

TDK DOLGOZAT

Készítette: Ambrusics Petra

2019

Állatorvostudományi Egyetem - Parazitológiai és Állattani Tanszék

Tudományos Diákköri Dolgozat

**A hazai juhállományokban haemonchosis vizsgálata kérdőíves és
molekuláris biológiai módszerekkel**

Szerző: Ambrusics Petra

állatorvosi szak, 11. évfolyam

Témavezető: Dr. Farkas Róbert

egyetemi tanár

Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés	6
3. Anyag és Módszer	15
3.1 Kérdőíves módszer	15
3.2 Bélsármintagyűjtés	16
3.3 Boncolás.....	17
3.4 A bélsármintákban talált peték kvantitatív vizsgálata	17
3.5 Peték bélsárból történő kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel.....	19
3.5.1 DNS-kivonás férgekől és petékből.....	19
3.5.2 Konvencionális PCR.....	19
3.5.3 Loop-mediated Isothermal Amplification (röviden LAMP)	20
4. Eredmények	22
4.1 Kérdőíves felmérés	22
4.2 A levágott vagy elhullott állatok oltógyomrának vizsgálata	23
4.3 A vizsgált „pool” bélsármintákban talált peték.....	24
4.4 Molekuláris biológiai vizsgálatokkal kapott eredmények	26
5. Megbeszélés	27
6. Összefoglaló	30
7. Summary	31
8. Irodalomjegyzék.....	33
9. Köszönetnyilvánítás	36

Rövidítések jegyzéke

DNS: Dezoxi-ribonuklein Sav

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAMACHA: FAffa MAlan CHArt

FAO: Food and Agriculture Organization

L1: első stádiumú lárva

L3: harmadik stádiumú fertőző lárva

LAMP: Loop-mediated Isothermal Amplification

PCR: Polimerase Chain Reaction

PPG: Pete Per Gramm

1. Bevezetés

Hazánk juhpopulációja a FAO adatai alapján 2017-ben 1,1 millió volt. A juhágazat fejlesztésében jelentős potenciál van. A juhtartás előnyei között lehet említeni többek között, hogy az állatok takarmányozása alapozható olyan takarmánytermelő területekre, amelyek alkalmatlanok más mezőgazdasági tevékenységekre (Blaskó és mtsai, 2011). Továbbá az ágazat kivetheti részét a vidéki foglalkoztatásból, és a tájfenntartásból is. Megfelelő munkaszervezés mellett pedig egész évben árbevételt biztosíthat.

A juhágazat gazdaságosságát azonban hátravetik a magyar viszonyok között elterjedt kedvezőtlen tartási és takarmányozási körülmények, ami miatt az állatok nem tudnak élettani képességeiknek megfelelően termelni. Ehhez nagy mértékben hozzájárul az állományok parazitás fertőzöttsége. A parazitózisok jelentős teljesítmény-, és bevétel-csökkenést okozhatnak (Motyovszki, 2017).

A juhok oltógyomrában több fereg faj fordulhat elő (Kassai, 2003). Ezek közé tartozik a vérrel táplálkozó *Haemonchus contortus*, ami a legeltetett juhállományokban számottevő állategészségügyi és gazdasági kárt okoz világszerte (Morgan és mtsai, 2013).

A fereg faj hazai megjelenéséről alig rendelkezünk ismeretekkel. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy az utóbbi években több-kevesebb rendszerességgel végzett parazitaellenes kezelések ellenére több juhászban állapították meg előfordulását (Nagy és mtsai, 2013).

A fentiek ismeretében az elvégzett vizsgálatok célja az volt, hogy bővítsük a *Haemonchus contortus* hazai elterjedtségével kapcsolatos ismereteket. Az ebben az évben végzett kérdőíves felmérés mellett hazánkban elsőként alkalmazott molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk az élősködő előfordulását juhállományokban.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 *Haemonchus contortus*

A házi és vadon élő kérődzők oltógyomrában élősöködő, Rudolphi által 1803-ban leírt faj a Nematoda törzs Trichostrongylidae családjába tartozik.

Legtöbbször egyéb gyomorbél-féreggel együtt fordul elő, elsősorban juhban és kecskében. Fontos megemlíteni, hogy a *H. contortus* a gazdaszervezetben és a környezetben rendkívüli biológiai és ökológiai alkalmazkodóképességet (Crofton és mtsai, 1965), ezért fordulhat elő világszerte (Besier és mtsai, 2016).

2.1.1 Morfológia és fejlődésmenet

Az oltógyomorban élősöködő többi féregfaj között könnyen felismerhető, mivel ez a legnagyobb, az adultok hossza 2-3 cm (Kassai, 2003). A nőtények orsószerű teste jellegzetes piros-fehér csíkozottságot mutat, ami azzal függ össze, hogy a gazda vérért tartalmazó bélső köré tekeredik a fehér petefészkek (Kassai, 2003).

Az oltógyomor üregében tartózkodó nőtények által naponta lerakott 5-15 ezer pete (Dineen és mtsai, 1965) a bélsárral a talajra kerül. A strongylida-típusú, ovális, 4-16 sejttel tartalmazó petéből általában 24 óra alatt kifejlődik az első stádiumú (L1) lárva. A lárva fejlődését elsősorban a klimatikus hatások, úgy mint a környezeti hőmérséklet és a páratartalom befolyásolja, a lárva igen érzékeny a szárazságra (Machen és mtsai, 1998; O'Connor és mtsai, 2007).

Az L1 a környezet hőmérsékletétől és nedvességtartalmától függően kb. 5-6 nap alatt fertőzőképes harmadik stádiumú lárává (L3) alakul (Roberts és Swan, 1981). A fertőzőképes lárva többsége nedves környezetben a fűszálakon tartózkodik. A lárva a bélsárból történő kivándorlásukhoz szintén nedvességre, és megfelelő hőmérsékletre van szükség (Besier és mtsai, 2016).

Az L3 lárva nagy része a bélsárban marad szárazság esetén, míg többségük a fűszálakon tartózkodik nagy nedvességtartalom és hőmérséklet mellett, így könnyebben jutnak be a gazdába legelés során (Silva és mtsai, 2008).

A lárvákat a szárazság vagy az alacsony hőmérséklet nem csak lassíthatja fejlődésükben, de akár el is pusztíthatja (Besier és mtsai, 2016).

Legelés közben a kérődzők által felvett lárvák az oltógyomor mirigyeibe hatolva további két vedléssel fejlődnek juvenilis férgékké, ún. preadultokká, majd visszatérve az oltógyomor üregébe ivaréretté válnak (Kassai, 2003).

A parazita teljes fejlődési ideje petéből adulttá kedvező körülmények között 21 napig tart (LeJambre és mtsai, 1970 ; Machen és mtsai, 1998).

Az ún. hypobiotikus állapot lehetővé teszi túlélésüket az állat szervezetében hónapokon keresztül, akár a számára kedvezőtlen időszakokban is (Melville és mtsai, 2014; Besier és mtsai, 2016). Ilyenkor fejlődésük az oltógyomor mirigyeiben 4-6 hónapra megszakad (Kassai, 2003). Ekkor a hypobiotikus lárvák nem táplálkoznak, nem tesznek kárt a gazdaszervezetben. Ezt a nyugalmi állapotot követően a lárvák fejlődése kedvező környezeti feltételek beköszöntekor folytatódik, ami az állatok megbetegedéséhez vezethet (Besier és mtsai, 2016). Mérsékelt égövi körülmények között a korábban hypobiotikus állapotban áttelelő lárvák tavasszal fejezik be fejlődésüket. Ezzel magyarázható, hogy azoknál az állatoknál, akiknél a korábbi időszakban a bélsárban nem vagy csak igen kevés petét lehet találni, jelentősen megemelkedik a peteszám a bányozás időszakában (Machen és mtsai, 1998). Ez viszont azzal jár, hogy a környezetben rövid időn belül kifejlődő fertőzőképes lárvák tömege fertőzheti a bányákat, ill. az idősebb állatok újra fertőződhetnek.

2.1.2 Kártétel

A *H. Contortus* miatti kár különösen a parazita számára kedvező meleg és csapadékos trópusi területeken számottevő (Besier és mtsai, 2016; Sallé és mtsai, 2019).

A parazita patogén hatásáért a vérrel táplálkozó negyedik stádiumú lárvák és az adultok a felelősek (Baker és mtsai, 1959). A lárvák és az adultok vérszívásának következménye akut anémia, áll alatti vagy akár has alji ödéma, bányadtság (Machen és mtsai, 1998). Az oltógyomor sérült nyálkahártyájából szivárgó vér miatt a bélsár sötétre színeződhet, alvadt vért tartalmazhat. Az állatok legyengülnek, fáradékonyak lesznek, előfordulhat gyapjúhullás is (Besier és mtsai, 2016). Az anémia az adultok számától függően igen súlyos lehet, a fertőzést követő két héten belül kialakulhat (Baker és mtsai, 1959).

