

*In vitro* anthelmintic effects of a tannin-containing feed supplement against gastrointestinal nematodes of small ruminants

Csivincsik Ágnes  
Tossenberger János  
Rózsa Dorottya  
Németh Katalin  
Nagy Zsófia  
Sugár László  
Nagy Gábor\*

Á. Csivincsik  
J. Tossenberger  
D. Rózsa  
K. Németh  
Zs. Nagy  
L. Sugár  
G. Nagy\*

Kaposvári Egyetem  
7400-Kaposvár, Guba S. u. 40.

\* e-mail: nagy.gabor@ke.hu

## Tannintartalmú takarmánykiegészítő *in vitro* féregellenes hatása kiskérődzők gyomor-bélférgeire

# PARAZITOLÓGIA

### ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők egy szelídgesztenyefa kéregkivonatát tartalmazó takarmánykiegészítő féregellenes hatását vizsgálták *in vitro*. A vizsgált anyag 75%-ban tartalmazott tannint. A petekelési teszt során a vizsgált koncentrációk (37,5 µg/ml, 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml) és a negatív kontroll között tapasztalható különbségek mindegyik esetben szignifikánsnak bizonyultak. A lárva-paralízis-tesztben vizsgált tanninkoncentrációk (1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml és 20 mg/ml) hatása szintén szignifikánsnak bizonyult. Az adult motilitási teszt során az 1,25 mg/ml és a 2,5 mg/ml koncentrációjú oldatok kivételével a többi (5 mg/ml, 10 mg/ml és 20 mg/ml) oldat hatása szignifikánsan különbözött a kontrolltól. Az eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált tannintartalmú takarmánykiegészítő *in vitro* körülmények között féregellenes hatású.

### SUMMARY

The authors investigated the *in vitro* anthelmintic effects of a chestnut tree bark feed supplement, that contained tannins in 75% ratio. In egg hatch and larval paralysis test all of the concentrations (37.5 µg/ml, 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml and 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5, mg/ml, 10 mg/ml and 20 mg/ml, respectively) had significant effects compared to the control. In adult motility test the 1.25 mg/ml, and 2.5 mg/ml concentrations did not differ from the control, while the others (5 mg/ml, 10 mg/ml and 20 mg/ml) showed significant differences. The results showed, that the studied tannin containing feed supplement could have *in vitro* anthelmintic properties.

A vizsgált takarmánykiegészítő tannintartalma megfelelő koncentrációban, laboratóriumi körülmények között kifejezett féregellenes hatású a kiskérődzők fonálférgeinek három stádiumára (pete, fertőző L3 lárva, adult féreg).

**A kiskérődzők gyomor-bélférgeinek gyógyszerrezisztenciája jelentős gazdasági károkat okoz**

**A tanninok csoportja felosztható hidrolizálható, ill. kondenzált tanninokra**

A kiskérődző-állományokban előforduló gyomor-bélférgek által okozott állat-egészségügyi és gazdasági kártétel egyik legfőbb oka a világszerte elterjedt féregellenes szerekkel szembeni rezisztencia (16, 24, 27). Mára világossá vált, hogy a probléma hatékony megoldása újszerű megközelítést kíván a gazdálkodóktól és az állatorvosoktól egyaránt, és nem alapulhat a kizárólagos gyógyszerhasználaton. Olyan, több támadáspontú, integrált technológiák kialakítása szükséges (2), amelyekkel hatékonyan lehet védekezni a paraziták és az általuk okozott károk ellen (1. ábra). Ennek a szemléletmódnak egyik fontos alappillére a takarmányozás, amelyen belül megkülönböztetett figyelem irányul a másodlagos növényi anyagcseretermékekre (secondary plant metabolites – SPM). Ezekről, a növények által, a kórokozók és kártevők elleni védelem céljából termelt metabolitokról (pl. alkaloidok, szaponinok, tanninok, polifenolok, illóolajok stb.) számos esetben kiderült, hogy *in vitro* és *in vivo* körülmények között féregellenes hatásúak (7, 10). Közülük a leginkább vizsgált csoportot a tanninok képezik (2, 14).

A tannin szó összefoglaló elnevezés, amelybe sokféle, különböző szerkezetű, kémiai tulajdonságú és eltérő méretű molekula sorolható. Jellemzően két csoportba oszthatók: a hidrolizálható tanninokra (HT) és a kondenzált tanninokra (CT) (9). Előfordulásuk a növényvilágban gyakori, utóbbi leggyakrabban a pillangósokban és fás szárú fajokban fordul elő, előbbi különböző lágy és fás szárú kétszikűekben. A CT-molekulák szerkezetileg flavonoid egységekből felépülő katechin (flaván-3-ol) és epikatechin (flaván-3,4-diol) oligomerekből állnak, amelyek a szénatomok között létrejövő kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. A takarmányozás során az emésztőtraktusba jutott CT-t a szervezet saját enzimekkel nem tudja hatékonyan bontani, így elmondható, hogy kevésbé toxikusak, mint a HT (9, 21). A HT-molekulák központi részét egy cukormolekula, általában D-glükóz alkotja. A hidroxilcsoportjait jellemzően fenolcsoportok (elsősorban galluszsav vagy ellagsav) észterezik. Ezeket a tanninmolekulákat a bendőflóra baktériumai közül több faj is képes metabolizálni (pl. *Eubacterium oxidoreducens*, *Streptococcus bovis*, *Syntrophococcus sucromutans* és *Coprococcus* spp.), a metabolizmus során keletkező pirogallol pedig a kérődzőkre nézve toxikus vegyület (21).

