*, 55. 166-171, 2017.
- Carmichael, K. P., Bienzle, D., McDonnell, J. J.: **Feline leukemia virus-associated myelopathy in cats**, *Vet. Pathol.*, 39. 536-545, 2002.
- Carpenter, M. A., Brown, E., W. MacDonald, D. W. et al.: **Phylogeographic patterns of feline immunodeficiency virus genetic diversity in the domestic cat**, *Virology*, 251. 234-243, 1998.
- Cattori, V., Pepin, A. C., Tandon, R. et al.: **Real-time PCR investigation of feline leukemia virus proviral and viral RNA loads in leukocyte subsets**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 123. 124-128, 2008.

- Cattori, V., Tandon, R., Riond, B. et al.: **The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome**, Vet. Microbiol., 133. 292, 2009.
- Cattori, V., Weibel, B., Lutz, H.: **Inhibition of Feline leukemia virus replication by the integrase inhibitor Raltegravir**, Vet. Microbiol., 152. 165-168, 2011.
- Caxito, F. A., Coelho, F. M., Oliveira, M. E. et al.: **Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil**, Vet. Res. Commun., 30. 953-956, 2006.
- Cotter, S. M.: **Feline viral neoplasia**. In: Greene, C.E. (ed): Infectious diseases of the dog and cat, ed 4. WB Saunders, Philadelphia. 71–84, 1998.
- Courchamp, F., Yoccoz, N. G., Artois, M. et al.: **At-risk individuals in feline immunodeficiency virus epidemiology: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*)**. Epidemiol. Infect., 121. 227-236, 1998.
- Crawford, P. C., Levy, J. K.: **New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection**, Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract., 37. 335-350, 2007.
- Dandekar, S., Beebe, A. M., Barlough, J. et al.: **Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats**, J. Virol., 66. 4040-4049, 1992.
- Daniels, M. J., Golder, M. C., Jarrett, O. et al.: **Feline viruses in wildcats from Scotland**, J. Wildl. Dis., 35. 121-124, 1999.
- Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D. et al.: **WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats**, J. Small Anim. Prac., 57. 1-45, 2016.
- de Oliveira Reis, M., Santos de Mello, L., Hesse, K. L. et al.: **Osteochondroma in a young cat infected by feline leukemia virus**, Cienc. Rural, 47. e20151558, 2017.
- de Parseval, A. – Grant, C. K., Sastry, K. J. et al.: **Sequential CD134-CXCR4 interactions in feline immunodeficiency virus (FIV): soluble CD134 activates FIV env for CXCR4-dependent entry and reveals a cryptic neutralization epitope**, J. Virol., 80. 3088-3091, 2006.
- de Parseval, A., Chatterji, U., Sun, P. et al.: **Feline immunodeficiency virus targets activated CD4+ T cells by using CD134 as a binding receptor**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101. 13044-13049, 2004.

- Demkin, V. V., Kazakov, A. A.: **Prevalence of hemotropic mycoplasmas and coinfection with feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats in the Moscow region, Russia**, *Prev. Vet. Med.*, 190. 105339, 2021.
- Diehl, L. J., Mathiason-Dubard, C. K., O'Neil, L. L. et al.: **Plasma viral RNA load predicts disease progression in accelerated feline immunodeficiency virus infection**, *J. Virol.*, 70. 2503-2507, 1996.
- Dinya, E., Solymosi, N.: **Biometria a klinikumban**, 1st ed. Budapest: Medicina, 2016.
- Doménech, A., Miró, G., Collado, V. M. et al.: **Use of recombinant interferon omega in feline retrovirogenesis: From theory to practice**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 143. 301-306, 2011.
- Druce, J. D., Robinson, W. F., Locarnini, S. A. et al.: **Transmission of human and feline immunodeficiency viruses via reused suture material**, *J. Med. Virol.*, 53. 13-18, 1997.
- Duarte, A., Tavares, L.: **Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity**, *Vet. Microbiol.*, 114. 25-33, 2006.
- Dunham, S. P., Graham, E.: **Retroviral infections of small animals**, *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 38. 879, 2008.
- Ellis, J. A., Jackson, M. L., Bartsch, R. C. et al.: **Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of leukemia viruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204. 767-771, 1996.
- English, R. V., Davidson, M. G., Nasisse, M. P. et al.: **Intraocular disease associated with feline immunodeficiency virus infection in cats**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 196. 1116-1119, 1990.
- Essex, M., McLane, M. F., Kanki. P. et al.: **Retroviruses associated with leukemia and ablative syndromes in animals and in human beings**, *Cancer. Res.*, 45. 4534-4538, 1985.
- Essex, M., Snyder, S. P.: **Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. I. Serologic studies with kittens exposed to cell-free materials from various feline fibrosarcomas**, *J. Natl. Cancer Inst.*, 51. 1007-1012, 1973.
- Essex, M.: **Horizontally and vertically transmitted oncornaviruses of cats**, *Adv. Cancer Res.*, 21. 175-248, 1975.

European Pet Food Industry Federation: **Facts and figures – European overview**, 2020.

Fails, A. D., Mitchell, T. W., Rojko, J. L. et al.: **An oligopeptide of the feline leukemia virus envelope glycoprotein is associated with morphological changes and calcium dysregulation in neuronal growth cones**, J. Neurovirol., 3. 179-191, 1997.

Finerty, S., Stokes, C. R., Gruffydd-Jones, T. J. et al.: **Mucosal immunization with experimental feline immunodeficiency virus (FIV) vaccines induces both antibody and T cell responses but does not protect against rectal FIV challenge**, Vaccine, 18. 3254-3265, 2000.

Finerty, S., Stokes, C. R., Gruffydd-Jones, T. J. et al.: **Targeted lymph node immunization can protect cats from a mucosal challenge with feline immunodeficiency virus**, Vaccine, 20. 49-58, 2001.

Firth, C. L., Möstl, K.: **A survey of feline leukaemia virus antigenaemia among cats in eastern Austria: a retrospective analysis of serum samples routinely tested between 1996 and 2011**, J. Feline Med. Surg., 1. 20, 2015.

Fogle, J. E., Mexas, A. M., Tompkins, W. A. et al.: **CD4+, CD25+ T regulatory cells inhibit CD8+ IFN-gamma production during acute and chronic FIV infection utilizing a membrane TGF-beta-dependent mechanism**, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 26. 201-216, 2010.

