

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA

Hungarian Veterinary Journal
Vol. 142. No. 9. – Budapest, September 2020.
Established by Prof. B. Nádaskay, 1878

*Lymphoid-sejtes beszűrődés pulyka ülőidegében
Marek-betegség során*

SERTÉS

Sertések *Mycoplasma hyorhinis* okozta megbetegedése

BAROMFI

A Marek-betegség előfordulása a hazai pulykaállományokban

KISÁLLAT

Az áramlási citométer, mint a lymphoma diagnosztikájában alkalmazható eszköz az állatorvosi onkológiában

BAKTERIOLÓGIA

Állati eredetű, meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek vizsgálata MALDI-TOF MS-módszerrel

PARAZITOLÓGIA

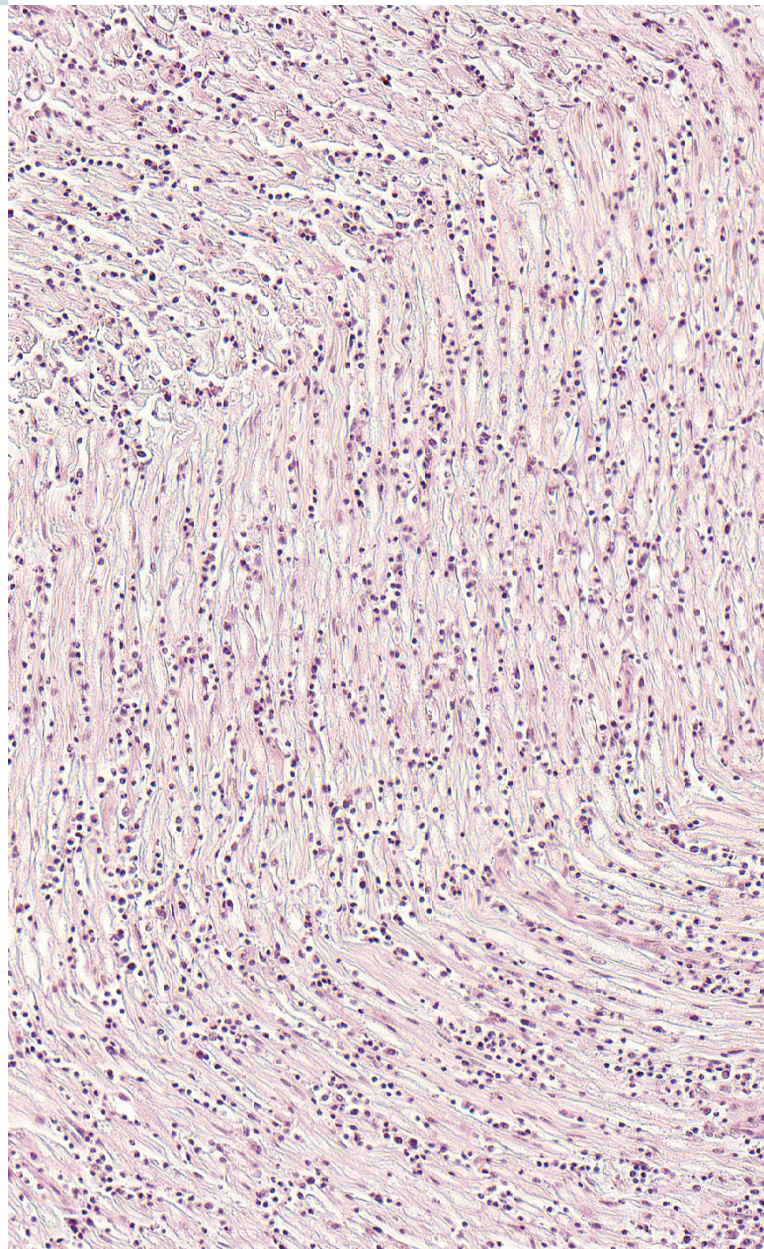
A vörös róka (*Vulpes vulpes* L.) ürülékének parazitológiai vizsgálata

TAKARMÁNYOZÁSTAN

A rozmaringsav hatásai a haszonállatokban

HIRDETÉS

MSD sajtóközlemény



AZ ELANCO ÜDVÖZLI A BAYER ÁLLATEGÉSZSÉGÜGYET



**Az Elanco és a Bayer
Állategészségügy
összeolvadása
egy még jobb
Elanco vállalat
létrehozásának
érdekében történik.**

Mindannyian elkötelezettek vagyunk abban, hogy egy szélesebb termékportfólióval, egyedülálló szolgáltatással és támogatással tegyünk közösen az állatok egészségéért, az emberek jobb életéért és a bolygónkért.



SERTÉS / PORCINE

- 515.** Földi D., Kreizinger Zs., Gyuranecz M.: Sertések *Mycoplasma hyorhinis* okozta megbetegedése
D. Földi, Zs. Kreizinger, M. Gyuranecz: *Mycoplasma hyorhinis* infection in swine

BAROMFI / POULTRY

- 525.** Nemes Cs., Simonyai E., Dr. Szajkiné Szalay D., Turbók J., Thuma Á.: A Marek-betegség előfordulása a hazai pulykaállományokban
Cs. Nemes, E. Simonyai, D. Dr. Szajkiné Szalay, J. Turbók, Á. Thuma: Occurrence of Marek's disease in Hungarian turkey flocks

KISÁLLAT / SMALL ANIMALS

- 531.** Karai E., Dékay V., Vajdovich P.: Az áramlási citométer, mint a lymphoma diagnosztikájában alkalmazható eszköz az állatorvosi onkológiában
E. Karai, V. Dékay, P. Vajdovich: Flow cytometer as a diagnostic tool for lymphoma in veterinary oncology

BAKTERIOLÓGIA / BACTERIOLOGY

- 545.** Horváth B., Peles F., Albert E., Erős Á., Sipos R., Szűcs K. D., Micsinai A.: Állati eredetű, meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek vizsgálata MALDI-TOF MS-módszerrel
B. Horváth, F. Peles, E. Albert, Á. Erős, R. Sipos, K. D. Szűcs, A. Micsinai: Characterization of livestock-associated *Staphylococcus aureus* strains by MALDI-TOF MS technique

