

Állatorvostudományi Egyetem
Parazitológiai és Állattani Tanszék



A gócos tüdőférgességet okozó paraziták szezonális dinamikájának tanulmányozása a nyulak protostrongylida férgein, mint modellen.

Készítette: Szabó Dóra Bettina

Témavezetők:

Dr. Majoros Gábor

ÁTE, Parazitológiai és Állattani Tanszék, tudományos főmunkatárs

Dr. Juhász Alexandra

ÁTE, Parazitológiai és Állattani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest, 2019.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	4
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1. A tüdőférgek taxonómiai besorolása, fejlődésmentes.....	5
3.2. A nyulakban előforduló tüdőférgek.....	6
3.3. A köztigazdák és a fertőződés módja	7
4. Célkitűzések.....	10
5. Anyag és Módszer.....	11
5.1. Terepi vizsgálatok a Tétényi fennsíkon.....	11
5.1.1. Bélsárminta gyűjtése	11
5.1.2. Fűminta gyűjtése	12
5.1.3. Köztigazda csigák előfordulásának vizsgálata a Tétényi-fennsíkon.....	12
5.1.4. Köztigazda csigák gyűjtése	13
5.2. Laboratóriumi vizsgálatok.....	14
5.2.1. Lárva izolálása.....	14
5.2.2. Köztigazda csigák fertőzöttségének vizsgálata.....	15
5.3. Lőtt üregi és mezei nyúl tüdők vizsgálata	17
5.3. A lárvák és a kifejlett férgek előkészítése PCR vizsgálatokra.....	18
6. Eredmények	20
6.1. Terepszemle eredménye	20
6.2. Köztigazda csigák fertőzöttsége	21
6.2.1. Az élő csigák vizsgálatának eredménye.....	21
6.2.2. Csigák boncolásának és fénymikroszkópos vizsgálatának eredménye...22	
6.3. Harmadik stádiumú lárvák izolálásának eredménye fűszálról	24
6.4. Az üregi és mezei nyulak fertőzöttsége	25
6.4.1. Első stádiumú lárvák megfigyelése fénymikroszkóppal.....	25
6.4.2. Boncolási eredmények	25

6.4.3 A férgek és lárvák DNS vizsgálatának eredményei	26
7. Következtetések	27
8. Összefoglaló.....	29
9. Summary	30
10. Irodalom.....	31
Köszönetnyilvánítás	35

1. Rövidítések jegyzéke

Alkalmazott rövidítések

A. cantonensis: *Angiostrongylus cantonensis*

dNTP: deoxiribóz-nukleozid-trifoszfát

MgCl₂: magnézium-klorid

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz-láncreakció)

P. oryctolagi: *Protostrongylus oryctolagi*

P. pulmonalis: *Protostrongylus pulmonalis*

P. rufescens: *Protostrongylus rufescens*

P. tauricus: *Protostrongylus tauricus*

X. obvia: *Xerolenta obvia*

Z. detrita: *Zebrina detrita*

Alkalmazott mértékegységek-rövidítések:

cm – centiméter

g – gramm

m – méter

ml – milliliter

mm – milliméter

nm – nanométer

μl – mikroliter

μm – mikrométer

2. Bevezetés

Állatorvosi körökben egyre nagyobb figyelmet kap a társállatok tüdőférgessége. A fertőzöttséget a *Metastrongylidae* főszerűség egyes tagjai idézik elő, melyek nagyobb részt a tüdő parenchymájában telepednek meg, vagy a kisebb-nagyobb légutak lumenében és annak nyálkahártyáján élnek. Széles gazdaspektrumuknak köszönhetően ragadozóknak, háziállatoknak és vadonélő patásoknak, nyúl-féléknek és rágcsálókban is megfigyelték már, sőt időnként, mint aberráns gazdában, az emberben is okozhatnak megbetegedést. A tüdőférgesség a legtöbb esetben nem jár súlyos klinikai tünetekkel, mégis fontos figyelmet kell fordítanunk a fertőzési ciklus megismerésére társ- és haszonállataink egészségének megőrzése érdekében. Ezért tanulmányoztam a tüdőférgek fertőzőképes lárváit.

A tüdőférgesség nem csak az állatorvosok számára fontos. Nemrégiben nagy publicitást kapott egy ausztráliai eset, amelyben a patkány *Angiostrongylus cantonensis* nevű tüdőférgének halálos kimenetelű agyhártyagyulladás okozott egy 19 éves fiúnál (Santee, 2018). Az *A. cantonensis* szintén a *Metastrongylus* főszerűség tagja, akárcsak az általam vizsgált *Protostrongylus oryctolagi* és *Protostrongylus pulmonalis* nevű tüdőférgek, amelyek nyulakban élnek. Az embert nem fertőző nyúl tüdőférgek tanulmányozása biztonságos, de járványtani tulajdonságainak ismerete orvosi és állatorvosi szempontból egyaránt hasznos, mivel a fejlődésük menete azonos a társállatok és az embert megbetegíteni képes tüdőférgek fejlődéséhez.

A gerincesek tüdőférgesei a fejlődésükhöz szárazföldi csigákat vesznek igénybe, s bennük érik el a végleges gazdára nézve fertőző, úgynevezett harmadik stádiumú lárvaalakot. A tüdőféreg-lárvák felvételével kapcsolatban még sok tisztázatlan kérdés van, mert nem tudjuk, hogy hogyan kerül a köztigazda csigákból a féreg a gazdába. A legtöbb tüdőféreg-gazda növényevő, szándékosan nem fogyaszt csigát. Ennek tanulmányozására kitűnő modell állat lehet a nyúl, mert a fertőzöttség tüdőféreggel gyakori, és a köztigazdák is könnyen gyűjthetőek.

A főváros határában lévő Tétényi-fennsíkon sok üregi és mezei nyúl él. A Balatoni út mellett található természetvédelmi területet csak sétálók, turisták és tereplovaglóknak járják, de egyébként háborítatlan maradt az elmúlt 20 év során, ami kedvezett a természetes vadállomány és paraziták elterjedésének is. Az itt található csigákban gyakoriak a nyulak tüdőférgének lárvái, ezért ezt a területet választottam a vizsgálatom helyszínéül.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A tüdőférgek taxonómiai besorolása, fejlődésmenté

Az általunk vizsgált, élősködő életmódot folytató *protostrongylidák* (*Protostrongylidae*) taxonómiaiilag a *Nematoda* (Fonálférgek) törzsbe, azon belül a *Metastrongyloidea* főcsaládba tartoznak. Ennek a feregcsoporthoz a kifejlett példányai az emlősállatok tüdejében, nagyobb légútjaiban élnek (Anderson, 1992). Esetenként előfordulhatnak vérerekben, izompólyákban, sőt az agyburkokban is. Gazdaspektrumuk igencsak széles, előfordulásukat leírták már vadonélő és házasított patásokban (Azimov, 1973; Boev, 1975; Cabaret, 1982), ragadozóknál (Gerichter, 1949), rágcsálókban (Chen et al, 2008), nyúlfélékben (Frölich, 1802), sőt cetfélékben is (Yamaguti, 1961).

Fejlődésmentükre jellemző, hogy közvetett módon, gerinctelen köztigazda, főleg csiga testében érik el a végleges gazdára nézve fertőző lárvállapotot. Életciklusuk első lépéseként a hörgőcskében élő, ovipar nőtény fereg petéit a tüdő parenchymájába rakja le, ahol a feregpete fejlődésnek indul, majd első stádiumú lárvává alakul át. A kikelést követő 10-12. napon a 0,35-0,50 mm hosszú lárvák feltehetőleg aktív mozgással, illetve a felköhögött hörgőváladékkal kerülnek a garatba, majd lenyelve az emésztőrendszeren keresztül, a bélsárral ürülnek a külvilágra (Kassai, 1999). A tüdőből kijutó lárvák aközben is fejlődnek, míg keresztül jutnak a gazda béltraktusán. Ezt a ténytet Babos csigafertőzési kísérlete is alátámasztotta, miszerint a bélsárból izolált első stádiumú lárvákkal 28%-kal sikerebben lehetett fertőzni a köztigazda csigákat, mint a tüdőkaparékból származó, frissen kikelt lárvákkal (Babos, 1959).

A külvilágra ürülő lárvák a bélsárban képesek hónapokig életben maradni. Erős kutikulájuk védi őket a környezeti ártalmaktól, a szárazságtól és a napsütéstől, de az állatok talajon heverő, száraz bélsárában, a hullatékban nem mozognak. Csak nedvesség esetén aktiválódnak (Cabaret et al, 1991.), és bejutnak a szárazföldi csigákba. A legtöbb házas és meztelencsigát a friss bélsár nem kifejezetten vonzza, de Boag (Boag, 1983) kísérletesen bizonyította, hogy az esőn ázott bélsárból viszont ki másznak. A csigák fertőzésére két lehetőség van. Az egyik esetben a fertőző első stádiumú lárvák a bélsarat hátrahagyva, aktívan keresik fel a csigát és furakodnak bele talpának izomzatába (Boag, 1983). A *protostrongylidák* az esetek döntő többségében a talpi részben indulnak fejlődésnek, de a köztigazda fejében is találtak már lárvákat (Erhardova és Rysavy, 1953). A fertőződés másik alternatívája akkor tud megvalósulni, ha a csiga a bélsárral együtt elfogyasztja a lárvákat és ilyen esetben átmenetileg az emésztőcsatornában is tartózkodhatnak (Samson-Holmes, 1985).

A csiga fertőzését követő 10. nap körül megtörténik az első vedlés és kialakul az első stádiumú lárvánál méretében is nagyobb, (kb. 0,6-0,8 mm hosszúságú) második stádiumú lárvá. Ekkor a lárvá testét a vékony, levedlett kutikula borítja. Az újabb növekedés és további fejlődési folyamatok hatására megtörténik a harmadik vedlés is, így alakul ki a végleges gazdát fertőzni képes harmadik stádiumú lárvá. Testét már két réteg levedlett kutikula borítja, ami a *Protostrongylus*-fajok esetében barna és harántsávozott. Csak ez képes fertőzni a gerinces gazdát, ezért „fertőzőképes” lárvának nevezzük.

A fertőzőképes lárváalakok a végleges gazdába jutásuk után a bél falán átfurakodva nagyobb vérerekbe és nyirokerekbe kerülnek. Ezt követően a mellvezetéken (ductus thoracicus) és a szíven keresztül eljutnak a tüdőbe, ahol átesnek a negyedik vedlésen. A négy vedléssel kialakult adultok a kisebb légutakba húzódnak, ahol elkezdik lerakni petéiket. A harmadik stádiumú lárvák köztigazdából való kijutásának természetes mechanizmusát eddig senki nem figyelte meg. Ismerve a nyulak táplálkozási szokásait, a kérdés megválaszolásában a mai napig nem született megegyezés a kutatók között. Az szinte biztosra vehető, hogy a nyulak szándékosan nem fogyasztanak csigát. Feltételezhető, hogy a lárvák a csiga halálát követően elhagyják azt, és így találkozhatnak a végleges gazdával (Rose, 1957), de ezt közvetlenül még senki nem figyelte meg eddig. Egyelőre még abban sem biztosak a témát kutatók, hogy a nyulak fertőzése a csigákból való kiszabadulás után, vagy azok elfogyasztásával együtt történik (Csobai és Majoros, 2012). A lárvák intrauterin fertőzését egyik kutatócsoport se tudta még megerősíteni, de egyesek ezt is feltételezik (Kralka és Samuel, 1990).