Forman, L. W., Pal-Ghosh, R., Spanjaard, R. A. et al.: **Identification of LTR-specific small non-coding RNA in FeLV infected cells**, FEBS Lett., 583. 1386, 2009.

Francis, D. P., Essex, M., Hardy, W. D.: **Excretion of feline leukemia virus by naturally infected pet cats**; Nature, 269. 252-254, 1977.

Freer, G., Matteucci, D., Mazzetti, P. et al.: **Effects of feline immunodeficiency virus on feline monocyte-derived dendritic cells infected by spinoculation**, J. Gen. Virol., 88. 2574-2582, 2007.

Fujino, Y., Horiuchi, H., Mizukoshi, F. et al.: **Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection**, Vet. Microbiol., 136. 217-225, 2009.

Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H.: **Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis**, Vet. Immun. Immunopathol., 123. 138-143, 2008.

- Fujino, Y., Satoh, H., Hisasue, M. et al.: **Detection of the integrated feline leukemia viruses in a cat lymphoid tumor cell line by fluorescence in situ hybridization**, J. Hered., 94. 251-255, 2003.
- Galdo Novo, S., Bucafusco, D., Diaz, L. M. et al.: **Viral diagnostic criteria for Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina**, Rev. Argent., 48. 293-297, 2016.
- Garg, H., Joshi, A., Tompkins, W. A.: **Feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein mediates apoptosis in activated PBMC by a mechanism dependent on gp41 function**, Virology, 330. 424-436, 2004.
- Gates, M. C., Vigeant, S., Dale, A.: **Prevalence and risk factors for cats testing positive for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection in cats entering an animal shelter in New Zealand**, N. Z. Vet. J., 65. 285-291, 2017.
- George, J. W., Rideout, B. A., Griffey, S. M. et al.: **Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats**, Am. J. Vet. Res., 63. 1172-1178, 2002.
- Gingerich, D. A.: **Lymphocyte T-cell Immunomodulator (LTCl): Review of the immunopharmacology of a new veterinary biologic**, Intern. J. Appl. Res. Vet. Med., 6. 2, 2008.
- Gleich, S., Hartmann, K.: **Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats**, J. Vet. Intern. Med., 23. 552, 2009.
- Gleich, S., Krieger, S., Hartmann, K.: **Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and riskfactors for infection in Germany**, J. Feline Med. Surg., 11. 985-992, 2009.
- Goldkamp, C. E., Levy, J. K., Edinboro, C., H. et al.: **Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats with abscesses or bite wounds and rate of veterinarian compliance with current guidelines for retrovirus testing**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 232. 1152, 2008.
- Gomes-Keller, M. A., Gönczi, E., Grenacher, B. et al.: **Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acids: a transmission potential**, Vet. Microbiol., 134. 208, 2009.

- Gomes-Keller, M. A., Gönczi, E., Tandon, R. et al.: **Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods**, J. Clin. Microbiol., 44. 916, 2006a.
- Gomes-Keller, M. A., Tandon, R., Gönczi, E. et al.: **Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats**, Vet. Microbiol., 112. 11, 2006b.
- Goto, Y., Nishimura, Y., Baba, K. et al.: **Association of plasma viral RNA load with prognosis in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus**, J. Virol., 76. 10079-10083, 2002.
- Greggs, W. M., Clouser, C. L., Patterson, S. et al.: **Broadening the use of antiretroviral therapy: the case for feline leukemia virus**, Therap. Clinic. Risk Manag., 7. 115-122, 2011.
- Greggs, W. M., Clouser, C. L., Patterson, S. et al.: **Discovery of drugs that possess activity against feline leukemia virus**, J. Gen. Virol., 93. 900-905, 2012.
- Grondahl-Røsado, R. C.: **Virological survey in stray carnivores and viral genetic characterisation**, Integrated Masters in Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Faculty of Veterinary Medicine, 2009.
- Gyetvai, B., Balogh, N.: **A macskák FeLV és FIV fertőzőségének elterjedése Magyarországon**, szakdolgozat, 2013.
- Hanlon, L., Argyle, D., Bain, D. et al.: **Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by coadministration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors**, J. Virol., 75. 8424-8433, 2001.
- Hardy, W. D. Jr., Zuckerman, E. E., Macewen, E. G. et al.: **A feline leukaemia and sarcoma virus-induced tumor-specific antigen**, Nature, 270. 249-251, 1977.
- Hardy, W. D. Jr.: **Epidemiology of primary neoplasms of lymphoid tissues in animals** *In*: Twomey, J. J., Good, R. A. (eds): Comprehensive immunology of lymphoreticular neoplasms, Plenum Medical Book Company, New York. 129-180, 1978.
- Hardy, W. D. Jr.: **Hematopoietic tumors of cats**, J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 17. 921-940, 1981.
- Hartmann, K., Gerle, K., Leutenegger, C.: **Feline leukemia virus-most important oncogene in cats?** *In*: Abstracts from the 4th International Feline Retrovirus Research Symposium, Glasgow, Scotland, UK. 39, 1998.

- Hartmann, K., Griessmayr, P., Schulz, B. et al.: **Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection**, J. Feline. Med. Surg., 9. 439-445, 2007.
- Hartmann, K.: **Clinical aspects of feline retroviruses: A Review**, Viruses, 4. 2684-2710, 2012a.
- Hartmann, K.: **Feline Leukemia Virus Infection** In: Greene, C.E. (ed): Infectious diseases of the dog and cat, ed 4. WB Saunders, Philadelphia., 2012b
- Hartmann, K.: **Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats: What does the current literature tell us?**, J. Feline Med. Surg., 17. 925-939, 2015.
- Hartmann, K.: **Pathogenesis of FeLV**, Suppl. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet., 27. 8, 2005.
- Hawkins, E. C.: **Saliva and tear tests for feline leukemia virus**, J. Am. Vet. Med. Assoc. 199. 1382-1385, 1991.
- Hayes, K. A., Rojko, J. L., Tarr, M. J. et al.: **Atypical localised viral expression in a cat with feline leukaemia**, Vet. Rec., 124. 344, 1989.
- Hayward, J. J., Rodrigo, A. G.: **Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (Felis catus)**, Vet. Immunol. Immunopathol., 134. 68-74, 2010.
- Hayward, J. J., Rodrigo, A. G.: **Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats**, Virol. J., 5. 76, 2008.
- Hayward, J. J., Taylor, J., Rodrigo, A. G.: **Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand**, J. Virol., 81. 2999-3004, 2007.
- Heit, B., Jones, G., Knight, D. et al.: **HIV and other lentiviral infections cause defects in neutrophil chemotaxis, recruitment, and cell structure: immunorestorative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor**, J. Immunol., 177. 6405-6414, 2006.
- Helfer-Hungerbuehler, A. K., Spiri, A. M., Riond, B. et al.: **No benefit of therapeutic vaccination in clinically healthy cats persistently infected with feline leukemia virus**, Vaccine, 33. 1578-1585, 2015a.
- Helfer-Hungerbuehler, K., Widmer, S., Kessler, Y. et al.: **Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes**, Vir. Res., 197. 137-150, 2015b.

