

DIPLOMAMUNKA

Koleszár Balázs

2019.

TDK dolgozat

Állatorvostudományi Egyetem
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

**Repellensek kullancsellenes hatékonyságának
vizsgálata egy új *in vitro* módszer tesztelésével**

Készítette: **Koleszár Balázs**

Témavezető: **Dr. habil. Csikó György**

egyetemi docens

Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék,

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	2
Bevezető	3
Célkitűzések	4
Anyag és Módszer	5
Eredmények	11
Megbeszélés	22
Összefoglaló	25
Summary	26
Irodalom	28
Köszönetnyilvánítás	29

Rövidítések jegyzéke

vcgo (víz-citronellal-gerniol-off)

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A paraziták elleni védekezés témakörén belül az ízeltlábú ektoparaziták elriasztása kiemelkedő jelentőséggel bír, hisz ezek az élősködők a gazdaszervezet közvetlen károsításán túl bizonyos veszélyes kórokozók vektorai is lehetnek (FARKAS 2015., MULLEN & DURDEN 2009.). Az egyik, járványvédelmi szempontból igen jelentős csoport a kullancsok (FARKAS 2015.), ezekkel az állatokkal, pontosabban a távoltartásukkal kapcsolatosan végeztünk kísérleteket.

Számos repellens hatású anyag ismert a természetes illóolajoktól a szintetikus vegyületekig, különböző spektrummal, hatékonysággal, mellékhatásokkal, melyek irodalma igen szerteágazó (THORSELL; MIKIVER & TUNON 2006., NERIO; OLIVERO-VERBEL & STASHENKO 2010., SCHRECK; FISH & MCGOVERN 1995., MAIA & MOORE 2011.). Az utóbbi időben egyre erősödik az a tendencia ezen a területen is, hogy szívesebben használunk természetes vegyületeket (NERIO; OLIVERO-VERBEL & STASHENKO 2010.), így ezen anyagok hatékonyságának tesztekkel való igazolása egyre fontosabbá vált. A természetben rengeteg olyan anyag található, aminek riasztó hatást tulajdonítanak, azonban a valóban hatékonyak kiszűrése ezek közül (vagyis amelyekkel érdemes foglalkozni a gyógyszerfejlesztés során) igen költséges és körülményes eljárás az általánosságban alkalmazott preklinikai vizsgálatokkal (STAFFORD 2005; Anonymous 2007). Az Európai Gyógyszerügynökség előírása szerinti preklinikai tesztek kullancsellenes repellensekre *in vivo* jellegűek, kezelési csoportonként legalább 6 kísérleti állattal, állatonként 50 adult kullancsral, amelyek közt az 1:1 ivararány javasolt (Anonymous 2007). Alkalmaznak emberkísérleteket is, mely során repellensenként 10 ember kézhátára kerül 5-5 kullancs, majd a függőlegesen tartott, riasztó anyaggal kezelt alkarra való felmászást (negatív geotaxis) vagy annak hiányát rögzítik (hivatkozás?).

Munkánk során két növényi illóolajat, a citronellalt és a geraniolt hasonlítottuk össze különböző élőhelyeken gyűjtött kullancsok felhasználásával, miközben egy új, költséghatékonyabb vizsgálati módszert teszteltünk. A geraniol a *Geranium* (gólyaorr) igazoltan jó repellens hatású illóolaja, melynek nagyobb koncentrációban ölü hatása is van (GÁLFI; CSIKÓ & JERZSELE 2015). A citronellal a *Cymbopogon nardus* (cironella) illóolaja, mely negatívan befolyásolja bizonyos kullancsfajok szaporodását (CUNHA DOS SANTOS; SILVEIRA FLORES VOGEL & GONZALEZ MONTEIRO 2012).

Célkitűzések

A repellensek preklinikai tesztjei azt hivatottak eldönteni, hogy az adott hatóanyag esetében érdemes-e elkezdni a gyógyszerfejlesztés hosszú és költséges folyamatát, vagyis van-e rá reális esély, hogy a szer hatékony. Előírás szerint erre állatkísérleteket alkalmaznak (Anonymous 2007), ugyanakkor ez magában is egy elég költséges eljárás, nem beszélve a dolog állatvédelmi oldaláról, így felmerül a kérdés, hogy lehet-e, és ha igen, hogyan lehetne az állatokat helyettesíteni a gyógyszerfejlesztés ezen előzetes, vizsgálódó szakaszában.

Célunk egy olyan *in vitro* teszt kidolgozása volt, ami nem igényel kísérleti állatokat, gyors, reális eredményt ad, kevesebb kullancsot igényel és költséghatékony. Ezekkel a tesztekkel szemben a legfontosabb elvárás, hogy gyorsan és olcsón adjon hasznos eredményt. Az állatkísérletek ahol lehet mellőzése fontos állatvédelmi irányelv, ráadásul az állatok beszerzése és tartása komoly anyagi és időráfordítást igényel. Az is fontos szempont volt, hogy a kísérlethez ne legyen szükség több száz kullancsra, hanem lehetőleg száz alatti szám legyen a vizsgálatban részt vevő egyedek száma, mert azok tömeges gyűjtése nem egyszerű feladat még erősen fertőzött területen sem.

Anyag és módszer

A vizsgálati tér

A méréseket egy szabályos kocka alakú, 1 m³ térfogatú, szilikonos ragasztóval készült, átlátszó plexidobozban (polimetil-metakrilát) végeztük, melyen elöl egy 50 cm x 50 cm-es szintén átlátszó plexi ajtó helyezkedett el. A doboz aljára kívülről 10 cm x 10 cm-es rácsot szerkesztettünk alkoholos filccel, majd fehér papírral borítottuk be a kullancsok mozgásának megfigyelését megkönnyítendő.

A kullancsok

A kullancsok gyűjtése két módon történt: az egyik módszer a fűhálózás, mely során egy függönyanyagból varrt, megerősített keretű, kúp alakú halóval söpörtem át a lágyszárú növényzetet olyan területeken, ahol kullancsok előfordulását sejtettem, majd a begyűjtött növénytörmelék és állatok

közül kiválogattam a kullancsokat (1. kép).

A másik módszer a lepedőzés, mely során egy lepedőt, rongyot, pólót húz végig az ember a fűben, és a kullancsok az alsó felére másznak. Ezt a módszert a szövet megszagósításával

lehetett hatékonyabbá tenni, vagyis kutya mellé betenni,

vagy a pólót megfelelő fizikai munka után használni erre a célra.

Mindkét módszerrel gyűjtöttünk nagyobb mennyiségű kullancsot. A módszerek kullancsok táplálékkeresési viselkedését használják ki, így a gyűjtött paraziták faj, kor és ivar szerinti összetétele és aránya hasonló ahhoz, mint ami egy ott elhaladó állatra mászna fel táplálkozás céljából. A gyűjtött kullancsok főleg a *Dermacentor*, *Ixodes* és *Haemophysalis* nemzetségekből kerültek ki, de fajukat nem határoztuk meg pontosabban.



1. kép: Kullancsgyűjtés fűhálóval

A vizsgált anyagok

A vizsgálat során növényi illóolajok, a geraniol és a citronellal 0,1%, 1%, 5% és 10%-os hígítású vizes emulzióit használtuk. Pozitív kontrollként OFF-ot alkalmaztunk, melynek hatóanyaga N,N-dietil-toluolamid. Negatív kontrollunk a desztillált víz volt.

A citronellal és a geraniol (mintegy 350 ml-t mindkettőből) az Animall Professional Care Kft. (2376 Hernád, Fő utca 183., Magyarország) bocsájtotta rendelkezésünkre. Mindkettő megfelel a biocid termék előírásoknak, legalább 97% tisztaságúak.