3.2. A nyulakban előforduló tüdőférgesek

Az elmúlt évszázadban számos szakirodalom született a vadnyulak tüdőférgét illetően. Először Frölich írta le „*Filaria pulmonalis*” néven, 1802-ben mezei nyúlból a *Protostrongylus pulmonalis* nevű fajt, majd száz évvel később Kamensky megalkotta a *Protostrongylus* genust és megállapította, miszerint tüdőférgességet vadnyulakban kizárólag ehhez a nemhez tartozó fajok képesek előidézni. A tüdőférges tanulmányozásának nehézségei miatt, sokáig még az egyes fajok elkülönítése sem volt egyértelmű. A kiskérődzőkben és a nyulakban lévő férgeseket sokáig egy fajba tartozónak vélték. Például Kamensky a juhban élő *Protostrongylus rufescens*-t a féreg nagy, illetve a nyúlban élő *Protostrongylus commutatus*-t a féreg kis formájaként említi (cit. Boev, 1984). Pár évtizeddel később Cameron nevezte el a Kamensky által felfedezett „nagy” formát *P. rufescens*-nek (cit. Boev, 1984). A *P. pulmonalis*-t sokáig nem tekintették külön fajnak, hanem azt gondolták, hogy a Frölich által leírt féreg a *P. rufescens* fajjal azonos

(Schulz és Kadenazii, 1949). A vita elrendezésére Babos 1961-ben megerősítette a két faj közötti lényeges különbséget a spiculumok szerkezete alapján.

Közép-Európában eddig üregi nyúlból (*Oryctolagus cuniculus*) és mezei nyúlból (*Lepus europaeus*) a *P. pulmonalis*-t (Frölich, 1802), *P. tauricus*-t (Schulz és Kadenazii, 1949) és a *P. oryctolagi*-t (Babos, 1959) sikerült kimutatni. Más földrajzi területeken az európai *Protostrongylus cuniculorum* (Joyeux és Gaud, 1946), az oroszországi *Protostrongylus kamenskyi* (Schulz, 1930) és havasi nyúlban élősködő amerikai *Protostrongylus boughtoni* (Goble és Dougherty, 1943) ismeretes a nyulakból. Magyarországon csak a *P. pulmonalis* és *P. oryctolagi* terjedt el.

A Babos által leírt *P. oryctolagi* kifejlett hím példányai 35-45 mm hosszúak és cérna vékonyságúak. A spiculum 0,31-0,32 mm, terminális végének alakja ping-pong ütőre emlékeztet. A spiculumok két oldalán található szárnyak közül a dorzálisan helyeződő a spiculum teljes hosszára kiterjed, és a terminális része előtt ered. A ventrális szárny a spiculum testének közepéről indul, és jóval rövidebb az előbb említetttnél. A spiculumot vezető gubernaculum disztális vége fogazott. A nőtény egyedek a hímeknél mindig nagyobbak, a 60 mm hosszúságot is elérhetik (Babos, 1955).

A *P. pulmonalis* adultjai általában fele akkorák, mint az előbb említett faj példányai, de a nőtény ritkán 80 mm hosszúságúra is megnőhet. A spiculumok teste rövidebb, 0,1-0,2 mm hosszú. A spiculumot vezető gubernaculum disztális vége nem fogazott (Boev, 1984).

3.3. A köztigazdák és a fertőződés módja

A nyulakban élősködő *Protostrongylus* fajok fejlődésmenetükhöz minden esetben csiga köztigazdát igényelnek. Leuckart már 1865-ben feltételezte, hogy a *P. rufescens* a fejlődésének egy bizonyos szakaszához köztigazdát igényel (Leuckart, 1865), de ezt bizonyítani csak a Hobmaier házaspár tudta 1929-ben. 1930-ban kiadott publikációjukban azt is hozzátették, hogy a feregárvák köztigazdaként csigákat használnak, de fertőzöttség mértéke a különböző fajokban eltérő (Hobmaier A. és M., 1930).

Anderson szerint a *protostrongylida* lárvák fejlődéséhez a környezetükben található legtöbb házaspár és meztelencsiga megfelelő lehet (Anderson, 1992). Elméletben valamennyi szárazföldi csiga képes továbbítani a fertőzést nyulakra, ám mégis úgy tűnik, hogy a természetes körülmények között előforduló tüdőferegárvák egyes csigafajokat jobban, másokat kevésbé preferálnak (Schulz és Skrajabin, 1940). A köztigazdákat a fertőzöttségben betöltött szerepük szerint először Schulz és Skrajabin osztotta két típusra: obligát és fakultatív köztigazdákra

(Schulz és Skrajabin, 1940). Ezen gondolon Davtjan indult tovább, aki a csigák fogékonyságát vizsgálata mesterséges körülmények között (Davtjan, 1945). Összes 20 fajt fertőzött *Protostrongylus*-lárvákkal és megfigyelte, hogy a fejlődési alakok elsősorban a szárazságtűrő (xerofil) és szárazság kedvelő (mesofil) csigafajokat részesítik előnyben, de ezeken belül is bizonyos fajokban a fejlődése gyorsabb, míg a más fajokban lassabb volt (Davtjan, 1945). Ennek alapján 5 csoportba osztotta a köztigazda fajokat:

1. Obligát köztigazdák, melyekben a fertőzés intenzitása és extenzitása is magas, és a fejlődő lárvák bennük érik el leghamarabb az infektív alakot.
2. Subobligát köztigazdák, melyekben a fertőzés intenzitása és extenzitása alacsonyabb, és a lárvák fejlődéséhez szükséges idő is hosszabb.
3. Fakultatív köztigazdák, melyekben a fertőzés extenzitása nem haladja meg a 20%-ot, a fejlődési idő bennük a leghosszabb.
4. Mortális köztigazdák, melyekben a lárvák nem érik el a nyulakra nézve fertőző formát.
5. Rezisztens köztigazdák, amelyekben a fertőzöttség egyáltalán nem tudott kialakulni.

Gerichter 1948-ban és 1951-ben folytatott kísérletei során szintén bizonyította, hogy a lárvák nem egyforma mértékben fertőzik meg a csigákat, és ennek alapján megfelelő és nem megfelelő köztigazdákra osztotta őket. Legmegfelelőbb csigaként a *Helicella obvia*-t jelölte meg (Gerichter, 1948). Ezt a csigafajt ma *Xerolenta obvia* néven ismeri a szakirodalom.

A köztigazdák fogékonyságát Georgiev és Bojko is vizsgálta Oroszországban. A csigák 2077 példánya közül kilenc fajt tudtak azonosítani. Ezek közül kiemelt jelentőségű köztigazdaként a *X. obvia*-t és a *Zebrina detrita*-t nevezék meg (Bojko és Georgiev, 2003). Három évvel később Georgiev a *X. obvia* populációk szezonálisát vizsgálta Bulgária délen fekvő területein. Arra a kérdésre próbált választ találni, hogy a köztigazda változó aktivitása milyen hatással van a *protostrongylidák* elterjedésére. Összesen 796 csiga héjátérőjét mérte le egyesével milliméter pontossággal, és ennek alapján 6 csoportra osztotta azokat: 2-4 mm, 4-6 mm, 6-8 mm, 8-10 mm, 10-12 mm és 12-15 mm közé eső példányok. Megállapította, hogy a csigák héjátérője és a bennük található féreglárvák száma egyenesen arányos a csigák életkorával, tehát a fertőzöttség az idősebb csigákban erősebb, mint a juvenilis alakokban (Georgiev, 2005). Azt a megállapítást, miszerint a fertőzöttség mértéke az életkorral nő, még korábban Cabaret írta le (Cabaret, 1982).

Hazai viszonylatban először Kassai vizsgálta 1955-ben a *X. obvia* csigák *Protostrongylus*-fertőzöttségét (Kassai, 1956). Áprilistól októberig havonta gyűjtötte a köztigazdákat egy törökbalinti juhlegelőn. A nyári hónapok mintáinak vizsgálata során figyelte meg a végleges gazdára nézve fertőző lárvalakokat, így megerősítést nyert Davtjan korábbi elmélete is, aki azt

állította, hogy a csigák fertőződésre a tavaszi hónapokban kezdődik, és ennek maximumát augusztus-szeptemberben éri el, figyelembe véve a lárvák átalakulásukhoz szükséges időt (Davitjan, 1950).

A magyarországi leporidák tüdőférgességében szerepet játszó köztigazdákról számos megfigyelést írt le Csobai és Majoros. A köztigazdák gyűjtését főleg Kiskunfélegyháza mellett végezték és az összesen vizsgált 170 darab *X. obvia* csigából 51 egyed hordozott *Protostrongylus*-lárvákat. A fertőzött egyedek talpában legtöbbször 1-2 lárvát lehetett látni, de előfordult, hogy 20-nál több fejlődési alak is látható volt. A csigák testéből aktív lárvakivándorlást nem tapasztaltak (Csobai és Majoros, 2011).

4. Célkitűzések

A nyulak tüdőférgesekkel való fertőződés körülményeiről a mai napig nem született konszenzus a kutatók között. Európaszerte számos kutatócsoport vizsgálta ezt a témát és ennek megfelelően sok elmélet is született magyarázatként, ám egyelőre nem tudták bizonyítani azokat. A Parazitológiai és Állattani Tanszék munkatársai évek óta folytatnak vizsgálatokat a nyulak gócos tüdőférgességét előidéző parazita tanulmányozásával.

A kutatáshoz 2018. májusában csatlakoztam, így az elmúlt másfél évben rendszeresen, 2-3 hetente voltam a Tétényi-fennsíkon, terepszemlén és vizsgálati anyagot gyűjteni. A fennsík ideális választásnak bizonyult a megközelíthetősége miatt. Emellett forgalmas utakkal körülhatárolt, így az itt élő mezei és üregi nyúl populáció zártnak tekinthető.

A munkát fennsíkon élő köztigazdák és nyulak természetes élőhelyeinek megfigyelésével kezdtem, majd ürüléket, fűvet és csigákat gyűjtöttem meghatározott helyekről. Elsősorban a fertőzöttség mértékét szerettem volna felmérni a Tétényi-fennsíkon, később a nyulak fertőződésének módját tanulmányoztam. A kutatásaim során az alábbi kérdések megválaszolását tűztem ki célul: van-e tényleges összefüggés a csigák fejlettsége és a bennük található *protostrongylida*-lárvák száma között? Ha nem a köztigazdák életkora, akkor milyen tényezők befolyásolják a fertőzöttség mértékét? A szezonális változások vagy a csigák életkora az erősebb módosító tényező?