Valamely féregellenes hatóanyag vagy egyéb kémiai anyagok (pl. növényi metabolit) *in vitro* anthelmintikus vizsgálata során a legnagyobb problémát a standard módszerek hiánya jelenti. Bár vannak ajánlások standard módszerekre (5, 28), nem alakult ki egységes konszenzus, így az egyes vizsgálati eredmények nem, vagy csak kevésbé vethetőek össze.

A másodlagos növényi anyagcseretermékek *in vitro* vizsgálataiban olyan tesztek alkalmaznak, amelyekben a gyomor-bélférgek több (pete, fertőző L3 lárva, ill. kifejlett féreg) stádiumára gyakorolt hatását vizsgálják (6, 11, 15, 23, 28).

A HT férgekre gyakorolt hatásai közvetlenek és közvetettek lehetnek. A hatások oka a tanninmolekulák azon jellegzetessége, hogy a pH 3,5–7,5 közötti tartományban reverzibilisen képesek fehérjékhez kapcsolódni (20), így a férgek különböző fejlettségi stádiumában képesek



**1. ÁBRA.** *Haemonchosisban elhullott juh oltógyomra*

**FIGURE 1.** *Abomasum of a ewe was succumbed by Haemonchus contortus infection*

hatni. A fehérjékhez kapcsolódó molekulák az egyes képletek élettani folyamataiban működési zavart okoznak, amely a peték esetében csökkent kelésben, lárváknál gyengébb motilitásban, benuulásában, adultok esetében pedig mozgászavarban és romló szaporodóképességben nyilvánul meg (11, 14, 22). A férgek/lárvák kutikulájában levő fehérjékhez kötődött tanninok károsítják azokat, ezáltal a paraziták nem tudnak védekezni a környezetük kedvezőtlen hatásai pl. a gyomor-béltraktus enzimekben gazdag, savas vagy épp lúgos közege ellen.

A férgek enzimeinek működési zavarára jó példa a *Haemonchus contortus* contortinja, amely egy véralvadást gátló enzim. Ez felelős azért, hogy a féreg emésztőtraktusában az általa kiszívott vér ne alvadjon meg és felszívódásra alkalmas állapotban maradjon. Tannin hatására az enzim két fő fehérjéjének (Hc-PCP1 és Hc-PCP2) blokkolása révén inaktívvá válik, és a kiszívott vér megalvad. Így alkalmatlanná válik arra, hogy a féreg szervezetében megfelelő mértékben hasznosuljon. Ez a folyamat csökkent tápanyagfelvételt eredményez, mely a parazita pusztulását is okozhatja (14).

A közvetett hatásokért szintén a már említett fehérjekötődés felelős. A bendőben található takarmány fehérjemolekulái reverzibilisen kapcsolódhatnak a tanninmolekulákhoz. A bendőtartalom pH-ja ugyanis optimális a kötés kialakulásához. A takarmányfehérjék így elkerülve a mikrobiális emésztést, bypass-fehérjeként, a kérődző által termelt fehérjebontó enzimek révén bomlanak le aminosavakra és szívódnak fel a vékonybélből. A bendőemésztést elkerülő, a vékonybélben lebomló fehérjék által az állatok több olyan aminosavhoz jutnak, amelyekből ellenanyagok is termelődhetnek. Ezek az ellenanyagok (elsősorban IgE) pedig jelentős szerepet játszhatnak a parazitáik elleni küzdelemben (9, 12).

A tanninok féregellenes tulajdonságait elemző kutatások túlnyomó része a növényekben található CT hatásairól szól (9, 11, 12, 14, 20, 21, 22), és csak elenyésző hányadukban találhatók következtetések a HT ugyanezen tulajdonságairól (17, 23).

A HT antiparazitikus hatása régóta ismert. Ezek az ismeretek azonban nem elsősorban a metazoa paraziták, hanem a protozoa fajok esetében jelentősebbek (1, 18, 26).