- Hisasue, M., Okayama, H., Okayama, T. et al.: **Hematologic abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndrome**, J. Vet. Intern. Med., 15. 471-477, 2001.
- Hoffmann-Fezer, G., Mortelbauer, W., Hartmann, K. et al.: **Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus**, Res. Vet. Sci., 61. 222-226, 1996.
- Hofmann-Lehmann, R., Cattori, V., Tandon, R. et al.: **How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination**, Vet. Immunol. Immunopathol., 123. 119, 2008.
- Hofmann-Lehmann, R., Gönczi, E., Riond, B. et al.: **Die feline Leukämievirus-Infektion: Bedeutung und aktuelle Situation in der Schweiz**, ZORA, 160. 95-105, 2018.
- Hofmann-Lehmann, R., Huder, J. B., Gruber, S. et al.: **Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats**, J. Gen. Virol., 82. 1589-1596, 2001.
- Hofmann-Lehmann, R.: **Comparing the efficacy of FeLV vaccines Comment on: Stuke, K. et al. Efficacy of an inactivated FeLV vaccine compared to a recombinant FeLV vaccine in minimum age cats following virulent FeLV challenge**, Vaccine, 33. 2737-2738, 2013.
- Hohdatsu, T., Motokawa, K., Usami, M. et al.: **Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene**, J. Virol. Methods, 70. 107-111, 1998.
- Hohdatsu, T., Sasagawa, T., Yamazaki, A. et al.: **CD8+ T cells from feline immunodeficiency virus (FIV) infected cats suppress exogenous FIV replication of their peripheral blood mononuclear cells in vitro**, Arch. Virol., 147. 1517-1529, 2002.
- Hoover, E. A., Mullins, J. I.: **Feline leukemia virus infection and diseases**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 199. 1287-1297, 1991.
- Hosie, M. J., Robertson, C., Jarrett, O.: **Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom**, Vet. Rec., 125. 293-297, 1989.
- Hwang, J., Gottdenker, N., Min, M. et al.: **Evaluation of biochemical and haematological parameters and prevalence of selected pathogens in feral cats from urban and rural habitats in South Korea**, J. Feline Med. Surg., 18. 443-451, 2016.

- Iatta, R., Furlanello, T., Colella, V. et al.: **A nationwide survey of Leishmania infantum infection in cats and associated risk factors in Italy**, Plos Negl. Trop. Dis., 13. 2019.
- Inada, G., Miyazawa, T., Inoshima, Y. et al.: **Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus isolated from cats in Taiwan**, Arch. Virol., 142. 1459-1467, 1997.
- Ishida, T., Tomoda, I.: **Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection**, Jpn. J. Vet. Sci., 52. 645-648, 1990.
- Jarrett, O., Laird, H. M., Hay, D.: **Growth of feline leukaemia virus in human cells**, Nature, 224. 1208-1209, 1969.
- Jarrett, O., Russel, P. H.: **Differential growth and transmission in cats of feline leukemia viruses of subgroups A and B**, Int. J. Cancer., 21. 466-472, 1978.
- Jarrett, W. F. H., Crawford, E. M., Martin, W. B. et al.: **A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma)**, Nature, 202. 567-568, 1964.
- Johnston, J. B., Jiang, Y., van Marle, G. et al.: **Lentivirus infection in the brain induces matrix metalloproteinase expression: role of envelope diversity**, J. Virol., 74. 7211-7220, 2000.
- Jordan, H. L., Liang, Y., Hudson, L. C. et al.: **Shedding of feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection**, Am. J. Vet. Res., 60. 211-215, 1999.
- Juvel, F., Brennan, S., Mooney, C. T.: **Assessment of feline blood for transfusion purposes in the Dublin area of Ireland**, Vet. Rec., 168. 352, 2011.
- Kann, R. K. C., Kyaw-Tanner, M. T., Seddon, J. M., et al.: **Molecular subtyping of feline immunodeficiency virus from domestic cats in Australia**, Aust. Vet. J., 84. 112-116, 2006.
- Kann, R. K. C., Seddon, J. M., Meers, J. et al.: **Feline immunodeficiency virus subtypes in domestic cats in New Zealand**, NZ. Vet. J., 55. 358-360, 2007.
- Katoh, K., Toh, H.: **Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program**, Brief. Bioinform., 9. 286-298, 2008.
- Kawamura, M., Watanabe, S., Odahara, Y. et al.: **Genetic diversity in the feline leukemia virus gag gene**, Vir. Res., 204. 74-81, 2015.

- Kimura M.: **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences**, J. Mol. Evol., 16. 111-120, 1980.
- Kiselow, M. A., Rassnick, K. M., McDonough, S. P. et al.: **Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995–2005)**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 232. 405-410, 2008.
- Knotek, Z., Hajkova, P., Svoboda, M. et al.: **Epidemiology of feline leukaemia and feline immunodeficiency virus infections in the Czech Republic**, J. Vet. Med., 46. 665-671. 2002
- Kohn, B., Weingart, C., Eckmann, V. et al.: **Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: diagnosis, therapy, and outcome (1998–2004)**, J. Vet. Intern. Med., 20. 159-166, 2006.
- Kokkinaki, K. G., Saridomichelakis, M. N., Leontides, L. et al.: **A prospective epidemiological, clinical, and clinicopathologic study of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in 435 cats from Greece**, Comp. Immunol. Microb., 78. 101687, 2021.
- Koç, B. T., Oğuzoğlu, T. C.: **A phylogenetic study of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) among domestic cats in Turkey**, Comp. Immunol. Microb., 73. 101544, 2020.
- Kronic, M., Ertl, R., Hagen, B. et. al.: **Decreased expression of endogenous feline leukemia virus in cat lymphomas: a case control study**, BMC Vet. Res., 90, 2015.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura K.: **MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets**, Mol. Biol. Evol., 33. 1870-1874, 2016.
- Kurosawa, K., Ikeda, Y., Miyazawa, T. et al.: **Development of restriction fragment-length polymorphism method to differentiate five subtypes of feline immunodeficiency virus**, Microbiol. Immunol., 43. 817-820, 1999.
- Lacerda, L. C., Silva, A. N., Freitas, J. S. et al.: **Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil**, Genet. Mol. Res., 16. 2017.
- Lakatos, B., Lutz, H., Beregi, A. et al.: **Feline Immunodeficiency Virus (FIV) infection of cats - a seroepidemiological survey**, Acta Microbiol. Immunol. Hung., 43. 213, 1996.