Citronellal: Gyártó: BASF Corporation NJ, USA
Gyártási szám: 01825629UO
Gyártási idő: 2014.04.02
Lejárat: 4 év

Geraniol: Gyártó: Neudorff GmbH/KG, Németország
Gyártási szám: 11600667
Gyártási idő: 2014.06.11
Lejárat: 4 év

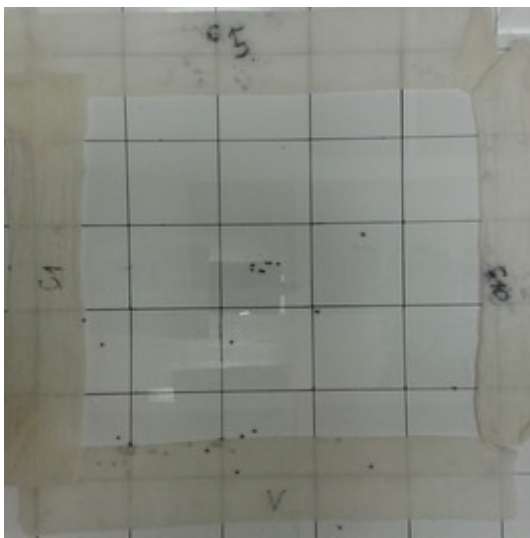
OFF! Spray (termék): Forgalmazó: DM Magyarország
Gyártó: S.C. Johnson GmbH, Ausztria
Hatóanyag: dietil-toluamid
Hatóanyag tartalom (a termékben): 7%
Gyártási szám (termék): 877506
Gyártási idő (termék): 2016.04.15
Lejárat (termék): 4 év

A repellens hatás vizsgálata pozitív taxist kiváltó inger nélkül

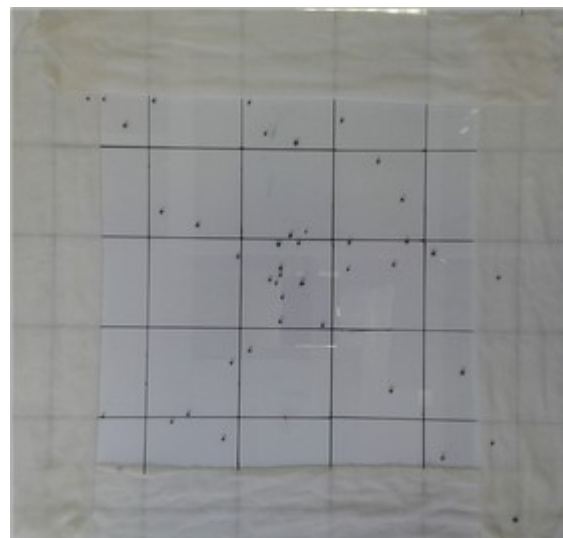
Ennél a vizsgálatnál azt figyeltük, hogy a repellensek hogyan változtatják meg a kullancsok mozgását. Abból indultunk ki, hogy ha az idegen környezetbe helyezett kullancsoknál a menekülés, helykeresés közben is kimutathatóvá válik a repellens hatás, akkor feltételezhető, hogy a nyugalomban lévő, táplálkozni kívánó kullancsoknál ez még kifejezettebb lesz. Ugyanis amíg a plexire helyezett kullancs a lehető leggyorsabban egy nyirkos, sötét helyre akar távozni, addig az ideális környezetben lévő vélhetően érzékenyebb a riasztó hatású

anyagokra, hisz nincs rajta a mozgására irányuló külső kényszer. Vagyis ha stressz ellenére is kimutatható az anyagok repellenst hatása, akkor az logikusan in vivo még inkább hatékony kell legyen.

A két vizsgált repellenst, a geraniolt és a citronellalt, 0,1%-os és 1%-os koncentrációban hasonlítottuk össze N,N-dietil-toluolamid pozitív kontroll mellett. Mindkét anyag riasztó hatásának koncentrációfüggését is vizsgáltuk 1%-os, 5%-os és 10%-os oldatok összehasonlításával. Minden esetben desztillált vízzel az oldatokkal azonos módon átitatott gézcsíkot használtunk negatív kontrollnak, valamint kontroll mérést is végeztünk kizárólag vizes gézcsíkokkal.



2. kép



3. kép

A repellenseket – különböző vizes hígításban – 10 cm széles és 50 cm hosszú gézcsíkokra vittük fel, melyeket négyzet alakban rendeztünk el (2-3. kép), ennek a középpontjára kerültek a kullancsok egy kupak alá, ahonnan egyszerre indítottuk őket a kupak levételével a futtatás kezdetekor. A mozgást egy Samsung Galaxy Trend Plus okostelefon hátoldali kamerájával követtük nyomon, fél-egy perces időközönként fotózva egyet rögzített kameraállásból, a doboz tetejéről (tárgytávolság ~1m). A készített képek mérete 2560x1920 pixel.

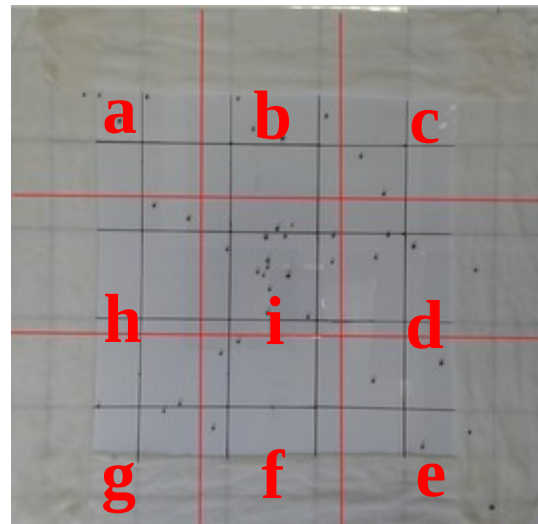
A vizsgálat menete

A gyűjtött kullancsokat egy nagyobb csoportban tartottuk, és a legvitálisabb 30-50 példányt válogattuk ki kísérletekhez. Így egy-egy kullancs – megfelelő pihentetés után – több futtatásban is részt vehetett.

Az állatokat a teszt indítását megelőzően egy kupak alá gyűjtöttük, hogy ne széledjenek szét és egyszerre lehessen őket indítani. Az indítást megelőzően készült a '0.' felvétel, majd levettük a kupakot. A kullancsok mozgását 5-8 percig figyeltük és rögzítettük, ez az idő bőven elegendőnek bizonyult a repellens hatás vizsgálatára. A kontroll futtatás során sűrűbben készítettünk felvételeket, hogy a vizsgált anyagokkal történő futtatások képeihez minél közelebbi idejű kontroll képet tudjunk rendelni.

A dobozt az egyes vizsgálatok közt alkoholos ronggyal töröltük ki, és kiszellőztettük.

A fényképeket Pinta képszerkesztő segítségével dolgoztam fel. Egy 3x3-as rácsot szerkesztettem rájuk, és az egyes cellákban megszámláltam a kullancsokat. A rácsszemeket a-tól f-ig betűkkel láttam el, és egy táblázatban mint gyakoriságokat rögzítettem a kullancsok számát az egyes képek egyes celláihoz (4. kép).