MONDAL és mtsai (2014) az ellagsav és egy trópusi növény (*Alternanthera sessilis*) *H. contortus*-ra gyakorolt hatását vizsgálták. A molekula és a növényi szubsztrát féregellenes hatását *in vitro* tesztekkel elemezték (petekelési, PK, és adult motilitási, AMT). A PK-tesztben alkalmazott koncentrációkban (25–0,0125 µg ellagsav/ml oldat) tapasztaltak alapján megállapították, hogy a HT-molekulákban is jelen lévő ellagsav LD<sub>50</sub> értéke a féregpeték keltetése során 3,097 µg/ml volt. Az adultok mozgását a molekula 3–0,09 mg/ml koncentrációjú oldataiban vizsgálták. A legerősebb hatás a 3 mg/ml-es oldatban volt tapasztalható. Itt a férgek fele (10 állat) már az első 2 órában elpusztult. A legkevésbé letális hatást a leghígabb oldatban figyelték meg, ahol is a 0,09 mg/ml koncentrációnál a megfigyelési időszak alatt (8 óra) a mortalitás átlagosan csak 0,67 féreg volt. A kísérletben elvégzett kémiai analízis során megállapították, hogy a vizsgált növényből készült kivonatban az ellagsav aránya igen nagy volt (3007 mg/100 g kivonat), ami a nagy HT-tartalomra utal. Emellett minimális mennyiségben CT-t (katechin) is kimutattak. A növény esetében elvégzett tesztek mindkét esetben gyengébb hatást mutattak az ellagsavhoz képest. A PK esetében az LD<sub>50</sub> 150 µg/ml, míg az AMT esetében a férgek 50%-os pusztulása 2 óra alatt 12,5 mg/ml koncentráció esetében volt megfigyelhető. Megállapították, hogy az ellagsav igen erőteljes féregellenes hatású, és bár az *Alternanthera sessilis* gyengébb eredményeket mutatott, extraktumának alkalmazását takarmánykiegészítőként erősen javasolhatónak tartották a féregellenes kezelések során (23).

SALAJPAL és mtsai (2004) *in vivo* kísérletben kocsányos tölgy makkját etették *ad libitum* sertésekkel. A kísérleti állatok igazoltan orsóféreggel (*Ascaris suum*) és

**Számos tannintartalmú növény esetében írtak le parazitaellenes hatást**

**Orsóféreggel és gócos vastagbélféreggel fertőzött sertésekben a kocsányos tölgy makkját ad libitum etetve drasztikus peteürítés-csökkenést írtak le**

gócos vastagbélféreggel (*Oesophagostomum* spp.) voltak fertőzöttek. Eredményük alapján elmondható, hogy a bélsárral ürülő peteszám a kontrollcsoportéhoz képest az etetési periódus végére (28 nap) mind az *A. suum*, mind az *Oesophagostomum* spp. esetében igen drasztikusan csökkent. A csökkenés mértéke az orsóféregnél 96,56%, a gócos vastagbélféregnél 93,55%, mindösszesen 96,01% volt. A kísérlethez kapcsolódó kémiai vizsgálattal a makk tannintartalmát szárazanyag-kilogrammonként 65 g-nak találták. Eredményeik alapján az extenzívebb körülmények között tartott sertések takarmányába javasolják a nagy (hidrolizálható) tannintartalmú komponenseket, amelyekkel jelentős peteredukció érhető el (25).

A HT- és CT-tartalmú növények féregellenes hatásainak összehasonlítását végezték el KATIKI és mtsai 2013-ban (17). Összesen 8 különböző növény leveleinek extrahált oldatait (vizsgált koncentrációk: 1–25 mg/ml) hasonlították össze *in vitro*, a fonálféreg modellállatának számító *Caenorhabditis elegans* kifejlett egyedek felhasználásával. A kapott eredmények alapján megállapították, hogy azon növények, amelyekben az összes tannintartalomban a HT-ok domináltak, vagy a HT : CT arány közel azonos volt, de a HT dominált, már sokkal kisebb mennyiségben is jelentős mortalitást okoztak (pl. *Quercus alba*, *Acer rubrum*, *Rhus typhina*, *Rosa multiflora*).

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### HÍGÍTÁSI SOR KÉSZÍTÉSE

A vizsgálatunk elvégzése során FARMACASTAN 75 (gyártó: VMD Állatgyógyászati Kft.) készítményt használtunk, amelyben a tannin aránya 75%. A por alakú készítményt fiziológiás sóoldatban (Salsol-oldatos infúzió, gyártó: TEVA Gyógyszergyártó Zrt.) oldottuk fel.