- Lakatos, B., Lutz, H., Beregi, A.: **A macskák „feline immunodeficiency vírus” (FIV) okozta fertőzöttsége. Hazai szerológiai felmérő vizsgálat**, Magy. Allatorvosok Lapja, 5. 213-215, 1992.
- Lauring, A. S., Anderson, M. M., Overbaugh, J.: **Specificity in receptor usage by T-cell-tropic feline leukemia viruses: implications for the in vivo tropism of immunodeficiency-inducing variants**, J. Virol., 75. 8888-8898, 2001.
- Lauring, A. S., Cheng, H. H., Eiden, M. V. et al.: **Genetic and biochemical analyses of receptor and cofactor determinants for T-cell-tropic feline leukemia virus infection**, J. Virol., 76. 8069-8078, 2002.
- Leal, R. O., Gil, S., Sepúlveda, N. et al.: **Monitoring acute phase proteins in retrovirus infected cats undergoing feline interferon- ω therapy**, J. Small Anim. Prac., 55. 39-45, 2014.
- Lee, I. T., Levy, J. K., Gorman, S. P. et al.: **Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 220. 620-622, 2002.
- Leucofeligen FeLV/RCP, **használati utasítás**, Virbac, Franciaország 2020.
- Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Mislin, C. N. et al.: **Molecular characterization of feline interleukin 16: chemotactic activity and effect on feline immunodeficiency virus infection and/or replication**, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 16. 569-575, 2000.
- Levy, J. K., Crawford, C., Hartmann, K. et al.: **American Association of Feline Practitioners Feline Retrovirus Management Guidelines**, 2008.
- Levy, J. K., Crawford, C., Tucker, S. J.: **Performance of 4 point-of-care screening tests for feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus**, J. Vet. Intern. Med., 31. 521-526, 2017.
- Levy, J. K., Scott, H. M., Lachtara, J. L. et al.: **Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 3. 371-376, 2006.
- Levy, J. K.: **FeLV and non-neoplastic FeLV-related disease** In: Ettinger, S. J., Feldman, E. C. (eds): Textbook of veterinary internal medicine. WB Saunders, Philadelphia, 424-432, 2000.
- Li, S., Zhao, F., Shao, J. J. et al.: **Interferon-omega: Current status in clinical applications**, Int. Immunopharmacol., 52. 253-260, 2017.

- Li, Z., Phadke, A., Weaver, E. A. et al.: **Feline CD8⁺ cells induced with FIV infected, irradiated T cells produce multiple anti-FIV factors**, *Dev. Comp. Immunol.*, 29. 809-824, 2005.
- Linenberger, M. L., Abkowitz, J. L.: **Haematological disorders associated with feline retrovirus infections**, *Baillieres Clin. Haematol.*, 8. 73-112, 1995.
- Liu, C., Liu, Y., Qian, P. et al.: **Molecular and serological investigation of cat viral infectious diseases in China from 2016 to 2019**, *Transbound. Emerg. Dis.*, 2020.
- Liu, J., O'Connor, T., Beall, M. et al.: **Evaluation of rapid diagnostic test kits for feline leukemia virus infection using samples from naturally infected cats**, *J. Feline Med. Surg. Open reports*, 1-4, 2016.
- Lott-Stolz, G.: **Osteochondromatosis in the cat**, *Schweiz. Archiv. Tierheilkd.*, 130. 635-638, 1988.
- Luaces, I., Doménech, A., García-Montijano, M. et al.: **Detection of feline leukemia virus in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*)**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20. 381-385, 2008.
- Luckman, C., Gates, M. C.: **Epidemiology and clinical outcomes of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in client-owned cats in New Zealand**, *J. Feline Med. Surg. Open Reports*, 1-9, 2017.
- oLutz, H., Addie, D., Belák, S. et al.: **Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management**, *J. Feline Med. Surg.*, 11. 565-574, 2009.
- Lutz, H., Castelli, I., Ehrensperger, F. et al.: **Panleukopenia-like syndrome of FeLV caused by co-infection with FeLV and feline panleukopenia virus**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 46. 21-33, 1995.
- MacDonald, K., Levy, J. K., Tucker, S. J. et al.: **Effects of passive transfer of immunity on results of diagnostic tests for antibodies against feline immunodeficiency virus in kittens born to vaccinated queens**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 225. 1554-1557, 2004.
- Major, A., Cattori, V., Boenzli, E. et al.: **Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection**, *Vet. Res.*, 41. 17, 2010.
- Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R. et al.: **Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV Infections in Domestic Cats in Japan**, *Microbiol. Immunol.*, 47. 147-153, 2003.