A végleges gazda fertőződésének körülményeit vizsgáló szakirodalmak gyakran egymásnak ellentmondó tényeket állítanak. A kutatók egyik csoportja azt feltételezi, hogy a végleges gazdát fertőzni képes harmadik stádiumú lárvá aktívan fúrja ki magát a csiga talpából, míg egy másik elmélet szerint a tüdőféreg lárvák a csiga izmos talpának mozgása során, passzívan préselődnek ki. Ismerve a köztigazdában élősködő tüdőféreg lárvá külvilágon való túlélési esélyeit, több kérdés is felvetődött. Akár aktív, akár passzív módon történik is a kiszabadulás, mennyi esélye van a lárvának fogékony gazdaállatra találni? A kérdés megválaszolására a nyulak és csigák által preferált területekről fűmintát is gyűjtöttünk.

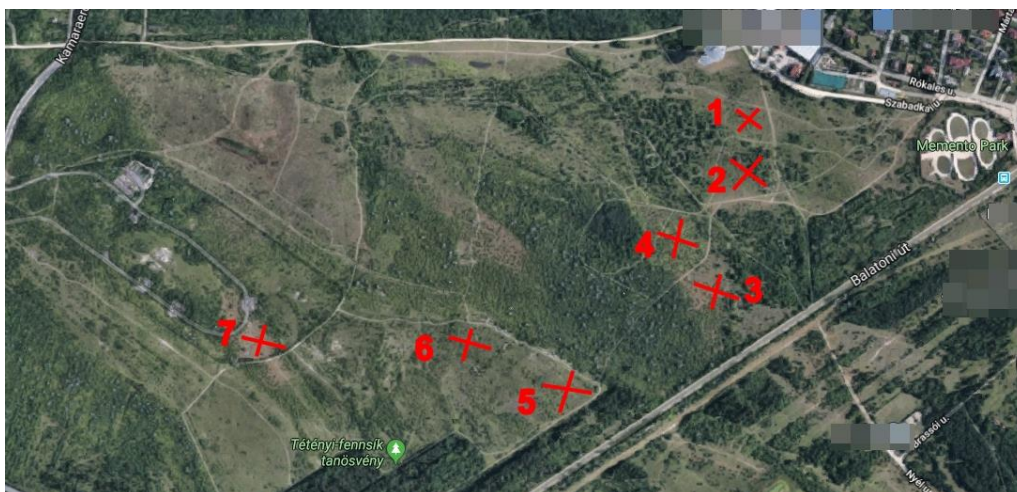
5. Anyag és Módszer

5.1. Terepi vizsgálatok a Tétényi fennsíkon

5.1.1. Bélsárminta gyűjtése

A fertőzőtség feltérképezéséhez a Tétényi-fennsíkon élő üregi és mezei nyúl populációtól két-háromheti rendszerességgel friss hullatékokat gyűjtöttem. Az első terepszemlék alkalmával megfigyeltem a területen élő nyulak ürítési szokásait, és feltérképeztem a nyulak által gyakrabban látogatott ürítő helyeket, a „latrinákat” és az ott elhullajtott, friss bélsárgolyókat összegyűjtöttem. A fennsíkon számos helyen találtam elszórtan ürüléket, illetve kisebb és kevésbé preferált latrinákat, végül rendszeresen 7 helyről szedtem a mintákat. Így a fertőzőtség mértékét hónapról hónapra nyomon tudtam követni, hiszen a gyakrabban használt ürítőhelyeken mindig találtam friss bélsarat. Annak érdekében, hogy mindig a megfelelő latrinához találjak, előzetesen GPS rendszerrel bemértem azokat (**1. ábra**).

1. ábra: A Tétényi-fennsíkon vizsgált nyulak által használt latrinák helyei



Az itt található ürüléket a kezemre húzott, tiszta műanyag zacskóval fogtam meg, majd azt kifordítottam úgy, hogy a bélsarat magába foglalja. A zacskót kiszáradás megakadályozására légmentesen lezártam. Kiemelten figyeltem arra, hogy csak a friss, 12 óránál nem régebbi (olajbarna, tömött) bélsárgolyókat szedjem fel. [A friss bélsár olajbogyó színű és kemény tapintatú.] A zacskót lezárása után felcímkéztem, amire ráírtam a pontos dátumot és területet, ahonnan a bélsárgolyókat gyűjtöttem.

Az így nyert mintákat 24 órán belül a Parazitológiai és Állattani Tanszék laboratóriumába szállítottam. Összesen 15 alkalommal végeztem hulladék minta gyűjtést az év során.

5.1.2. Fűminta gyűjtése

A fűminták gyűjtését a fennsík több, mint 20 különböző területéről sikerült megvalósítani. Elsődleges szempont volt, hogy ez olyan helyekről történjen, ahol a korábbi tapasztalatok alapján sűrű csigapopuláció él, illetve ahonnan a latrinák közelsége miatt számítani lehetett az első stádiumú lárvák megjelenésére. Eszközként ollót és kést használtam, igyekeztem a talajhoz minél közelebb vágni, hiszen a fiatalabb, 2-3 mm héjátérőjű csigák általában csak a fű tövéig másznak fel. Az így levágott szárazakat zacskóba tettem, és innen rögtön a Parazitológiai és Állattani Tanszék laboratóriumába szállítottam. Összesen 200 liternyi lágyszárú növényt gyűjtöttem.

5.1.3. Köztigazda csigák előfordulásának vizsgálata a Tétényi-fennsíkon

A fertőzöttségben szerepet játszó köztigazdák, kiváltképp a lapos kórócsiga (*X. obvia*) gyűjtését a bélsármintákkal egyidőben kezdtem meg. A tanszék munkatársai a Tétényi-fennsík, Balatoni úthoz közelebb eső területén több, mint 14 csigafajt találtak már, de ezek eloszlása nem volt egyenletes (**1. táblázat**).

A gyűjtött csigafajok a testméretük sorrendjében	Átlagos héjátérő	Gyakorisága a területen
<i>Punctum pygmaeum</i>	1 mm	Nagyon ritka
<i>Truncatellina cylindrica</i>	2 mm	Ritka
<i>Vallonia costata</i>	2,5 mm	Nem túl ritka
<i>Vallonia pulchella</i>	2,5 mm	Nem túl ritka
<i>Pupilla muscorum</i>	3 mm	Ritka
<i>Cochlicopa lubricella</i>	4 mm	Ritka
<i>Granaria frumentum</i>	7 mm	Gyakori
<i>Chondrula tridens</i>	9 mm	Ritka
<i>Helicopsis striata</i>	12 mm	Nagyon ritka
<i>Xerolenta obvia</i>	20 mm	Gyakori
<i>Zebrina detrita</i>	25 mm	Szórványos
<i>Deroceras reticulatum</i>	25 mm	Ritka
<i>Cepaea vindobonensis</i>	30 mm	Szórványos
<i>Helix pomatia</i>	40 mm	Szórványos

1. táblázat: A Tétényi-fennsíkon élő csigafajok és azok előfordulása

(Dr. Majoros Gábor közlése alapján)

A fertőzöttség kialakításában egyébként számos más csigafaj szerepét is kimutatták, de a nagyobb méretű csigák közül a fennsíkon a tavalyi év során főleg a *X. obvia* fordult elő, így a 2018-ban gyűjtött és vizsgált csigák túlnyomó többségét ez alkotta. Érdekesség, hogy idén három alkalommal végzett terepszemlém során némely helyen a zebracsiga (*Zebrina detrita*) volt a gyakoribb, így abból is gyűjtöttem 20 példányt.

Az általam tanulmányozott *X. obvia* a fennsíkon elszórt foltokban, kisebb populációkban él. Egy-egy ilyen területen akár több száz különböző méretű és életkorú csiga található, de a nagy egyedsűrűségű foltok határán kívül viszont egyáltalán nem fordul elő. Aktivitásukat főleg a reggeli órákban, illetve naplementét követően figyeltem meg, ugyanis a szárazságot és a meleget nem tűrik, így főleg reggelente vagy esténként történt a mintavételezés is.

5.1.4. Köztigazda csigák gyűjtése

Több, mint 2000 csigát sikerült összeszednem a nyúl-latrinák közeléből, ezek egy része csak üres héj volt. A gyűjtést igyekeztem mindig kora délelőtt, vagy késő délután-kora estére időzíteni, amikor a csigák fokozottabb aktivitása miatt könnyen észrevehetőek. A nyári nagy szárazságok idején ez kiemelten igaz volt, ám egy borús, csapadékosabb hétvégén a nap bármely szakaszában lehetett szedni őket. Az év első felében főleg a lágyszárú növények szárán és levelén, majd a nyár kezdetétől a száraz, vastagabb szárátmérőjű kórókon találhatóak meg. A 2019-es évben 3 alkalommal voltam a fennsíkon mintákat gyűjteni (2. táblázat).

Gyűjtés időpontja	Gyűjtött csigák faja	Gyűjtött csigák példányszáma (db)
2018. 05. 12.	<i>X. obvia</i>	123
2018. 05. 27.	<i>X. obvia</i>	367
2018. 06. 10.	<i>X. obvia</i>	96
2018. 06. 24.	<i>X. obvia</i>	78
2018. 06. 24.	<i>Z. detrita</i>	5
2018. 07. 21.	<i>X. obvia</i>	196
2018. 07. 21.	<i>Z. detrita</i>	6
2018. 08. 26.	<i>X. obvia</i>	143
2018. 08. 26.	<i>Z. detrita</i>	3
2018. 09. 16	<i>X. obvia</i>	67
2018. 09. 30.	<i>X. obvia</i>	129
2018. 09. 30.	<i>Z. detrita</i>	2

2018. 10. 12.	<i>X. obvia</i>	260
2018. 11. 02.	<i>X. obvia</i>	125
2018. 11. 02.	<i>Z. detrita</i>	4
2018. 11. 03.	<i>X. obvia</i>	84
2018. 11. 11.	<i>X. obvia</i>	15
Összesen		1703 [20 <i>Z. detrita</i> és 1683 <i>X. obvia</i>]

2. táblázat: A tavalyi év során gyűjtött köztigazdák

5.2. Laboratóriumi vizsgálatok

5.2.1. Lárva izolálása

A nyulak bélsarából és a területen gyűjtött lágyszárú növényekről az első stádiumú lárvákat Baermann-féle lárvaizolálással mutattam ki. A módszer a lárvák hidrotropizmusán alapul, miszerint az ürülékben található első stádiumú féreglárvák vízzel érintkezve elhagyják azt, és a vízben leülepednek az edény aljára, mivel úszni nem tudnak.

Gyermekökölnyi mennyiségű bélsarat harisnyába csomagoltam, azt a tengelye körül megtekertem és a harisnyát újra ráhúztam a csomóra. Ezt a műveletet még háromszor megismételttem. Ekkor a többretegű nejlonharisnya lyukátmérője 50-150 mikrométer volt. A csomagot ezután egy 250 ml űrtartalmú talpas, csúcsos fenekű ülepítő pohárba helyeztem, és annyi langyos vizet öntöttem rá, hogy a becsomagolt mintát teljesen elfedje, de elmerülni ne tudjon. Minimum 2, de maximum 24 órára napsütötte helyre helyeztem a poharat, mert a napfény, illetve a meleg víz fokozza a lárvák aktivitását. Az ülepítési idő leteltével a mintát a szitaszövettel együtt eltávolítottam a pohárból, ügyelve arra, hogy a pohár tartalmát ne kavarjam fel. Ez idő alatt a lárvák folyadék hatására, a szűrőként funkcionáló harisnyán át elhagyták a bélsarat, és a pohár aljára kerülnek. A következő lépésben egy 1 ml-es pipetta szűkebb végét az ülepítő pohár alján összegyűlt üledékbe merítettem. A tágabb, felső végét befogva 0,2-0,3 ml folyadékot engedtem a pipettába. Ügyeltem rá, hogy a folyadék a lemez széléről ne folyjon le. A fertőzöttség megfelelő kimutatása érdekében több tárgylemezre is cseppentettünk, így nagyobb eséllyel találtuk meg a lárvákat.