PARAZITOLÓGIA / PARASITOLOGY

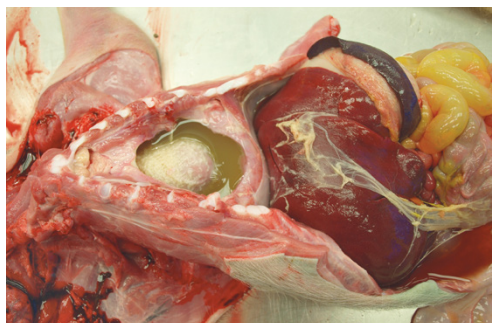
- 553.** Majoros G., Udvari L., Juhász A.: A vörös róka (*Vulpes vulpes* L.) ürülékének parazitológiai vizsgálata
G. Majoros, L. Udvari, A. Juhász: Coprological examination of red fox (*Vulpes vulpes* L.) droppings

TAKARMÁNYOZÁSTAN / ANIMAL NUTRITION

- 567.** Pomothy J. M., Barna R. F., Pásztiné Gere E.: A rozmaringsav hatásai a haszonállatokban Irodalmi összefoglaló
J. M. Pomothy, R. F. Barna, E. Pásztiné Gere: The effects of the rosmarinic acid in livestock animals Literature review

HIRDETÉS

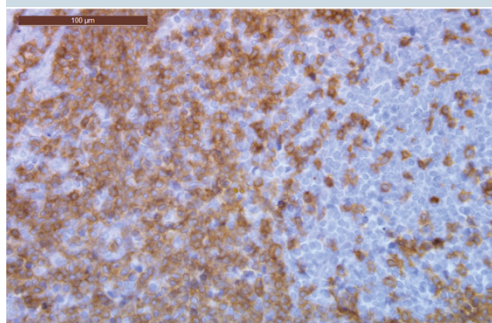
- 552.** MSD sajtóközlemény



518. *M. hyorhinis* okozta savóshártya-gyulladás



528. Marek-betegség pulykában



539. T-sejtes lymphoma kutyában



559. Sporulált *Isospora* oociszta rókahullatékban

A folyóiratot indexeli és referálja/The journal is indexed and abstracted by: CAB Abstracts (CABI), Science Citation Index Expanded, Zoological Record, BIOSIS previews (Thomson Reuters), Scopus (Elsevier).
Tartalom/Contents: Current Contents – Agriculture, Biology & Environmental Sciences (Thomson Reuters)

Ingyenes mutatószám kérhető a főszerkesztőtől/Free sample copies are available from the editor-in-chief: H-1078 Budapest, István utca 2. Hungary
Megrendelhető a fenti címen a szerkesztőségtől/
Subscription orders to the Editorial Office (address above)

*** Internet address
(English contents pages, subscription price, etc.)
<http://www.univet.hu/mal>



Rizsföldi haltenyésztés

JANUS DUBRAVIUS először 1547-ben megjelent, a *Halastavakról és a bennük nevelt halak természetéről* szóló, tudós, és a *vagyon gyarapítását segítő* öt könyvében beszámol arról, hogy MÁTYÁS király a tatai vár mellett létesített halastavába a Dunából „a delfinhez hasonló halakat, vizákat hozatott...”, és ezzel ejtette ámulatba BEATRIX királynét, a pápai legátust és a velük lévő cseh előkelőket. A vizák csak rövid ideig maradtak élve a tóban, de más fajok számára – cseh mintára, többek között DUBRAVIUS részletes útmutatása alapján – számos halastó létesült országszerte.

DUBRAVIUS nem ismerhette még azt a speciális tófaját, amit az Alföldön járva itt-ott láthatunk. Méteres gáttal körülvett, szabályos alakú területek ezek, amelyeket ma többnyire legeltetésre, gabona- vagy zöldségfélék termesztésére használnak. Az 1950-es években rizst próbáltak bennük termesztetni, és Európában elsőként pontytenyésztésre is felhasználták őket. Sok helyen a hozzájuk vezető csatornahálózat is működik – a horgászok örömére. WOYNAROVICH ELEK mellett a száz esztendeje született SZALAY MIHÁLY közreműködésével 1952-ben létrehozta a szarvasi Haltenyésztési Kutatóintézetben a rizsföldi kísérleti állomást és az ehhez tartozó kiegészítő tógazdaságot, amelynek eredményeit, tapasztalatait WOYNAROVICH könyvben, SZALAY több cikkben ismertette. Az 1954-es sajtófotó a rizsföldeknek a haltenyésztés igényeinek megfelelő átalakítását mutatja be.

A rendszerváltás után a hazai rizstermelés visszaszorult, ám az alkalmazott műtrágyák és rovarirtó szerek miatt már régóta szóba se jött a halászati hasznosítás. A klímaváltozás, a kevésbé vízigényes rizsfajták kitenyésztése, valamint a bioélelmiszerek iránti megnövekedett igény azonban megváltoztatta a helyzetet, és újra felmerült a rizs legveszélyesebb kártevőinek, az aknázó rizslégynek és a rizsszűnyognak a lárváit fogyasztó halivadékok telepítése az ökológiai gazdálkodással működő rizsföldekre. Ebben az ötvenes évekbeli kutatási eredményekre, tapasztalatokra is lehet támaszkodni.

Az agrár- és állatorvosi végzettséggel egyaránt rendelkező SZALAY MIHÁLY rövidre szabott, küzdelmes élete alatt kutatóként, oktatóként, minisztériumi osztályvezetőként, majd a Haltenyésztési Kísérleti Intézet igazgatójaként fáradhatatlanul és komplex megközelítéssel foglalkozott számos problémával, például kombinált kacsá- és halhús-termelési eljárások kidolgozásával, pontytörzsek teljesítményvizsgálattal, ivadék- és árupontytáp összeállításával és TÓTH SÁNDORRAL együtt kifejlesztett egy drótkötélpályán futó csillerendszert, amelyben a halakat szállították a tavak között.