- Matsumura, S., Ishida, T., Washizu, T. et al.: **Pathologic features of acquired immunodeficiency-like syndrome in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus**, J. Vet. Med. Sci., 55. 387-394, 1993.
- Matteuci, D., Baldinotti, F., Mazzetti, P. et al.: **Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reactio**, J. Clin. Microbiol., 31. 494-501, 1993.
- McCaw, D., Boon, G., Jergens, A. E. et al.: **Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection**, J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 37. 356-363, 2001.
- Mehrotra, S., Mishra, K. P., Yadav, V. S. et al.: **Immunomodulation by peptide analogs of retroviral envelope protein**, Peptides, 24. 979-985, 2003.
- Mikkelsen, S. R., Reckling, S. K., Egan, E. A. et al.: **In vivo depletion of CD4(+) CD25(hi) regulatory T cells is associated with improved antiviral responses in cats chronically infected with feline immunodeficiency virus**, Virology, 403. 163-172, 2010.
- Miró, G., Doménech, A., Escolar, E. et al.: **Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FeLV) infections**, J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med., 54. 203-209, 2007.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R. et al.: **Current status of L. infantum infection in straycats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis?**, Parasit. Vectors, 7. 112, 2014.
- Mitchell, T. W., Rojko, J. L., Hartke, J. R. et al.: **FeLV envelope protein (gp70) variable region 5 causes alterations in calcium homeostasis and toxicity of neurons**, J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 14. 307-320, 1997.
- Moench, T. R., Whaley, K. J., Mandrell, T. D. et al.: **The cat/feline immunodeficiency virus model for transmucosal transmission of AIDS: nonoxynol-9 contraceptive jelly blocks transmission by an infected cell inoculum**, AIDS, 7. 797-802, 1993.
- Muirden, A.: **Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital**, Vet. Rec., 150. 621-625, 2002.
- Nakamura, K., Suzuki, Y., Ikeo, K. et al.: **Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C**, Arch. Virol., 148. 783-791, 2003.

- Nakamura, Y., Nakamura, Y., Ura, A. et al.: **An updated nation-wide epidemiological survey of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in Japan**, J. Vet. Med. Sci., 72. 1051-1056, 2010.
- Nesina, S., Helfer-Hungerbuehler, K., Riond, B. et. al.: **Retroviral DANN - the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats**, Retrovirology, 12. 105, 2015.
- Obert, L. A., Hoover, E. A.: **Early pathogenesis of transmucosal feline immunodeficiency virus infection**, J. Virol., 76. 6311-6322, 2002.
- Okada, S., Pu, R., Young, E. et al.: **Superinfection of cats with feline immunodeficiency virus subtypes A and B**, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 10. 1739-1746, 1994.
- O'Neil, L. L., Burkhard, M. J., Hoover, E. A.: **Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats**, J. Virol., 70. 2894-2901, 1996.
- Pacitti, A. M., Jarrett, O.: **Duration of the latent state in feline leukaemia virus infections**, Vet. Rec., 117. 472-474, 1985.
- Pancino, G., Castelot, S., Sonigo, P.: **Differences in feline immunodeficiency virus host cell range correlate with envelope fusogenic properties**, Virology, 206. 796-806, 1995.
- Park, H. S., Kyaw-Tanner, M., Thomas, J. et al.: **Feline immunodeficiency virus replicates in salivary gland ductular epithelium during the initial phase of infection**, Vet. Microbiol., 46. 257-267, 1995.
- Pecoraro, M. R., Tomonaga, K., Miyazawa, T. et al.: **Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus**, J. Gen. Virol., 77. 2031-2035, 1996.
- Pedersen, N. C.: **Feline leukemia virus infection** In: Pedersen, N. C. (ed): Feline infectious diseases. American Veterinary Publications, Santa Barbara, CA. 83, 1988.
- Pepin, A. C., Tandon, R., Cattori, V. et al.: **Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral RNA in leukocyte subsets of longterm experimentally infected cats**, Vir. Res., 127. 9-16, 2007.
- Perharić, M., Bidin, M., Staresina, V. et al.: **Phylogenetic characterisation of feline immunodeficiency virus in naturally infected cats in Croatia indicates additional heterogeneity of subtype B in Europe**, Arch. Virol., 161. 2567-2573, 2016.

- Phillips, T. R., Prospero-Garcia, O., Puaoi, D. L. et al.: **Neurological abnormalities associated with feline immunodeficiency virus infection**, J. Gen. Virol., 75. 979-987, 1994.
- Phipps, A. J., Hayes, K. A., Al-dubaib, M. et al.: **Inhibition of feline leukemia virus subgroup A infection by coinoculation with subgroup B**, Virology, 277. 40-47, 2000.
- Pistello, M., Cammarota, G., Nicoletti, E. et al.: **Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B**, J. Gen. Virol., 78. 2247-2257, 1997.
- Pool, R. R., Carrig, C. B.: **Multiple cartilaginous exostoses in a cat**, Vet. Pathol., 9. 350-359, 1972.
- Pu, R., Omori, M., Okada, S. et al.: **MHC-restricted protection of cats against FIV infection by adoptive transfer of immune cells from FIV-vaccinated donors**, Cell. Immunol., 198. 30-43, 1999.
- Quackenbush, S. L., Donahue, P. R., Dean, G. A. et al.: **Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS**, J. Virol., 64. 5465-5474, 1990.
- R Core Team: **A language and environment for statistical computing**, <https://www.R-project.org/> (2016. accessed November 20, 2019).
- Reggeti, F., Bienzle, D.: **Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada**, J. Gen. Virol., 85. 1843-1852, 2004.
- Richards, J. R., Elston, T. H., Ford, R. B. et al.: **The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel report**, J. Am. Vet. Med. Assoc., 229. 1405-1441, 2006.
- Roccabianca, P., Avallone, G., Rodriguez, A. et al.: **Cutaneous lymphoma at injection sites: pathological, immunophenotypical, and molecular characterization in 17 cats**, Vet. Pathol., 53. 823-832, 2016.
- Rojko, J. L., Essex, M., Trainin, Z.: **Feline leukemia/sarcoma viruses and immunodeficiency**, Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 32. 57-96, 1988.
- Rojko, J. L., Hardy, W. D.: **Feline leukemia virus and other retroviruses** In: Sherding, R. G. (ed): The cat diseases and clinical management, ed 2. Churchill Livingstone, New York. 263-432, 1994.