Ugyanezen a módon vizsgáltam meg a fűmintákat, csak azokból labda nagyságú, harisnyával bevont csomagokat készítettem, és vödörben áztattam. A vödörben képződött üledéket csúcsos poharakba öntöttem, és pipettával szippantottam fel a mikroszkópos vizsgálat céljára.

A tárgylemezre helyezett cseppeket fénymikroszkóp alatt vizsgáltam tovább. Ehhez 40-60x-os nagyítást alkalmaztam, hiszen már ekkor is megfigyelhető a lárvák élénk mozgása a folyadékban. Mivel a talajban nagyon sok, nem parazita életmódot folytató fonálféregfaj él, így a vizsgálat során ezek is megtalálhatóak. A tüdőféreg lárvák és az előbb említett szabadon élő férgek elkülönítése fontos volt a vizsgálat során. Az általam keresett *Protostrongylus* lárvák nyelőcsőve dudor („bulbus”) nélküli hosszú cső, azaz morfológiáját tekintve filariform, míg a talajlakó, szabadon élő férgek nyelőcsővének proximális vége kidudorodó, rhabditiform, ami a nyelőcsővön található, gömbölyded bulbusról lett elnevezve. Előbbi esetben a nyelőcső fonalszerű, ami csak folyadékok felvételére alkalmas, így a parazita lárva a kívülágon nem táplálkozik. A rhabditiform nyelőcsővel rendelkező férgeknek ez fontos szerepet játszik a szilárd képletek, pl. baktériumok, egysejtűek elfogyasztásában. A nyelőcső megfigyelése nehézségekbe ütközhet, hiszen a lárvák a fénymikroszkóp lámpája által felmelegített tárgylemezen sokszor nagyon aktívan mozognak. Ha a tárgylemezen lévő folyadékra 1-2 csepp jódot-oldatot cseppentettem, a lárvák megbénultak. A szabadon élő nematoda-lárvák az oldattól sárga színűre festődtek, míg a tüdőféreg lárvák teljesen áttetszőek maradtak: üvegszerű testük és jellegzetes morfológiájú farki végük jól vizsgálható lett.

5.2.2. Köztigazda csigák fertőzőtségének vizsgálata

5.2.2.1. Élő csigák vizsgálata

A begyűjtött csigákat 250 ml-es, fedéllel zárható üvegpohárba tettem és 1 dl vízzel színültig felöntöttem, majd lezártam. Pár óra múlva az élő példányok a vízből menekülve, az edény falára és fedelére másztak. Ezen a módon jól el tudtuk különíteni az élő, de házába mélyen visszahúzódott, illetve a szállítás közben elpusztult egyedeket.

Az üveg falán és a fedél tetején mászó csigák kinyújtott talpát egy nagyító segítségével vizsgáltam, keresve a szabad szemmel is látható, barna színű, felcsavarodott 0,2-0,3 mm-es lárvákat (**5. ábra**). Forrásban lévő vízbe merítéssel előltem a csigákat. Minden csigát 70%-os etil-alkoholban konzerváltam, de a fertőzöttnek talált példányokból mélyhűtőben helyeztem el DNS-kivonásra, majd PCR vizsgálatra alkalmas állapotban néhány példányt.

5.2.2.2. Konzervált csigák vizsgálata

A csigák héját mérőjét alkoholból kivéve egyenként tizedmilliméter pontossággal sztereomikroszkóp segítségével lemértem, majd a héjukat összetörtem és eltávolítottam annak érdekében, hogy meg tudjam vizsgálni az izmos talpi részt. Olló segítségével elválasztottam a talpat és a fejet a zsigerektől és a talpat körülvevő köpenytől. Ez főleg a nagyobb, idősebb

csigák esetében fontos, ahol a csiga emésztőtraktusában maradt szerves törmelékek akadályozza a talp átláthatóságát a későbbi fénymikroszkópos vizsgálat alatt.

A csigatalpat és fejet egy alkoholos filccel előre felszámozott sejtenyésző edény (microplate) rekeszeibe helyeztem, amibe egyszerre 24 mintát tudtam tenni. Ezt követően 1:4 arányban vízzel hígított tejsavat öntöttem rájuk, a csiga méretétől függően annyit, amennyi a szervdarabot éppen elfedte. Erre a műveletre azért volt szükségem, mert az így tárolt talpak a tejsav hatására 2 nap múlva áttetszőkké és puhákká váltak. A folyamat gyorsítása érdekében meleg szárítószekrénybe tettem a tálcákat, aminek hatására a csiga talpában lévő víz hamarabb el tudott távozni, és helyét a tejsav tudta átvenni.

A talpakat a rekeszekből kivéve egyesével két tárgylemez közt összenyomtam és fénymikroszkóp alatt, 40x-es nagyítás alatt vizsgáltam. Meghatároztam a bennük lévő tüdőféreg lárvák számát, fejlettségi állapotukat. A barna színű, harmadik stádiumú lárvákat sokszor mikroszkóp nélkül, szabad szemmel is könnyen észrevettem. A második stádiumú lárvák megtalálása nehezebb volt, mert kutikulájuk színe teljesen áttetsző, ezért csak a féreg körvonalát lehetett látni. Minden példányban megszámoltam a féreg lárvák számát, és ezeket az adatokat a héjak mérete szerint csoportosítottam.

Logisztikus regresszióval vizsgáltuk a csigákban talált lárvák mennyiségét a héjátérő és a gyűjtési idő függvényében. A modellillesztés első lépéseként a két magyarázó változót, és ezek interakcióját is belevettük a modellbe, majd egyesével elimináltuk a nem szignifikáns változókat. Az elemzésekhez a „Language and Environment for Statistical Computing 2019” programot használtuk (R Core Team, 2019).

5.3. Lőtt üregi és mezei nyúl tüdők vizsgálata

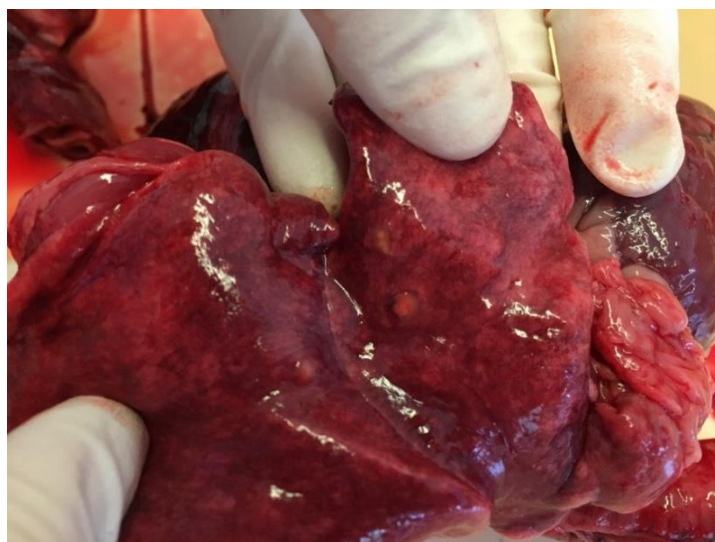
A férgek azonosításához az ország több pontjáról kaptam lőtt üregi és a mezei nyúl tüdőket (3. táblázat).

Dátum	Honnan	Faj	Mennyiség (db)
2018.11.12	Szeged	Mezei nyúl	14
2018.12.02	Hanság, Bősárkány	Mezei nyúl	30
2018.12.26	Tétényi fennsík	Mezei nyúl	1
2019.01.19	Hanság, Bősárkány	Mezei nyúl	1
2019.03.11	Sopron	Üregi nyúl	1
Összesen:			47

3. táblázat: A vizsgált nyúl tüdők száma és származási helye

A tüdőkben tömött gócot és azokban kifejlett férgeket kerestem (2. ábra). Ezekre a területekre rámeteszve és arra egy tárgylemezt nyomva lenyomati készítményeket is csináltam, majd fénymikroszkóp alatt kerestem a petéket és a lárvákat, amelyek a kifejlett férgek jelenlétét jelezték. Hegyes csipeszekkel fellazítottam a tüdő állományát és a bennük található cérnavékony, adult férgeket tárgylemezre óvatosan kiemeltem. A morfológiai vizsgálathoz és a két faj elkülönítésére a hímek párzószerveit használtuk. Az identifikáció megerősítésére néhány adult férget tettünk félre DNS-kivonásra és PCR vizsgálatra. Először 70%-os etil-alkoholt tartalmazó Eppendorf-csőbe tettem azokat, amit tanszéki mélyhűtőben helyeztem el.

2. ábra: Mezei nyúl tüdőjének boncolás során talált, tömött tapintatú gócok.



5.3. A lárvák és a kifejlett férgek előkészítése PCR vizsgálatokra

A boncolás során izolált férgeket a fénymikroszkóp alatt végzett morfológiai azonosítás után molekuláris módszerekkel is vizsgáltuk. Az üregi és mezei nyúl tüdőférgeinek elkülönítésére a köztigazda csigákból kiszedett lárvák és a boncolás során nyert adultok 28S riboszomális RNS-ét kódoló és a riboszóma ITS (internal transcribed spacer) részét kódoló DNS génszakaszt használtuk, mert ennek a két génszakasznak a szekvenciája a fajok elkülönítésére használható a *Nematodák* esetében. A nukleinsav megsokszorozására és azonosítására PCR technikát választottuk, ami alkalmas a specifikus nukleinsav szekvenciák in vitro sokszorozására, illetve akkor is alkalmazható, ha a minta kis mennyiségű DNS-t tartalmaz.

A molekuláris vizsgálatot Lesage és munkatársai által publikált módon végeztük (Lesage et al, 2014). Az első feladat a DNS kivonása volt. Annak kiderítésére, hogy a reakciók alapját képező minta, és annak állapota, mennyire befolyásolja a végeredményt, több előkészítési módszert is kipróbáltunk. Először a konzervált csigatalpából kigyűjtött 4 lárvát 70%-os etil-alkoholban mostuk, majd a későbbiekben részletezett módon eltávolítottuk az alkoholt. Ebben az esetben kíváncsiak voltunk, hogy az etil-alkohol milyen mértékben módosítja az eredményeket. Alkoholos kezelés nélküli csigatalpából kiperéselt további 6, illetve 8 lárvát fedő- illetve tárgylemezre szárítottunk. Ezen felül egy 20 illetve 2 darab lárvát tartalmazó csigatalpat egészen a lárvákkal együtt konzerváltuk és dolgoztuk fel. Végül a csigából post mortem kiszabadított, majd alkoholba tett 10, illetve 11 lárvát tartalmazó két mintát is megvizsgáltunk. A négyféle módon kinyert és konzervált lárvák kimutatható nukleinsav tartalmát összehasonlítottuk.