4. kép

Statisztika

A statisztikai elemzést R Commander segítségével végeztük. Először a kontroll futtatást ellenőriztük, hogy egyenletes-e az eloszlás a cellákban. Erre khi-négyzet próbát alkalmaztunk, szimulált p-értékkel, mivel a várható gyakoriságok a cellákban 5 alattiak voltak. A vizsgálatok során az egyes cellákban kapott gyakoriságok eloszlását Fisher-féle egzakt próbával vetettük össze a kontroll vizsgálat eredményeivel. A képeket párosítottuk, mérésenként legalább hét kép adatait elemeztük.

A citronellal és a geraniol koncentrációfüggés-vizsgálatának képeit egymással is összehasonlítottuk azokon a képeken, ahol a kullancsok már kellően szétszórtak.

Az 1%-os és 0,1%-os összehasonlítás során készült képeket oly módon is összehasonlítottuk a kontrollal, hogy a középső cellában lévő kullancsoktól eltekintettünk, és csak a szélső rácsszemekben lévő gyakorisági értékeket hasonlítottuk össze. Erre azért volt szükség, mert ezekben a futtatásokban sok volt a csökkent életképességű kullancs, amelyek nem, vagy csak alig távolodtak el az indítás helyétől, és középen „felhalmozódva” fals eredményt okoztak.

Ezt az összehasonlítást csak azokon a képeken végeztük el, ahol a kép kontroll párjának eloszlása már egyenletes volt, vagyis elég idő telt el ahhoz, hogy a kullancsok széteszoljanak.

Ábrák

Az ábrákat R Studio, GIMP és Pinta programok segítségével készítettük. A képsorok számozása nem követi azt a rendet, ami a képek elemzéshez való párosítása során kialakult, hanem az átláthatóság érdekében 1-7-ig, illetve 8-ig számoztam őket függetlenül attól, hogy valójában hányadik felvétel volt az adott vizsgálatban és hogy melyik kontroll képhez volt időben közel, vagyis melyikhez rendeltük hozzá.

Egyéb módszerek

Pozitív taxis és gátlása

A vizsgálatnak ebben a részében olyan ingereket próbáltunk előidézni, amelyek csalogathatják a kullancsokat, majd ezután a repellens hatást kívántuk vizsgálni a pozitív taxis ellenében. A thermotaxist egy Exo-Terra terráriumi fűthető műsziklával igyekeztünk modellezni, valamint különböző csalogató anyagokat is használtunk: ammóniát és vajsavat, valamint kutyakozmetikából származó szórt, a gyűjtéshez használt pólót, valamint vért (MITCHELL et al 2017.; WALADDE & RICE 1982).

A szórt a műsziklához gézzel rögzítettük, így egy 35-40°C-os, kutyaszőrszagú gombóc keletkezett, amit a fent említett anyagokkal vagy azok nélkül kínáltunk fel az alanyoknak. A gyűjtéshez használt pólót szintén kerek alakúra gyűrve helyeztük el.

Egy másik elrendezésben a szórt gézhengerekbe töltöttük, és négyzet alakban helyeztük el, a pozitív taxis nélküli vizsgálatnál leírt módon kezelve a vizsgált anyagokkal, vagyis a két módszert ötvöztük.

Folytonos változók elemzése

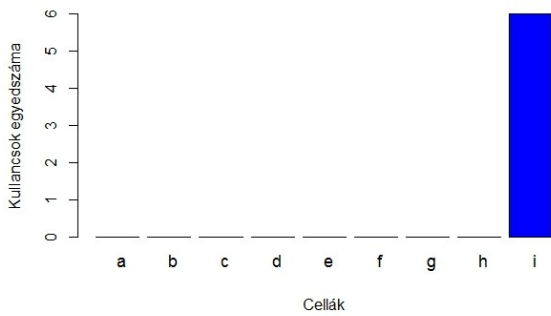
A fényképeket GIMP képszerkesztővel dolgoztam fel: a kullancsok pixelben megadott koordinátáit egy táblázatban rögzítettem képenként. Ezeket a koordinátákat egy olyan, jobb sodrású koordináta-rendszerbe transzformáltam, ahol az origó az indulásig a kullancsokat fedő kupak középpontja, valamint a pixeleket mm-re váltottam. A statisztikai elemzéshez a középponttól való távolságot és az elmozdulás szögét alkalmaztam, ezeket a koordinátákból számoltam ki a Pitagorasz-tétel és a trigonometria segítségével.

Az elemzést R Studio-val végeztük. Nullhipotézisünk az volt, hogy a kontroll futtatásban résztvevő kullancsok, és a repellens tartalmú textilcsíkok közé helyezett kullancsok középponttól való távolságának és az elmozdulás szögének a két csoportnál azonos a variáciája. Egyoldalú ellenhipotézisünk szerint pedig a variancia kisebb a kezelt térbe helyezett kullancsoknál, mert a szerek eltérítik az egyébként random mozgásukat egy irányba. A vizsgálat során párba rendeztük a hasonló időben készült képeket az aktuális vizsgált és a kontroll futtatásból, majd a képpárokat hasonlítottuk össze.

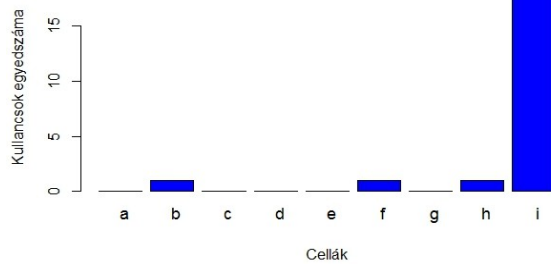
Mann-Whitney-féle U-próbával szintén próbáltuk az adatsorok közti eloszlásbeli különbségeket megtalálni.

Eredmények

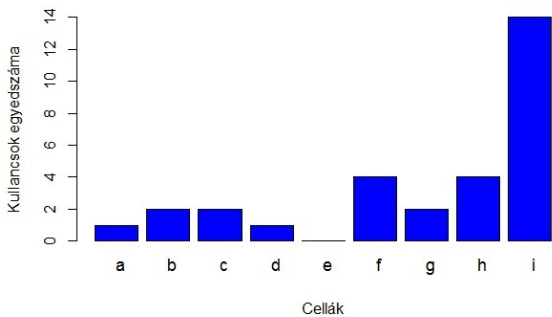
Semleges környezetben a kullancsok véletlenszerű mozgásuk révén egyenletesen töltötték ki a teret, ezt mutatja a kontroll mérés eredménye. Az ábrákon az egyedszámok az aktív, mozgó kullancsok számát jelölik. (A kullancsok egyedszáma a cellákban képenként: 1-9. ábra; Az egyenletes eloszlástól való eltérés tesztelésére alkalmazott chi-négyzet próba szimulált p-értékei: 1. táblázat)



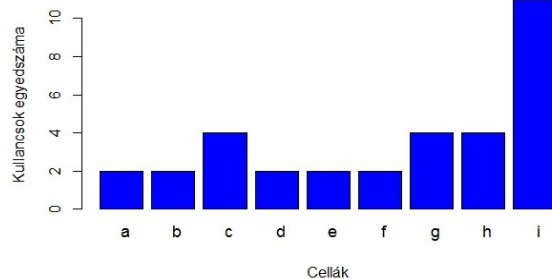
1. ábra: 1. kép (kontroll)



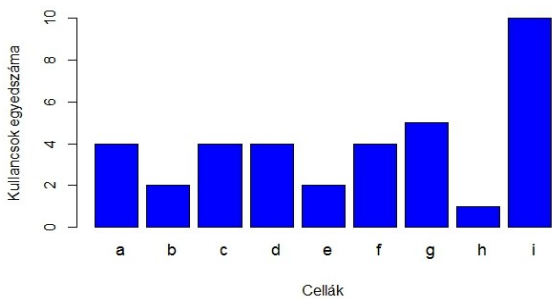
2. ábra: 2. kép (kontroll)