### PETEKELTETÉSI TESZT

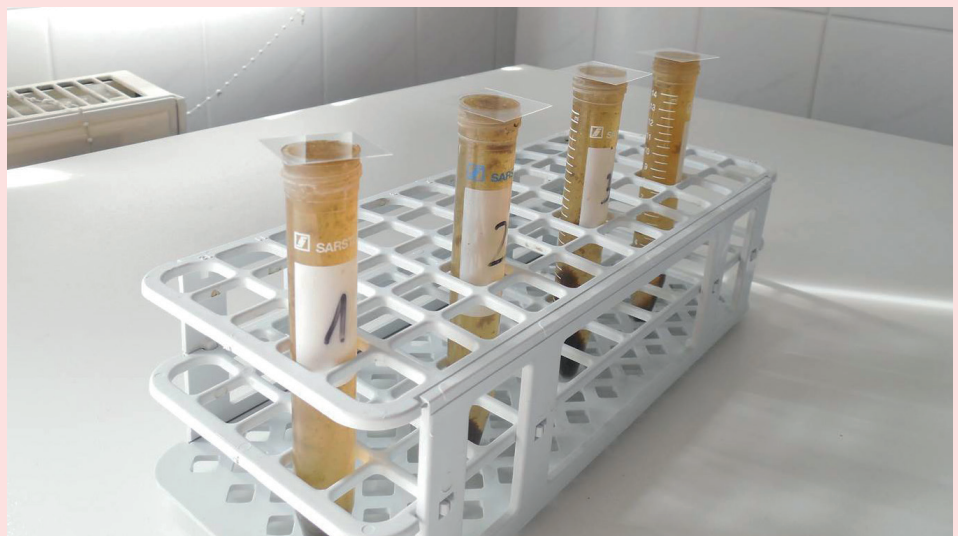
A petekelési teszt (PK) elvégzéséhez a World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) féregellenes szerekre vonatkozó ajánlásait vettük alapul (5). A vizsgálat lényege, hogy a gyomor-bélféreg petéiből kikelő lárvák aránya hogyan viszonyul a kontrollhoz képest az egyes koncentrációkban. A petéket vegyes összetételű, juhokból és kecskékből álló állomány kecskéiből nyertük (2. ábra). A bélsarat az alomról közvetlenül az ürítés után gyűjtöttük, a peték kimosását a gyűjtés után 1,5 órán belül elvégeztük.

**A petekelési teszt lényege, hogy a féregpetékből kikelő lárvák aránya hogyan viszonyul a kontrollhoz képest**

**A petéket vegyes összetételű, juhokból és kecskékből álló állomány kecskéiből nyertek**

**2. ÁBRA.** Peték kinyerése bélsár-szuspenzióból

**FIGURE 2.** Egg recovery from fecal suspension



A teszt során 5 különböző koncentrációt vizsgáltunk 4 ismétléssel egy negatív kontrollhoz viszonyítva. Az egyes hígítások tanninkoncentrációi 37,5 µg/ml, 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml és 600 µg/ml voltak. A vizsgálat során 24 lyukú lemezt használtunk, az egyes lyukakba 100 µl, petéket tartalmazó szuszpenziót és 100 µl tanninoldatot, a kontroll esetében pedig a peteszuszpenzióhoz 100 µl Salsol-oldatot töltöttünk. Az inkubáció 25 °C-on történt 48 órán keresztül, ezt követően minden lyukba egy csepp jódot cseppentettünk, aminek hatására a kikelt lárvák azonnal elpusztultak. A peték, ill. a kikelt L1-lárvák számlálását fénymikroszkóppal, 40×-es nagyításon végeztük el.

**A lárva-paralízisteszttel  
során a hatóanyag  
nyomán elpusztuló  
lárvák arányát  
viszonyítják a  
kontrollcsoportéhoz**

A lárva-paralízisteszttel (LPT) KANOJIVA és mtsai módszerével (15) végeztük el, amelyhez a gyűjtött bélsárban lévő petékből L3-lárvákat tenyésztettünk (7 nap, 70–80%-os relatív páratartalom, 27 °C). A lárvákat Baermann-féle lárvaizolálással nyertük ki. A teszt elvégzéséhez 24 lyukú lemezt használtunk úgy, hogy minden lyukba 1–1 ml, lárvákat tartalmazó szuszpenziót helyeztünk. Az LPT során alkalmazott kísérleti oldatok töménysége 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml és 20 mg/ml volt. Az egyes koncentrációkat 4 ismétlésben vizsgáltuk. A kontroll esetében tanninoldatot helyett fiziológiás sóoldatot használtunk. A lárvák elhelyezése után mindegyik lyukban ellenőriztük és feljegyeztük az esetleges holt lárvák számát. A vizsgálat 24 órán keresztül tartott. Ez idő alatt a lemezt 25 °C-on, 70–80%-os relatív páratartalom mellett tároltuk sötétben. Az idő letelével a kontroll-lyukban és a vizsgált koncentrációkban is meghatároztuk az élő és elpusztult lárvák arányát.