Jó kondíció esetén is a súlyosan fertőzött állatok néhány nap alatt legyengülhetnek, lesóványodhatnak. Hirtelen elhullás is bekövetkezhet az előtt, hogy a faj petéi megjelenének a bélsárban (Emery és mtsai, 2016). A kártétel nagyban függ az állatok öröklött rezisztenciájától (fajta- és egyedi rezisztencia), az életkortól, a takarmányozástól, valamint egyéb tényezőktől.

2.1.3 A haemonchosis európai és hazai előfordulása

A kártétele miatt az utóbbi évtizedekben kezdtek felfigyelni erre a parazitafajra kontinensünkön. A közelmúltban végzett európai kutatások szerint a *H. contortus* előfordulásának átlagos prevalenciája kb. 57% volt a juhászatokban, de ez az érték országonként jelentős eltérést mutatott, így pl. Írországból 4%, míg Svájcban és Olaszországban 70% fölött volt (Rinaldi és mtsai, 2015). A parazita az alpesi legelőkön tartott nyájokban és több észak-európai országban, így Skandinávia sarkkörüli területein is megjelent (Domke és mtsai, 2013; Høglund és mtsai, 2009; Kenyon és mtsai, 2009; Troell és mtsai, 2005; Waller és mtsai, 2004).

Magyarországon is ismert a parazitafaj előfordulása különböző kérődző fajokban, így juhokban is (Leopold, 1941; Kotlán, 1961; Kassai, 2003; Nagy és mtsai, 2013).

Kotlán Sándor által írt Parazitológia című könyvében (Kotlán, 1961) említve van a faj hazai előfordulása.

Kassai (2003) könyvében részletesen írt a féregről. Nagy és munkatársai (2013) arról számoltak be, hogy a dél-dunántúli térségben élő 8 kérődző faj (dámszarvas, gímszarvas, muflon, őz, juh, kecske, bivaly, szarvasmarha) 143 állatának boncolásakor az oltógyomrokban található férgeket vizsgálva a legtöbb fajban megtalálták a *H. contortus* példányait. A vizsgált 22 juh közül 20, a 10 kecske mindegyike fertőzött volt (Nagy és mtsai, 2013). 2015 és 2017 között több ízben vizsgálták a *H. contortus* férgek gyógyszerekkel szembeni rezisztenciáját (Nagy és Zsolnai, 2015; Nagy és Csivincsik, 2016; Nagy és Csivincsik, 2017).

2.1.4 A haemonchosis kórjelzése

Hagyományos vizsgálati módszerek

A *H. contortus* okozta fertőzöttség a klinikai tünetek alapján nem diagnosztizálható. A haemonchosis miatti vérszegénység súlyosságának a megállapítására kidolgoztak egy ún. FAMACHA módszert. A conjunctiva színe alapján történő öt kategória van, az ötödik a legsúlyosabb anémiát jelzi (van Wyk és Bath, 2002). A módszer alkalmazásával a juhtartó időben állapíthatja meg a beteg állatoknál az anémiát és hatékony parazitaellenes szerrel elvégezheti a gyógykezelést. Azon túl, hogy a beteg egyedek élete megmenthető, azzal az előnnyel is jár, hogy az egyedi kezelésekkal csökkenthető a *H. contortus*-ra ható szelekciós nyomás, mely a rendszeres anthelmintikum-használat következtében folyamatosan fennáll. A gyógyszerköltségek is csökkenthetők, azonban ennek a módszernek a rendszeres használata munkaerő hiányában sok juhászatban nem kivitelezhető.

A fertőzöttség okozta anémia hematológiai vizsgálattal is megállapítható. Súlyos fokú haemonchosis esetében a haematokrit érték 15% alá is csökkenhet, ami az állat elhullásához vezet (Besier és mtsai, 2016). A módszerrel azonban nem csak a *H. contortus* okozta fertőzöttség állapítható meg -, másfelől nem gyakorlatias.

A parazitózis megállapításának egyik lehetősége a paraziták azonosításával lehetséges. Ehhez az elhullott vagy levágott állatok oltógyomrait kell vizsgálni. Az oltógyomor ödémás, petekekkel és vérzésekkel borított nyálkahártyáján szabad szemmel is észrevehetőek (Besier és mtsai, 2016) a 2-3 cm hosszú, fonalszerű *H. contortus* adultok (1. ábra).



1. ábra: *Haemonchus contortus* férgek

A fertőzöttség megállapításának másik módszere a bélsárral ürülő peték vizsgálata. Ennek nehézsége azzal függ össze, hogy a gyomorban és a bélcsatornában élő fonálféregnek többségének a petei egyformák, az ún. strongylida- típusú peték morfológiájuk alapján nem különíthetők egymástól el.

Biztosabb módszer a petékből kitenyésztett L3-ak morfológiai vizsgálata. Az egyes fonálféregfajok lárváinak elkülönítése a testhossz, a fej morfológiája, a bélhámsejtek száma és alakja, valamint a farki rész burok-kiterjesztései alapján történik (van Wyk és Mayhew, 2013). A *H. contortus* harmadik stádiumú lárváinak vizsgálata azonban igen időigényes, nagy gyakorlatot és szakértelemet igényel, ezért nem alkalmazzák. A módszer meglehetősen pontatlan is, mivel a kialakuló lárvák eltérő módon reagálnak a tenyésztés körülményeire, így különböző méretűek lehetnek (Rossanigo és Gruner, 1996; Melville és mtsai, 2014).

A fertőzöttség ismeretében a grammonkénti peteszám (PPG) alkalmas lehet a legelő *H. contortus*szal való szennyezettségének a felmérésére, illetve az állatok fertőzöttségi fokának megállapítására (Besier és mtsai, 2016). H A *H. contortus* legtöbbször más Nematoda-fajokkal együtt fordul elő, azonban az ilyen állományokban is a *H. contortus* petéinek szignifikáns dominanciája jellemző a legelőket szennyező bélsárban (Peter és Chandrawathani, 2005).

A módszer akut vagy perakut megbetegedések esetén nem használható. Az állatok már akkor súlyos betegség tüneteit mutatják, amikor még nem jelennek meg a peték a bélsárban. A *H. contortus* esetében szoros összefüggést mutattak ki a naponta ürített peték száma és az adultok száma között (Coadwell és Ward, 1982), valamint az adultok abszolút száma és a PPG között (Roberts és Swan, 1981).

Alternatív vizsgálat módszerek a *H. contortus* fertőzöttség megállapítására

A *H. contortus* peték alapján történő azonosítására kidolgozott módszer a lektin-binding assay. A bélsárból kimosott petéket lektinhez kapcsolt fluoreszcens festékkel inkubálják. A lektin - mely a földimogyoró egy agglutinin proteinje - specifikusan a *H. contortus* peték felszíni receptoraihoz kötődik. Ezáltal a petéket nem csak azonosítani, de számlálni is lehet. Meg kell azonban említeni, hogy a peték tisztításához használt módszer, illetve növényi szennyező anyagok befolyásolhatják az eredményeket (Palmer és McCombe, 1996).

Egy másik lehetőség a LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) módszer használata. A LAMP nukleinsav-sokszorosító módszer izoterm körülmények között, ami nagy sebességgel, nagyon érzékeny módon amplifikálja a kiválasztott DNS-t (Melville és mtsai, 2014). Ehhez hat, e célra kifejlesztett primert kell használni, melyek a DNS szál 3' és 5' végéhez illetve a képződő hurkokhoz képesek kapcsolódni, és a polimerizációt megkezdeni.

A PCR Taq-polimerázt használ a reakciókhoz, ugyanakkor a LAMP módszer Bst-polimerázt, ami izoterm körülmények között dúsítja fel a DNS-t. Amellett, hogy a LAMP gyorsabb, mint a PCR, 10-szer érzékenyebbnek is bizonyult kutatások során (Melville és mtsai, 2014).

Immunológiai módszerek is használhatók a fertőzöttség kimutatására. Az állatok váladékaiból (nyál, szérum, tej) a *H. contortus* antigénjei, illetve az ezekkel szemben termelődött ellenanyagok vizsgálhatók Western-blot vagy ELISA segítségével (Nisbet és mtsai, 2016).

2.1.5 Gyógyszeres kezelés és rezisztencia

A haemonchosis kezelésére használt készítmények hatóanyagai közé tartoznak a benzimidazolok, imidazotiazolok (levamisol), makrociklikus laktonok, foszforsavészterek (naphthalophos), tetrahidropirimidinek (morantel), szalicilanilidek és szubsztituált fenolok (closantel, nitroxinil), amino-acetonitril-származékok (monepantel) és spiroindolok (derquantel) (Besier és mtsai, 2016).