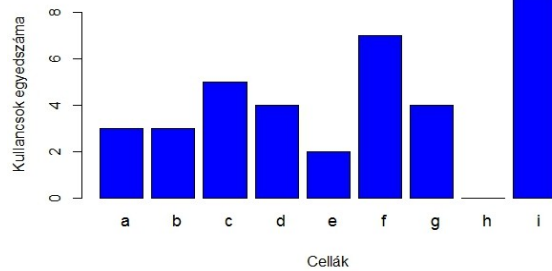
3. ábra: 3. kép (kontroll)



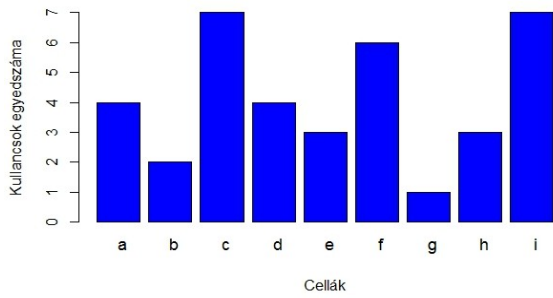
4. ábra: 4. kép (kontroll)



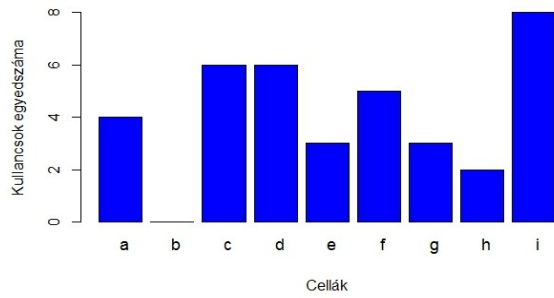
5. ábra: 5. kép (kontroll)



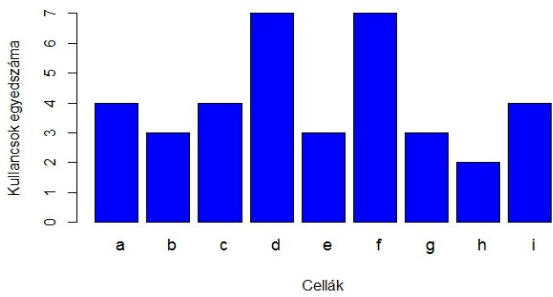
6. ábra: 6. kép (kontroll)



7. ábra: 7. kép (kontroll)



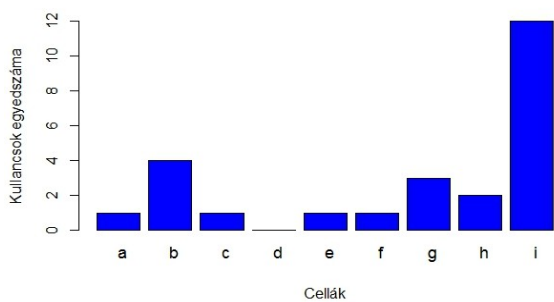
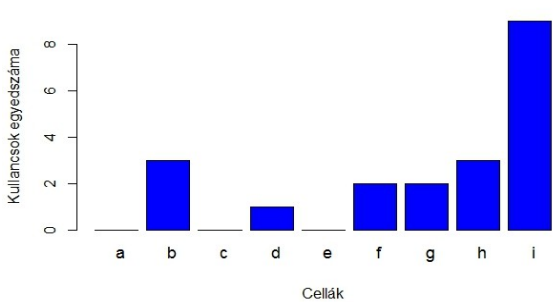
8. ábra: 8. kép (kontroll)

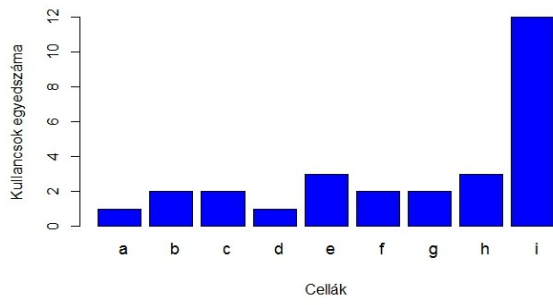


9. ábra: 9. kép (kontroll)

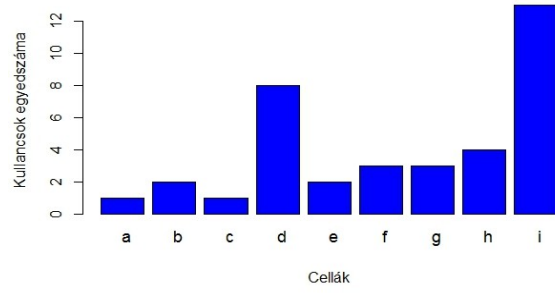
1. táblázat

A citronellal és a geraniol repellens hatásának összehasonlítása során a következőképpen alakultak a kullancsok egyedszámai (10-16., illetve 17-24. ábra), valamint a kontrollhoz viszonyított eloszlásra Fisher-féle egzakt próbával kapott p-értékek (2. és 3. táblázat):

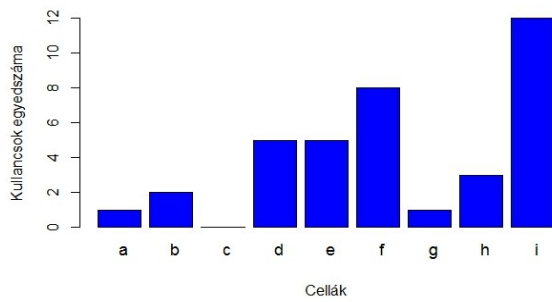




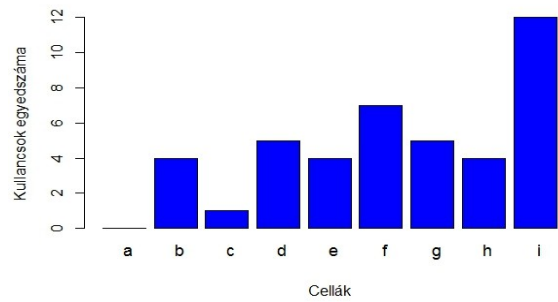
12. ábra: 3. kép (vcgo, 0,1%)



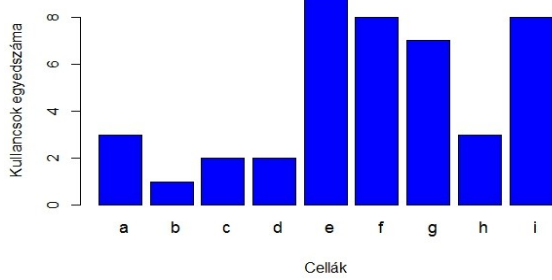
13. ábra: 4. kép (vcgo, 0,1%)



14. ábra: 5. kép (vcgo, 0,1%)