**Az adult motilitási  
tesztben kifejlett férgek  
mozgása utal az  
életképességre**

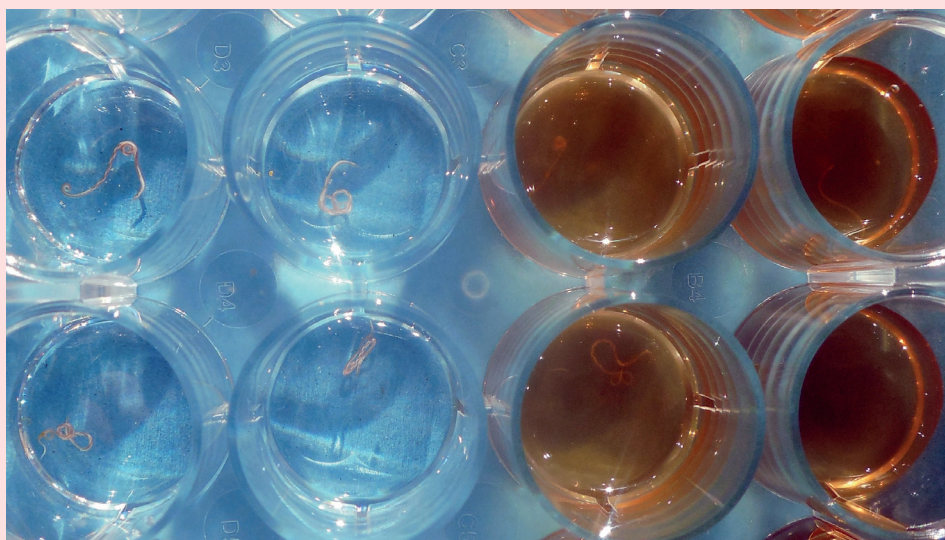
Az adult motilitási tesztben (AMT) kifejlett *H. contortus* férgeket használtunk fel, melyeket vágóhídon levágott juhból izoláltunk. A vágás után 2 órával a férgeket a laboratóriumban fiziológiás sóoldatba helyeztük, lemostuk, majd 24 lyukú lemezekre helyeztük (6) (3. ábra). Minden egyedre 1–1 ml Salsol- és tanninoldatot helyeztünk, beállítva az 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml és 20 mg/ml tanninkoncentrációkat. A tesztben az egyes koncentrációkból 12 ismétlést végeztünk úgy, hogy lyukanként csak egy-egy férget helyeztünk el. A lemezeket ezután inkubátorba helyeztük (38 °C, 80% relatív páratartalom) 8 órára. A férgek mozgását fénymikroszkóppal, 40×-es nagyításon vizsgáltuk 2 óránként. Egy féreg ellenőrzése egy-egy alkalommal 5–6 másodpercig tartott. Amennyiben az ellenőrzés ideje alatt az adott féreg nem mozdult, fiziológiás sóoldatba helyeztük, majd további 1 percig vizsgáltuk az esetleges mozgást. Ha ez nem történt meg, a férget elhullottnak tekintettük.

### 3. ÁBRA.

Adult motilitási teszt

### FIGURE 3.

Adult motility test



**A különböző hígítások hatását mindhárom módszerben kezeletlen kontrollcsoporthoz hasonlították és statisztikai módszerekkel elemezték**

A vizsgált koncentrációk hatását mindhárom testben a kontrollhoz viszonyítottuk. A PK-ban a peték és lárvák száma jelentette a statisztikai számítások alapját, ezek ismeretében határoztuk meg a kontrollban és az egyes koncentrációkban a petekelés %-os arányát, valamint az LD<sub>50</sub> értéket. A motilitási tesztekben (LPT, AMT) a motilis és mozdulatlan egyedek száma volt a statisztikai számítások alapja. A kapott arányok segítségével az LPT-ben az LD<sub>50</sub>-érték koncentrációját határoztuk meg. Az AMT-ben azt az időtartamot határoztuk meg, amely ahhoz szükséges, hogy a vizsgált koncentrációban az adult férgek 50%-nak elpusztulása bekövetkezzen. Az egyes tesztekben a tanninoldatok hatását  $\chi^2$ -próbával vizsgáltuk. Az adatok felvételezése és az alapstatisztika kiszámításához a Microsoft Excel 2010 programot, míg a  $\chi^2$ -próbához az R statisztikai szoftvert (R version 3.1.0) használtuk. Az LD<sub>50</sub>-értékeket probitanalízissel, az SPSS statisztikai szoftver 16.0.0 verziójának segítségével számítottuk.

## EREDMÉNYEK

### PETEKELTETÉSI TESZT

**A vizsgált hatóanyag koncentrációfüggő módon csökkentette a kikelő peték és növelte az elpusztult lárvák arányát**

A kapott adatok alapján a petékből történt lárvakelés aránya a kontrollban 90,49%, az 37,5 µg/ml-es oldatban 86,07%, míg a többiben 85,46% (75 µg/ml), 78,35% (150 µg/ml), 63,4% (300 µg/ml) és 42,72% (600 µg/ml) volt (1. táblázat) (4. ábra).

A  $\chi^2$ -próbával számított *p*-érték mindegyik koncentráció esetében szignifikáns eltérést igazolt a kontrollhoz képest (37,5 µg/ml, *p* = 0,0242; 75 µg/ml, *p* = 0,01; 150 µg/ml, *p* > 0,001; 300 µg/ml, *p* > 0,001; 600 µg/ml, *p* > 0,001).