Ismert, hogy a *H. contortus* rövid időn belül rezisztenssé válik anthelmintikumokkal szemben. Új gyógyszer csoport bevezetése után gyakori, hogy kevesebb, mint tíz éven belül rezisztensé, sőt multirezisztens válnak a férgek (Kotze és Prichard, 2016).

A használatban lévő hatóanyagok közül a benzimidazolok, imidazotiazolok és makrociklikus laktonok elleni rezisztencia már széles körben elterjedt, újabban pedig egyre többen jelentik a legújabb készítmény, a monepantel elleni rezisztenciát is (Kotze és Prichard, 2016; Besier és mtsai, 2016).

A rezisztenciát ún. peteszámcsökkenés módszerével vizsgálják (Kotze és Prichard, 2016). Ennek során az anthelmintikus kezelés előtt majd a kezelést követően 10-14 nappal később megállapítják a PPG-t. A 90-95%-nál kisebb grammonkénti peteszám csökkenés rezisztenciát jelez.

A *H. contortus* rezisztenciájával kapcsolatos hazai helyzetről Nagy és Zsolnai (2015) közöltek adatokat. Haemonchosis miatt elhullott anyajuh boncolásakor gyűjtött férgek molekuláris biológiai vizsgálatai alapján Magyarországon először állapították meg az adott féregpopuláció albendazollal szembeni rezisztenciáját (Nagy és Zsolnai, 2015).

A klinikai tüneteket mutató állatok szelektív kezelése ígéretes lehet a rezisztencia terjedésének lassításában. Így jelentősen csökkenteni lehet a legelőt fertőző lárvák számát.

Az összes állatra kiterjedő parazitológiai vizsgálat költséges, azonban a szelektív kezelés által számottevően csökkenthető a felhasznált antiparazitikumok mennyisége (Kenyon és mtsai, 2009). A Dél-Afrikában kidolgozott FAMACHA-módszer segítségével csökkenteni lehetett a kezelések számát, valamint a gyógyszerköltségeket.

Gyógyszermentes védekezés

A parazitózis elleni komplex védekezés elemei az integrált vegyszeres, immunológiai és környezetgazdálkodási szabályok (Kassai, 2003). Ide sorolható a takarmányozási és legeltetési rendszabályok szabványos alkalmazása is. Lényeges a takarmány kielégítő fehérjetartalma, amely fokozza az állatok férgekkel szembeni ellenálló képességét.

Legelőgazdálkodás

A legelő betelepítésekor el kell kerülni a túlnépesítést (Kassai, 2003), illetve a legeltetés ütemezésénél figyelembe kell venni az adott terület ökológiai és epidemiológiai sajátosságait (Besier és mtsai, 2016). A legeltetés típusának megválasztásakor célszerű a szakaszolt legeltetést előnyben részesíteni (Besier és mtsai, 2016).

Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a *H. contortus* lárvák a környezetben fokozott ellenállóképességgel rendelkeznek (Crofton és mtsai, 1965), ezért korántsem biztos, hogy akár hetek-hónapok alatt elpusztulnak.

Genetikai rezisztencia

A *H. contortus* ellen fokozott rezisztenciát és toleranciát mutató állatok genetikai szelekciójának jelentősége sokéve ismert (Kassai, 2003; Besier és mtsai, 2016).

A rezisztenciára való szelekcióval nem csak az egyes egyedek ellenállóképessége növekedne, hanem csökkenne a legelők parazita-petékkal való fertőződése is (Woolaston és Baker, 1996).

Fajta rezisztencia

Egyes fajták fokozott ellenállóképességét a parazitózissal szemben az eltérő környezetben végbemenő evolúcióval magyarázzák (Besier és mtsai, 2016).

A helyi fajták már alkalmazkodtak a térség környezeti tényezőihez, és ellenállóbbak az ott honos parazitákkal szemben (Kassai, 2003).

Vakcinák

A gazdaszervezet immunválasza a parazitára kulcsfontosságú a fertőzöttség lefolyásában. Ez azonban lassan alakul ki, és a szerzett immunitás gyakran csak részleges és instabil, ezért a féregvakcinák megbízhatósága kérdéses (Kassai, 2003). Azonban a *H. contortus* elleni vakcinázás szempontjából előnyös, hogy a többi féregfajjal összehasonlítva a *H. contortus* relatíve erősen immunogén.

H. contortus-vakcinákat először a parazita intesztinális membránjából kivont rejtett antigénekből állítottak elő (Smith és mtsai, 2001; Besier és mtsai, 2016).

Egy 2018-as kísérlet során Barbervax® nevű oltóanyaggal kezeltek *H. contortus*szal fertőzött anyajuhokat és bárányokat (Bassetto és mtsai, 2018). A vakcinázott anyajuhok között csökkent az anthelmintikus kezelésre szoruló egyedek száma, a vakcinázott bárányoknál a PPG 80%-kal csökkent. Ennek az eredménynek az eléréséhez azonban szükség volt az anyajuhokat a vemhesség során hatszor, a bárányokat pedig 72 napos korukig háromszor oltani.

Biológiai védekezés

A biológiai védekezés a fertőződés megakadályozására irányul, a lárvák sebezhetőségének kihasználásával. Ennek ígéretes lehetősége a *Duddingtonia flagrans* nevű gomba (Kassai, 2003). Az állatok emésztőrendszerén áthaladó, majd a bélsárral a legelőre ürített gomba elszaporodva különleges térszerkezetet vesz fel. A csapdába került lárvák a bélsarat elhagyva nem tudnak a fűszálakra vándorolni (Waller és mtsai, 2006). A *Duddingtonia flagrans* használata laboratóriumi és terepkísérletekben hatékonynak bizonyult (Kassai, 2003). A gombát tartalmazó készítményből jelenleg a Livamol® és a BioWorma® termék érhető el Ausztráliában.

A legelőkön előforduló növényeknek a lárvák elleni hatását is vizsgálják. Egyes növények különböző bioaktív kémiai anyagokat, így pl. tannint tartalmaznak (Holmes, 1993).

3. Anyag és Módszer

3.1 Kérdőíves módszer

2019 februárjától a Magyar Juh- és Kecskenyésztő Szövetség segítségével országos szintű kérdőíves felmérést végeztünk. A kérdőívben összesen tizenegy parazitológiai témájú kérdés, valamint tartásviszonyokra vonatkozó kérdések is szerepeltek (2. ábra).

Kérdőív

Tisztelt Juhtartó!

Felmérésünk célja, hogy képet kapjunk a hazai juhállomány parazitás betegségeiről.
A kérdőív kitöltése körülbelül 5 percet vesz igénybe.
Kérem a kérdőívet legjobb tudása szerint szíveskedjen kitölteni.
Elérhetőségeim:
Név: Ambrusics Petra
Telefon: +36 30/386-8437
Email: ambrusicspetra@gmail.com
Köszönöm segítségét!

1. Megye:

2. Tartási hely:

3. A juhtenyésztés kezdete:

4. Az állomány létszáma: <50 50-200 200-500 500-1000 >1000

5. Anyajuhok száma: Kosok száma:

6. Hasznosítási irány (több is jelölhető):
 Merinó típusú Hús típusú Tej típusú Óshonos

7. Legeltetés típusa: Pásztoroló Szakasos Legelőkertes
Éjjel istállóban: Igen Nem

8. A legelőre kihajtanak-e más állatokat?:
Igen: Állatfaj(ok): Nem

9. Tud-e belső élősködők okozta fertőzöttségről (több is jelölhető?):
Igen: Májmételykór Bendőmételykór Kergékór (folyadékkal telt hólyagok az agyban)
 Bélférgesség Tüdőférgesség Lándzsásmételykór Egyéb:

Nem

10. Történik-e belső élősködők elleni kezelés?:
 Igen Nem

Gyakoriság: Évente 1x Évente 2x Évente 3x Évente 4x

Mikor (hónap/hónapok):

Mivel (gyógyszer):

Kihajtás Előtt Után

11. Tud-e külső élősködők okozta fertőzöttségről (több is jelölhető?):
Igen: Kullancssóság Paklincssóság Tetvesség Nyüvesség Orrbagócs lárv fertőzöttség
 Rühösség

Nem

12. Történik-e külső élősködők elleni kezelés?:
 Igen Nem

Gyakoriság: Évente 1x Évente 2x Évente 3x Évente 4x

Mikor (hónap/hónapok):

Mivel (gyógyszer):