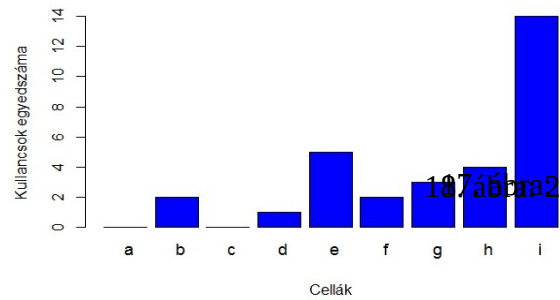
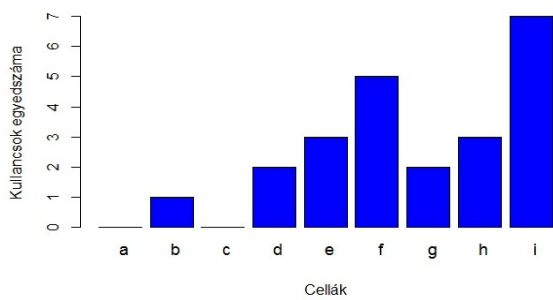
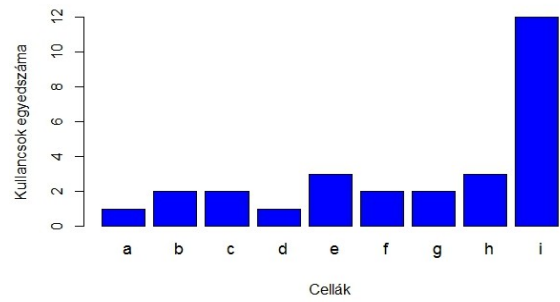
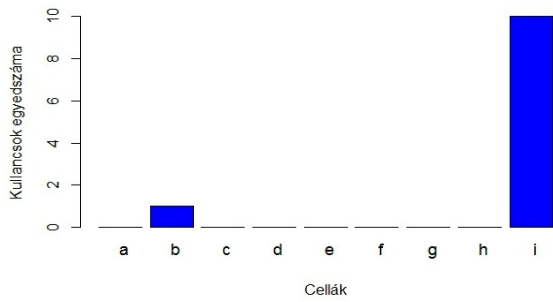
15. ábra: 6. kép (vcgo, 0,1%)



0,1%-os adatok összehasonlítása	
	p-érték
1. kép	0,5316

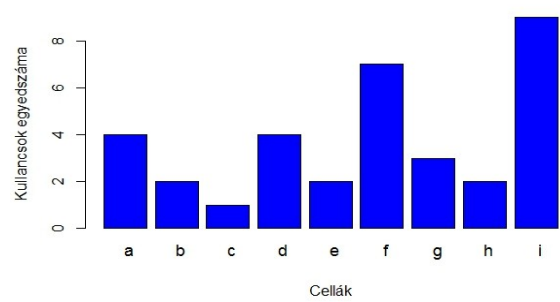
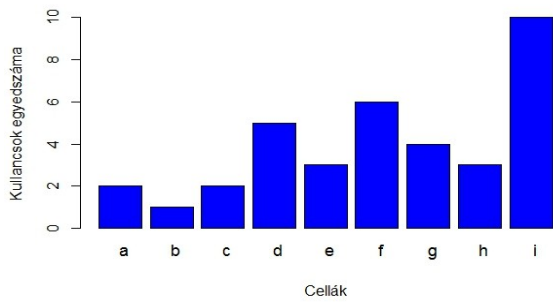
16. ábra: 7. kép (vcgo, 0,1%)

2. táblázat



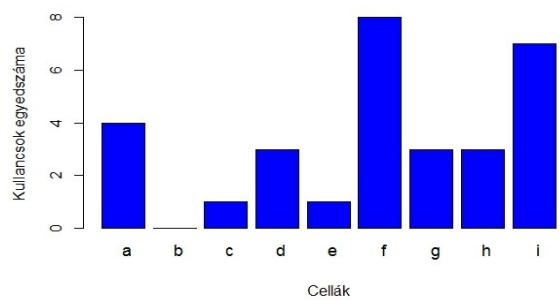
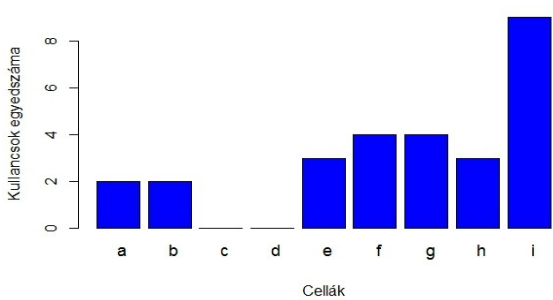
19. ábra: 3. kép (vcgo, 1%)

20. ábra: 4. kép (vcgo, 1%)



21. ábra: 5. kép (vcgo, 1%)

22. ábra: 6. kép (vcgo, 1%)



3. táblázat

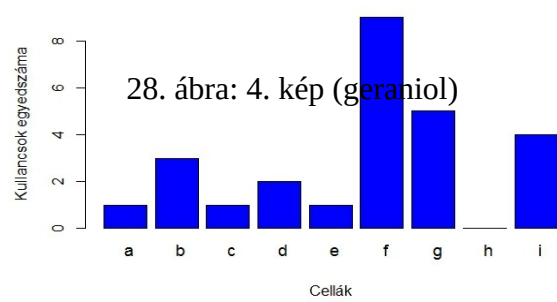
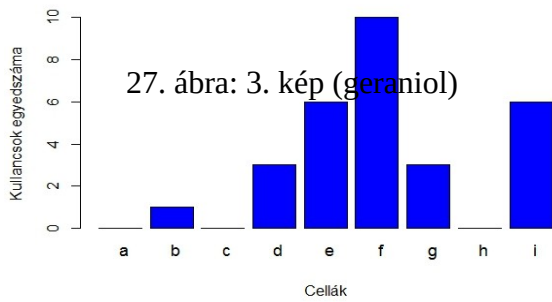
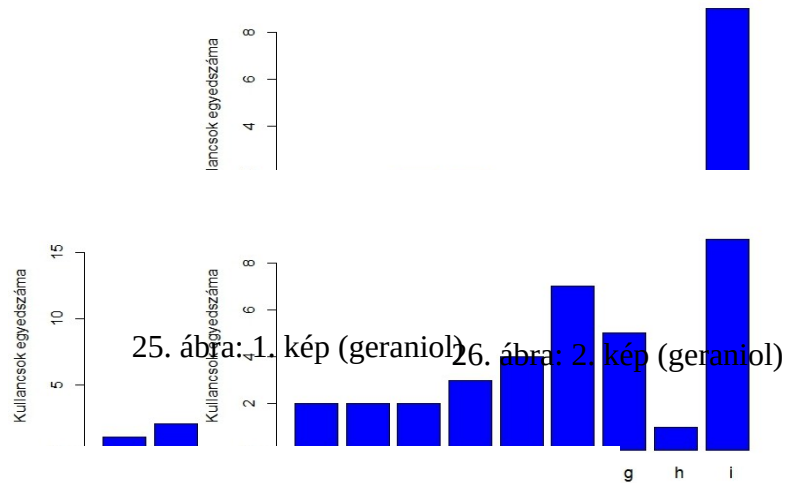
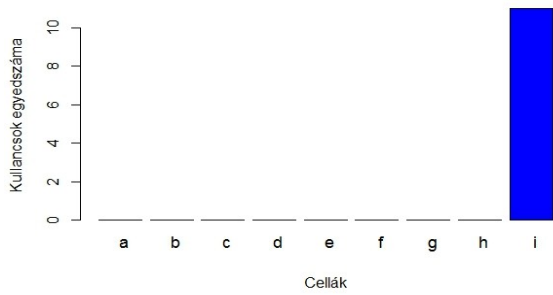
Miután elhagytuk a középső cellát (i) az elemzésből (lásd Anyag és módszer), a következő p-értékeket kaptuk (28-29. ábra):

0,1%-os összesen középső c
1. kép

4. táblázat

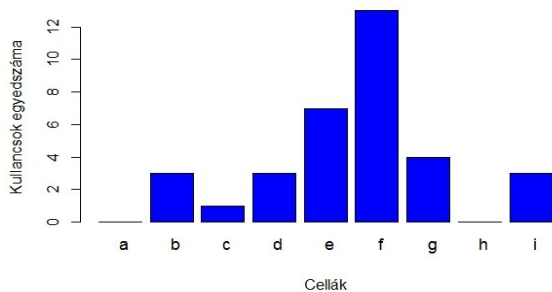
5. táblázat

A geraniol koncentrációfüggés-vizsgálata során a kullancsok eloszlását a 25-31. ábra mutatja, a Fisher-teszt által adott p-értékeket a 6. táblázat foglalja össze.