Orbán Éva

FŐSZERKESZTŐ / EDITOR-IN-CHIEF

Dr. BALKÁ Gyula

SZERKESZTŐBIZOTTSÁG / EDITORIAL BOARD

Dr. Abonyi Tamás
 Dr. Balka Gyula (elnök), Dr. Bándy Pál
 Dr. Bíró Ferenc, Dr. Bodó Gábor
 Dr. Búza László, Dr. Dunay Miklós Pál
 Dr. Farkas Róbert, Dr. Fekete Sándor György
 Dr. Fodor László, Dr. Gál János
 Dr. Gálfi Péter, Dr. Gönczi Gábor
 Dr. Jakab Csaba, Dr. Jerzsele Ákos
 Dr. Korzenszky Emőd, Dr. Laczay Péter
 Dr. Magyar Tibor, Dr. Manczur Ferenc
 Dr. Molnár Viktor, Dr. Nagy Béla
 Dr. Nemes Imre, Dr. Németh Tibor
 Dr. Ózsvári László, †Dr. Sályi Gábor
 Dr. Seregi János, Dr. Solti László
 Dr. Sótonyi Péter, Dr. Szieberth István
 Dr. Tóth Balázs, †Dr. Tuboly Tamás
 Dr. Varga János, Dr. Vetési Ferenc
 Dr. Visnyei László, Dr. Vörös Károly

SZERKESZTŐSÉGI TITKÁR

Tóth Zsuzsanna

SZERKESZTŐSÉG / EDITORIAL OFFICE

H-1078 Budapest, István u. 2. Hungary
 Levélcím: 1400 Budapest 7. Pf. 2.
 Telefon/fax: (36-1) 341-3023
 Internet: <http://www.univet.hu/mal>
 E-mail: mal@univet.hu

KIADÓ / PUBLISHER

Herman Ottó Intézet Nonprofit Kft.
 H-1223 Budapest, Park u. 2.
 Telefon: (36-1) 362-8100
 Telefax: (36-1) 362-8104
 Internet: www.agrarlapok.hu
 E-mail: info@agrarlapok.hu
 Felelős kiadó: Bozzay Péter ügyvezető

HIRDETÉSEK FELVÉTELE

Telefon: (36-70) 232-4231, (36-1) 362-8100
 Telefax: (36-1) 470-0410
 E-mail: info@agrarlapok.hu

Minden jog fenntartva. A lapból értesítéseket átvenni csak a Magyar Állatorvosok Lapjára való hivatkozással lehet. A hirdetések és egyéb reklámkiadványok tartalmáért a kiadó felelősséget nem vállal.

LAPTERV

made by zwoelf – www.zwoelf.hu

TERVEZŐSZERKESZTŐ

Pintéerné Tóth Viktória

NYOMÁS

Hivatalos Biztonsági Okmány- és Jegynyomda Kft.
 Felelős vezető: Kratochwill Balázs vezérigazgató

INDEX: 25531
 HU ISSN 0025-004X

LAPTULAJDONOS



KIADÓ



***Mycoplasma hyorhinis*
infection in swine**

D. Földi¹
Zs. Kreizinger¹
M. Gyuranecz^{1,2,*}

**Sertések *Mycoplasma hyorhinis*
okozta megbetegedése**

Földi Dorottya¹, Kreizinger Zsuzsa¹, Gyuranecz Miklós^{1,2,*}

1. Agrártudományi Kutatóközpont,
Állatorvos-tudományi Intézet,
H-1143 Budapest, Hungária krt. 21.

2. Állatorvostudományi Egyetem,
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék,
H-1143 Budapest, Hungária krt. 23-25.

*e-mail: m.gyuranecz@gmail.com

Összefoglalás

A szerzők összefoglalják a *Mycoplasma hyorhinis*-ről és az általa okozott megbetegedésekről rendelkezésre álló legfontosabb ismereteket. Leírják, hogy a *M. hyorhinis* a savóshártyák és ízületek gyulladásával járó kórkép mellett, kötőhártyagyulladást és középfülgyulladást is okozhat. Megállapítják, hogy a megfelelő diagnózis felállításához a járványtani adatok, klinikai tünetek és kóronctani elváltozások mellett laboratóriumi vizsgálatokra is szükség van, valamint, hogy az állományok célzott antibiotikumos kezelésével csökkenthető a *M. hyorhinis* fertőzés okozta gazdasági kár.

Summary

Background: *Mycoplasma hyorhinis* is a pathogenic mycoplasma species in swine, occurring worldwide. It causes polyserositis, arthritis, conjunctivitis and otitis. The infected piglets, usually of 3 to 10 weeks old, show a retarded growth, which results in great economic losses. The control of *M. hyorhinis* infection is based mainly on adequate housing conditions and proper antibiotic metaphylaxis and treatment.

Objectives: The aim of this review is to summarise the recent knowledge about *M. hyorhinis*, especially from the aspects of clinical medicine.

Materials and Methods: Review of the published literature. References for this review were identified by searches of PubMed, ScienceDirect, Web of Science and Google Scholar using the terms “Mycoplasma”, “swine mycoplasmosis”, “*Mycoplasma hyorhinis*”, “antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis*”.

Results and Discussion: In the last few years, the detection of *M. hyorhinis* from piglets showing the presumable symptoms of the infection has increased. This can be due to the better sensitivity and specificity of the recently introduced diagnostic tools, like *M. hyorhinis* specific polymerase chain reactions, but to the increased prevalence of this pathogen, as well. The appropriate housing conditions, protection against viral infections (swine influenza, porcine respiratory and reproductive syndrome virus, porcine circovirus 2) and antibiotic treatment are the best aids to control this infection. Several antimicrobial agents are effective against *M. hyorhinis*, but a preceding antibiotic susceptibility determination before treatment, is highly recommended to avoid the development of resistance.

SERTÉS

A *Mycoplasma hyorhinis* egy sertéseket megbetegítő fakultatív patogén *Mycoplasma* faj. SWITZER írta le először 1955-ben (79). A kórokozó világszerte elterjedt, előfordulási arányát sertésállományokban 50–70% közöttire becsülik (41). Az utóbbi években megnőtt e *Mycoplasma* faj okozta diagnosztizált fertőzések száma, ami a kórokozó terjedése mellett a nagy specificitású és érzékenyséű polimeráz láncreakción (PCR) alapuló rendszerek diagnosztikai elterjedésével is magyarázható (36).

A *Mycoplasma hyorhinis* egy sertéseket megbetegítő, széles körben elterjedt fakultatív patogén kórokozó

Az általa okozott kórképek jelentős gazdasági veszteségeket okoznak

A *M. hyorhinis* 3–10 hetes malacokban okoz ízületgyulladással, mellhártya-, hashártya- és szívburokgyulladással járó tüneteket (49). Ritkább esetben középfülgyulladást (66) és kötőhártya-gyulladást (73) is kiválthat, ill. másodlagos kórokozóként más betegségek tüneteit is súlyosbíthatja (53, 58). A megbetegedés nagy gazdasági kártétellel jár, mivel az érintett malacok étvágytalanok, elmaradnak a növekedésben, takarmányhasznosításuk romlik (77).