Az etil-alkoholban fixált, kifejlett férgeket először tárgylemezre helyeztük. Annak érdekében, hogy az alkohol a későbbi reakciókat ne zavarja, többször desztillált vizet pipettáztunk a mintára, majd itatóspapíron leitattuk a felesleget. Ezzel a művelettel az etil-alkoholnak csak egy részétől szabadultunk meg, ezért a férgeket 200 µl desztillált vizet tartalmazó Eppendorf csövekbe helyeztük. Fél óra elteltével, amikor a vizsgálati minták a cső aljára süllyedtek, megszabadultunk a maradék alkoholtól is. A férgek testét tiszta Eppendorf csőbe helyeztük.

A DNS kivonásához és megsokszorozásához a „QIAamp DNA mini kit”-et alkalmaztuk, a gyártók által javasolt lépések szerint.

A lárvákra és a férgekre 200 µl ALT puffert és 20 µl protein-kinázt pipettáztunk. Az így előállított szuszpenziót 10 másodpercig az asztali keverőgépen összekevertük, majd 60 °C-os inkubátorba helyeztük 1 órára. A folyamat végén nyert áttetsző oldatra 200 µl AL puffert

mértünk rá, mely megállította az enzimatis folyamatokat. A megemésztett anyagokra további 200 µl abszolút etanolt pipettáztunk és 10 másodpercig asztali keverőgépen alaposan összekevertük, majd DNS-kötő filtert tartalmazó, mini centrifugacsövekbe töltöttük át. A mintát 2 percig 15000 G gyorsulással centrifugáltuk asztali centrifugában és az így visszamaradó folyadékot pedig kiöntöttük. A nukleinsav megkötődése után fennmaradó szennyező anyagokat egymás után következő mosási lépésekben távolítottuk el. Először 400 µl mosópuffer 1-et adtunk hozzá, majd 15000 G gyorsulással, fél percig centrifugáltuk. Utána 400 µl mosópuffer 2-vel, 15000 G gyorsulással 3 percig mostuk. A centrifugálás után a felülúszót mind a két esetben leöntöttük a mintáról.

A filteren lévő nukleinsavat elúciós pufferben oldottuk le. Egy tiszta Eppendorf csövet helyeztünk a filter alá, és 100 µl AE jelzésű oldatot mértünk rá, majd állni hagytuk szobahőmérsékleten 1 percig, majd 1 percig centrifugáltuk 15000 G gyorsulással. Az így nyert leoldott, tisztított nukleinsav közvetlenül felhasználható volt a további folyamatokhoz, illetve +4 °C-on tárolható a későbbi felhasználás céljára.

A reakciókhoz szükséges primereket Lesage és mtsai által írt cikk alapján készítettük elő (Lesage et al, 2014). A további reakciókhoz Dream Taq mastermix-et alkalmaztunk, amely 0,625 egység mesterségesen módosított Taq DNS-polimerázt, 1-szeres reakciópuffert, 1,5 mmol MgCl₂-ot és 0,2 mmol dNTP-t tartalmazott.

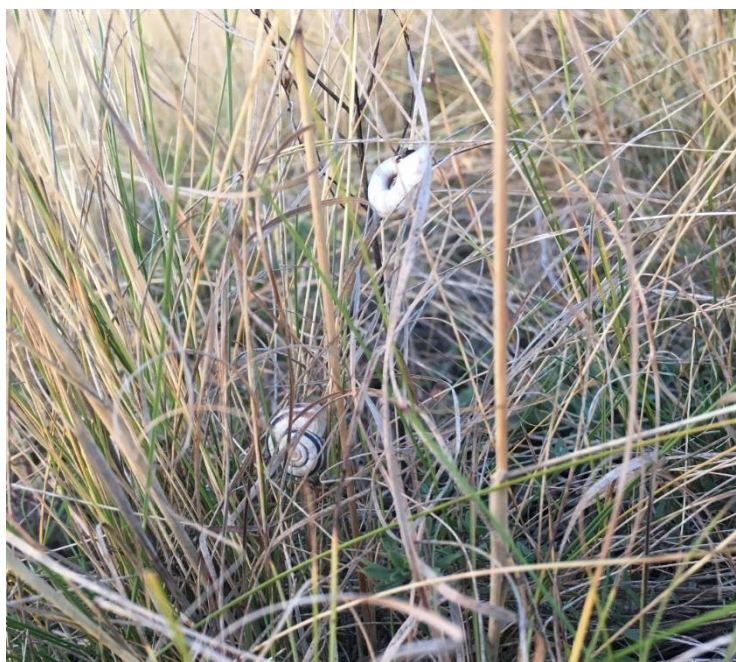
Az így nyert PCR termékekben lévő DNS jelenlétét agaróz gélben, gélelektroforézissel detektáltuk. A 1,5%-os gél elkészítéséhez 1,8 g agaróz port és 60 ml IX TBE oldatot használtunk. A keveréket másfél percig mikrohullámú sütőben felforraltuk, majd folyó víz alatt fél percig hűtöttük. A még folyékony gélhez 5 µl etídium-bromidot öntöttünk, ami így megfestette azt. A gél futtató kádba töltöttük és hagytuk fél óráig megszilárdulni. A PCR mintákból, illetve az ismert szekvenciájú *P. oryctolagi* és *P. pulmonalis* primerekből, a kontrollként működő, nukleinsavat nem tartalmazó premixből, és a nukleinsavak hosszúságát mérő DNS keverékből kimértünk a gél felületén lévő apró vájatokba, majd egy óráig futtattuk azokat. Az így kapott DNS csíkokat UV megvilágítás alatt detektáltuk. Azokat a mintákat, amelyek DNS-e a pozitív kontrolloknak megfelelő magasságban voltak, az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontba küldtük szekvenálásra. Az így kapott szekvenciákat a GenBank adatbáziséval összehasonlítva azonosítottuk.

6. Eredmények

6.1. Terepszemle eredménye

A terepi vizsgálataimat a Tétényi-fennsíkon végeztem, ami a fővárostól mindössze 15 km-re található, a Duna-Ipoly Nemzeti Park részeként számontartott természetvédelmi terület. A felszínét borító talaj és növényzet rendkívül változatos, egyes területein csupasz mészkő foltokkal tarkított, máshol bozótosokkal körülvett sztyeprét. Az itt található növénytakarót számos gyepalkotó lágyszárú növény, természetes eredetű és telepített cserje hozza létre. A tüdőférgességben szerepet játszó köztigazda csigák nyaranta főleg a pázsitfűvek és a kétszikű lágyszárúak szárán, levelén, vagy azok tövében találhatók meg (**3. ábra**). Általában a nap hűvösebb időszakában, illetve esős, párásabb időjárás esetén mozognak. Száraz időben akár napokig, sőt hetekig is mozdulatlanok lehetnek.

3. ábra: A köztigazda, *X. obvia* természetes élőhelyén



A Tétényi-fennsíkon eddig összesen megfigyelt 14 fajt az előfordulásukat tekintve két csoportba lehetett sorolni. Vannak a ritkán előforduló, kisebb héjátérőjű fajok, illetve a szórványosan, vagy gyakran fellelhető, nagyobb átmérővel rendelkező csigák. A fertőzés kialakításában szerepet játszó *Protostrongylus* lárvákat a korábbi vizsgálatok során csak a *Xerolenta obvia* és *Cepea vindobonensis* csigákból sikerült kimutatni (Majoros et al, 2019), ezért a gyakori és gyakran lárvákat is tartalmazó *X. obvia* volt a vizsgálat alanya.

A fennsíkon a *X. obvia* eloszlása inhomogénnek tekinthető. Terepszemléim során általában 100-200 egyedből álló, néhány négyzetméternyi területen szétszóródott egyedekből álló populációkat figyeltem meg, és ezek területek egy éven belül nem változtak.

A fennsíkon az nyulak folyamatosan jelen voltak, amit a friss hullatékot tartalmazó latrinák bizonyítottak. A vizsgálatok időszakában rendszeresen találtam frissen kotort nyúl üregeket a bozótosok közelében, és gyakran látogatott latrinákat a sziklagyepek közepén. A nyulak által gyakran látogatott latrinákban élő köztigazdákat nem sikerült gyűjtenem, de előfordult, hogy az üregi nyúl latrináiban vagy a mezei nyúl hullatéka mellett üres csigaházakat találtam (**4. ábra**). Ilyen esetben nem lehetett eldönteni, hogy a csiga a már a bélsár ürítésekor azon a helyen volt-e, vagy azután került oda.

4. ábra: A friss nyúl-bélsárcupac mellett talált *X. obvia* üres héja



6.2. Köztigazda csigák fertőzöttsége

6.2.1. Az élő csigák vizsgálatának eredménye

A laboratóriumba való szállítás után életben maradt csigák, a víztől menekülve, a pohár szélére és a fedő tetejére másztak fel. Kinyújtott talpukban barna pontokként lehetett látni a harmadik stádiumú lárvákat (**5. ábra**). A csigák mozgása folyamán lárvakivándorlást nem tapasztaltam.

- 5. ábra:** Az élő *X. obvia* csigák talpának felszínén sötétbarna pontok formájában áttűnnek a harmadik stádiumú, *Protostrongylus* lárvák.



6.2.2. Csigák boncolásának és fénymikroszkópos vizsgálatának eredménye

A tavasztól ősz végéig összesen 1701 *X. obviát* gyűjtöttünk, amelyek közül 205 egyed volt fertőzött. A fertőzött példányokból 165 tartalmazott 1-5 darab harmadik stádiumú lárvát, 19 egyedben találtunk 5-10 darabot, és 21 csiga talpizomzatában 10 darab feletti lárvát számoltunk. (4. táblázat).

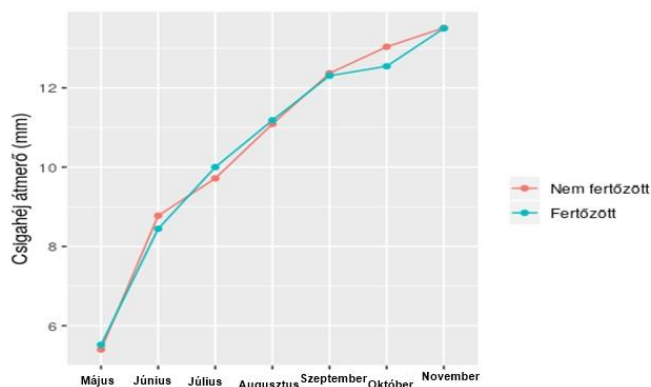
	1-5 darab lárvá	5-10 darab lárvá	10 darabnál több lárvá
Fertőzött köztigazdák száma	165	19	21
	Összesen: 205 darab		

4. táblázat: A fertőzött köztigazdák megoszlása a lárvaszámtól függően

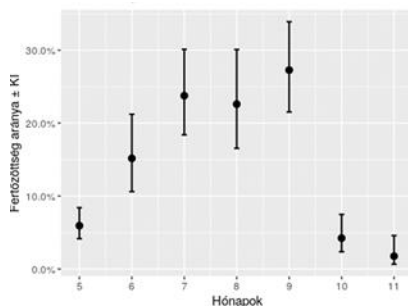
Május hónapban a legtöbb fertőző stádiumú lárvát a 4,5 mm héjátérővel rendelkező csigák tartalmazták, összesen 15 egyed, míg júniusban a 8-9 mm átmérőjűek voltak a legfertőzöttebbek. Augusztus végére a leginkább fertőzött csigák héjának átmérője 10 mm-re nőtt. A legtöbb lárvá, amit egy augusztus 26-án gyűjtött, 10 mm héjátérőjű csiga talpában számoltam, 115 példány volt. Októbertől kezdődően a csigák héjának növekedésével arányos módon csökkent a fertőzöttség mértéke. Ebből a hónapból származó 260 *X. obvia* csigából mindössze 11 volt fertőzött, többségében 1 lárvát találtam bennük. Novemberben 228 vizsgált csigából 5 bizonyult fertőzöttnek.