27. ábra: 3. kép (geraniol)

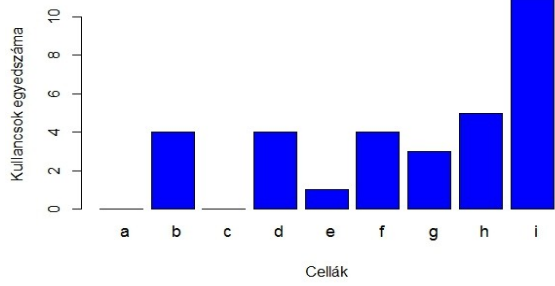
30. ábra: 6. kép (geraniol)



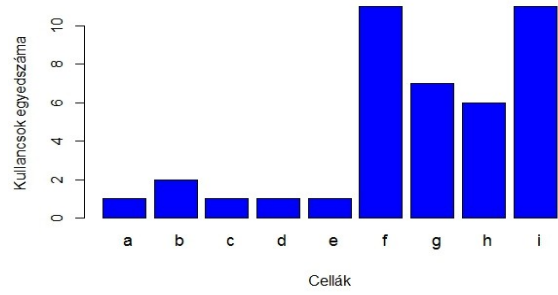
31. ábra: 7. kép (geraniol)

6. táblázat

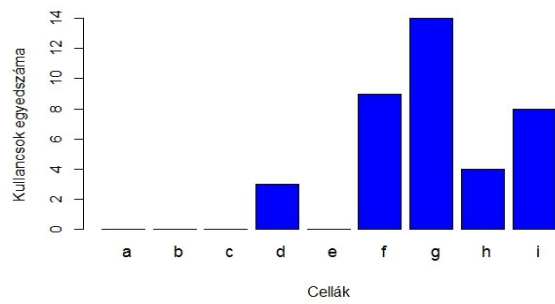
A citronellal koncentrációfüggés-vizsgálata során a kullancsok eloszlását a 32-38. ábra mutatja, a Fisher-teszt által adott p-értékeket a 7. táblázat foglalja össze.



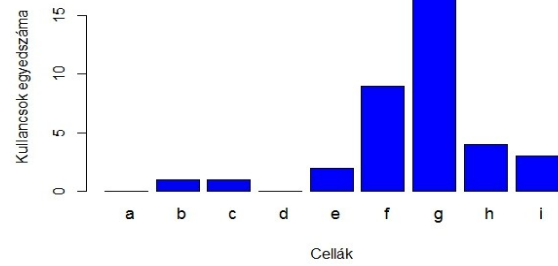
32. ábra: 1. kép (citronellal)



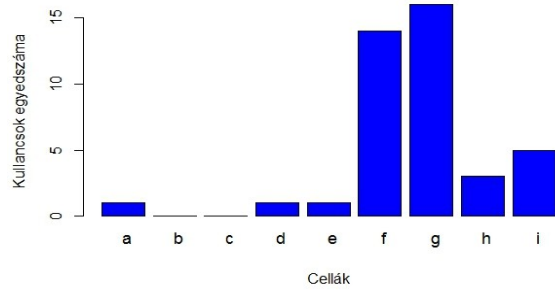
33. ábra: 2. kép (citronellal)



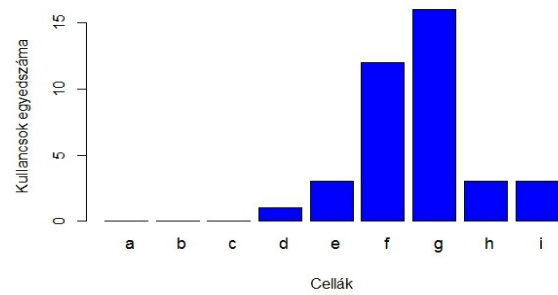
34. ábra: 3. kép (citronellal)



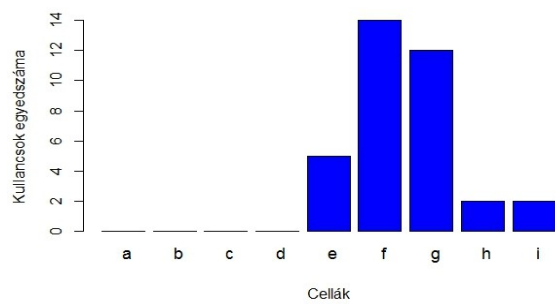
35. ábra: 4. kép (citronellal)



36. ábra: 5. kép (citronellal)



37. ábra: 6. kép (citronellal)



37. ábra: 7. kép (citronellal)

7. táblázat

A két vizsgált illóolaj koncentrációfüggésének összehasonlítása során a 8. táblázatban megtalálható p-értékek jöttek ki.

8. táblázat

Az új módszerek kikísérletezése során elkerülhetetlen a zsákutcák, akadályok, korlátok feldezése teljesen akaratlanul. Velünk sem volt ez másképp, egész sor zátonyra futottunk rá a vizsgálataink során, melyek ugyanakkor tanulságosak voltak a munkánkra és a jövőre nézve. Az 'Egyéb módszerek'-nél az Anyag és módszer fejezetben felsorolt vizsgálati módok egyike sem működött, vagy fals eredményt adott, most röviden ezt részletezem.

Pozitív taxist egyik esetben sem sikerült kiváltani a kullancsokon.

A folytonos változók elemzése fals eredményre vezetett. Mivel az adatsorok eloszlása nem volt normális, erősen lecsökkent a szóba jöhető próbák száma. Sehol sem kaptunk

szignifikáns eredményt, még ott sem, ahol szemre is tökéletesen látszódott a repellensek által kiváltott negatív chemotaxis.

Megbeszélés

A kontroll egyenletes eloszlásának vizsgálata

Ahogy a p-értékek növekedéséből is látszik, a közepről induló kullancsok fokozatosan eloszlának a vizsgálati térben egyenletesen: az 5. kontroll képtől kezdve eloszlásuk szignifikánsan nem tér el az egyenletestől, vagyis megállapítható, hogy nem befolyásolta őket számottevően a vizsgálati téren kívüli tényező.

A repellensek 0,1%-os koncentrációinak összehasonlítása

Bár a futtatás vége felé készült képeken már észlelhető nagyobb gyakoriság a vizes csík közelében, a p-értékek sehol nem mutatnak szignifikanciát, csupán megközelítik az 5%-os szintet. A középső cella figyelmen kívül hagyásával a p-értékek tovább csökkentek, de a kontrolltól való eltérés így is csak kardinálisan szignifikáns.

Ebben a koncentrációban láthatóan a repellensek hatékonysága nem üti meg azt a szintet, hogy oly mértékű riasztó hatást fejtson ki, ami a kullancsokat nagyobb távolságra riasztja el, ezáltal a kullancsok száma nem fog a kevésbé riasztó gézcsíkok mentén szignifikánsan megnőni. A módszer számára tehát ebben a tartományban túl kis mértékű az anyagok közti eltérés ahhoz, hogy kimutatható legyen.