KÓROKTAN

A *Mycoplasma* nemzetség tagjai a legkisebb önállóan szaporodni képes prokarióta szervezetek

A *Mycoplasma hyorhinis* a Mollicutes osztály, Mycoplasmatataceae család, *Mycoplasma* nemzetségének tagja. A nemzetségbe tartoznak a legkisebb önállóan szaporodni képes prokarióta szervezetek, a fajok sejtjeinek átlagos átmérője 0,2–0,8 µm. A *Mycoplasma* nemzetségre jellemző a kisméretű genom és a sejtfal hiánya, aminek következtében a sejtek alakja pleomorf, mivel a sejtek citoplazmáját csak membrán határolja (72). Sejtfal hiányában a *Mycoplasma* fajok ellenálló képessége viszonylag gyenge, az általánosan használt fertőtlenítőszerrel hatékonyan alkalmazhatóak velük szemben (27).

A *Mycoplasma* fajok membránja nagyon összetett, szerepet játszik a transzport folyamatokban, a patogén-gazda kapcsolat kialakításában, és ez érintkezik a gazdaszervezet immunrendszerével is (14). A *M. hyorhinis* sejtek membránjában található variábilis lipoprotein (Vlp) fehérje családnak fontos szerepe van mind a sejtadhézió kialakításában, mind a gazdaszervezet immunválaszával szembeni védekezésben (13, 15, 91). *M. hyorhinis* esetében a törzsek virulenciájáért a felszíni lipoproteinek mellett H₂O₂-termelés is felelős (28, 75).

A *Mycoplasma* nemzetségbe tartozó patogén fajok általában szűk gazdaspektrummal rendelkeznek, stenoxenek, azonban egy gazdafajt több *Mycoplasma* faj is képes fertőzni (72). Sertésekben *M. hyorhinis* mellett leggyakrabban kimutatható *Mycoplasma* fajok a *M. hyopneumoniae*, a *M. hyosynoviae* és a *M. flocculare*. A fajok közül a *M. hyorhinis*, a *M. hyopneumoniae* és az apatogén *M. flocculare* mutat közelebbi rokonságot, míg a *M. hyosynoviae* másik leszármazási vonalat képvisel (6, 88).

JÁRVÁNYTAN

A *M. hyorhinis* fakultatív patogén kórokozó, kimutatható kifejlett sertések felső légutainak és manduláinak nyálkahártyájáról anélkül, hogy ezekben az állatokban megbetegedést okozna (76). A malacok fertőződésének módja még nem teljesen tisztázott, jelenlegi ismereteink alapján a kocáktól vagy a környezetből fertőződhetnek, majd a kórokozót egymás között is terjesztik (17, 18). Választás előtt mind a kocákból, mind a malacokból kis számban mutatható ki a *M. hyorhinis*, a baktérián azonban, a malacok keveredésével, nagyon gyorsan elterjed és szinte az összes egy helyen tartott állatból kimutatható (17, 18).

Tünetek jellemzően 3–10 hetes korú malacokban, leginkább választás után alakulnak ki. A malacok hét hetes korukban a legfogékonyabbak a *M. hyorhinis* fertőzéssel szemben, majd az életkor előrehaladtával a fogékonyosság csökken,

Tünetek jellemzően 3–10 hetes korú malacokban, leginkább választás után alakulnak ki

Gyakran megtalálható a sertések légzőszervi betegség komplexében más kórokozókkal együtt

de ritkán még a 16 hetes malacok is mutathatnak tüneteket (62). A fertőzés kialakulásában szerepe lehet a választás okozta vagy környezeti stresszhatásoknak és különböző, főleg vírusos fertőzések (influenza A vírus, sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírus, [PRRSV], sertéscirkovírus 2, [PCV2]) megjelenésének (17, 47, 54, 69). Ezen kívül feltételezhető, hogy az anyai immunitásnak, elsősorban az anyatejjel kapott ellenanyagoknak fontos szerepe van a *M. hyorhinis* kolonizáció megakadályozásában (18). *M. hyorhinis* jelenléte súlyosbíthatja a *M. hyopneumoniae* okozta pneumonia tüneteit (30, 58). A sertések légzőszervi betegség komplexében (porcine respiratory disease complex, PRDC) is szerepe van: a tüneteket mutató állatokban nagy számban mutatják ki *M. hyorhinis* jelenlétét, jellemzően más kórokozókkal együtt. Különösen súlyos elváltozások alakulnak ki, ha PRRSV és *M. hyorhinis* egyszerre fertőzi az állatot (10, 53).

Az említettekén kívül a *M. hyorhinis* gyakran kimutatható *Mycoplasma*-fertőzött sejtenyészetekből is (49, 51). A *Mycoplasma*-fertőzésnek a vírusokra jellemző citopatogén hatása van a sejtekre, ugyanakkor rejtve is maradhat. A fertőzés hatással van a sejtek anyagcsere-folyamataira és a gének kifejeződésére is, így a sejtenyészetekeken végzett vizsgálatok eredményét is befolyásolhatja (8, 12). A sejtenyészetekből izolált törzsek teljes genomszekvenciáját összehasonlítva a fertőzött állatokból származó törzsek genomszekvenciáival, elsősorban a már említett Vlp családba tartozó fehérjéket kódoló gének számában találtak eltérést: a sejtenyészetekből származó törzsek kevesebb *vlp* génnel rendelkeznek, mint a fertőzött állatokból származók (8, 12, 22, 37, 50, 56).

KÓRFEJLŐDÉS

A légutak csillós hámsejtjeihez kapcsolódva károsítja azokat

A *M. hyorhinis* a malacok légútjainak csillós hámsejtjeihez kapcsolódik a membránjában található lipoproteinek segítségével (90, 91). A kórokozó kolonizálja a légzőhámot, jelenléte helyi gyulladást vált ki, felszíni lipoproteinjei (68), ill. a H₂O₂-termelése (28, 75) révén. Károsítja a csillókat és a hámsejteket, ill. a kórokozó megtelepedésekor megnő a kehelysejtek száma is (53). A szisztémás tünetek megjelenéséért a baktérium hematogén elterjedése felelős, ennek pontos módja és kiváltó oka jelenleg még ismeretlen. A különböző genotipizáló módszerekkel és kísérletes fertőzések során kapott eredmények alapján megfigyelhető, hogy egy adott *M. hyorhinis* törzs képes minden szervben kialakítani a jellemző elváltozásokat (20, 24, 31, 62, 84, 86). Ugyanakkor arra is van példa az irodalomban, hogy a különböző szervekből vett mintákból genotipizálás során eltérő törzseket mutattak ki (24).

