

SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**Halélősködő nyálkaspórák intrapiscin és
intraoligochaeta stádiumainak kísérletes
vizsgálata**

Doktori értekezés tézisei

készítette:
Rác Zsuzsanna Zita

témavezető:
Dr. Molnár Kálmán

**Budapest
2004**

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....

Dr. Molnár Kálmán
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Készült 8 példányban. Ez az 1. sz. példány.

.....

Rác Zsuzsanna Zita

Tartalomjegyzék

<u>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</u>	4
<u>2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	5
<u>Kísérletes fertőzések</u>	5
<u>Az actinospóra termelést befolyásoló tényezők vizsgálata</u>	6
<u>Oligochaetékból nyert actinospóra stádiumok vizsgálata</u>	7
<u>3. EREDMÉNYEK</u>	7
<u>Kísérletes fertőzések</u>	7
<u>Az actinospóra termelést befolyásoló tényezők vizsgálata</u>	8
<u>Oligochaetékből nyert actinospóra stádiumok vizsgálata</u>	9
<u>4. KÖVETKEZTETÉSEK</u>	9
<u>Kísérletes fertőzések</u>	9
<u>Az actinospóra termelést befolyásoló tényezők vizsgálata</u>	10
<u>Oligochaetékből nyert actinospóra stádiumok vizsgálata</u>	11
<u>5. A SZERZŐ TÉMÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEI</u>	12

Rövidítések

CFSE	karboxy-fluoreszcein-diacetát-szukcinimidil észter
H&E	haematoxylin és eozin
lyuklemez	szövettenyésztő lemez
PKD	Proliferative Kidney Disease
SPF	Specific Pathogen Free (itt: nyálkaspórák fertőzéstől mentes)
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TAM	triacinomyxon
TEHAG	temperáltvízű halgazdaság
QP 2.0	Quantitative Parasitology 2.0

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A nyálkaspórások (Myxosporea) mikroszkopikus méretű metazoon paraziták. Állatorvosi szempontból, mint a halak gyakori élősködői érdemelnek kitüntetett figyelmet. A mintegy 1350 fajt számláló törzs jelentős kórokozó képességű fajai pl. a pisztrángok kergekórját okozó *Myxobolus cerebralis*, vagy a lazacfélékben PKD-t okozó *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Magyarországon a nyálkaspórásfertőzések közül az ismertebbek közé a pontyok *M. cyprini* által kiváltott rosszindulatú vérfogyottsága, a *Sphaerospora molnari* okozta kopolyú-sphaerosporosisa, és a *S. renicola* által előidézett úszóhólyaggyulladás tartozik. Hazánkban az utóbbi években nem figyeltek meg jelentősebb nyálkaspórásfajok által okozott gazdasági kártételt, azonban gyakori előfordulásuk és néhány külföldi (USA, Kanada, Norvégia) lazac- illetve pisztrángtelepen észlelt, nagy mortalitással járó nyálkaspórásbetegség arra figyelmeztet bennünket, hogy lehetséges kártételüket nem szabad figyelmen kívül hagyni, s mint potenciális állat-egészségügyi kockázati tényezőt állandóan számításba kell venni.

A kétségtelen kórtani jelentőség mellett a myxosporeák kutatásának aktualitását több tényező is adja. A paraziták fejlődési ciklusát csupán húsz éve sikerült tisztázni, és csak az elmúlt évtized kutatásai mutattak rá arra, hogy ezek az évtizedekig a protozoonok közé sorolt paraziták valójában primitív többsejtűek. A nyálkaspórást újabban a csalánozókkal, illetve bilateráliákkal (kétoldali részarányosak tagozatával) rokonítják molekuláris biológiai analízisek alapján. A *M. cerebralis*-szal végzett vizsgálatot, melyben a nyálkaspórást fejlődési ciklusát elsőként tisztázták, később számos szerző kb. 25 fajjal megismételte. A vizsgálatok azt bizonyították, hogy ez az élősködőcsoport két alternatív gazdával szaporodik, legtöbbször egy halgazdával és egy oligochaeta (kevésértéjű gyűrűsféreg) gazdával. A vizsgálatok azt is igazolták, hogy a halgazdában kialakuló myxospórák többnyire valamilyen oligochaeta fajt fertőznek, melyekben a korábban önálló fajoknak tekintett actinospórák alakulnak ki. Ezek az actinospórák képesek csak a hal fertőzését létrehozni. A fejlődési

ciklusok nehéz kivitelezhetősége miatt eddig csupán 4 faj esetében sikerült a teljes fejlődési ciklust kísérletes körülmények között reprodukálni. Az Actinosporea osztály tagjainak a Myxosporea osztály megfelelő tagjaival való szinonimizálása a rendszertan napjaink egyik legnagyobb méretű változását indukálta, melynek végrehajtásához az egyes Actinosporea- és Myxosporea-fajok kísérletes úton történő, vagy molekuláris szinten végzett azonosítása szükséges. Az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetének halkórtani témacsoportja, ahol munkámat végeztem, mindkét területen jelentős eredményeket ért el.