A kezelés típusa: Fürdetés Gyógyszeres

13. Történik-e parazitákkal kapcsolatos laboratóriumi vizsgálat?:
 Igen: Évente 1x Évente 2x Évente 3x Évente 4x Nem

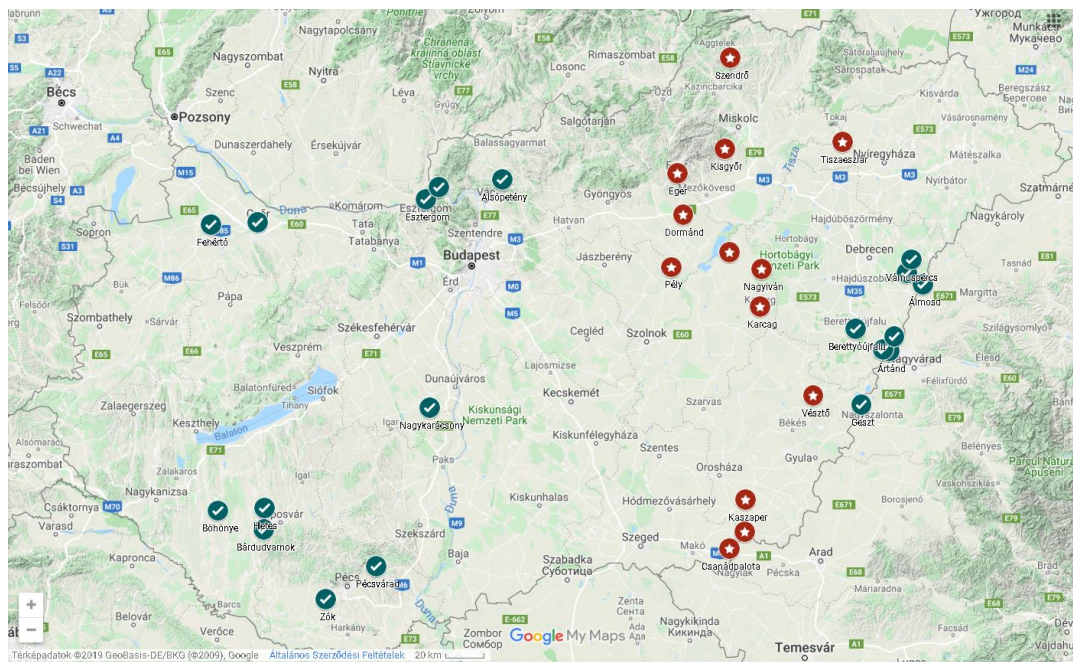
14. Egyéb megjegyzések:

2. ábra : A juhtartóknak kiküldött kérdőív

A kérdőívet a Magyar Juh- és Kecsketenyésztő Szövetség területi instruktoraik töltötték ki az állattartókkal. Az adatokat egy számítógépes program segítségével vittem fel az adatbázisba.

3.2 Bélsármintagyűjtés

A bélsárminták gyűjtése 2018. októbere és 2019. augusztusa között történt az ország 14 megyéjében tartott 37 állományban. Helyszíni kiszállások során személyesen gyűjtöttem az adatokat és a mintákat 22 állományban (3. ábra). További 15 juhászatból a vizsgálatokhoz szükséges bélsármintákat a Debreceni Egyetem két PhD hallgatója gyűjtötte, és juttatta el a Parazitológiai és Állattani Tanszékre. Ipolydamásdról, ahol személyesen is jártunk, az állatok tulajdonosa juttatta be a mintákat a tanszékre.



3. ábra Mintagyűjtési helyek

✔ : azon településeket jelöli, ahol saját mintavétel történt

★ : azon települések, ahonnan a mintákat küldték

Ún. pool bélsárminták gyűjtése történt. Állományonként kb. 20-50 állat által ürített friss bélsár egy részét egy tárolóedénybe gyűjtöttük. A mintákat állományonként külön csomagolva a gyűjtés helyének és időpontjának pontos megjelölésével műanyag dobozban és/vagy tasakban légmentesen lezárva hűtőládában szállítottam/szállították a tanszékre.

3.3 Boncolás

Két állományban egy-egy elhullott, valamint a Hetesi vágóhídon levágott tíz juh postmortem vizsgálatakor összegyűjtöttem az oltógyomrok alaposan kimosott tartalmait. Az oltógyomorban előforduló parazitákat úgynevezett dekantálás segítségével gyűjtöttem össze. Ennek lényege, hogy gyomortartalmakat csapvízzel alaposan elkevertem, majd néhány perc után a felúszókat leöntöttem. Ezt addig ismételttem, míg az üledék feltisztult s abból a férgeket sztereomikroszkóp alatt kiszedtem és 70%-os alkoholban tároltam. A fonálféreg morfológiai vizsgálatakor arra voltam kíváncsi, hogy a mintákban előfordult-e *Haemonchus contortus*.

3.4 A bélsármintákban talált peték kvantitatív vizsgálata

Az Állatorvostudományi Egyetem Parazitológiai és Állattani Tanszékének laboratóriumában történtek a vizsgálatok. Az állományonként gyűjtött bélsármintákat alaposan összekevertem és ezt követően, hazánkban elsőként alkalmazott, mini-FLOTAC-módszerrel (4. ábra) kvantitatív ovoszkópiát végeztem. Megállapítottam a parazitapeték grammonkénti számát.

Állományonként öt párhuzamos mintát vizsgáltam. A módszer rövid lényege: a mini-FLOTAC keverőpoharába mért 2 gramm bélsarat 18 ml ZnSO₄ dúsító oldattal homogenizáltam, majd a módszer leírása szerint felöntöttem a vizsgálati kamrákat. A kamrákban látható különféle petéket fénymikroszkóp alatt megszámláltam.

E módszer a hagyományosan használt McMaster módszerhez képest ötször érzékenyebb, grammonkénti öt pete is kimutatható, A peték morfológiai vizsgálatához (Kassai, 2003) könyvében található ábrákat használtam.



4. ábra: Mini FLOTAC készlet

3.5 Peték bélsárból történő kimutatása molekuláris biológiai módszerekkel

3.5.1 DNS-kivonás férgekéből és petékből

A dekantálással kinyert *H. contortus* férgeket olló segítségével feldaraboltam. A bélsármintákból többszöri felszándúsítással kinyert, majd vízzel kimosott petéket először 2x4 percig 0,7 mm átmérőjű gránit őrlemény segítségével a peteburkok roncsolása céljából SpeedMill plus (Analytikjena) készülékben zúzattam. A férgekéből és a petékből NucleoSpin Tissue© (Macherey-Nagel) DNS-kivonó kittel történt a DNS-kivonását a kit protokollja szerint.

3.5.2 Konvencionális PCR

A konvencionális PCR reakció során a *H. contortus* ITS1 génszakaszának körülbelül 280 bázispár (bp) nagyságú terméke volt amplifikálva fajspecifikus F3 forward és B3 reverse primerekkel (Melville és mtsai, 2014). 25 µl végtérfogatú elegyet 5 µl DNS templát és 20 µl reagens alkotta, amiben a következők voltak: 1,0 U HotStar Taq *Plus* DNA polimeráz (5U/µl) (QIAGEN, Hilden, Germany); 0,5 µl nukleotid mix (10mM); 0,5 µl mindegyik primerből (50µM); 2,5 µl of 10x Coral Load PCR puffer (15mM MgCl₂-ot tartalmaz); és 15,8 µl PCR víz.

A hőreakció során az egyszeri kezdeti aktivációs lépést (95°C 5 min) 35 ciklusban ismétlődve követte denaturáció 95°C 30 sec, anelláció 58°C 40 sec, extenzió (polimerizáció) 72°C 1 min és lezárásként egy egyszeri ún. végső extenziós lépés 72°C 10 min. *H. contortus* férgekéből kivont DNS-t használtam pozitív kontrollként.

A kapott PCR termék detektálása gélelektroforézissel történt, ethidium-bromiddal festett, 1,5%-os agaróz gélen, 100V feszültség mellett kb. 1 órán át. Az eredményt UV fény alatt rögzítettük. A pozitívnak talált minták a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutató Központjában voltak szekvenáltak.