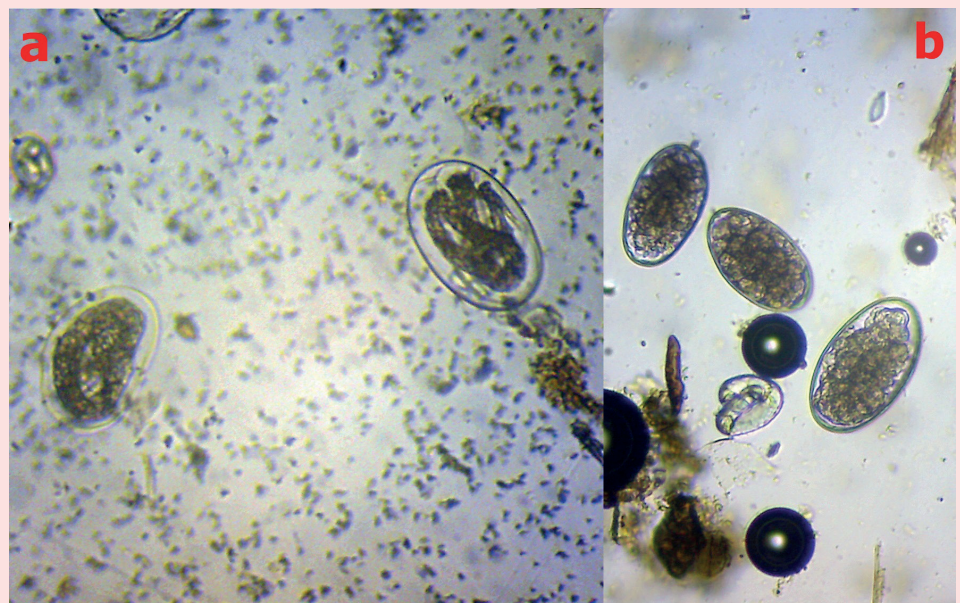
**1. TÁBLÁZAT.** A peték és lárvák számának alakulása a vizsgálatban

**TABLE 1.** Number of eggs and larvae and their proportion in Egg Hatch Test

	Kontroll	37,5 µg/ml	75 µg/ml	150 µg/ml	300 µg/ml	600 µg/ml
Peteszám	52	73	82	113	209	291
Lárvaszám	495	451	482	409	362	217
Összesen	547	524	564	522	571	508
Kelés aránya (%)	90,49	86,07	85,46	78,35	63,40	42,72

**4. ÁBRA.** Tannin hatására elpusztult lárvák petében (a) és életképes peték (b)

**FIGURE 4.** Wasted larvae in eggs in tannin solution (a) and viable eggs (b)



**2. TÁBLÁZAT.**

Az elpusztult lárvák aránya  
a lárva-paralízisteszben

**TABLE 2.** Proportion of  
dead larvae in Larval  
Paralysis Test

	Kontroll	1,25 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
Összes lárva száma	280	274	310	294	317	311
Holt lárvák száma	18	34	59	73	110	184
Holt lárvák aránya (%)	6,43	12,41	19,03	24,83	34,70	59,16
<i>p</i> -érték		0,0158	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

**3. TÁBLÁZAT.**

Az élő férgek aránya (%) az  
adult motilitási teszben a  
vizsgálat ideje alatt

**TABLE 3.** Proportion of alive  
adults (%) in Adult Motility  
Test during the examination

Eltelt idő (óra)	Kontroll	1,25 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml
2	100	100	100	100	100	91,7 (11/1)
4	100	100	100	100	100	58,3 (7/5)
6	100	91,7 (11/1)	88,3 (10/2)	66,7 (8/4)	58,3 (7/5)	33,3 (4/8)
8	91,7 (11/1)*	66,7 (8/4)	58,3 (7/5)	41,7 (5/7)	33,3 (4/8)	25 (3/9)

\*Élő/holt férgek száma / Number of alive/dead larvae

**LÁRVA-PARALÍZISTESZT**

A lárva-paralízisteszben a vizsgált koncentrációk hatása kifejezett volt. Az egyes tanninoldatok által okozott paralízis mértéke szignifikánsan különbözött a kontrolltól. Az egyes vizsgálati oldatokban elpusztult és élő L3 lárvák arányát, valamint a statisztikailag számított *p*-értékeket a **2. táblázat** tartalmazza.

Az eredmények alapján kiszámított LD<sub>50</sub>-érték 16,032 mg/ml volt. (CI95% = 13,045–21,122).

**ADULT MOTILITÁSI TESZT**

A teszt során az egyes koncentrációk hatása az első 4 órában nem különbözött markánsan egymástól, kivételt csak a 20 mg/ml-es oldat jelentett, mivel ebben a kiinduláskor elhelyezett 12 féregből már 5 elpusztult. A későbbi ellenőrzési időpontokban azonban már kifejezetté vált a tanninok adult férgekre kifejtett hatása. A részletes adatokat a **3. táblázat** mutatja be.

Az egyes oldatokban, a kontrollhoz képest tapasztalt motilitáscsökkenés a teszt 8. órájában az 1,25 mg/ml (*p* = 0,1316) és a 2,5 mg/ml-es (*p* = 0,0593) koncentrációban nem bizonyult szignifikánsnak. A többi hígításban a tannin által kiváltott hatás szignifikáns volt (5 mg/ml, *p* = 0,0094; 10 mg/ml, *p* = 0,0032; 20 mg/ml, *p* = 0,0009).