Célkitűzéseim a következők voltak:

- Kísérletes fertőzésekkel eddig nem vizsgált nyálkaspórás fajok actinospóra stádiumainak kimutatása; a paraziták oligochaeta gazdában való fejlődésének nyomon követése; a kísérletesen nyert actinospórák morfológiai jellemzése; teljes fejlődési ciklusok reprodukálása SPF halaknak a kísérletekben nyert actinospórákkal történő fertőzésével.
- Az oligochaeta alternatív gazdák actinospóra termelését befolyásoló különböző tényezők vizsgálata.
- Adatokat gyűjteni természetes vizek és halgazdaságok oligochaeta-állományának nyálkaspórás-fertőzöttségére.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérletes fertőzések. A fertőzési kísérletekhez használt myxospórák közül a *Myxobolus macrocapsularis*-t dévérkeszeg, a *M. intimus*-t pedig bodorka kopoltyújáról gyűjtöttük. A fertőzni kívánt *Tubifex tubifex*-ek és *Limnodrilus hoffmeisteri*-k SPF oligochaeta-állományból származtak. Ismert számú példányukat műanyag edényekbe, hőkezeléssel sterilizált iszapba helyeztük el. Meghatározott számú myxospórát öntöttünk az edényekbe, majd vízzel töltöttük fel a tálakat. Az edények vizét rendszeresen szűrtük 21 µm-es szűrővel. Actinospórák észlelésekor az iszából kigyűjtött férgeket egyesével lyuklemezre helyeztük. A lyuklemezeket a vizsgálat ideje alatt 4°C-on tartottuk. Néhány kísérletben a férgeket az actinospóra ürítés

megszűnése után halálukig 4°C-on tartottuk, néhány kísérletben pedig pár nappal az actinospóra ürítés befejezése után az oligochaetákat iszapba, szobahőmérsékletre helyeztük vissza. A lyuklemezek vízrétegét naponta ellenőriztük sztereómikroszkóppal. A kibocsátott – fénymikroszkóposan vizsgált – actinospórákról digitális fotókat és videófelveteleket készítettünk. A spórákat lerajzoltuk, pontos méretüket IMAGO® számítógépes-program segítségével határoztuk meg. A férgek egyedi vizsgálatával megállapítottuk a fertőzöttség prevalenciáját, intenzitását, a fertőzött férgek faji hovatartozását. Több fertőzött féregből szövettani és félvékony metszeteket készítettünk. A teljes fejlődési ciklusok reprodukálásához a *M. intimus*-szal végzett kísérletekből nyert, illetve a már régebb óta vizsgált bodorka izomparazita *M. pseudodispar* TAM-okkal SPF halivadékokat fertőztünk. A halakat vagy lebegő TAM-okat tartalmazó vízbe helyeztük, vagy fertőzött férgekkel etettük meg őket.

Az actinospóra termelést befolyásoló tényezők vizsgálata. A kandicsrákok (*Cyclops* spp.) actinospóra fogyasztó képességét vizsgáltuk egyszerű sztereó- és fénymikroszkópos megfigyeléssel. Később a TAM-okat CFSE-vel festettük, melyek cyclops-okba jutását fluoreszcens mikroszkóppal végzett vizsgálattal követtük nyomon. Fertőzési kísérletekben SPF bodorkaivadékokkal *M. pseudodispar* TAM-okat fogyasztott cyclops-okat etettünk. A kísérlet kontrolljaként lebegő TAM-okkal végzett bodorkaivadék-fertőzés szolgált.