Egyes *M. hyorhinis* törzsek virulenciáját jelentősen befolyásolja a Vlp fehérjecsaládba tartozó membránfehérjék mérete. A hosszabb (nagyobb molekulásúlyú) Vlp fehérjét kifejező törzsek esetében nagyobb ellenállóképességet figyeltek meg a gazdaszervezet immunválaszával szemben. A hosszabb Vlp fehérje eltakar a sejtmembránban egy eddig ismeretlen komponenst, ezzel megvédve azt a gazda komplement-független humorális immunválaszától (13, 15).

M. hyorhinis fertőzés esetén az immunrendszer sejtjei közül a monocyták reagálnak legérzékenyebben a kórokozó jelenlétére, és citokintermelésükkel súlyos gyulladást válthatnak ki, amely akár a T-sejtek gátlásához is vezethet, így elősegítve a *Mycoplasma* sejtek fennmaradását. A *M. hyopneumoniae* fertőzéssel összehasonlítva a *M. hyorhinis* fertőzés erősebb B-sejtes proliferációt képes kiváltani (85).

TÜNETEK

A tünetek megjelenéséhez hajlamosító tényezők szükségesek

Mivel a *M. hyorhinis* fakultatív patogén baktérium, a betegség tüneteinek kiváltásában fontos szerepe van hajlamosító tényezőknek, környezeti stresszhatásoknak (54).

A beteg állatok termelési mutatói jelentősen romlanak

Jellemző az ízületek, a savóshártyák, a kötőhártyák és a középfül gyulladása

A megbetegedés első tünetei a kedvetlenség, étvágytalanság és a hőemelkedés vagy láz. Az első tünetek jellemzően a fertőzödést követő 3–10. napban jelentkeznek (4, 36, 54). A beteg malacok elmaradnak növekedésben az egészséges társaiktól, egyes mérések szerint a beteg állatok napi átlagos testtömeggyarapodása akár 200 grammal is elmaradhat az egészséges malacokétól (62). Ez a testtömeggyarapodási különbség akár a teljes hizlalási perióduson keresztül fennállhat (4), ami jelentős veszteségeket okoz.

A *M. hyorhina*s által kiváltott ízületgyulladás (1. ábra) jellemzően több ízületet is érint, de ezeknek számát a malac fertőzésekori életkora befolyásolhatja, idősebb malacokban gyakran kevesebb ízület érintett (49, 62). Az ízületgyulladás jellegzetes tünetei a sántaság, duzzadt ízületek, nyújtózkodó testtartás, az állatok számára fájdalmas lehet az állás és a mozgás, súlyos esetekben az érintett malacok nehezen vagy egyáltalán nem kelnek fel (4, 36).

A betegség másik jellemző megjelenési formája a savóshártyák gyulladása, amelynek jellegzetes tünetei lehetnek a nehézlégzés, esetleg a köhögés (49). A fentiekén kívül *M. hyorhina*s kiválthat középfül- vagy fülkürtgyulladást, amelyek tünete lehet a malacok ferde fejtartása (66, 67). Kötőhártya-gyulladás is megfigyelhető a fertőzés során, amelynek tünetei kezdetben könnyezés, majd kötőhártya-duzzanat és gennyes gyulladás (73).



1. ÁBRA. *Mycoplasma hyorhina*s okozta ízület- és nyáktömlő-gyulladás

FIGURE 1. *Mycoplasma hyorhina*s-induced joint lesion and bursitis



2. ÁBRA. *Mycoplasma hyorhina*s okozta savós-fibrines savóshártya-gyulladás (Biksi IMRE felvétele)

FIGURE 2. *Mycoplasma hyorhina*s-induced polyserositis (photo taken by IMRE Biksi)

KÓRBONCTAN

Az ízületi gyulladás tüneteit mutató malacok esetében jellegzetes kórbonctani elváltozások az ízületi membrán ödémássá válása, súlyos esetekben roncsolódása, az ízület üregében véres-savós folyadék jelenik meg, az ízületi folyadék felszaporodik (26, 36).

Az elhullott állatok testüregeiben esetenként súlyos savós-fibrines savóshártya-gyulladás, idült esetben összenövés láthatók

A tünetek nem kórjelző értékűek, a diagnózis felállításához elengedhetetlen a kórokozó azonosítása

A kórokozó izolálása nem rutin eljárás

Az elhullott malacokban a savóshártyák gyulladása esetén a mellhártya, a hashártya és a szívburok savós-fibrines gyulladása figyelhető meg, súlyos, elhúzódó esetekben a belső szervek savóshártyáinak összetapadása, majd idővel kötőszövetes összenövés is kialakulhatnak (2. ábra) (35, 49).

A fertőzésben érintett szövetek gyulladással járó folyamatokra jellemző kórszövetetani képet mutatnak, vagyis felhalmozódnak bennük a mononuclearis phagocytasejtek (monocyták, macrophagok), a lymphocyták és a granulocyták (36, 52, 53, 74). A savóshártyák érintettsége esetén a szövetek felszínén fibrinkiválás látható, amelyben jellemzően neutrophil granulocyták találhatók (74). Tüdő- és légcsőérintettség esetén tüdőgyulladás (bronchopneumonia) és a csillós hámsejtek pusztulása tapasztalható (52, 55). Az ízületekben az immunsejtek felszaporodása mellett pedig súlyos esetekben az ízületi membrán roncsolódása és akár hegyszövet (pannus) kialakulása is megfigyelhető (36).