3.5.3 Loop-mediated Isothermal Amplification (röviden LAMP)

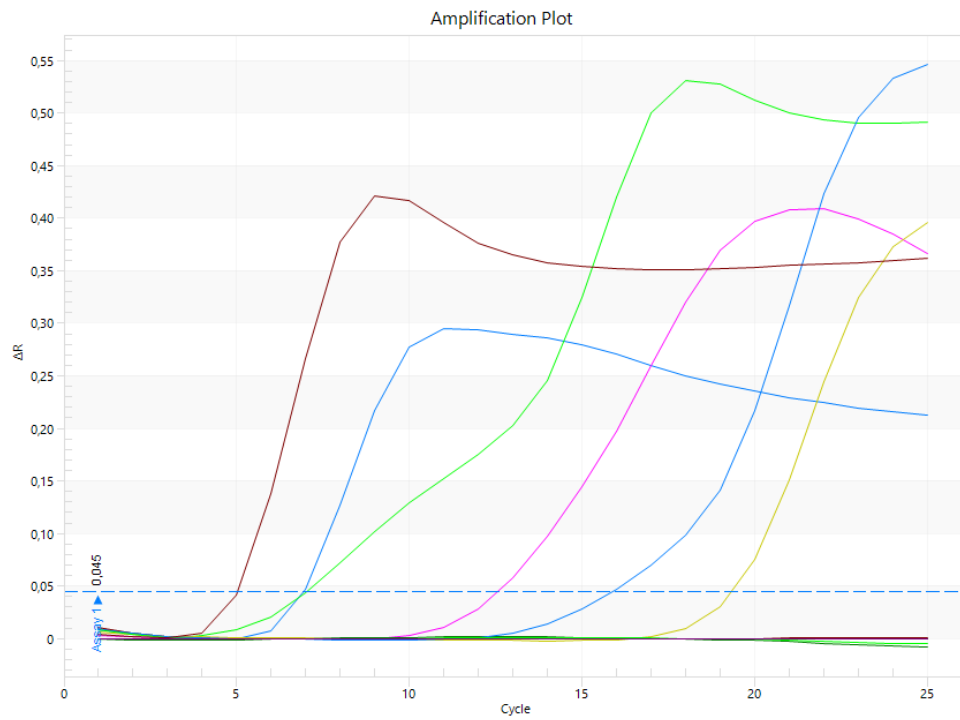
A módszer lényege, hogy a DNS amplifikálása nem igényel hődenaturációt, a reakció állandó (60–65 °C) hőmérsékleten történik, speciális DNS-polimeráz (*Bacillus stearothermophilus*-ból izolált *Bst* polimeráz) segítségével. Négy különböző primer a cél DNS-en 6 különböző szakaszt ismer fel és ezek indítják el a reakciót. Az általunk végzett reakcióban további 4 négy szakaszt felismerő 2 primert is alkalmaztunk. A keresett DNS 15–60 perc alatt 10^9 – 10^{10} -szeresére felszaporodik.

Az általunk alkalmazott LAMP módszer célja a *Haemonchus contortus* DNS ITS1 (first internal transcribed spacer) génszakaszának amplifikálása és kimutatása 3 speciálisan megtervezett primerpár segítségével: F3 belső forward primer 5' - GGT TCC ATT GAT CAC GAG AA - 3', B3 belső reverse primer 5' - CAG TAC ACC ACA TAC TCA AGA A - 3', FIP külső forward primer 5' - AAC AAT CAC AGC CGC CAC TAA GCT CTA TTA CAT GAG GTG TC-3', BIP külső reverse primer 5' - TCA TTG ATG GTT GAG CTT GAG ACT TGT TCG TAC TTA ACC ACC ATC A -3', FLP hurok forward primer 5' - AAG CGG CTC ATG TCA TAC AT - 3' és BLP hurok reverse primer 5' - CTA TAA TAC TGC CTC GCC GTT - 3' (Melville és mtsai, 2014).

A vizsgálatokat speciális LAMP reagens kittel végeztük (MAST ISOPLEX[®] DNA Lyo, Mast Group Ltd, Bootle, UK). A reakciókörülményeket a gyártó utasításait figyelembe véve a tanszéki berendezésekhez igazítottuk.

Reagensmix minden mintára: 0.04 µl mindkét F3 és B3 primerek (50 µM törzsoldat), 0.32 µl FIP és BIP primerek (50 µM törzsoldat), 0.16 µl FLP és BLP primerek (50µM törzsoldat), 8.8 µl MAST ISOPLEX[®] DNA Lyo MasterMix, 2 µl templát DNS. Pozitívként a kit Pozitív Kontroll DNS reagensét, negatív kontrollként PCR vizet használtunk.

Az egyszerűbb és gyorsabb kivitelezés érdekében az izotermális amplifikációt (63°C, 35 perc) és a termék detektálását egy reakcióban, FAM filterrel ellátott real-time PCR készülékkel végeztük (Eco[™] Real-Time PCR System, Illumina Inc., San Diego, CA, USA). A készülék a 35 perces reakció alatt, 30mp-ként rögzítette az adatokat és görbén ábrázolta az eredményt (5. ábra). Pozitívnak azt a mintát tekintettük, amelyik görbéje átlépte a szoftver szerinti 0,05 küszöbértéket és alakja exponenciálisan növekvő.



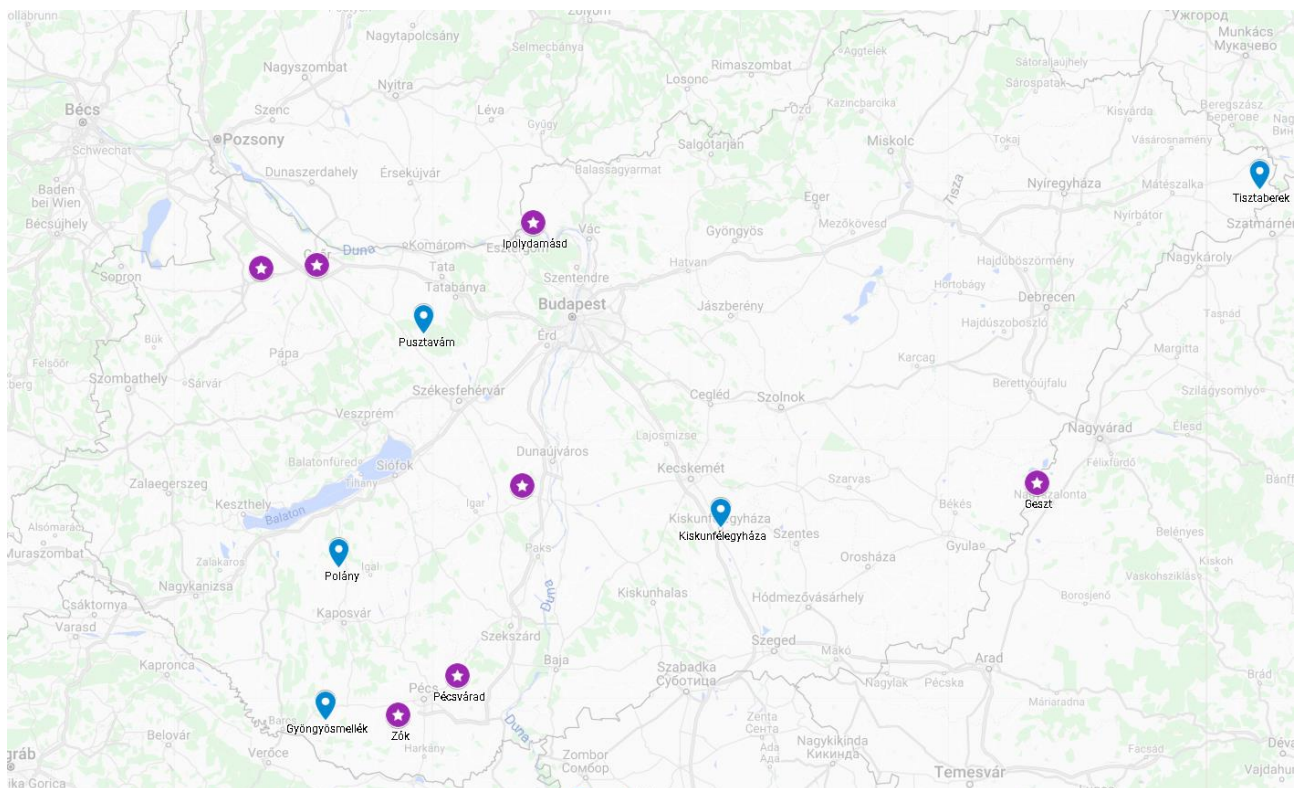
A szaggatott vonal fölé emelkedő görbék pozitív eredményt jeleznek.

5. ábra: LAMP vizsgálat eredménye.

4. Eredmények

4.1 Kérdőíves felmérés

A Magyar Juh- és Kecsketenyésztő Szövetség segítségével két megye kivételével a többiből sikerült adatokhoz jutni. A kitöltött és visszajuttatott 911 kérdőív közül mindössze hat olyan volt, amin azt írták, hogy az állományban korábban megállapították a haemonchosis előfordulását. Ezek a juhászatok Baranya, Somogy, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Fejér egyében vannak, valamint kettő Bács-Kiskun megyében (6. ábra).



6. ábra: A kérdőívre adott válaszok alapján megállapított (📍) és a klinikai tünetek alapján feltételezett (★) haemonchosis előfordulási helyei az országban

Továbbá voltak olyan juhászatok, ahol kérdőíven feltüntették, valamint telefonon keresztüli beszélgetés és személyes találkozásunk alkalmával arról számoltak be, hogy a haemonchosisra utaló vérszegénység jeleit, áll alatti ödémát (7. ábra), valamint megnövekedett számú elhullást figyeltek meg nyolc megye (Baranya, Békés, Fejér, Győr-Moson-Sopron, Heves, Jász-Nagykun-Szolnok, Komárom-Esztergom, Pest) 9 állományában.