A hőmérséklet és a fertőzéséhez használt myxospóra sűrűség actinospóra termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata céljából SPF *Tubifex tubifex*-eket fertőztünk *M. pseudodispar* myxospórákkal. A fertőzéseket 3 különböző hőmérsékleten (19, 23, 27°C) 2 különböző myxospóra fertőzési sűrűséggel (50 és 470 myxospóra/*T. tubifex*) végeztük faktoriális elrendezésben. A hat fertőzési csoport mindegyikébe 10-10 edényt osztottunk véletlenszerűen. Minden edényben 100 *T. tubifex* volt. A TAM-ok észlelésétől egyedileg folytattuk a férgek vizsgálatát 4°C-on tartott lyuklemezekben. Az actinospóra-kibocsátás időbeni lezajlását (kezdétét, időtartamát, végét) feljegyeztük. Naponta meghatároztuk az intenzitást (féregegyedenként

ürített actinospórák mennyisége), az összTAM mennyiséget (egy edény összes férgé által ürített TAM-ok száma) és a prevalenciát (fertőzött férgek aránya). Az SPSS 11.0 programcsomag Kruskal-Wallis és Mann-Whitney *U*-tesztjét használtuk a myxospóra fertőzési sűrűség és hőmérséklet összTAM mennyiségre gyakorolt hatásának vizsgálatára a csoportok között. A prevalencia, az átlagos és medián intenzitás értékeire az actinospóra ürítés csúcspanján kapott adatokat a QP 2.0 programmal elemeztük. A TAM termelés leállása után pár nappal a férgéket iszapba, szobahőmérsékletre helyeztük vissza. A víz rendszeres szűrésével csoportonként megállapítottuk az ürített TAM-ok mennyiségét. A TAM termelést a kísérlet elindításától számított 337 napig követtük nyomon.

Oligochaetéből nyert actinospóra stádiumok vizsgálata.

Észtországi és magyar vizek oligochaetáinak nyálkaspórák fertőzőtségét vizsgáltuk. Hazánkból a százhalombattai TEHAG-ból és a Tisza tiszafüredi szakaszáról, Észtországból két tó (Vörtsjärv és Peipsi) és egy folyó (Emajõgi) partmenti üledékéből gyűjtöttünk oligochaetákat. Az észti természetes vizekből származó oligochaeták mellett 15 észti laboratóriumban tartott oligochaeta-állományt is vizsgálatainkba vontunk. Az állományok iszapját a Vörtsjärv tóból származó, nem sterilizált, tehát myxospóra fertőzőtséget is hordozó iszappal frissítették.

3. EREDMÉNYEK

Kísérletes fertőzések. Reprodukáltuk a *M. macrocapsularis* és a *M. intimus* fejlődési ciklusának intraoligochaeta szakaszát. A kísérletekben csak *T. tubifex* egyedek bizonyultak fertőzöttnek. A férgek mindkét faj esetében TAM-okat ürítettek. A 2 TAM morfológiailag különbözött a pontyokból eddig ismert *Myxobolus* fajok TAM-jaitól. A *M. macrocapsularis*-szal végzett kísérletekben a TAM-ok a 66-85. napon kezdtek el ürülni. A *M. intimus*-szal végzett két kísérletben a 37. és az 58. napon. Az utóbbi fajjal végzett első kísérletben a férgéket a 15 napig tartó actinospóra ürítés után halálukig 4°C-on tartottuk. Ezalatt

nem következett be újabb actinospóra ürítés. A második kísérletben a férgek a TAM ürítés befejezése után pár nappal iszapba, szobahőmérsékletre helyeztük. Ezek a férgek ismét elkezdtek TAM-okat üríteni, mely a kísérlet elejétől számított 11 hónapon keresztül folytatódott. Szövetani és félvékony metszetekben 8 TAM-ot tartalmazó érett pánsporociszták és korai fejlődési alakok egyaránt felismerhetőek voltak a *Tubifexek* bélhámjában. A pánsporocisztákat csak a fertőzött hámsejtek ektoplazmájának vékony hárttyája választotta el a béllumentől. A *M. pseudodispar* esetében sikerült lebegő TAM-okkal bodorkákat fertőznünk. Fertőzött *Tubifexek* etetésével nem sikerült fertőzést kiváltanunk. A *M. intimus* TAM-okkal fertőzött bodorkák és egyéb halfajok esetében nem észleltünk nyálkaspórás fertőzöttséget.

Az actinospóra termelést befolyásoló tényezők vizsgálata. Egyszerű mikroszkópos vizsgálattal a TAM-ok számának gyors csökkenését tapasztaltuk a cyclops-okat is tartalmazó vízben. A CFSE-vel festett TAM-ok a rákok szűrőkészülékénél 1-1,5 órával, a kimyomott gyomortartalomban 4,5 órával a spórasuszpenzióba helyezés után felismerhetőek voltak. A poláris filamentumok kilökődését 2,5 órával a szuszpenzióba helyezés után detektáltuk. Bodorkákban fertőzést csak lebegő TAM-okkal tudtunk kiváltani, TAM-okat fogyasztott cyclops-ok etetésével nem.