- Rojko, J. L., Hoover, E. A., Mathes, L. E. et al.: **Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection**, J. Natl. Cancer. Inst., 63. 759-768, 1979.
- Rojko, J. L., Hoover, E. A., Quackenbush, S. L. et al.: **Reactivation of latent feline leukaemia virus infection**, Nature, 298. 385-388, 1982.
- Romatowski, J., Lubkin, S. R.: **Use of an epidemiologic model to evaluate feline leukemia virus control measures**, Feline Pract., 25. 6-11, 1997.
- Rosa, C., Kirberger, R. M.: **Extraskelatal osteochondroma on a cat's elbow**, J. S. Afr. Vet., 83. 1-4, 2012.
- Roukaerts, I. D. M., Theuns, S., Taffin, E. R. L. et al.: **Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strains from naturally infected cats in Belgium and The Netherlands**, Virus Res., 196. 30-36, 2015.
- Rypuła, K., Płoneczka-Janeczko, K., Bierowiec, K. et al.: **Prevalence of viral infections in cats in southwestern Poland in the years 2006 to 2010**, Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 127. 163-165, 2014.
- Samman, A., McMonagle, E. L., Logan, N. et al.: **Phylogenetic characterisation of naturally occurring feline immunodeficiency virus in the United Kingdom**, Vet. Microbiol., 150. 239-247, 2011.
- Sarma, P. S., Log, T., Jain, D. et al.: **Differential host range of viruses of feline leukemia-sarcoma complex**, Virology, 2. 438-446, 1975.
- Sarvani, E., Tasker, S., Filipović M. K. et al.: **Prevalence and risk factor analysis for feline haemoplasmas in cats from Northern Serbia, with molecular subtyping of feline immunodeficiency virus**, J. Feline Med. Surg. Open Reports, 1-10, 2018.
- Scherk, M., Ford, R. B., Gaskell, R. M. et al.: **Disease information fact sheet: Feline leukemia virus**, J. Feline Med. Surg. 15. Supp. file, 785-808, 2013.
- Schrenzel, M. D., Higgins, R. J., Hinrichs, S. H. et al.: **Type C retroviral expression in spontaneous feline olfactory neuroblastomas**, Acta Neuropathol., 80. 547-553, 1990.
- Shalev, Z., Duffy, S. P., Adema, K. W. et al.: **Identification of a feline leukemia virus variant that can use THTR1, FLVCR1, and FLVCR2 for infection**, J. Virol., 83. 6706-6716, 2009.
- Shelton, G. H., Linenberger, M. L.: **Hematologic abnormalities associated with retrovirus abnormalities in the cat**, Semin. Vet. Med. Surg., 10. 220-233, 1995.

- Shimoda, T., Shiranaga, N., Mashita, T. et al.: **A hematological study on thirteen cats with myelodysplastic syndrome**, J. Vet. Med. Sci., 62. 59-64, 2000.
- Sivagurunathan, A., Atwa, A. M., Lobetti, R.: **Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection in Malaysia: a retrospective study**, J. Feline Med. Surg. Open Reports, 1-5, 2018.
- Sleeman, J. M., Keane, J. M., Johnson, J. S. et al.: **Feline leukemia virus in a captive bobcat**, J. Wildl. Dis., 37. 194-200, 2001.
- Snyder, H. W. Jr., Hardy, W. D. Jr., Zuckerman, E. E. et al.: **Characterisation of a tumour-specific antigen on the surface of feline lymphosarcoma cells**, Nature, 275. 656-658, 1978.
- Sodora, D. L., Shpaer, E. G., Kitchell, B. E. et al.: **Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns**, J. Virol., 68. 2230-2238, 1994.
- Solano-Gallego, L., Hegarty, B., Espada, Y. et al.: **Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain**, Vet. Microbiol., 118. 274-277, 2006.
- Southard, T. L., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Priest, H. et. al.: **Holoprosencephaly and pure red cell aplasia in a Feline leukaemia virus-positive kitten**, J. Comp. Path., 154. 239-242, 2016.
- Sparger, E. E.: **Feline immunodeficiency virus infection** In: Greene C. (ed.): Infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. WB Saunders Co. Philadelphia, 334-345, 2012.
- Sprague, W. S., Robbiani, M., Avery, P. R. et al.: **Feline immunodeficiency virus dendritic cell infection and transfer**, J. Gen. Virol., 89. 709-715, 2008.
- Steinrigl, A., Ertl, R., Langbein, I. et al.: **Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades A and B to central Europe and identifies diverse variants of clade B**, Vet. Immunol. Immunopathol., 134. 82-89, 2010.
- Steinrigl, A., Klein, D.: **Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostic**, J. Gen. Virol., 84. 1301-1307, 2004.
- Stover, M. G., Watson, R. R.: **Animal lentiviruses**, in: Health of HIV infected People, 2015.

- Studer, N., Lutz, H., Saegerman, C. et al.: **Pan-European study on the prevalence of the feline leukaemia virus infection – reported by the European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD Europe)**, *Viruses*, 11. 993, 2019.
- Stuetzer, B., Brunner, K., Lutz, H. et al.: **A trial with 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine and human interferon- α in cats naturally infected with feline leukaemia virus**, *J. Feline Med. Surg.*, 15. 667-671, 2013.
- Sukhumavasi, W., Bellosa, M. L., Lucio-Forster, A. et al.: **Serological survey of *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) infections in pet cats in Bangkok and vicinities, Thailand**, *Vet. Parasitol.*, 188. 25-30, 2012.
- Sullivan, K. M., Dean, A., Soe, M. M.: **OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health**, *Public Health Rep.*, 124. 471-474, 2009.
- Sutton S.: **Detection of feline immunodeficiency virus DNA products in lytic versus latent infection, including early reverse transcription, intermediate reverse transcription, and late circle junctions**, Senior Honors thesis, Ohio State University, 2007.
- Sykes, J., Greene, C.: **Feline immunodeficiency virus**. In: Sellon, R. K., Hartmann, K. (eds). *Infectious diseases of the dog and cat*, ed 4. WB Saunders, Philadelphia, 142, 2012.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. et al.: **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**, *Mol. Biol. Evol.*, 12. 2725-2729, 2013.
- Tanabe, T., Yamamoto, J. K.: **Feline immunodeficiency virus lacks sensitivity to the antiviral activity of feline IFN- γ** , *J. Interferon Cytokine Res.*, 21. 1039-1046, 2001.
- Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, M. A. et al.: **Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by Taq-Man® real-time polymerase chain reaction**, *J. Virol. Methods*, 130. 124-132, 2005.
- Tarcsai, K. R., Kapran, I., Hidvégi, M. et al.: **Fermentált búzacsíra-kivonat (Avemar) antivirális hatásának vizsgálata macska AIDS modellben**, *Magy. Allatorvosok Lapja*, 142. 731-741, 2020.
- Tavares, L., Roneker, C., Johnston, K. et al.: **3'-Azido-3'-deoxythymidine in feline leukemia virus-infected cats: a model for therapy and prophylaxis of AIDS**, *Cancer Res.*, 47. 3190-3194, 1987.