7. ábra: Áll alatti ödéma és sápadt kötőhártya

4.2 A levágott vagy elhullott állatok oltógyomrának vizsgálata

Egy-egy bárdudvarnoki, nagykarácsonyi és ipolydamásdi juh boncolásakor az oltógyomrokban nagy számú *Haemonchus contortus* férgek fordultak elő (8. ábra). Az ezekkel fertőzött oltógyomor nyálkahártyáján peteček és nagy kiterjedésű erythema volt megfigyelhető (9. ábra).



8. ábra : Nagy számú *Haemonchus contortus* féreg egy juh oltógyomrában



9. ábra: *Haemonchus contortus* okozta oltógyomorbeli elváltozások

4.3 A vizsgált „pool” bélsármintákban talált peték

Egy kaszapéri állomány kivételével a többi állomány mintáiban előfordultak strongylida-típusú peték (1. táblázat). A strongylida-típusú petéken kívül több mintákban más paraziták petéit is láttam. A *Moniezia benedeni* jellegzetes négyszög alakú petéi 17 állomány mintáiban fordultak elő. A *Moniezia expansa* szintén jellegzetes morfológiájú petéi 3 állomány mintáiban voltak. A gyomor- és bélférgek közé tartozó *Nematodirus* petéket 13 állományból származó mintákban találtam.

Mintavétel helye	Megye	Átlagos (n=5) peteszám/gramm
Pécsvárad	Baranya	11
Kökény	Baranya	97
Zók	Baranya	524
Bárdudvarnok1	Somogy	314
Bárdudvarnok2	Somogy	60
Bárdudvarnok3	Somogy	221
Böhönye	Somogy	38
Berettyóújfalu	Hajdú-Bihar	9
Biharkeresztes	Hajdú-Bihar	223
Ártánd	Hajdú-Bihar	19
Nagykerek	Hajdú-Bihar	49
Álmosd	Hajdú-Bihar	5
Újléta	Hajdú-Bihar	4
Vámospércs	Hajdú-Bihar	101
Tiszaeszlár1	Szabolcs-Szatmár-Bereg	32
Tiszaeszlár2	Szabolcs-Szatmár-Bereg	50
Csanádpalota	Csongrád	20
Kaszaper	Békés	Negatív
Mezőhegyes	Békés	70
Vésztő	Békés	38
Szendről	Borsod-Abaúj-Zemplén	25
Kisgyőr	Borsod-Abaúj-Zemplén	6
Alsópetény	Nógrád	13
Eger	Heves	7
Pély	Heves	87
Dormánd	Heves	205
Karcag1 (brit tejelő)	Jász-Nagykun-Szolnok	19
Karcag1 (kutató)	Jász-Nagykun-Szolnok	9
Nagyiván	Jász-Nagykun-Szolnok	86
Tiszaszőlős	Jász-Nagykun-Szolnok	214
Győr	Győr-Moson-Sopron	274
Esztergom	Komárom-Esztergom	40
Fehértó	Győr-Moson-Sopron	3
Ipolydamásd	Pest	116
Zók	Baranya	25

1. táblázat: Mini Flotac módszerrel vizsgált bélsármintákban talált strongylida-típusú peték grammonkénti száma

4.4 Molekuláris biológiai vizsgálatokkal kapott eredmények

Először a boncolás során kigyűjtött *H. contortus* férgekből kivont DNS-ek PCR vizsgálata történt. A szekvenált termékek mindegyikénél 100%-os azonosságot találtunk a génbankba letett szekvenciákkal történt összehasonlításkor. A férgekből kivont DNS LAMP módszerrel végzett vizsgálata is hasonló eredményt adott. A későbbiekben ezeket használtuk pozitív kontrollként a petékkal kapcsolatos PCR vizsgálatokban.

Hét juhállomány bélsármintáiból kimosott strongylida-típusú petékből kivont DNS-ekkel végzett kétféle molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeit a 2. táblázat foglalja össze. Hagyományos PCR vizsgálatkor 4 mintából (Hetes, Nagykarácsony, Geszt és Ipolydamásd) lehetett kimutatni terméket. Ezeket szekvenáltattuk. A kapott szekvenciák közül egy 97,4%-ban, a többi 99%-os azonosságot mutatott a génbankban elhelyezett *H. contortus* szekvenciával. LAMP módszerrel végzett vizsgálatokban a hét állomány mintái közül hatnál lehetett megállapítani a *H. contortus* okozta fertőzöttséget, köztük a bárdudvarnoki, az esztergomi és a fehértói mintákban, amelyeknél negatív volt a fertőzöttség megállapítása PCR-rel (2. táblázat). Az ipolydamásdi juhok bélsármintáiból kimosott petékből nyert DNS-sel végzett LAMP vizsgálat negatív eredményt adott.

Származási hely	Molekuláris módszer	
	PCR	LAMP
Bárdudvarnok	-	+
Hetes	+	+
Nagykarácsony	+	+
Esztergom	-	+
Fehértó	-	+
Geszt	+	+
Ipolydamásd	+	-

2. táblázat: *Haemonchus contortus* kimutatása strongylida-típusú petékből

5. Megbeszélés

A házi és vadon élő kérődzők oltógyomrában élősködő fonálféregfajok közül a *Haemonchus contortus* okozza a legnagyobb kárt világszerte, elsősorban a fiatal kis kérődzőkben (Kassai, 2003). Az általa okozott parazitózis állategészségügyi és gazdasági jelentősége régóta ismert. A negyedik stádiumú lárvák és az adultok gyakori vérszívása következtében kialakult jelentős vérvesztés miatt a fertőzést követően rövid időn belül számottevően rosszabbodik az állatok egészségi állapota. A fertőzöttség súlyosságától függően láthatóvá válnak az anémiával összefüggő klinikai tünetek a nyálkahártyákon, áll alatti vagy has alji ödéma alakul ki, az állatok bágyadtak, elhullhatnak (Machen és mtsai, 1998).

Bár a magyarországi viszonylatokról egyelőre kevés információval rendelkezünk, a parazitafajt kimutatták már hazánkban.

Leopolod Ödön 1941-ben említette a *H. contortus* „elhullott állatok gyomrában való viselkedését”, a „Közlemények az összehasonlító élet- és kórtan köréből” című könyvben. Később, 1960-ban Kotlán írt a parazitafajról, melyet a juh sodrottestű gyomorférgének nevezett. Kassai 2003-as parazitológia könyvében is szó van a fajról. Nagy és munkatársai több cikket is közöltek a *H. contortus* hazai előfordulásával kapcsolatban. 2013-ban számoltak be arról, hogy boncoláskor a dél-dunántúli térségben élő 8 kérődző faj (dámszarvas, gímszarvas, muflon, őz, juh, kecske, bivaly, szarvasmarha) 143 állatának oltógyomrában található férgeket vizsgálva a bivaly kivételével a többi fajban megtalálták. A vizsgált 22 juh közül 20, és a 10 kecske mindegyike fertőzött volt (Nagy és mtsai, 2013).

2015-ben elhullott anyajuhból származó férgek molekuláris biológiai vizsgálatai alapján állapították meg Magyarországon először a *H. contortus* benzimidazolokkal szembeni rezisztenciáját (Nagy és Zsolnai, 2015). A következő évben az említett molekuláris biológiai módszerrel albendazol-rezisztens *H. contortus* hímeket találtak farmon tartott gímszarvasokban, amelyeket 17 éven át ezzel a hatóanyaggal kezeltek (Nagy és Csivincsik, 2016). Egy évvel később arról számoltak be, hogy 11 dél-dunántúli juhászatból származó 189 *H. contortus* hím PCR–RFLP-módszerrel végzett vizsgálata szerint széles körben fordul elő rezisztencia a hosszú ideje használt albendazollal szemben (Nagy és Csivincsik, 2017).

Hazánkban eddig a *H. contortus* kevesebb figyelmet kapott, mint a nagy juhtartó országokban, ritkán kerül azonosításra.

A legtöbb helyen, ha fel is boncolják az elhullott juhokat, az oltógyomorritkán nyitják fel, vagy nem veszik észre a férgeket az oltóban.

Intézetben végzett boncolással megállapítható lenne a parazitózis előfordulása, de az országban található 3 intézetbe csak ritkán, általában más ok miatt küldenek tetemeket.

Boncoláskor az oltógyomor fala kipirult, falában petehek figyelhetők meg. A *H. contortus* példányok általában az oltógyomor tartalmában figyelhetők meg, súlyosan fertőzött állatok esetében tömegesen. A parazita könnyen felismerhető a többi gyomorbél-féreghez képest nagyobb méretéről, valamint a nőstények jellegzetes piros-fehér csíkozottságáról.