Az 50%-os letalitás eléréséhez szükséges időtartam a koncentrációk erősödésével egyre kisebb volt. Így a férgek pusztulásához szükséges idő a leghíggabb (1,25 mg/ml) oldatban volt a leghosszabb, 8,746 óra (CI95% = 7,598–34,34). A 2,5 mg/ml-es oldatban 8,28 óra (CI95% = 7,212–13,806), az 5 mg/ml-es oldatban 7,348 óra (CI95% = 6,439–9,149), a 10 mg/ml-es oldatban 6,945 óra (CI95% = 6,073–8,217), míg a 20 mg/ml-es oldatban 5,24 óra (CI95% = 3,817–6,753) volt szükséges a férgek felének pusztulásához.

**MEGVITATÁS**

A vizsgálatunk során alkalmazott tanninkoncentrációk mindhárom *in vitro* teszt esetében hatásosnak bizonyultak a kontrollhoz képest. Az eredmények alapján

**Az adult motilitási  
tesztben idő és  
koncentrációfüggő  
hatást tapasztaltak**

**A vizsgált takarmány-  
kiegészítő tannintar-  
talma megfelelő  
koncentrációban, labo-  
ratóriumi körülmények  
között kifejezett  
féregellenes hatású a  
kiskérődzők fonálférgei-  
nek három stádiumára**

**A férgek fokozott  
tanninérzékenységét  
kutikulájuk nagy  
prolintartalma okozza**

kijelenthető, hogy a vizsgált takarmánykiegészítő tannintartalma megfelelő koncentrációban, laboratóriumi körülmények között kifejezett féregellenes hatású a kiskérődzők fonálférgeinek három stádiumára (pete, fertőző L3 lárvá, adult féreg).

A tanninmolekulák féregellenes hatásukat a férgek fehérjemolekuláihoz történő kötődésük során érik el, amely jelenség mindhárom alkalmazott tesztben érzékelhető volt. A *Nematoda*-fajok petéinek burka általában három rétegből épül fel. A legkülső, vékony réteg főként fehérjéből és lipidekből, a középső, legvastagabb réteg kitinszerű anyagokból, míg a legbelső réteg elsősorban lipidekből áll (19). Feltételezhető, hogy a peték legkülső rétegéhez kapcsolódó tanninmolekulák a fehérjék működési zavarát okozhatják, amelynek eredménye a peték károsodása és ebből adódóan az azokban kifejlődő lárvák pusztulása. A paralízis és motilitási tesztek eredményeit a felhasznált L3 lárvák és az adult férgek kutikulájának összetételével lehet megmagyarázni. BIRD és ROGERS (3) vizsgálataikban megállapították, hogy a parazitikus nematodák (*H. contortus*, *Trichostrongylus* spp., *Nippostrongylus muris*) L3 lárváinak kutikulája kollagén-szerű anyagból áll, amelyben nagy mennyiségben található meg a prolin aminosav. Hasonló megállapításra jutott FETTERER (8) is, aki vizsgálataiban szintén a kutikula prolintartalmának igen nagy arányát állapította meg mind a lárvá állapotú, mind a kifejlett férgek esetében. FRUTOS és mtsai (9) megállapították, hogy a prolin a többi aminosavval szemben sokkal erősebb, kevésbé reverzibilis kötést képes kialakítani a tanninmolekulákkal. Ezen alapul a koncentráltabb takarmányt fogyasztó kérődzők tannintoleranciája, mivel nyáluk nagy prolintartalma inaktiváló barrierként védi őket a toxikus hatásoktól; és feltételezhető, hogy ez a jelenség az alapja a férgek fokozott tanninérzékenységének is, amelyet vizsgálatunk során is tapasztaltunk.

A szelídgesztenyefa kéregkivonatának L3 és adult férgekre gyakorolt hatását HOSTE és mtsai (13) vizsgálták *in vitro* körülmények között. Lárvák esetében 300, 600 és 1200 µg/ml-es, míg kifejlett férgek esetében 75, 150, 300, 600 és 1200 µg/ml-es koncentrációt használtak. A vizsgálatok alapján megállapították, hogy a kivonat hatékonysága szignifikáns volt a kontrollként használt PBS-hez képest.

COMANDINI és mtsai (4) szelídgesztenye fakérgen elvégzett folyadékkromatográfiás vizsgálataik során – amelyben 4 különböző eredetű kéregből készült minta elemzését végezték el – a tannintartalom mennyiségileg igen változatos képet mutatott, a főbb összetevők között (veszkalagin, 1-O-galloil kasztalagin, kasztalagin) akár 14-szeres különbség is mutatkozott. Ez alapján feltételezhető, hogy a vizsgált tanninkészítmény hatását annak CT- és HT-tartalma, ill. azok egymáshoz viszonyított aránya is okozhatta, melynek pontosabb megismerése *in vivo* kísérlet és kémiai elemzés által lehetséges.