A csigák átlagos héjátérője növekvő tendenciát mutatott a hónapok során (**5. ábra**). A tavaszi hónapokban a kisebb, 5 mm alatti átmérővel rendelkező csigák voltak a gyakoriak, míg őszi felé közeledve már 10 mm alatti héjátérőjű csiga nem is fordult elő a gyűjtött példányok között.

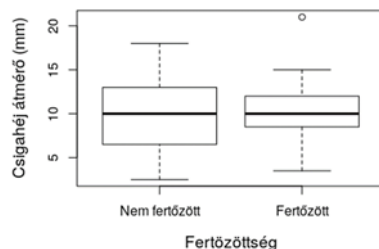
6. ábra: A fertőzött és nem fertőzött csigák átlagos héj átmérőjének változása az eltelt idő függvényében.



7. ábra: A *X. obvia* csigák gyűjtésének ideje és a fertőzöttségük közötti összefüggés.



8. ábra: A *X. obvia* csigák héjánagysága és a fertőzöttségük közötti összefüggés



A felállított statisztikai modellek alapján egyedül a gyűjtés időpontjának volt szignifikáns ($p=0.121$) hatása a fertőzöttség valószínűségére (**6. ábra**). A *protostrongylida*

lárva előfordulása a meleg nyári hónapok, illetve szeptember során volt leginkább megfigyelhető. Bár a csigák az év folyamán növekedtek (**8. ábra**), a héjátérő és a fertőzöttség közötti összefüggés nem volt bizonyítható, mert mind a fertőzött és nem fertőzött csigák esetében az átlagos héjátérő 10 cm körüli értékre esett (**7. ábra**).

A konzervált csigák talpa a tejsav hatására pár nap alatt puha és áttetsző lett. A fertőzött példányok izomzatában legtöbbször barna színű, feltekeredett, bordázott kutikulájú, harmadik stádiumú *Protostrongylus*-lárva lehetett látni (**9. ábra**), de ritkán, főleg a nyár elején vizsgált csigákban, átlátszó, 2. stádiumú lárva is találtam. A csigákban általában vagy csak 2. stádiumú, vagy csak 3. stádiumú lárva figyeltem meg, egy példánytól eltekintve, amelyben mindkét fejlettségi állapotú lárva előfordult. A talpon kívül a csiga egyéb szervében fejlődési alakokat nem láttam. A fertőzöttség a 10-12 mm átmérővel rendelkező csigákban, ősszel volt a legintenzívebb.

9. ábra: *X. obvia* csiga talpában található, bordázott kutikulával rendelkező harmadik stádiumú lárva (Dr. Juhász Alexandra felvétele)



6.3. Harmadik stádiumú lárva izolálásának eredménye fűszálról

A fűvek áztatására használt víz üledékéből mintát vettünk és fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk, de tüdőféreg-lárva egy alkalommal sem tudtuk abban kimutatni. Ezzel ellentétben a minták sok szabadon élő fonálféreg-lárva tartalmaztak, amelyeket rhabditiform nyelőcsőjük és szemcsés bélcsatornájuk alapján ismertünk fel.

6.4. Az üregi és mezei nyulak fertőzöttsége

6.4.1. Első stádiumú lárvák megfigyelése fénymikroszkóppal

A Tétényi-fennsíkon élő üregi és mezei nyúl latrinák bár télen és nyáron is tartalmaztak ürüléket, viszont a köztigazdát fertőzni képes, első stádiumú lárvákat csak május és november közötti időszakban tudtuk abból izolálni. (10. ábra). A mintákban ezen kívül más parazitákat is találtunk, például *Passalurus*-, *Cittotenia*-, *Dicrocoelium*-, *Trichuris*- és trichostrongylida-fajok fajok petéit.

10. ábra: A nyúl bélsarából izolált, üvegszerűen átlátszó tüdőféreg lárvák. (Dr. Majoros Gábor felvétele)



6.4.2. Boncolási eredmények

Összesen 47 nyúl tüdejének vizsgálatára nyílt lehetőségünk, amiből 46 származott mezei nyúlból, 1 pedig üregi nyúlból. A Szeged környékéről származó mezei nyúl tüdők mindegyikében találtunk gócos elváltozásokat és férgeket is. Ezekből a szervekből 14 *P. oryctolagi* férget sikerült izolálnunk. Az ország nyugati részéről (Hanság, illetve Sopron) származó tüdőkben nem találtunk jelentős fertőzöttségre utaló jeleket, de 3 *P. pulmonalis* példányt gyűjtöttünk belőlük. A *P. oryctolagi* példányok gubernaculumának vége a fajra jellemzően apró dudorokat viselt (11. ábra), míg a *P. pulmonalis* példányoknál ez a képlet teljesen sima felszínű volt. A Tétényi-fennsíkról származó egyetlen mezei nyúl tüdejéből nem tudtunk *Protostrongylus*-férgeket kimutatni.

11. ábra: *P. oryctolagi* hím farki vége. A vízszintesen álló barna villa a gubernaculum, aminek vége fogazott oldalú (Dr. Majoros Gábor felvétele)



6.4.3 A férgek és lárvák DNS vizsgálatának eredményei

Az ITS-t és a 28S génszakaszok vizsgálata megerősítette, hogy a Szeged mellől származó mezei nyulak tüdejében talált férgek *P. oryctolagi* példányok voltak, míg az ország nyugati feléből származó tüdőkben *P. pulmonalis*-t mutatott ki a molekuláris vizsgálat.

A Tétényi-fennsíkról gyűjtött, *X. obvia* csigák talpából kinyert és molekuláris vizsgálatra félretett lárvák mindegyikéből a *P. oryctolagi* faj jelenlétét igazolta a szekvenciák összehasonlítása.

7. Következtetések

Vizsgálatainkkal a témában korábban ismert szakirodalmi adatokat többnyire megerősíteni tudtuk. Azt tapasztaltuk, hogy természetes körülmények között az idősebb, nagyobb héjátmérővel rendelkező csigák lárvahordozása sokkal gyakoribb jelenség, mint a kisebb átmérőjű, juvenilis egyedek esetében. Ennek alapján kimondható lenne, hogy a tüdőférgesség fenntartásában a nagyobb testű csigáknak van szerepük. Mégis úgy tűnik, hogy a fertőzöttség kialakulását nem csak a csigák mérete és életkora, de az életmódjukat befolyásoló környezeti viszonyok is szabályozzák. Láttuk, hogy a nyár folyamán a csigák a növekedésükkel párhuzamosan fertőződnek, de ez nem jelenti azt, hogy a kisebb csigákban kevesebb lárvá telepszik meg, mint a nagyobbakban. A csigák aktív időszakában, nyáron minden életkorú csiga fertőződni tud a lárvákkal, tehát elvileg bármelyik életkorú csiga lehet a nyulak fertőződésének forrása. A szeptember utáni időszakban gyűjtött csigákban a testméretüktől függetlenül megritkulnak a lárvák, ezért feltételezhető, hogy a csigák őszi viselkedésének hatása van a lárvák sorsára. Ezt mi magunk nem tudtuk vizsgálni, de például Cabaret és Everling megfigyelte, hogy azokból a csigákból, amelyek a fűszálakon mászkáltak, több lárvát lehetett izolálni, mint azokból a példányokból, amelyek inkább a talajhoz közel mozogtak (Cabaret és Everling, 1987). Statisztikai elemzéseink azt sugallják, hogy a nyár végén valamilyen esemény történik a csigákkal, amely drasztikusan csökkenti a lárvával fertőzött példányok számát. Lehetséges, hogy a fertőzött példányok nagyobb valószínűséggel pusztulnak el, mint a nem fertőzöttek, de az is lehetséges, hogy a csigák egy része megszabadul a lárváktól. Az előbbi esetben feltételezhető, hogy a nyulak (vagy valamely más állat?) táplálékai lesznek, vagy spontán módon pusztulnak el. Mindezen lehetőségeket további vizsgálatoknak kell tisztázniuk.

Az a tény, hogy eltérő fejlődési stádiumú lárvák csak nagyon ritkán fordulnak elő egyszerre ugyanazon csigának a talpában, azt támasztja alá, hogy a köztigazdák életük során többnyire csak egy alkalommal találkoznak az első stádiumú lárvákkal, amikor megfertőződnek. Az a tény viszont, hogy egy csigában különböző korú lárvák is előfordulhatnak, arra utal, hogy a csiga nem válik immunissá az ismételten bekövetkező fertőzésekkel szemben. Az immunitás alacsony szintje valószínűtlenné teszi, hogy a lárvákat a csiga kilökje magából, bár ezt a mechanizmust nemcsak az immunitás, hanem más folyamat is előidézheti.

A terepi vizsgálatok alapján nem jellemző, hogy a nyulak által látogatott hulladék depókban, a latrinákban csigák mászkálnának, ami a csigák fertőzési esélyeit rontja. Ugyanakkor a bélsárból kiszabaduló, első stádiumú lárvák szárazságtűrő képessége kiváló számít, mivel még a száraz bélsárgolyókból is minden esetben tudtuk izolálni azokat. Ezzel szemben az esőáztatta

hullatékból *protostrongylida* lárvát nem tudtunk kimutatni. Lehet, hogy azok elhagyják a hullatékot, amikor alkalmuk nyílik rá.

A mezei nyulakban talált tüdőféreg morfológiai és molekuláris vizsgálata egyaránt bizonyította, hogy a *P. pulmonalis* és a *P. oryctolagi* fajok nem gazdaspecifikusak, noha az előbbi fajt mezei nyúlból, az utóbbit üregi nyúlból írták le. Ez az eredmény összhangban van francia szerzők megállapításaival, akik mindkét féregfajt megtalálták a mezei nyúlban (Lesage et al, 2014). A két féregfaj elterjedésében és életmódjában lehetnek különbségek, ezért lehetséges, hogy egy adott területen csak az egyik vagy csak a másik faj fordul elő.

A csigákból kipreparált lárvákból jól kivonható a DNS, és a PCR reakció működik abban az esetben is, ha a csigatalpat egészben dolgozzuk fel. A lárvákat borító három kutikuláris burok sem akadályozza a molekuláris vizsgálatokat. A Tétényi-fennsíkon élő csigákban kimutatott *P. oryctolagi* valószínűleg nemcsak az ott élő üregi nyulakat, hanem a mezei nyulakat is fertőzni képes, ezért ha a bélsárból molekuláris vizsgálatokkal meghatároznánk az abban előforduló lárvák fajtát, az nem bizonyítaná, hogy az ürüléket melyik nyúlfaj hullatta.