A haemonchosis okozta károk megelőzése érdekében a legfontosabb feladat megállapítani, hogy a juhállományokban előfordul-e az ezt okozó parazitafaj. Ennek egyik lehetősége a bélsármintákban előforduló peték vizsgálata lenne. Azonban köztudott, hogy a juhok egyidejűleg több olyan fonálféreg fajjal fertőzöttek, amelyeknek a petéit nem lehet elkülöníteni a *H. contortus* petéitől, mert a strongylida-típusú petéik vannak (Kassai, 2003). Ezért csak azt lehet megállapítani, hogy lehetséges, nem biztos, hogy az állatok fertőzöttségét *H. contortus* okozhatja. Lehetőség lenne arra, hogy a petékből kitenyésztett és izolált L3-ak morfológiai vizsgálatával megállapítsák e faj előfordulását (Mayhew, 2013). Ezt a módszert azonban nem alkalmazzák mert időigényes és nagy szakértelmet követel (Rossanigo és Gruner, 1996; Melville és mtsai, 2014).

A haemochosis kórjelzésére szerológiai módszereket nem használnak. Napjainkban azonban molekuláris biológiai módszereket is igénybe lehet venni a parazitózis gyors és biztos megállapítására, amikor is a petékben lévő DNS-t mutatjuk ki (Melville és mtsai, 2014; Amarante és mtsai, 2017). A *H. contortus* örökítő anyaga fajon belül kevés, de fajokhoz képest jelentős eltérést mutat (Roeber és mtsai, 2017; Amarante és mtsai, 2017), ezért alkalmas a faj PCR azonosítására. A másik alkalmazott módszer, a Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) a konvencionális PCR-hez képest 10-szer érzékenyebb, egy gramm bélsárban lévő két pete esetén is megbízható eredményt ad (Melville és mtsai, 2014).

Hazánkban elsőként azt vizsgáltuk, hogy a két módszer segítségével lehet-e vizsgálni a *Haemonchus*-fertőzöttségét.

PCR-rel és LAMP-al vizsgálataink során összesen hat megye egy-egy olyan állományában állapítottuk meg a fonalféregfaj előfordulását, ott, ahol korábban nem tudtuk az előfordulásáról.

Az elvégzett vizsgálatokkal bővültek az ismereteink a jelentős kárt okozó parazitózis hazai elterjedtségéről. Egyre több adat azt jelzi, hogy több állományban fordul elő a *H. contortus*, mint eddig tudtuk. A vizsgálatokat folytatni kell és érdemes lenne kiterjeszteni a kecske- és szarvasmarha állományokra is, valamint vadon élő kérődzőkre, amelyek szerepet játszhatnak a parazita terjedésében.

6. Összefoglaló

A HAZAI JUHÁLLOMÁNYOKBAN HAEMONCHOSIS VIZSGÁLATA KÉRDŐÍVES ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

Az oltógyomorban élősködő *Haemonchus contortus* a legeltetett juh- és kecskeállományokban számottevő állategészségügyi és gazdasági kárt okoz világszerte. A parasitosis az utóbbi évtizedben kontinensünkön is az érdeklődés középpontjába került, ami a klímaváltozással és az anthelmintikumokkal szembeni rezisztencia gyakoribbá válásával függ össze. A *H. contortus* hazai jelenléte régóta ismert, de a mai napig nincsenek adatok a juhállományok fertőzöttségéről, állategészségügyi és gazdasági jelentőségéről. Petevizsgálattal e fonálféregfaj okozta parasitosis nem állapítható meg, a harmadik stádiumú lárvák tenyésztése és morfológiai vizsgálata időigényes és nagy tapasztalatot igényel. Az elmúlt évben végzett kérdőíves felmérés mellett hazánkban elsőként alkalmazott kétféle molekuláris biológiai módszerrel vizsgáltuk az élősködő előfordulását juhállományokban.

A 911 kitöltött kérdőív közül hat helyről jelezték a haemonchosis előfordulását, a bántalomra jellemző vérszegénységet és áll alatti ödémát többen észlelték. Az ország 14 megyéjében tartott 37 állományban egy alkalommal ún. pool bélsármintákat gyűjtöttünk. A gyomor- és bélférgek strongylida-típusú petéit mini-FLOTAC módszerrel vizsgáltuk. Egy hely kivételével a többi mintában előfordultak strongylida-típusú peték. Összesen 10 juhászat mintáiból kimosott petékből NucleoSpin Tissue© (Macherey-Nagel) kittel történt a DNS kivonása. Hagyományos polimeráz reakcióval (PCR) és a DNS egy másik amplifikációs módszerével (Loop-mediated isothermal amplification, röviden LAMP) vizsgáltuk a *H. contortus* előfordulását. A PCR vizsgálatokban boncolás során talált adultokból kivont DNS-t használtunk pozitív kontrollként. A LAMP esetében a kit pozitív kontroll DNS reagensét, negatív kontrollként PCR vizet használtunk. A petékből kinyert DNS-sel kapott PCR termékeket szekvenáltattuk. Összesen hat megye egy-egy olyan állományában állapítottuk meg a fonálféregfaj előfordulását, amelyről korábban nem tudtak.

Az országos kérdőíves és a hazánkban elsőként alkalmazott molekuláris parazitológiai vizsgálatok eredményei hozzájárulnak a jelentős kártétellel járó haemonchosisal kapcsolatos ismereteink bővüléséhez.

A LAMP módszerrel rövid időn belül megállapítható az állományok *H. contortus* okozta fertőzöttsége. Ez a módszer a konvencionális PCR-hez képest 10-szer érzékenyebb, egy gramm bélsárban lévő két pete esetén is megbízható eredményt ad.

7. Summary

EXAMINATION OF HAEMONCHOSIS IN SHEEP HERDS IN HUNGARY WITH QUESTIONNAIRE AND MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS

Haemonchus contortus is a parasite, living in the abomasum, causing damage in animal health and economy in sheep and goat flocks around the world. The parasitosis got to the center of attention in Europe in the last decade. This is related to climate change and the fact that resistance to anthelmintics is becoming more common. Presence of *H. contortus* in Hungary has long been known, but still there is no data about the degree of infection of sheep, or its impact on animal health or economy. The infection caused by this Nematode cannot be diagnosed by examination of eggs. Breeding and morfological examination of stage 3 larvae is time-consuming and require considerable experience. Besides our survey was being done last year, we also used two types of molecular biological methods first time in Hungary to identify the parasite in sheep flocks.

911 questionnaire have been filled in, 6 in which haemonchosis was noted. More owners noticed the classical signs of the infection, such as anaemia and submandibular oedema. We collected pooled fecal samples once in 37 flocks of 14 counties. Strongylide type eggs of Trichostrongylidae have been examined with mini-FLOTAC. Strogylide type eggs were found in all samples, except one. Eggs were washed out of the samples of 10 flocks, and we extracted DNA with NucleoSpin Tissue© (Macherey-Nagel) kit. Presence of *H. contortus* was examined with conventional PCR and another amplification method called Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). For PCR examinations we used the DNA from adults found with autopsy as positive control. In LAMP the positive control DNA from the examining kit was used. As negative control we used PCR water. We sent the PCR product of DNA extracted from eggs to sequencing. We identified the parasite in six flocks in six counties, where the presence of *H. contortus* hasn't been known.

The country-wide survey, as well as the molecular biological methods first used in Hungary will also contribute to the knowledge about this damage-causing parasite, the *H. contortus*.

LAMP method is suitable for rapidly diagnosing the flock's infection with *H. contortus*. This method is 10 times more sensitive than PCR, the result is reliable even if fecal egg count is only 2 eggs in one gram feces.