A tanninok hatását elemző kutatások eredményei – az egységes módszertan hiányában – pontosan nem vehető össze egymással. Egyrészt az egyes növényi kivonatok hidrolizálható és kondenzált tannintartalma is jelentősen különbözhet, ill. a fő csoportokon belül is hatalmas minőségi és mennyiségi eltérések lehetnek az összetevőkben. Ezt alapul véve kijelenthető, hogy pontos féregellenes hatásmechanizmusok megismeréséhez elengedhetetlen a kémiai analízis, amelyből általánosabb következtetések is levonhatók.

## IRODALOM

- ASRES, K. – BUCAR, F. et al.: *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. *Phytother Res.*, 2001. 15. 7. 613–617.
- BATH, G. F.: The “BIG FIVE” – A South African perspective on sustainable holistic internal parasite management in sheep and goats. *Small Ruminant Res.*, 2014. 118. 48–55.
- BIRD, A. F. – ROGERS, W. P.: Chemical composition of the cuticle of third stage nematode larvae. *Exp. Parasitol.*, 1956. 5. 449–457.
- COMANDINI, P. – LERMA-GARCÍA, M. J. et al.: Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC-DAD-MS. *Food Chem.*, 2014. 157. 290–295.
- COLES, G. C. – JACKSON, F. et al.: The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*, 2006. 136. 167–185.
- EGUALE, T. – TILAHUN, G. et al.: *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandum sativum* against *Haemonchus contortus*. *J. Ethnopharmacol.*, 2007. 110. 428–433.



7. ELANDALOUSI, R. B. – AKKARI, H. et al.: *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: Chemical composition and *in vitro* anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, 2013. 197. 274–378.
8. FETTERER, R. H.: The cuticular proteins from free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus* – I. Isolation and partial characterization. *Comparat. Biochem. Physiol.*, 1989. 94. 383–388.
9. FRUTOS, P. – HERVÁS, G. et al.: Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.*, 2004. 2. 191–202.
10. GITHIORI, J. B. – ATHANASIADOU, S. – THAMSBORG, SIG. M.: Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.*, 2006. 139. 308–320.
11. HOUNZANGBE-ADOTE, M. S. – PAOLINI, V. et al.: *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.*, 2005. 78. 155–160.
12. HOSTE, H. – JACKSON, F. et al.: The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.*, 2006. 22. 253–261.
13. HOSTE, H. – BRUNET, S. et al.: Compared *in vitro* anthelmintic effects of eight tannin-rich plants browsed by goats in the southern part of France. *Options Méditerran. A.*, 2009. 85. 431–436.
14. HOSTE, H. – MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C. et al.: Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet. Parasitol.*, 2012. 186. 18–27.
15. KANOJIYA, D. – SHANKER, D. et al.: *In vitro* and *in vivo* efficacy of extracts of leaves of *Eucalyptus globulus* on ovine gastrointestinal nematodes. *Parasitol. Res.*, 2015. 114. 141–148.
16. KAPLAN, R. M.: Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.*, 2004. 20. 477–481.
17. KATIKI, L. M. – FERREIRA, J. F. S. et al.: Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. *Vet. Parasitol.*, 2013. 218–227.
18. KOŁODZIEJ, H. – KAYSER, O. et al.: Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor- $\alpha$  release in macrophages *in vitro*. *Planta Med.*, 2001. 67. 825–832.
19. MANSFIELD, L. S. – GAMBLE, H. R. – FETTERER, R. H.: Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* – I. Structural components. *Comparat. Biochem. Physiol.*, 1992. 103. 681–686.
20. MIN, B. R. – BARRY, T. N. et al.: The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2003. 106. 3–19.
21. MIN, B. R. – HART, S. P.: Tannins for suppression of intestinal parasites. *J. Anim. Sci.*, 2003. 81. 102–109.
22. MOLAN, A. L. – WAGHORN, G. C. et al.: The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasit.*, 2000. 47. 39–44.
23. MONDAL, H. – HOSSAIN, H. et al.: Anthelmintic activity of ellagic acid, a major component of *Alternanthera sessilis* against *Haemonchus contortus*. *Pak. Vet. J.*, 2014. 35. 58–62.
24. PAPADOPOULOS, E. – GALLIDIS, E. – PTOCHOS, S.: Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Vet. Parasitol.*, 2012. 189. 85–88.
25. SALAJPAL, K. – KAROLYI, D. et al.: Effects of acorn (*Quercus robur*) intake on faecal egg count in outdoor reared Black Slavonian Pig. *Acta Agr. Slov.*, 2004. 1. 173–178.
26. SHUAIBU, M. N. – PANDEY, K. et al.: Castalagin from *Anogeissus leiocarpus* mediates the killing of *Leishmania in vitro*. *Parasitol. Res.*, 2008. 103. 1333–1338.
27. SILVESTRE, A. – HUMBERT, J. F.: Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *Int. J. Parasitol.*, 2002. 32. 921–928.
28. TAYLOR, M. A. – HUNT, K. R. – GOODYEAR, K. L.: Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.*, 2002. 103. 183–194.

Közlésre érke.: 2015. máj. 19.