A fertőzési hőmérséklet növekedésével egyre korábban észleltünk TAM-okat. A spóraürítés időtartama csökkent a fertőzési hőmérséklet növekedésével. A magasabb myxospóra sűrűséggel fertőzött férgek a vizsgált hőmérsékleteken tovább ürítettek TAM-okat az alacsony myxospóra sűrűséggel fertőzöttekhez képest. Az összTAM mennyiségben nem találtunk szignifikáns különbséget a myxospóra fertőzési sűrűség és hőmérséklet hatására a fertőzött csoportok között, hatásukat együtt vagy külön-külön vizsgálva sem. A fertőzési prevalencia és intenzitás szignifikáns különbségeit a következő esetekben tapasztaltuk. *Prevalencia:* az alacsonyabb fertőzési hőmérsékletű csoportok közül nagyobb volt a fertőzött férgek aránya a magas spórasűrűséggel fertőzött csoportokban, mint az alacsony

spórasűrűséggel fertőzöttekben. A magas spórasűrűséggel fertőzött csoportokban több volt a fertőzött féreg, ha azokat alacsonyabb hőmérsékleten fertőztük. *Intenzitás*: Az alacsony myxospóra sűrűséggel fertőzött férgek közül több TAM-ot ürítettek a magasabb hőmérsékleten fertőzöttek, mint az alacsony hőmérsékleten fertőzöttek. Magasabb hőmérsékleten az alacsony myxospóra sűrűséggel fertőzött férgek valamivel több (marginális szignifikancia az átlagos intenzitásra) TAM-ot bocsátottak ki, mint a magas spórasűrűséggel fertőzöttek. A teljes megfigyelési idő alatt a magas spórasűrűséggel fertőzött csoportok mindhárom hőmérsékleten több TAM-ot ürítettek, mint az alacsony spórasűrűséggel fertőzöttek. A legtöbb TAM-ot a legmagasabb hőmérsékleten fertőzött 2 csoport ürítette. A TAM-ok száma proliferációt (a férgek kb. másfélszer annyi TAM-ot termeltek, mint amennyi myxospórát elfogyasztottak; feltételezve, hogy valamennyi myxospórát elfogyasztották) csak a legmagasabb hőmérsékleten alacsony spórasűrűséggel fertőzött férgek esetében mutatott.

Oligochaetéből nyert actinospóra stádiumok vizsgálata. Első alkalommal mutattuk ki nyálkaspórák paraziták actinospóra stádiumait Észtországból. Három TAM típust detektáltunk, egyet egy laboratóriumi *Tubifex*-állományból. Ez utóbbi típus morfológiailag különbözött az összes eddig leírt TAM típustól. A TEHAG-ból 14 actinospóra típust írtunk le (4 triactinomyxon, 4 neoactinomyxon, 3 aurantiactinomyxon, 1-1 guyenotia, raabeia és antonactinomyxon), a Tiszából pedig 4 típust (2 triactinomyxon, 1-1 aurantiactinomyxon és guyenotia).

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérletes fertőzések.

- A *M. intimus* fajjal végzett kísérletben egy, az optimális hőfokon rendkívül rövid idő alatt lezajló prepatens periódust állapítottunk meg.
- Bizonyítottuk, hogy a vegetációs nyári időszakban magasabb hőtartományt igénylő cyprinidákban élősködő myxosporeák fejlődése

számára az alacsonyabb hőfok kedvezőtlen, ezért szüntethették be spórákibocsátásukat 4°C-on a *Tubifex*ekben.

□ Megállapítottuk, hogy a korai actinospóra stádiumok az oligochaetákban nem pusztulnak el alacsony hőmérsékleten, csupán fejlődésüket szüneteltetik, lassítják, s a kedvező hőmérsékleti tényezők visszatérése esetén ismét fejlődni kezdenek, az actinospórák kibocsátása ismételten felgyorsul.

□ A teljes fejlődési ciklus sikeres reprodukálásával a *M. pseudodispar* képében egy további kísérleteinkhez is alkalmas modellfajt találtunk.