8. Összefoglaló

A nyulak tüdőférgességét okozó *protostrongylidák* lárvái a szárazföldi csigákban érik el a harmadik lárvastádiumukat. Ez a lárvastádium képes fertőzni a nyulat. Magyarországon leggyakrabban a közönséges kórócsiga, a *Xerolenta obvia* hordoz *protostrongylida* lárvákat, köztük a nyulak tüdőférgesének lárváit is. Az viszonylag könnyen érthető, és kísérletileg igazolható, hogy a csiga milyen úton fertőződik a nyúl ürülékében lévő lárvákkal, de azt még senki sem állapította meg, hogy a nyúlba miképpen kerülnek bele a fertőzőképes lárvák.

A mai napig nem született megegyezés a kutatók között arról, hogy az alapvetően növényevő nyúl megeszi-e a csigákat, vagy a lárvák kimásznak a csigából a fűre, és ilyen módon kerülnek az állat szájába. Ennek a kérdésnek gyakorlati jelentősége van, mert más egyéb, csigákat rendszeresen nem fogyasztó állat, például a kutyák és a macskák, továbbá az ember is fertőződhet olyan lárvákkal, amelyek szárazföldi csigákban fejlődnek. Ezért adatokat kívántunk szerezni a lárvák és a csigák kapcsolatáról. Megvizsgáltuk, hogy a Tétényi-fennsík egyik rétjén van-e összefüggés a csigák fejlettsége és lárvatartalma között, illetve mutat-e valamilyen szezonálisitást a lárvák gyakorisága?

A tavasztól őszi végéig, kétheti időközzel összesen 1701 *X. obvia* csigát gyűjtöttünk és minden példányban meghatároztuk a féreglárvák számát. A csigák fejlettségét a héjuk mérete alapján becsültük meg. A csigák gyűjtésével egyidejűleg megvizsgáltuk a talajon heverő nyúlbélsár lárvatartalmát, és két alkalommal kb. 200-200 liter térfogatú fűmintát is gyűjtöttünk azokról a helyekről, ahol a *Xerolenta* csigák mászkáltak a növényeken. Mikroszkópos vizsgálattal meghatároztuk a lárvák fejlettségének mértékét is.

A csigahéjak mérete nem befolyásolta szignifikánsan a csigában megtelepedett lárvák számát, de mivel a nyári hónapokban és az őszi elején gyűjtött csigákban volt a legtöbb lárvák, a fertőzés gyakorisága szezonálisra enged következtetni. A csigákkal egyidejűleg gyűjtött nyúl ürülék is főként ugyanebben az időszakban tartalmazott lárvákat, a téli hónapok alatt viszont egyáltalán nem. A nyulakat fertőzni képes, harmadik stádiumú lárvát a lágyszárú növényekről sem a nyári, sem a téli hónapokban nem sikerült izolálni.

Feltételezzük, hogy a csigák nyári aktivitása alatt egyre több lárvák kerül beléjük, de minden életkorú csigába képes behatolni a féreglárvák. Ezért arra az időszakra, amikor a csigák már tömegesen mászkálnak a fűszálakon, a kisebb és a nagyobb csigák is fertőzöttek lesznek. Mivel télen, a talajfelszínen nincsenek csigák, a lárvák őszi kulminációja összefüggésben kell hogy legyen a nyulak fertőződésének módjával, ami ezek szerint időszakos jelenség.

9. Summary

The larvae of *protostrongylid* worms, which cause nodular lungworm disease in rabbits, reach their third larval stage in terrestrial snails. Only this stage of larvae is able to infect the rabbit. In Hungary, usually the common heath snail, (*Xerolenta obvia*), carries *protostrongylid* larvae, including larvae of rabbit lungworms. It is relatively easy to understand and experimentally verify the way how the snail becomes infected by the larvae getting from the rabbit faeces, but no one has yet proved the way how infectious larvae enter the rabbit.

To date, there is no consensus among scientists whether the predominantly herbivorous rabbit eats the snails or the larvae crawl out of the snail onto the grass and thus enter the animal's mouth. This issue is of practical importance because other animals that do not regularly eat snails, such as dogs and cats, and humans also can become infected with larvae that develop in land snails. Therefore, we wanted to obtain data on the relationship between larvae and snails. We examined whether there is a correlation between the development of snails and their larval content in one of the meadows of the Tétényi Plateau and whether the frequency of larvae shows any seasonality.

From spring to late autumn, we collected a total of 1701 *X. obvia* snails at fortnightly intervals and determined the number of worms in each specimen. The development of the snails was estimated on the basis of their shell size. Simultaneously with the collection of the snails, the larvae content of the rabbit faeces collected on the ground was examined, and we also collected approximately 200-200 litres of grass samples twice in those places where *Xerolenta* snails crawled on the plants. The degree of larval development was also determined by microscopic examination.

The size of the snails did not significantly affect the number of larvae settled in the snail, but since most larvae were collected in the summer months and in early autumn, the frequency of infection suggests seasonality. The rabbit faeces collected at the same time as the snails also contained larvae mainly during the same period, but not at all during the winter months. Third-stage larvae that could infect rabbits could not be isolated from herbaceous plants in either the summer or winter months.

We presume that during the summer activity of snails, more and more larvae intrude into them, but the larvae can penetrate snails of all ages. Therefore, by the time the snails are crawling in large numbers on the leaves of grass, both smaller and larger snails will be infected. Since there are no snails on the soil surface in winter, the peaking in the number of larvae should be related to the way the rabbits are infected, which seems to be a seasonal phenomenon.

10. Irodalom

1. Anderson, R. C., 1992.: Nematode parasites of vertebrates, Their development and transmission. *CAB International*, Wallingford, UK. p. 154-175.
2. Audousset, J. C., Rondelaud, D. 1989.: Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 7, p. 217–22
3. Azimov, D. A., Ubaidullaev, Y. V., Zimin, Y. M. 1973.: Protostrongylid disesaes of sheep and goats (In Russian) *Veterinariya* p. 66-88.
4. Babos, S. 1955.: Über die Lungenhelinthiasis der Hasen und Wildkaninchen in Ungarn. *Acta Veterinaria, Acad. Sci. Hung.*, 5/2. p. 167-169.
5. Babos, S. 1959.: Vizsgálatok a magyarországi leporidák tüdőférgességéről. *Kandidátusi értekezés*, Budapest, MTA Állategészségügyi Kutató Intézet, p. 1-121.
6. Bailey, S. E. R. 1989.: Foraging behavior of terrestrial gastropods: integrating field and laboratory studies. *J. Moll. Studies*, 55. p. 263-272.
7. Boag, D. A. 1983.: The response of terrestrial snails to the presence of ungulate feces, a source of nematode larvae (*Metastrongyloidea: Protostrongylidae*). *Can. J. Zool.* 61: p. 1852-1856.
8. Boev, S.N. 1975. Basics of Nematodology. *Protostrongylidae*. Moscow, *Nauka Publishers*, Vol. 25.
9. Boev, S. N. 1984.: Protostrongylids. Calcutta, *Oxonian Press Pvt. Ltd. New Delhi*. p.1-338.
10. Cabaret, J.: L'infestation des chèvres par *Muellerius capillaris* au pâturage. Roles des larves infestantes libérées après la mort des limaces hôtes intermédiaires. *Ann. Parasitol.* 1982. 57. p. 637-638.
11. Cabaret, J., Everling, J.P. 1987.: Les protostrongylidoses des ovins en garrigue: interet de l'etude des mollusques hotes intermediaires [*Metastrongylidae*, *Pseudotachea splendida*. *Acta Oecologica Oecologia Applicata*, 8 (2), p. 111-123.
12. Cabaret, J. 1991.: Survival of sheep and goat first stage protostrongylid larvae in experimental conditions: influence of humidity and temperature, *Journal of Helminthology*, 65, p. 201-207.
13. Candrian, U., Lüthy, J. 1991, Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik, *Chimia*, 2010. Vol. 45, p. 49–52.
14. Chen, X.G., Lai, D.H., Lun, Z.R., Wang, Q.P., Zhu, X.Q. 2008.: Human angiostrongyliasis, *Lancet Infect Dis.* 8:621–30.
15. Cordero del Campillo, M., Castañón Ordoñez, L.: Epidemiology of ovine protostrongylidosis. *Pro Veterinario* (Upjohn Co.) 1989. 9/1 2-3.
16. Csobai, E., Majoros, G. 2011.: A nyulak tüdőférgének kötigazdái és a végleges gazda fertőződésének módja. *A Békés Megyei Múzeumok Közleményei* 34. Békéscsaba, Békés Megyei Múzeumok Igazgatósága, p. 39-76.
17. Davtjan, E. A. 1947.: Sravitelnaja vospriimchivost molluskov k invazirovaniju lichinkami *M. capillaris*, *C. nigrescens*, i *Synthetocaulus* spp. (Comparative susceptibility of molluscs to larval infection of *M. capillaris*, *C. nigrescens*, i *Synthetocaulus* spp.) [in Russian] *Trudi Arm. NIVI, Armgosizdat, Jerevan*, 5. p. 3-20.
18. Davtjan, E. A. 1949.: Cikl. razvityija nematod legkih oves i kou Armenii. [in Russian] *Zool. Szb. A. N. Arm. Nyivi*. p. 185-263.
19. Davtjan, E. A. 1950.: Gynamika zarazsennisztjy molljuszkov licsinkami cisztokaula i protosztrongilov v esztyesztvennih uszlovijah [in Russian] *Trudi Arm. Nyivi*. 7. p. 121-124.