A repellensek 1%-os koncentrációinak összehasonlítása

1%-os koncentrációban már jobban érezhetőek az egyes anyagok közti hatékonyságbeli különbségek, de szignifikáns eltérést a kontrolltól csak akkor tapasztaltunk, amikor elhagytuk a középső cellát az elemzésből. Erre azért volt szükség itt és a 0,1%-os összehasonlítás esetében, mert e két futtatás során kevésbé életképes kullancsok is kerültek a vizsgálati térbe, és ezek nem léptek ki a középső cellából, ugyanakkor a képeken nem lehetett őket elkülöníteni a rendesen mozgó társaiktól. Középen felhalmozódva pedig torzították az eloszlást, és ez kis mértékben megnövelte a Fisher-féle egzakt próba által kiadott p-értékeket. A középső cella elvetésével egy helyen kaptunk szignifikáns eredményt.

A két összehasonlító vizsgálatok tapasztalata azt mutatja, hogy ezek a koncentrációk a módszer érzékenységének alsó határán mozognak. A szignifikáns és kardinálisan szignifikáns eredményekből pedig arra következtethetünk, hogy a geraniol a dietil-toluamidhoz hasonló hatékonyságú ebben a koncentrációban, a citronellal pedig valamivel gyengébb repellens. Ez

az eredmény összhangban van azzal a ténnyel, hogy a geraniol az illóolajok közt az erősebb hatásúak közé tartozik, cid hatása is ismert nagyobb koncentrációban (GÁLFI, P.; CSIKÓ, Gy.; JERZSELE, Á. 2015).

A geraniol koncentrációfüggés-vizsgálata

Egy képnél kaptunk szignifikáns p-értéket, ami azért érdekes, mert a vizsgálat során egyértelműen látszott, hogy a kullancsokat riasztja az anyag. Ez az ellentmondás két módon is magyarázható. Az egyik, hogy a kullancsok egy része a vizes csíkon átmászva elhagyta a körbezárt területet, ami torzítja az eredményt. A másik magyarázat pedig az, hogy a geraniol kis koncentrációban is olyan riasztó volt az állatok számára, hogy azok inkább visszafordultak, és nem megkerülni próbálták. Emellett nem csak a gézcsíkkal való kontaktust, hanem a környezetét is kerülték. Ahogy a későbbiekben tárgyalásra kerül, a geraniol hatása jóval kevésbé koncentrációfüggő – eredményeink szerint – a citronellalénál. Így, mivel három oldalról körülvette őket a repellens, ami ráadásul távolról is riasztólag hatott és ez a riasztó hatása kevésbé függött a koncentrációtól, kevésbé alakult ki taxis a koncentrációgrádiens mentén.

A citronellal koncentrációfüggés-vizsgálata

A citronellal vizsgálata hozta a legegységesebb eredményt az összes futtatás közül. Már a harmadik képtől szignifikánsan eltér a kontroll eloszlástól a kullancsok elrendeződése (időben ez az 5. kontrollképhez volt közel, ahhoz is volt rendelve az elemzésnél, hanem a nulladik és az első értékelhető felvétel közt telt el több idő), a negyedik képtől kezdve pedig a p-érték nagyon erős szignifikanciát mutat.

Ennél a vizsgálatnál nem okozott gondot a képről való lemászás, mert a kullancsok a vizes csík alá bújtak, ami látszódt a képeken.

Az eredményekből kitűnik, hogy a citronellal repellens hatása erősen függ a koncentrációtól. Míg az 1%-os csíkot megközelítik, sőt, rá is mászhatnak, addig az 5%-os, de még inkább a 10%-os citronellal nagyon erős repellens hatással bír.

A két anyag koncentrációfüggésének összehasonlítása

Azokat a képeket, ahol a kullancsok jelentős része már elkezdett mozogni, egymással is összehasonlítottuk a két kísérlet összehasonlításaként. Három időpontban is szignifikáns a két

eloszlás eltérése, ami azt jelzi, hogy a két anyag koncentrációfüggése eltérő. A citronellal riasztó hatása sokkal szélesebb skálán mozog a koncentráció függvényében, mint a geraniolé.

Egyéb módszerek

Pozitív taxis kiváltása vélhetően azért nem sikerült, mert a kullancsok a manipulációk okozta stressz és a természetestől igen különböző környezet (páratartalom!) miatt elsősorban elbújni, nem pedig táplálkozni akartak. A másik ok pedig az, hogy a vizsgált kullancsok olyan fajokból kerültek ki, amelyek a növényzetben várják a gazdát, nem pedig aktívan kutatják fel, mint pl. a *Hyalomma marginatum* (FARKAS, R. 2015.).

A pozitív taxis nélküli vizsgálati mód szőrrel tömött gézhengerrel való továbbfejlesztése nem volt alkalmas a vizsgálatra, mert a kullancsok a gézből kiszabaduló apró szőrszálakba kapaszkodtak, és mozgás helyett egy csomóba gabalyodtak össze.

A folytonos változók felvétele igen hosszadalmasnak bizonyult az átlalunk használt szoftverekkel, ráadásul sokkal nehezebb korrigálni az adatokat, ha valamilyen torzító tényezőt fedezünk fel. A normál eloszlást a legtöbb esetben a csökkent életképességű kullancsok adataiból összeálló második csúcs „rontotta el”, az adatsorból pedig szinte lehetetlen kiszűrni ezeket.

Tanulságok a módszer finomítását illetően, a fejlesztés lehetőségei

A vizsgálatok számos lehetséges hibaforrásra mutattak rá a módszer alkalmazása során, melyek kiküszöbölése elsődleges fontosságú a vizsgálatok finomítása során.

1. A vizsgálati teret úgy kell megalkotni, hogy a kullancsok ne tudjanak kilépni a repellensekkel átitatott és a kontroll gézcsíkok alkotta négyzetből.
2. Különböző anyagok összehasonlítása esetén nagyobb koncentrációkat érdemes használni.
3. A pozitív taxis kiváltása, „műkutyá” létrehozása kullancsok esetében nem működik.
4. A folytonos változók nehezen kezelhetőek, viszont a rácsszemekben tapasztalt gyakoriságokkal dolgozó statisztikai eljárások finomíthatók tovább, nagyobb számú kullancs esetén sűrűbb rács is kerülhet a képekre, ami tovább növeli a pontosságot.
5. A képek készítése során egy nagy időintervallummal dolgozó, sorozatfelvételt készítő fényképezőgép használata precízebbé tenné az adatgyűjtést.

Összefoglaló

A kullancsok elriasztása - parazita és vektor tevékenységük miatt - fontos része a háziállatok egészségvédelmének. Erre a célra egyre több természetes anyag, például növényi illóolajok alkalmazása merül fel lehetőségként. Azonban, egy-egy új repellensnek tűnő anyag hatásának ellenőrzése komoly költséget jelent, ha az előírások szerinti állatkísérletekkel vizsgálják azt, ráadásul nagy mennyiségű kullancsot igényel. Továbbá, állatvédelmi szempontból is kívánatos lenne kiváltani az állatkísérleteket *in vitro* tesztekkel.

Munkánk során új *in vitro* vizsgálati módszert fejlesztettünk ki és teszteltünk olyan módon, hogy két illóolaj, a citronellal és a geraniol repellens hatását hasonlítottuk össze desztillált víz negatív és N,N-dietil-toluolamid pozitív kontroll mellett 0,1%-os és 1%-os koncentrációban. Teszteltük továbbá a két anyag koncentrációfüggését is 1%-os, 5%-s és 10%-os hígítású vizes emulziók használatával vizes negatív kontroll mellett. A vizsgálandó anyagokat és a kontrollokat gézcsíkokra vittük fel, majd négyzet alakban helyeztük el őket a vizsgálat helyéül szolgáló kocka alakú, átlátszó plexiből készült doboz alján. Végeztünk kontroll futtatást is, csak vízzel nedvesített gézcsíkok használatával. A kullancsokat egyszerre indítottuk középről, mozgásukat rögzített állásból fényképeztük, majd a kullancsok helyzetének, elrendeződésének paramétereit használtuk fel az elemzésnél.