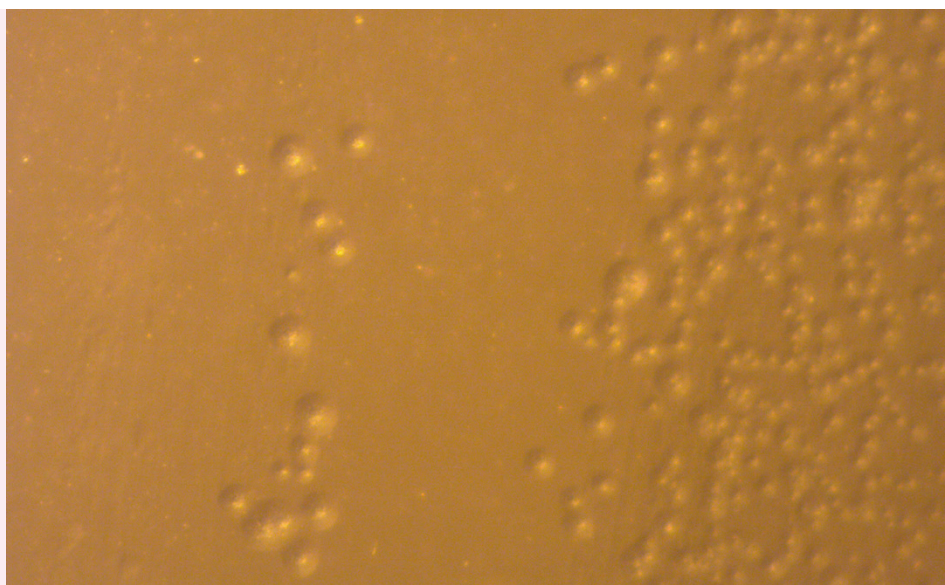
KÓRJELZÉS

A *M. hyorhinis* fertőzés esetén a tünetek nem kórjelző értékűek. Felső légúti tünetek esetén különböző vírusos és bakteriális fertőzések, mint influenza A vírus, PRRSV, PCV2 (54, 69), *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* és *M. hyopneumoniae* is okozhat hasonló elváltozásokat (53). Ízületgyulladást pedig *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* és *M. hyosynoviae* is kiválthat (54). Ezért a pontos diagnózis felállításához elengedhetetlen a kórokozó azonosítása. *Mycoplasma*-fertőzések kimutatására rutin diagnosztikai eljárások a szerológiai vizsgálatok, jellemzően enzim-kapcsolt ellenanyag kimutatás (ELISA) és a DNS-alapú molekuláris módszerek, leggyakrabban polimeráz láncreakción (PCR) alapuló próbák.

A különböző fajok izolálása klinikai mintákból nem rutin eljárás, mivel a *Mycoplasma* fajok nagyon igényes, mesterséges tápközegben nehezen növeszthető baktériumok. Ennek oka, hogy a genom méret csökkenésével több anyagcsere-útvonal génjét is elvesztették, ezért a tenyésztéshez összetett, élesztőkivonattal, vérsavóval, koleszterollal, és metabolizálható szénhidrátokkal (glükóz) dúsított tápközegre igényelnek (1, 72). A *M. hyorhinis* izolálása mindezeket figyelembe véve a megfelelő tápközegben, pár százalék szén-dioxid mellett (mikroaerofil környezetben) viszonylag gyorsan lehetséges, primer izolálás esetén táptalajon 2–7 nap alatt képez *Mycoplasma* fajokra jellemző, tükörtojásra emlékeztető telepeket (3. ábra). Kevert fertőzés esetén a *M. hyopneumoniae*-t szinte minden esetben túlnövi (21). Erre magyarázat lehet a két faj teljes genomjának összehasonlítása alapján, hogy a *M. hyorhinis* rendelkezik olyan anyagcsere-útvonalakkal, amelyekkel a *M. hyopneumoniae* nem (78).

3. ÁBRA. *Mycoplasma hyorhinis* jellegzetes tükörtojásra emlékeztető formájú telepei szilárd táptalajon

FIGURE 3. *Mycoplasma hyorhinis* colonies with typical fried-egg morphology on solid media



Diagnosztikai mintának az elváltozást mutató szervek a legmegfelelőbbek

A *M. hyorhinis* kimutatására számos PCR-próba áll rendelkezésre

A *M. hyorhinis* izolálásához, és a PCR-vizsgálathoz a legmegfelelőbb minták az elhullott állatokból származó, az elváltozást mutató szövetek (mellhártya, szívburok, hashártya, tüdő), vagy ízületgyulladás esetén ízületi folyadék. A baktérium kimutatható orrtamponnal vett mintából, nyálmintából vagy mandulákból is, azonban, mivel a *M. hyorhinis* a felső légutakban előfordulhat a természetes baktériumközösség tagjaként is (49, 61), az innen származó pozitív minták nem feltétlenül támasztják alá, hogy a tünetek kiváltásáért ez a kórokozó a felelős (33). Nem találtak például összefüggést *M. hyorhinis* pozitív nyálminták és az állományban megjelenő sántaság között (71). Ugyanakkor a felső légúti vagy nyálmintákból kimutatott törzsek fontos járványtani ismeretekkel szolgálhatnak (61).

A *M. hyorhinis* kimutatására számos PCR-próba áll rendelkezésre, amelyek több specifikus génszakaszt (16S rRNS, p36, p37, p46 gének) célozhatnak (2, 3, 9, 55, 57, 61, 65). A hagyományos PCR-eljárások mellett elérhető kvantitatív, real-time PCR-rendszer is. Az eljárás előnye, hogy gyorsabb és érzékenyebb, mint a hagyományos PCR-eljárás (19, 29). A PCR-alapú eljárások mellett elérhetőek más DNS-alapú kimutató eljárások (hurok közvetített izotermikus amplifikáció – loop mediated isothermal amplification, LAMP, DNS-hibridizáció, fluoreszcens *in situ* hibridizáció), amelyek a napi gyakorlatban kevésbé elterjedtek (7, 25, 44, 45, 80, 81).

M. hyorhinis ellenanyagok kimutatására jelenleg még nem kapható kereskedelmi forgalomban ELISA-készlet. Ennek egyik oka lehet, hogy a sertés *Mycoplasma* fajok antigénjei sok esetben nagyfokú keresztreakciót mutatnak (32, 70). A legújabb vizsgálati eredmények alapján azonban, a *M. hyorhinis* Vlp fehérjei megfelelően specifikus antigének lehetnek *M. hyorhinis* ellenanyagok kimutatására vérből, keresztreakciók nélkül (35).

Bizonyos esetekben, például járványügyi nyomozások során igény lehet nem csak az adott kórokozó specifikus kimutatására, hanem az adott baktérium különböző törzseinek megkülönböztetésére, rokonsági kapcsolatainak feltárására is. A molekuláris biológiai módszerek elterjedése előtt *M. hyorhinis* esetében a rokonsági kapcsolatok feltárására a restrikciós endonukleáz vizsgálatot alkalmazták, ez a módszer azonban nehezen standardizálható (23). Napjainkban a PCR-alapú, különböző génszakaszok vizsgálatán alapuló eljárásokat alkalmazzák széleskörben, mint a multi-lókus szekvenca tipizálás (multi-locus sequence typing, MLST) és a multi-lókus VNTR-analízis (multiple-locus variable number tandem-repeat analysis, MLVA). A két módszer együttes alkalmazásával akár az egy telepről, azonos évből származó törzsek is megkülönböztethetőek egymástól (20, 24, 31, 84, 86).