- Tchamo, C. C., de Rugerlis, M., Noormahomed, E. V.: **Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Maputo city and province, Mozambique: a pilot study**, J. Feline Med. Surg. Open Reports, 1-6, 2019.
- Teixeira B. M., Taniwaki, S. A., Menezes, P. M. M. et al.: **Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil**, J. Feline Med. Surg. Open Reports, 1-7, 2019.
- Terry, A., Kilbey, A., Naseer, A. et al.: **Barriers to infection of human cells by Feline leukemia virus: Insights into resistance to zoonosis**, J. Virol., 91. 2119–2116, 2017.
- Thompson, K. G., Pool, R. R.: **Tumors of bones**, In: Meuten, D. J. Tumors in domestic animals, Wiley & Sons, Inc, 5th edition, 2017.
- Troth, P., Dean, D., Hoover, E. A.: **In vivo CXCR4 expression, lymphoid cell phenotype and feline immunodeficiency virus infection**, Vet. Immunol. Immunopathol., 123. 97-105, 2008.
- Uhl, E. W., Heaton-Jones, T. G., Pu, R. et al.: **FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review. FIV vaccine 2002 update and review**, Vet. Immunol. Immunopathol., 90. 113-132, 2002.
- Ueland, K., Lutz, H.: **Prevalence of feline leukemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in Norway**, Zentralbl. Veterinarmed. B., 39. 53-58, 1992.
- Valli, V. E., Jacobs, R. M., Norris, A. et al.: **The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation**, J. Vet. Diagn. Invest., 12. 295-306, 2000.
- van der Meer, F. J. U. M., Schuurman, N. M. P., Balzarini, J. et al.: **Comparative evaluation of the activity of antivirals towards feline immunodeficiency virus in different cell culture systems**, Antiviral. Res., 76. 198-201, 2007.
- Vobis, M., D'Haese, J., Mehlhornet, H. et al.: **Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (Ctenocephalides felis)**, Parasitol. Res., 91. 467-470, 2003.
- Wang, J., Kyaw-Tanner, M., Lee, C. et al.: **Characterisation of lymphosarcomas in Australian cats using polymerase chain reaction and immunohistochemical examination**, Aust. Vet. J., 79. 41-46, 2001.

- Weaver, E. A., Collisson, E. W., Slater, M. et al.: **Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses**, J. Virol., 78. 2158-2163, 2004.
- Weaver, E. A.: **A detailed phylogenetic analysis of FIV in the United States**, PLoS One, 5. 2010.
- Webb, C., Bedwell, C., Guth, A. et al.: **Use of flow cytometry and monochlorobimane to quantitate intracellular glutathione concentrations in feline leukocytes**, Vet. Immunol. Immunopathol., 112. 129-140, 2006.
- Westman, M. E., Malikband, R., Norrison, J. M.: **Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians**, Aust. Vet. J., 97. 47-55, 2019.
- Westman, M., Malik, R., Hall, E. et al.: **Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva**, Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis., 50. 88-96, 2017.
- Westman, M., Yang, D., Green, J. et al.: **Antibody responses in cats following primary and annual vaccination against feline immunodeficiency virus (FIV) with an inactivated whole-virus vaccine (Fel-O-Vax® FIV)**, Viruses, 13. 470, 2021,
- Wilkes, R. P., Anis, E., Dunbar, D. et al.: **Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection**, J. Feline Med. Surg., 20. 362-369, 2018.
- Zoetis Inc.: **Data on file, Study Report No. D880Z-US-14-013**, 2014a.
- Zoetis Inc.: **Data on file, Study Report No. D880Z-US-14-014**, 2014b.

12. A doktori kutatás eredményeinek közlései

12.1. A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent közlemények

- Szilasi A., Balka Gy.: **A macskák retrovírus fertőzései: Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Irodalmi áttekintés 1. rész**, Magy. Allatorvosok Lapja, 137. 351-360, 2015. IF 0,212
- Szilasi A., Reinhard, E., Balka Gy.: **A macskák retrovírus fertőzései: Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Irodalmi áttekintés 2. rész**, Magy. Allatorvosok Lapja, 137. 729-738, 2015. IF 0,212
- Szilasi A., Dénes, L., Balka, Gy.: **A macskák retrovírus fertőzései: Feline Leukemia Virus (FeLV) Irodalmi áttekintés**, Magy. Allatorvosok Lapja, 140. 457-472, 2018. IF 0,143
- Szilasi A., Dénes, L., Jakab, Cs., Erdélyi, I., Resende, T., Vannucci, F., Csomor, J., Mándoki, M., Balka, Gy.: **In situ hybridization of feline leukemia virus in a primary neural B-cell lymphoma**, J. Vet. Diagn. Invest., 32(3). 454-457, 2020. IF 1,135
- Szilasi A., Dénes, L., Krikó, E., Murray, C., Mándoki, M., Balka, Gy.: **Prevalence of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in domestic cats in Ireland**, Acta Vet. Hung., 68(4). 413-420, 2020. IF 0,991

12.2. A doktori értekezés témájában, lektorált, nem impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

- Szilasi, A., Dénes, L., Krikó, E., Heenemann, K., Ertl, R., Mándoki, M., Vahlenkamp T. W., Balka, Gy.: **Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary**, J. Feline Med. Surg. Open Reports, 5(2). 1-7, 2019.

12.3. A doktori értekezés témájában tartott előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon

- Szilasi, A., Dénes, L., Balka, Gy.: **Feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) prevalence in domestic cats from Hungary**, 42nd World Small Animal Veterinary Association Congress and FECAVA 23rd Eurocongress - poszter, 2017.
- Szilasi, A., Balka, Gy.: **Macska retrovírusok molekuláris biológiai vizsgálata**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2017.
- Szilasi, A., Dénes, L., Heenemann, K., Balka, Gy.: **Phylogenetic characterization of feline retroviruses in Hungary**, 43rd World Small Animal Veterinary Association Congress and 9th FASAVA Congress - poszter, 2018.
- Szilasi, A., Dénes, L., Balka, Gy.: **Detection of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in tissue samples of domestic cats with in situ hybridization**, British Small Animal Veterinary Association Congress - poszter, 2018.
- Szilasi, A., Dénes, L., Resende, T., Balka, Gy.: **Macska-retrovírusok *in situ* hybridizációs vizsgálata**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2018.