20. Erhardova, B., Rysavy, B. 1953.: Effect of the external environment on pre-invasive stage of *Müllerius capillaris* Müller, 1889, *Chekhoslovatskaia Biol.*, 2 (1) p. 39-43.
21. Froelich, J.A., 1802: Beitrage zur Naturgeschichte der Eingewedewurmer, *Der Naturforscher*, 29, p. 5-96.
22. Fryer, S. F., Probert, A. J. 1988.: The cercarial output from three Nigerian bulinids infected with two strains of *Schistosoma haematobium*. *Journal of Helminthology*, 62, p. 133-140
23. Gregoriev B., Gregoriev D. M. 2002.: Terrestrial Gastropods as Intermediate Hosts of Protostrongylid Nematodes in Pastures for Sheep and Goats in the Region of Stara Zagora, Bulgaria, *Acta Zoologica Bulgarica*
24. Georgiev, B., Kostadinova, A., Georgiev, D. M. 2003.: Land snails in the transmission of protostrongylids on pastures in Southern Bulgaria: variability of infection levels related to environmental factors. *Acta Parasitologica*, 48, 3, p. 208-217.
25. Gregoriev, D. M. 2005.: Seasonal changes in morphology among populations of land snail *Helicella obvia* and effects of these changes on circulation of Protostrongylids in pastures of Stara Zagora, South Bulgaria
26. Gerichter, C. B. 1948.: Observations on the life history of lung nematodes using snails as intermediate hosts. *American Journal of Veterinary Research*, 9 (30), p. 109-112.
27. Gerichter, C. B. 1949.: Studies on the nematodes parasitic in the lungs of Felidae in Palestine. *Parasitology*, 39. p. 251-262.
28. Goble, F.C., Dougherty, E.C. 1943: Notes on the lungworms (genus *Protostrongylus*) of varying hares (*Lepus americanus*) in eastern, North America, *J Parasitol*, 29:397-404
29. Handeland, K., Gibbons, L. M., Skorpung, A. 2001: Experimental *Elaphostrongylus cervi* infection in sheep and goats. *J. Comp. Path.* 23. p. 248-257.
30. Hobmaier, A., Hobmaier, M. 1930.: Life history of *Protostrongylus rufescens*. *Society for Experimental Biology and Medicine*, Volume: 28 issue: 2, p. 156-158
31. Joeux, C., Gaud, J. 1946.: La Recherches helminthologiques Marocaines. *Arch. de l'Inst. Pasteur de Maroc*. 3. 6. p. 383-461.
32. Kassai, T. 1956.: Tanulmány a juhok gócos tüdőférgességéről különös tekintettel a *Cytocaulus ocreatus*ra, *Kandidátusi értekezés*, p. 78-85.
33. Kassai, T. 1957.: Vizsgálatok a juh tüdőférgességéről. III. rész: A juh-protostrongylidák köztigazdái hazánkban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 12./6. p. 169-172.
34. Kassai, T. 1999.: Veterinary Helminthology, Oxford, *Butler Worth Heinemann*, 9.
35. Kassai, T. 2011.: Helminológia, *Magyar Állatorvosi Kamara*, p. 1-369.
36. Kassai, T., Holló, F. 1957.: Vizsgálatok a juh tüdőférgességéről. V. rész: A hazai juh-tüdőférgék I. lárváinak differenciáldiagnózisa. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 12. p. 232-234.
37. Kendall, S. B., McCullough, F. S. 1951.: The emergence of the cercariae of *Fasciola hepatica* from the snail *Limnaea truncatula*. *J. Helminthology*, 24. p. 77-92.
38. Kralka, R. A., Samuel, W. M. 1984.: Emergence of larval *Protostrongylus boughtoni* (Nematoda: Metastrongyloidea) from a snail intermediate host and subsequent infection in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Parasitol.* 70. p. 457-458.
39. Kralka, R. A., Samuel, W. M. 1990.: The lungworm *Protostrongylus boughtoni* (Nematoda, Metastrongyloidea) in gastropod intermediate hosts and the snowshoe hare, *Lepus americanus*, *Can. J. Zool.* Vol. 68. p. 2576-2575.
40. Kutz, S. J., Hoberg, E. P., Polley, L. 1999.: Experimental infections of muskoxen (*Ovibos moschatus*) and domestic sheep with *Umingmakstrongylus pallikuukensis* (Nematoda: Protostrongylidae): parasite development, population structure, and pathology. *Canadian Journal of Zoology*, 77. p. 1562-1572.

41. Kutz, S. J., Hoberg, E. P., Polley, L. 2000.: Emergence of larvae of *Umingmakstrongylus pallikuukensis* from three gastropod intermediate host species. *J. Parasitol.*, 86(4). p. 743-749.
42. Lesage, C. et al. 2014.: *Protostrongylus pulmonalis* (Frölich, 1802) and *P. oryctolagi* Baboš, 1955 (Nematoda: Protostrongylidae), parasites of the lungs of European hare (*Lepus europaeus* L.) in France: morphological and molecular approaches, *Parasitol Res*, 113. p. 2103–2111.
43. Leuckart, K. G. F. R. 1865.: Bericht iiber die wissenschaftlichen Leistungen in der Naturgeschichte der niederen Thiere wahrend der Jahre 1864 und 1865. (Erste Halfte.) *Arch. Naturg.* 31. J, 2. p. 165-268.
44. Majoros, G., Fukár, O., Farkas, R. 2010.: Autochthonous infection of dogs and slugs with *Angiostrongylus vasorum* in Hungary, *Veterinary parasitology*, 174(3-4), p. 351-4
45. Majoros, G. 1985.: Csigák gyűjtése talajmintákból. *Malakológiai Tájékoztató* 6. p. 5-18.
46. Majoros, G. 2015.: Állatorvosi parazitológiai diagnosztika I. Általános parazitológia és protozoológia. *Egyetemi jegyzet*, Állatorvostudományi Egyetem, p. 14-15.
47. Majoros, G. – Juhász, A. – Szabó, D. 2019.: A protostrongylidák és köztigazdáik kapcsolatának vizsgálata a nyulak gócos tüdőférgességét okozó fajok lárváinak segítségével, *Magyar Állatorvosok Lapja*, Megjelenés alatt
48. Martinez-Morales, E. 1967.: Sobre algunos factores de la infestacion ovina con *Protostrongylidos*. *Anna. Fac. Vet. Leon*, 13. p. 109-134.
49. Matekin, P. V., Turligina, E. S., Shalaeva, E. M. 1954.: К биологии легоchnikh протостронгилid овets i koz v sviazi s epizootologiei protostrongileza v Srednei Azii. (Biology of lung protostrongylids of sheep and goats int he context of epizootiology of protostrongylosis in Central Asia) *Zoologicheskij Zhurnal*, 33/2, p. 373-394.
50. Patai, K. 2005.: Az éti csiga (*Helix pomatia* L.) nyári aktivitásának és elhullásának vizsgálata. *Állatorvosi szakdolgozat*, SZIE-AOTK Parazitológiai és Állattani Tanszék
51. R Core Team: A Language and Environment for Statistical Computing, family, *R Foundation for Statistical Computing*, 2019, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org>
52. Rausch, D. 2010.: A juhok protostrongylida lárvákkal való fertőződésének lehetőségei *Állatorvosi szakdolgozat*, SZIE-AOTK Parazitológiai és Állattani Tanszék
53. Rose, J. H. 1957.: Observations on the larval stages of *Muellerius capillaris* within the intermediate hosts *Agriolimax agrestis* and *A. reticulatus*. *J. Helminth.* 31/1-2. p. 1-16.
54. Rosen, L., Ash, L.R., Wallace, G. D. 1970.: Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet). *American Journal of Veterinary Research* 32, p. 131-143.
55. Samson, J., Holmes, J. C. 1985.: Modes of entry of first-stage larvae of *Protostrongylus stilesi* and *Protostrongylus rushi* (Nematoda: Metastrongyloidea) in the snail intermediate host *Vallonia pulchella*. *Can J. Zool.* 63: p. 2481-2482.
56. Sandee, L. 2018.: He ate a slug on a dare, became paralyzed and died. [Internetes dokumentum], URL:<https://edition.cnn.com/2018/11/05/health/man-dies-after-eating-slug-on-dare/index.html>, Megtekintve: 2018. 11. 28.
57. Sauerländer, R. 1979.: *Cepaea nemoralis* (*Helicidae*, *Stylommatophora*) als experimenteller Zwischenwirt für *Muellerius capillaris* (Protostrongylidae, Nematoda). *Zeitschr. Parasitenkd.*, 59. p. 53–66.
58. Seniczak, A., Seniczak, S. 2019.: Seasonal Dynamics of Oribatid Mites (Acari, Oribatida) in a Bog in Poland. *Wetlands* p. 1-12.
59. Smyth, J. D. 1976.: Animal parasitology (3rd ed.) Cambridge, *University Press*, p. 1-549.
60. Spratt, D. M. 2015.: Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 4. p. 178–89.

61. Sréter, T., Széll, Z., Marucci, G., Pozio, E., Varga, I. 2003.: Extraintestinal nematode infections of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. *Vet Parasitol.* 115. p. 329–334.
62. Schulz, R.S., Skrajabin, K. I. 1940.: Basis of general helminthology, *Akad. Nauk. SSSR*, p. 88-106.
63. Schulz, R.S., Kadenazii, A.N. 1949: Filogeneticheskie svyazi legochnih nematode grizunov i parnokopitnih. *Dokladi, Akad. Nauk. SSSR*, 69. p. 707–709.
64. Székely, D. 2007.: A protostrongylida lárvák és köztigazdáik kapcsolatának tanulmányozása természetes és laboratóriumi körülmények között. *Szakdolgozat. SZIE-ÁOTK*, Budapest
65. Yamaguti, S. 1961.: Systema Helminthum III. The Nematodes of Vertebrates I. *Interscience Publ. Inc.*, N.Y. p. 492–513.
66. Zdárská, Z. 1960.: Larvální stadia cizopsných cervu z našich suchozemských plzu. [A csehszlovákiai szárazföldi csigákban előforduló parazitikus féreglárvák] *Ceskoslovenská parazitologie*, 7. p. 355-379.

Köszönetnyilvánítás

Dolgozatom végéhez érve szeretném köszönetemet és nagyrabecsülésemet kifejezni a témavezetőim, Dr. Majoros Gábor és Dr. Juhász Alexandra számára. Munkám jelentős részében szakmai segítségemre voltak, nélkülük valószínűleg nem jöhetett volna létre a szakdolgozatom. Szeretném megköszönni nekik értékes tanácsaikat, építő jellegű kritikáikat, illetve azt a türelmet és bátorítást, amire szükségem volt egy-egy nehezebb periódusomban.

Köszönettel tartozom Fehérvári Péternek, aki szabadidejét nem sajnálva segítette munkám statisztikai részét értelmezni.

Köszönöm a családomnak, akik a tereplátogatásokat családi programként kezelték, és minden alkalommal elkísértek a Tétényi-fennsíkra, nélkülük a mintaszám fele se sikerült volna.

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”).

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Szabó Dóra Bettina
Elérhetőség (e-mail cím): Szabadorabettina@gmail.com
A feltöltendő mű címe: A gyors tudásfelfrissítés 900 példányt tartalmazó
digitális tanulmánykötete a nyelvi próbatételre készült mintamunkák
A mű megjelenési adatai: 2019.
Az átadott fájlok száma: 1.

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 másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, 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 anyagrészt 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 címeire) 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:**

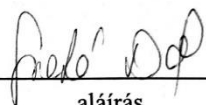


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

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 törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év11.....hó ...21...nap



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, szolgáltatassa, 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. Majoros Gábor igazolom, hogy
Szabó Dóra Bettina

..... (a hallgató neve)
A gyors tudáselérkezést elősegítő paravirtuális dinamizáló tanulmányozási a nyúlak polastangyida-érzelmű modelleu

című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 21.

Dr. Majoros Gábor
Majoros Gábor

a témavezető neve és aláírása

Paravirtuális és Alattani
Tanszék

tanszék

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Juhász Alexandra igazolom, hogy

Szabó Dóra Bettina (a hallgató neve)

A fentebb tudatott hallgató Dr. Juhász Alexandra
tanulmányozása a nyelvi protokoll alapján, mint modellel
című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 21.

.....
Dr. Juhász Alexandra, Juhász Alexandra

a témavezető neve és aláírása

Parazitológiai és Allatani

Tanszék

tanszék

Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

Alulírott Szabó Dóra Bettina..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címe A csecstüdők részét szedő paraziták szexuális
dinamfájának tanulmányozása a nyúlak protostrongylosisán mint modellel
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a 2019
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019. 11. 21......

Szabó Dóra Bettina
Szabó Dóra
a hallgató neve és aláírása