VÉDEKEZÉS

Mycoplasma-fertőzésekkel szemben a védekezésnek alapvetően három módja van. Ezek a mentesítés, a vakcinázás és a gyógyszeres kezelés, ami jellemzően antibiotikum-kezelést jelent (46). Sertésállományok *M. hyorhinis* mentesítése eddig csak kísérletes körülmények között történt meg. Ennek során a mentesítést a vizsgált állomány „lezárásával” és antibiotikum-kezeléssel érték el. A kísérlet kezdetén *M. hyorhinis* fertőzött állomány a lezárás után 43 héttel mentesnek bizonyult a kórokozótól, azonban amikor a lezárás végén új süldőket hoztak az állományba a betegség ismételtelen megjelent (16). Ez alapján bár a mentesítés hatékony módszer lenne a fertőzéssel szemben, a gyakorlatban nem kivitelezhető. Ugyanakkor a már fennálló fertőzés kontrollálásához, korlátozásához jelentős segítséget nyújthat a különböző korosztályok megfelelő elkülönítése (77).

A *M. hyorhinis* fertőzés megelőzésére Magyarországon még nincs kereskedelmi forgalomban kapható vakcina. Az Egyesült Államokban elérhető egy inaktivált vakcina (Ingelvac MycoMAX™, Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc., Duluth, USA), ill. egyre több vakcinajelölt fejlesztése is folyamatban van. Ezek a vakcinajelöltek mind inkaktivált vakcinák, amelyeket vagy csak *M. hyorhinis* elleni védelemre terveztek,

Hazánkban jelenleg nem kapható vakcina *M. hyorhinis* ellen

A gyógyszeres kezelés önmagában nem alkalmas mentesítésre

Hatékonyak lehetnek ellene a makrolidok, a linkozamidok, az aminoglikozidok, a tetraciklinek, a pleuromutilinek és a fenikolok

vagy kombinált formában *M. hyopneumoniae* vagy PCV2 ellen is védelmet biztosítanak (52, 63, 64, 87). Ezek a vakcinajelöltek kísérletesen mind alkalmasnak bizonyultak *M. hyorhinis* okozta fertőzés kontrollálására, terepi körülmények között azonban vizsgálatuk még nem történt meg.

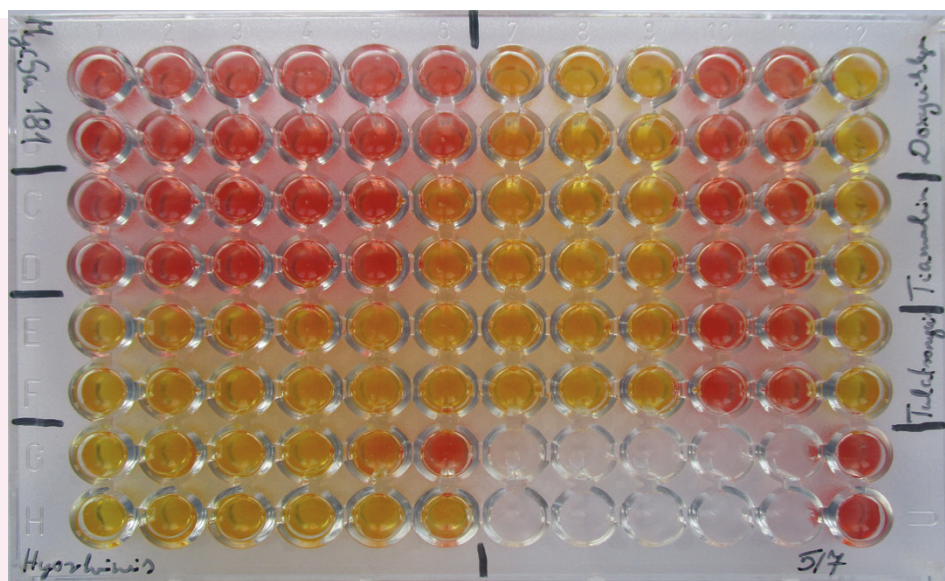
Vakcina hiányában így az elsődleges védelem *M. hyorhinis* fertőzés esetén a gyógyszeres kezelés, amely alkalmas a tünetek enyhítésére vagy megszüntetésére, de nem távolítja el a kórokozót, így mentesítésre nem alkalmas (46). Sejtfal hiányában a *Mycoplasma* fajok nem érzékenyek a sejtfallszintézist gátló antibiotikumokkal szemben. Természetes rezisztenciával rendelkeznek továbbá rifampicinnel, polimixinekkal, szulfonamidokkal és első-generációs kinolonokkal (nalidixsav, trimetoprim) szemben (11, 34). *M. hyorhinis* továbbá természetes rezisztenciát mutat a 14-tagú laktongyűrűt tartalmazó makrolidokkal szemben (eritromicin) (83, 89).

Mycoplasma-fertőzéssel szemben azok az antibiotikumok hatékonyak, amelyek a fehérje-, RNS- vagy a DNS-szintézis gátlásán keresztül hatnak. Ilyenek a makrolidok (tilozin, tilmikozin, tilvalozin, tulatromicin, gamitromicin), linkozamidok (linkomicin), aminoglikozidok (spektinomycin, gentamicin), tetraciklinek (oxitetraciklin, doxiciklin), pleuromutilinek (tiamulin, valnemulin) és a fenikolok (florfenikol). Ezen kívül alkalmazhatóak még fluorokinolonok is (enrofloxacin, marbofloxacin), azonban ezek használata csak abban az esetben indokolt, ha más szerek hatástalannak bizonyultak, mivel ezeknek kiemelt a közegészségügyi jelentőségük (5, 38, 39, 40, 42, 43, 47, 48, 59, 60, 83, 89). A fluorokinolonok kivételével ezek mind bakteriosztatikus szerek, így többek között ezért sem alkalmas az antibiotikum-kezelés az állományok *Mycoplasma*-mentesítésére (82).