8. Irodalomjegyzék

- Amarante MRV, Santos MC, Bassetto CC, Amarante AFT. (2017). PCR primers for straightforward differentiation of *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei* and their hybrids. *Journal of Helminthology*, 91 (6), 757-761.
- Baker NF, Cook EF, Douglas JR, Cornelius CE. (1959). The Pathogenesis of Trichostrongyloid Parasites. III. Some Physiological Observations in Lambs Suffering from Acute Parasitic Gastroenteritis. *The Journal of Parasitology*, 45 (6), 643 - 651.
- Bassetto CC, Almeida FA, Newlands GFJ, Smith WD és mtsai. (2018). Trials with the *Haemonchus* vaccine, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: Nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. 264, 52-57.
- Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, Van Wyk JA. (2016). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*, 93, 181 - 238.
- Blaskó B, Cehla B, Kiss I, Kovács K és mtsai. (2011). Állattenyésztési ágazatok ökonómiája. TÁMOP - 4.1.2 - 08 / 1/2009 - 0010 project.
- Coadwell WJ és Ward PF. (1982). The use of faecal egg counts for estimating worm burdens in sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 85 (2), 251 - 256.
- Crofton HD, Whitlock JH, Glazer RA. (1965). Ecology and biological plasticity of sheep nematodes. II. Genetic x environmental plasticity in *Haemonchus contortus* (Rud. 1803). *Cornell Veterinarian*, 55 (2), 251 - 258.
- Dineen JK, Donald AD, Wagland BM and Jan Offner. (1965. 08). The dynamics of the host-parasite relationship: III. The response of sheep to primary Infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 55 (3), 515 - 525.
- Domke AV, Chartier C, Gjerde B, Leine N, Vatn S és mtsai. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary Parasitology*, 1, 48 - 49.
- Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF. (2016. 11). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*, 46 (12), 755-769.
- Höglund J, Gustafsson K, Ljungström BL, Engström A és mtsai. (2009). Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Veterinary Parasitology*, 161, 60 - 68.
- Holmes, Peter H. (1993). Interactions between parasites and animal nutrition: the veterinary consequences. *Proceedings off the nutrition society*, 52, 113-120.
- Kassai T. (2003). *Helmintológia: Az állatok és az ember féregélszködök okozta bántalmai*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.
- Kenyon F, Sargison ND, Skuce PJ, Jackson F. (2009). Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Veterinary Parasitology*, 163, 293 - 297.
- Kotlán S. (1961). *Parazitológia 3. átdolgozott kiadás*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.
- Kotze AC, Prichard RK. (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Advances in Parasitology*, 93, 397-428.
- LeJambre LF, Ractliffe LH, Whitlock JH, Crofton HD. (1970). Polymorphism and Egg-Size in the Sheep Nematode, *Haemonchus contortus*. *Evolution*, 24 (3), 625 - 631.
- Leopold Ö. (1941). *Vizsgálatok a Haemonchus contortusnak elhullott állatok gyomrában való viselkedéséről. Közlemények az összehasonlító élet- és kórtan köréből.* (30. évf. (2.sz.) kötet).
- Machen R, Craddock F, Craig T and Fuchs T. (1998. 05 22). *A Haemonchus Contortus Management Plan for Sheep and Goats in Texas*. Texas A&M AgriLife Extension.

- Mayhew, v. W. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80 (1), 539.
- Melville L, Kenyon F, Javed S, McElarney I és mtsai. (2014. 12 15). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Haemonchus contortus* eggs in ovine faecal samples. *Veterinary Parasitology*, 206 (3-4), 308 - 312.
- Morgan E, Charlier J, Hendrickx G, Biggeri A. (2013). Global change and helminth infections in grazing ruminants in Europe: impacts, trends and sustainable solutions. *Agriculture*, old.: 484– 502.
- Motyovszki, N. (2017). A juhok albendazolos kezelésének vizsgálata. A diagnosztikai vizsgálatok nélkül végzetkezések következményei. . Budapest: Állatorvostudományi Egyetem.
- Nagy G, Ács K, Csivincsik Á, Sugár L. (2013). A *Haemonchus contortus* faj előfordulási viszonyai déldunántúli kérődzőkben. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola. Akadémiai Beszámolók. Állattan, Parazitológia. 2013. 40. füzet.
- Nagy G és Zsolnai, A. (2015). Benzimidazol-rezisztencia kimutatása PCR–RFLP módszerrel juhból izolált *Haemonchus contortus*ban. *Esetismertetés. Magyar. Állatorvosok Lapja*, 2015. 137. 167–172.
- Nagy G és Csivincsik Á. (2016). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* recovered from farmed red deer. *Parasitol. Res.*, 2016. 115. 3643–3647.
- Nagy G és Csivincsik Á. (2017). Situation of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in southwestern Hungary. *Acta Agr. Kapos.*, 2017. 21. 36–41.
- Nisbet AJ, Meeusen EN, González JF, Piedrafita DM. (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. *Advances in Parasitology*, 93, 353-396.
- O'Connor LJ, Kahn LP, Walkden-Brown SW. (2007). Moisture requirements for the free-living development of *Haemonchus contortus*: quantitative and temporal effects under conditions of low evaporation. *Veterinary Parasitology*, 150 (1-2), 128-138.
- Palmer DG, McCombe IL. (1996). Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: Rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. *International Journal for Parasitology*, 26 (4), 447 -450.
- Peter JW, Chandrawathani P. (2005. 12 22). *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology.). *Tropical biomedicine*, (2), 131 - 137.
- Rinaldi L, Catelan D, Musella V, Cecconi L és mtsai. (2015). *Haemonchus contortus*: spatial risk distribution for infection in sheep in Europe. *Geospatial Health*, 9 (2), 325 - 331.
- Roberts JL és Swan RA. (1981). Quantitative studies of ovine haemonchosis. I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. *Veterinary Parasitology*, 8 (2), 165 - 171.
- Roeber F, Morrison A, Casaert S, Smith L és mtsai. (2017). Multiplexed-tandem PCR for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep: an European validation study. *Parasites & Vectors*, 10 (1), 226.
- Rossanigo CE és Gruner L. (1996). The length of strongylid nematode infective larvae as a reflection of developmental conditions in faeces and consequences on their viability. *Parasitology Research*, 82 (4), 304 - 311.
- Sallé G, Doyle SR, Cortet J, Cabaret J és mtsai. (2019. 4 13). The global diversity of the major parasitic nematode *Haemonchus contortus* is shaped by human intervention and climate. *bioRxiv*, 450692.
- Silva BF, Amarante MR, Kadri SM, Carrijo-Mauad JR, Amarante AF. (2008). Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* grass. *Veterinary Parasitology*, 158 (1-2), 85 - 92.
- Smith WD, van Wyk JA, van Strijp MF. (2001). Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture. *Veterinary Parasitology*, 98, 285-297.

- Troell K, Waller P, Höglund J. (2005). The development and over-wintering survival of free-living larvae of *Haemonchus contortus* in Sweden. *Journal of Helminthology*, 79, 373 - 379.
- van Wyk JA, Bath GF. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Onderstepoort J Vet Res.*, 33 (5), 509 - 529.
- van Wyk JA és Mayhew E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort J Vet Res.* 80(1), 539.
- Waller PJ, Rudby-Martin L, Ljungström BL, Rydzik A. (2004). The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Veterinary Parasitology*, 122, 207 - 220.
- Waller PJ, Ljungström BL, Schwan O, Martin LR. (2006). Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 47, 23-32.
- Woolaston RR és Baker RL (1996). Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. *International Journal for Parasitology*, 26(8-9), 845-55.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Farkas Róbertnek a vizsgálatok kivitelezésében és a TDK megírásában nyújtott segítségével. Szeretnék köszönetet mondani továbbá Gyurkovszky Mónikának, aki a vizsgálatok gyakorlati részében nyújtott támogatást, valamint Takács Nóra tanszéki mérnöknek, aki a molekuláris biológiai vizsgálatokban volt segítségemre. Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Parazitológiai és Állattani Tanszék minden munkatársának segítőkészségükért.

Köszönettel tartozom továbbá a Magyar Juh- és Kecsketenyésztő Szövetség minden munkatársának, elnökségének és instruktorainak, akik nélkül az országos szintű kérdőíves felmérés nem valósulhatott volna meg.

Szeretném megköszönni a Debreceni Egyetem kutatóinak és PhD hallgatóinak, hogy rengeteg mintát biztosítottak vizsgálataimhoz. Hálás köszönetemet szeretném kifejezni minden állattartónak is, aki mintagyűjtéseimhez hozzájárult.

Köszönöm Szüleimnek, akik nem csak lelki, de szakmai támogatást is nyújtottak a kérdőíves felmérésben és a dolgozat szerkesztésében.

Hálás vagyok testvéreimnek, barátomnak és barátaimnak is tanácsaikért, bátorításukért és támogatásukért.

„A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával)”

„The Project is supported by the European Union and co-financed by the European Social Fund (grant agreement no. EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, project title: „Strengthening the scientific replacement by supporting the academic workshops and programs of students, developing a mentoring process)”

SZÉCHENYI 



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Petra Ambrusics
Elérhetőség (e-mail cím): ambrusicspetra@gmail.com
A feltöltendő mű címe:
A hazai juhállományokban haemonchosis vizsgálata kérdőíves és molekuláris biológiai módszerekkel
A mű megjelenési adatai: 37. oldal
Az átadott fájlok száma: 2

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédelemű PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyag rész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év október hó 22. nap

Andrius Péter

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. FARKAS ROBERT igazolom, hogy

..... Ambrosius Petra (a hallgató neve)

..... A horai juhállományban haemochsis
..... vizsgálata vérdőve és maldulási hisztéria vizsgálattal

című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. XI. 19.

..... Prof. Dr. Tóth László
.....

a témavezető neve és aláírása

..... Keresztényi és Allettani
.....

tanszék

Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

Alulírott AMBRUSICS PETRA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címe A HAZAI ZUHÁLLOMÁNYOKBAN HAFEMONCHOSIS
VIZSGÁLATA KÉRDŐÍVES ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a 2019.....
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019.11.19......

AMBRUSICS PETRA
Ambrusics Petra.....

a hallgató neve és aláírása