□ A tény, hogy csak lebegő TAM-okkal sikerült a fertőzést a halakra továbbvinnünk azt sejteti, hogy a *M. pseudodispar* TAM-ok fertőző sejtjei a halbőrön vagy a kopoltyúin keresztül törnek be a halba, de semmi esetre sem a bélfalon át, majd végső fejlődési helyüket, a vázizomzatot, az ezt követő vándorlással érik el.

□ A *M. intimus*-szal végzett halfertőzési kísérleteink sikertelenségének legkézenfekvőbb oka az lehet, hogy a balatoni bodorka-állományban is csak kétéves vagy idősebb halak esetében észleltünk *M. intimus* fertőzöttséget. A paraziták fejlődése az általunk kísérleteknél használt ivadék helyett csak a fejlettebb halakban lehet eredményes.

Az actinospóra termelést befolyásoló tényezők vizsgálata.

□ Az actinospórák cyclops-ok (és nagy valószínűséggel más hasonló vízi lények) általi elfogyasztása a laboratóriumi kísérleteken túlmutatóan a természetben is hasznosítható lehetőségeket rejthet magában. Például biz. nyálkaspórák fajok okozta halfertőzések csökkentését magas zooplankton biomassza fenntartásával lehetne elérni halgazdászati tavakban.

□ A magasabb myxospóra sűrűséggel fertőzött férgek esetében a myxospórák fejlődése kevésbé szinkronizáltnak tűnik.

□ A prevalencia, az átlagos és medián intenzitás együttes vizsgálatát első alkalommal használtuk *T. tubifex* férgek nyálkaspórák fertőzöttségének tanulmányozására, amely jobb módszernek bizonyult,

mint a csoportonként összesen ürített TAM-ok mennyiségének statisztikai elemzése.

□ Feltételezzük, hogy a prevalenciák különbségeit az egyes csoportok között a nagyobb myxospóra sűrűség több féreg fertőződését lehetővé tevő hatása mellett a hőstressz (4°C-ra helyezés) okozhatta.

□ Az intraoligochaeta fejlődés magasabb hőmérsékleten a felgyorsult fejlődés miatt korábban léphetett a proliferációs szakaszba, mely következtében egy féregegyeden belül adott idő alatt több actinospóra alakulhatott ki. Részben ez okozhatta a fertőzési intenzitások közötti különbséget. Az alacsonyabb spórasűrűség pedig a fertőzési küszöbérték közelében lehetett, és proliferálódhatott, szemben a magas myxospóra sűrűségen fertőzött férgek által felvett spórákkal.

Oligochaetéből nyert actinospóra stádiumok vizsgálata.

□ Az észt laboratóriumi oligochaeta-állományok vizsgálata az egyes fajok nyálkaspórák fertőzőttségével szembeni fogékonyságában való jelentős különbségre utal.

□ A hazai felmérés során több, morfológiailag újnak mondható típust találtunk, míg számosat morfológiai karakterek alapján korábban leírt típusokkal vagy ismert fajok kísérletes úton nyert actinospóráival tudunk azonosítani.

□ A talált, 8 spóra összekapcsolódásával kialakuló spóraforma világviszonylatban is ritkaságnak számít. A spórák kapcsolódása különbözik az összes eddig a világban leírt nyolcas spóraformától, ezért a spóraforma megfelelő gyűjtőcsoportba való besorolása is kérdéses.

5. A SZERZŐ TÉMÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEI

RÁCZ O. Z. & TIMM, T. (2001): First report on the occurrence of actinosporean stages of fish myxosporeans (Myxozoa, Myxosporea) in Estonia. *Acta Parasitologica*, 47: 190–195.

SZÉKELY CS., MOLNÁR K. & **RÁCZ O.** (2001): Complete developmental cycle of *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova) (Myxosporea: Myxobolidae). *Journal of Fish Diseases*, 24: 461–468.

SZÉKELY CS., **RÁCZ O.**, MOLNÁR K. & ESZTERBAUER E. (2002): Development of *Myxobolus macrocapsularis* (Myxosporea: Myxobolidae) in an oligochaete alternate host, *Tubifex tubifex*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48: 117–123.

RÁCZ O. Z., SZÉKELY CS. & MOLNÁR K. (2004): Intraoligochaete development of *Myxobolus intimus* (Myxosporea: Myxobolidae), a gill myxosporean of the roach (*Rutilus rutilus*). *Folia Parasitologica*, 51: 199–207.

RÁCZ O. Z. (2004): Újabb eredmények a halparazita nyálkaspórák fajok kutatásában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, (közlésre elfogadva)