- Szilasi, A.: **FeLV és FIV – magyarországi helyzetkép, a megelőzés lehetőségei**, XIX. Kómár napok, „Staying alive” – élethosszig tartó állatorvosi szolgáltatások - előadás, 2019.
- Szilasi, A., Dénes, L., Balka, Gy., Heenemann, K.: **Macska-retrovírusok magyarországi prevalenciája**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2019.
- Szilasi, A.: **Vírusok a katedrán: FeLV, FIV, FIP, amit ma tudni érdemes**, PrimaCATedra – előadás, 2021.

12.4. A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények, előadások, poszterprezentációk tudományos konferenciákon

- Lakatos, B., Demeter, Z., Palade, A., Mari, V., Szilasi, A., Decaro, N., Rusvai, M.: **A kutyák pantropikus koronavírusfertőzésének kimutatása Magyarországon**, Magy. Allatorvosok Lapja, 135. 41-47, 2013. IF 0,185
- Liptovszky, M., Szilasi, A., Papp, G. V.: **A fully reversible drug combination for the deep sedation of red foxes (*Vulpes vulpes*)**, International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals – poszter, 2014.
- Liptovszky, M., Szilasi, A.: **Dexmedetomidin-midazolam-butorfanol kombináció hatásai vörös rókák (*Vulpes vulpes*) anesztéziája során**, Magy. Allatorvosok Lapja, 139. 49-53, 2017. IF 0,196

- Szilasi, A.: **Aberrant migration of Spirocerca lupi (S. lupi) in spinal canal in a dog, Hungary – a case report**, 42nd World Small Animal Veterinary Association Congress and FECAVA 23rd Eurocongress - poszter, 2017.
- Dénes, L., Biksi, I., Albert, M., Szeredi, L., Knapp, D. G., Szilasi, A., Bálint, Á., Balka, Gy.: **Detection and phylogenetic characterization of atypical porcine pestivirus strains in Hungary**, Transbound. Emerg. Dis., 65. 2039-2042, 2018. IF 3,554
- Szilasi, A., Jakab, Cs.: **Angiomyxoma of unknown origin in thoracic cavity of a dog – a case report**, 43rd World Small Animal Veterinary Association Congress and 9th FASAVA Congress - poszter, 2018.
- Tóth, I., Jócsák, G., Szilasi, A., Kiss, D. S., Bárány, Z. B., Bartha, T., Mándoki, M.: **Állatorvostudományok oktatása a digitális korszakban**, Magy. Allatorvosok Lapja, 140. 697-703, 2018. IF 0,143
- Menyhért, Zs., Vizi, Zs., Szilasi, A.: **Tüdő-leishmaniasis kutyában, Esetismertetés és irodalmi áttekintés**, Magy. Allatorvosok Lapja, 142. 163-176, 2020. IF 0,107
- Szilasi, A.: **Macska hepadnavírus magyarországi prevalenciája**, Akadémiai Beszámolók – előadás, 2021.
- Szilasi, A.: **COVID-19 és a macska - érdemes-e rendelői dömpingre készülni?**, MÁOK Fővárosi Szervezet Oktatási Bizottságának továbbképzése – előadás, 2021.
- Dénes, L., Ruedas-Torres, I., Szilasi, A., Balka, Gy.: **Detection and localization of atypical porcine pestivirus in the testicles of naturally infected, CT-affected piglets**, under minor revision – Transbound. Emerg. Dis. 2021. IF 5,0

13. Köszönetnyilvánítás

Legelőször is témavezetőmnek és mentoromnak, dr. Balka Gyulának szeretném megköszönni a folyamatos segítséget a kutatás és a dolgozat írása során; azt a számtalan órát, amit a kézirateim lektorálásával, átolvasásával, az előadásaim hallgatásával töltött, és azokat, amikor segített egy kicsit kiforrotlan és kezdetleges ötletet PhD-kutatássá emelni. Már hallgatóként, amikor a TDK-dolgozatom témavezetője volt, elkezdtünk összezsizsolódní. Sok nagyon szép és nagyon nehéz pillanatot köszönhetek azóta is neki, de mindig mellettem állt és támogatott: ezek nélkül nem lennék ott, ahol most vagyok.

Köszönöm Végh Borbálának és Dénes Lillának, hogy megtanítottak a PCR-vizsgálatok és filogenetika rejtelméire (még ha néha egy kicsit többször is kellett valaminek nekiugranom), Lillának az *in situ* hibridizációban nyújtott segítségét, valamint Schönhardt Kittinek a mintafeldolgozásban nyújtott áldozatos munkáját.

Köszönöm Pop Renátának, hogy nem tudtam olyan kórszövettani vagy immunhisztokémiai feladat elé állítani, ami akadályt jelentett volna neki. Nélküle a diagnosztika közel sem lenne ilyen élmény.

Köszönöm dr. Solymosi Norbert és dr. Krikó Eszter pótolhatatlan segítségét a kutatás statisztikai elemzéseinek elkészítésében, valamint dr. Varga Zsolt, dr. Péntek Gábor és a Zoetis Hungary támogatását az ELISA-teszt kitek biztosításával.

Köszönet illeti továbbá prof. dr. Thomas Vahlenkampot és dr. Kristin Heenemannt a Lipcsei Egyetem Állatorvostudományi Karának Virologiai Intézetéből a szekvenálásban nyújtott segítségükért, valamint dr. Fabio Vannuccit és dr. Talita Resendet a Minnesotai Egyetem Állatorvostudományi Karának Diagnosztikai Laboratóriumából az RNAscope háttérének megteremtéséért.

Hálás vagyok prof. dr. Rusvai Miklósnak, a Patológiai Tanszék korábbi vezetőjének, aki elindított a patológusi pályán, és meglátta bennem a lehetőséget. Szintén hálával tartozom dr. Mándoki Mírának, a Tanszék jelenlegi vezetőjének, hogy folyamatosan támogat, meghallgatja az ötleteimet, és megtisztel bizalmával.

Köszönöm a Tanszéken minden kollégámnak, hogy támogatnak, segítenek, és minden nap mosollyal az arcomon jöhetnek dolgozni, egy kiváló csapat tagjaként. Külön köszönet mindenkinek, aki átolvasta a dolgozatot, és bármilyen tanáccsal szolgált.

Végül, de egyáltalán nem utolsó sorban, köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és bíztattak, még amikor kicsit nehéz is volt velem az élet. Nélkületek nem ment volna!