Az adatokat R Commander segítségével elemeztük, az eloszlások közti eltérések vizsgálatára Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztunk, ahol a kontrollal hasonlítottuk össze az egyes méréseket, illetve a két anyag koncentrációfüggés-vizsgálatainak adatait egymással is összehasonlítottuk. A kontroll futtatás egyenletes eloszlását chi-négyzet próbával teszteltük.

A citronellal és a geraniol koncentrációfüggésének vizsgálata során is szignifikáns eltérést tapasztaltunk a kontroll futtatáshoz képest a kullancsok eloszlásában, csakúgy, mint a két anyag összehasonlítása során. A hatáserősség összehasonlítására irányuló futtatások közül csak az 1%-os hozott szignifikáns eredményt. Az eredmények alapján a citronellal hatása sokkal inkább függ a koncentrációtól, mint a geraniolé, mely kis koncentrációban is elég riasztó a kullancsok számára, míg a citronellal kevésbé. A dietil-toluolamiddal összehasonlítva a citronellal – kis koncentrációban – kevésbé volt hatásos, a geraniol esetében ez nem volt megfigyelhető.

Összességében elmondható, hogy a módszer működőképes, és többféle összehasonlításra is alkalmas. A továbbiakban szeretnénk az új módszert finomítani, hogy egy olyan egzakt,

pontos, megbízható, valamint jól kivitelezhető preklinikai teszt legyen belőle, ami kiválthatja az állatkísérleteket.

Summary

Deterring ticks - due to their parasitic and vector activity - is an important part of domestic animal health protection. Several natural substances come up, as a repellent; especially essential oils are the most common ones. However, evaluating the effect of a new repellent substance is a serious cost, if it is tested by animal experiments according to the regulations, moreover it requires a large amount of ticks. The animal welfare is important as well, so it would be great to substitute the animal testing by *in vitro* tests.

In our work, we have developed and tested a new *in vitro* test method. The repellent effect of two essential oils; citronellal and geraniol was compared to purified water as negative control and to N,N-diethyl-toluamide in 0.1% and 1% dilution as positive control. We also tested the concentration dependence of the two substances using 1%, 5% and 10% diluted aqueous emulsions using water as negative control. The test substances and controls were applied to gauze strips of about 50 cm long and 5 cm wide and placed in square form at the bottom of a 1 m³ cubic box of transparent plexiglass (polymethyl methacrylate, PMMA). We also carried out a control measurement using gauzes moistened only with water. The ticks were started from the centre at the same time, their motion was captured from a fixed position, and the parameters of the position and arrangement of ticks were used in the analysis.

The data were analysed by R Commander, and Fisher's exact test was used to compare the differences between the distributions, all measurements were compared to the control, and the data of the concentration-dependence studies of the two substances were compared to each other as well. The uniform distribution of control run was tested by a chi-square test.

The concentration dependency of both the citronellal and the geraniol were significantly different in the distribution of ticks compared to both the control and each other. Among the measurements of comparing the strength, only the 1% concentration was significant. According to the results, the effect of citronellal is more dependent on the concentration than geraniol, which at low concentrations is quite deterrent for ticks, while the citronellal is less. Compared to diethyl-toluamide, citronellal was less effective at low concentrations, but this was not observed in geraniol.

Overall, it can be said that the method is workable and is suitable for multiple comparisons. Hereinafter, we would like to refine the new method to provide a precise, accurate, reliable and well-performing preclinical test that can replace animal experiments.

Irodalom

THORSELL, W.; MIKIVER, A.; TUNON, H. Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L. *Phytomedicine*, 2006. 13.1: 132-134.

NERIO, Luz Stella; OLIVERO-VERBEL, Jesus; STASHENKO, Elena. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, 2010, 101.1: 372-378.

SCHRECK, C. E.; FISH, D.; MCGOVERN, T. P. Activity of repellents applied to skin for protection against *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, 1995, 11.1: 136-140.

MAIA, Marta Ferreira; MOORE, Sarah J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 2011, 10.1: S11.

WALADDE, S. M.; RICE, M. J. The sensory basis of tick feeding behaviour. *The physiology of ticks*, 1982, 71-118.

MITCHELL, Robert D., et al. Infrared Light Detection by the Haller's Organ of Adult American Dog Ticks, *Dermacentor variabilis* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2017.

MULLEN, Gary R.; DURDEN, Lance A. (ed.) 2009. *Medical and veterinary entomology*. Academic press is an imprint of Elsevier

FARKAS, R.: *Állatorvosi entomológia*. Egyetemi jegyzet. Állatorvostudományi Egyetem, Budapest, 2015.

Anonymous. Guideline for the testing and evaluation of the efficacy of antiparasitic substances for the treatment and prevention of tick and flea infestation in dogs and cats. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP), London, 2007.

STAFFORD III, Kirby C., PhD. *Tick bite prevention & the use of insect repellents*. The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, 2005.

ZÖLDI, V.; ERDŐS, Gy.; SZLOBODNYIK, J. 2. Módszertani levél a kullancsok elleni védekezésről. *Epinfo*, Országos Epidemiológiai Központ, 2009. 16.3

GÁLFI, P.; CSIKÓ, Gy.; JERZSELE, Á: *Állatorvosi gyógyszerteran III. 2. kiadás*. Robbie-Vet Kft., Budapest, 2015.

CUNHA DOS SANTOS, Fernanda Carlini; SILVEIRA FLORES VOGEL, Fernanda; GONZALEZ MONTEIRO, Silvia. *Efeito de diferentes concentrações de óleo e tintura de citronela sobre os parâmetros reprodutivos de teleóginas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Semina: Ciências Agrárias, 2012, 33.3.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Csikó Györgynek a rengeteg segítséget amit a kutatómunka és a dolgozat megírása során nyújtott. Köszönet illeti a Cikkelyné Ágh Nórárt és Piross Imre Sándort a statisztikában való kalauzolásért, és végül, de nem utolsó sorban a menyasszonyomat, Bukor Boglárkát, aki nélkül még most is az R kódokkal bíbelődnék.

4. melléklet Konzulensi ellenjegyzés

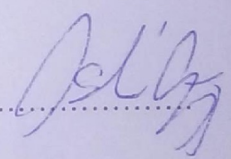
Alulírott DR. CSIKÓ GYÖRGY Igazolom, hogy

KOLESSA'R BALÁZS (a hallgató neve)

REPELLENSEK KULLANCSÉLLENES HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA EGY ÚJ INVITRO MÓDIZEN TESZTELÉSÉVEL

című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2013. 11. 21.

DR. CSIKÓ GYÖRGY 

a témavezető neve és aláírása

GYÓGYSZERTANI ÉS MÉRÉGTANI
.....

tanszék

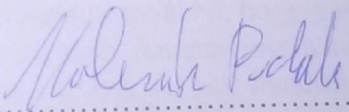
5. melléklet

Nyilatkozat TDK- és szakdolgozat azonosságáról

NYILATKOZAT

Alulírott KOLESZAI BALÁZS nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe REPELLENSEK KULLANCSÉLLENES HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA EGY
..... ÚJ INVITRO MÓDSZER TELJESÍTÉSÉVEL
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019. 11-27.

.....


a hallgató neve és aláírása