Mycoplasma fajok esetében a törzsek lassú növekedése és összetett tápközeg igénye miatt az antibiotikumok minimális gátló koncentrációinak meghatározása *in vitro* mikroleves-hígítási módszerrel történik (4. ábra) (11). Ennek hátránya, hogy költség, munka és időigényes, hiszen csak a baktérium izolálása után végezhető el. Egy adott fertőzésből származó törzs antibiotikum-érzékenysége meghatározása hiányában rendszerint tapasztalati úton történik az antibiotikumok kiválasztása, ami a törzsek érzékenységének különbségei miatt gyakran a nem megfelelő szer kiválasztásához, és ellenálló törzsek kialakulásához vezet (34).

4. ÁBRA. Három antibiotikum (doxiciklin, tiamulin, tulatromicin) minimális gátló koncentrációjának meghatározása egy *Mycoplasma hyorhinis* törzssel szemben mikroleves-hígítási módszerrel

FIGURE 4. Determination of minimal inhibitory concentrations of three antibiotics (doxycycline, tiamulin, thulatromycin) against a *Mycoplasma hyorhinis* strain by microbroth dilution method



A *M. hyorhinis* törzseken végzett antibiotikumérzékenység-meghatározást az utóbbi években elsősorban ázsiai országokban végezték (42, 43, 59). Ezek alapján megnőtt a makrolidokkal szemben csökkent érzékenységet mutató *M. hyorhinis* izolátumok száma, míg 1996-ban a Japán törzseknek csak 10%-a volt ellenálló (47),

Egyes hazai törzsek makrolidokkal és linkozamidokkal szemben csökkent érzékenységet mutatnak

2005-ben már a törzsek 40%-a (48). Az európai izolátumok közül hosszú idő után először a magyarországi izolátumok vizsgálata történt meg. A hazai *M. hyorhinis* törzsek *in vitro* vizsgálata alapján egyik alkalmazható antibiotikum esetében sem találtunk nagy számban ellenálló törzseket. Azonban már a hazai izolátumok között is találtunk makrolidokkal és linkozamidokkal szemben csökkent érzékenységet mutató izolátumokat (5).

Mivel a *M. hyorhinis* fakultatív patogén baktérium, megfelelő tartási körülményekkel (istálló hőmérséklete, állatok sűrűségének szabályozása, megfelelő ivóvíz és takarmány ellátás) csökkenthető a betegség kialakulását elősegítő stressz. Továbbá védekezés más kórokozókval szemben, mint a sertésinfluenza, a PCV2 és a PRRSV szintén csökkentik a *M. hyorhinis* által kiváltott megbetegedés valószínűségét (54).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A cikk elkészültét a Magyar Tudományos Akadémia Lendület pályázata (LP2012-22), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K_16 (119594), FK_17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatai, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az Innovációs és Technológiai Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának Bolyai+ Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíja (ÚNKP-19-4-ÁTE-1) támogatták.

IRODALOM

- ALUOTTO, B. B. – WITTLER, R. G. et al.: Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 1970. 20. 35–58.
- ASSUNÇÃO, P. – DE LA FE, C. et al.: The occurrence of mycoplasmas in the lungs of swine in Gran Canaria (Spain). *Vet. Res. Commun.*, 2005. 29. 453–462.
- BARATE, A. K. – LEE, H. Y. et al.: An improved multiplex PCR for diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis*. *Korean J. Vet. Res.*, 2012. 52. 39–43.
- BARDEN, J. A. – DECKER, J. L.: *Mycoplasma hyorhinis* swine arthritis. I. Clinical and microbiologic features. *Arthritis Rheum.*, 1971. 14. 193–201.
- BEKŐ, K. – FELDE, O. – SÜLYÖK, K. M. – KREIZINGER, Z. – HRIVNÁK, V. – KISS, K. – BIKSI, I. – JERZSELE, Á. – GYURANECZ, M.: Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from swine in Hungary. *Vet. Microbiol.*, 2019. 228. 196–201.
- BLANK, W. A. – ERICKSON, B. Z. – STEMKE, G. W.: Phylogenetic relationships of the porcine mycoplasmas *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyopharyngis*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 1996. 46. 1181–1182.
- BOYE, M. – JENSEN, T. K. et al.: *In situ* hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *Apmis*, 2001. 109. 656–664.
- CALCUTT, M. J. – FOECKING, M. F. et al.: Genome Sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain GDL-1. *J. Bacteriol.*, 2012. 194. 1848.
- CARON, J. – OUARDANI, M. – DEA, S.: Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J. Clin. Microbiol.*, 2000. 38. 1390–1396.
- CHEN, D. – WEI, Y. et al.: Synergistic pathogenicity in sequential coinfection with *Mycoplasma hyorhinis* and porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.*, 2016. 182. 123–130.
- CHERNOVA, O. A. – MEDVEDEVA, E. S. et al.: Mycoplasmas and their antibiotic resistance: The problems and prospects in controlling infections. *Acta Naturae (английзычная версия)*, 2016. 8.
- CIBULSKI, S. P. – SIQUERIA, F. M. et al.: Genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from cell cultures. *Genome Announc.*, 2016. 4. e01119–16.
- CITTI, C. – KIM, M. F. – WISE, K. S.: Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect. Immun.*, 1997. 65. 1773–1785.
- CITTI, C. – NOUVEL, L. X. – BARANOWSKI, E.: Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol.*, 2010. 5. 1073–1085.
- CITTI, C. – WATSON-MCKOWN, R. et al.: Gene families encoding phase-and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. *J. Bacteriol.*, 2000. 182. 1356–1363.
- CLAVIJO, M. J. – ANDERSON, A. et al.: Can we eliminate *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis*? 2017. <https://www.nationalhogfarmer.com/animal-health/can-we-eliminate-mycoplasma-hyosynoviae-and-mycoplasma-hyorhinis>
- CLAVIJO, M. J. – DAVIES, P. et al.: Temporal patterns of colonization and infection with *Mycoplasma hyorhinis* in two swine production systems in the USA. *Vet. Microbiol.*, 2019. 234. 110–118.
- CLAVIJO, M. J. – MURRAY, D. et al.: Infection dynamics of *Mycoplasma hyorhinis* in three commercial pig populations. *Vet. Rec.*, 2017. 2017. 181. 68.
- CLAVIJO, M. J. – OLIVEIRA, S. et al.: Field evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma hyorhinis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2014. 26. 755–760.
- CLAVIJO, M. J. – SREEVATSAN, S. et al.: Molecular epidemiology of *Mycoplasma hyorhinis* porcine field isolates in the United States. *PLoS one*, 2019. 14. 1–13.

21. COOK, B. S. – BEDDOW, J. G. et al.: Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2016. 195. 158–164.
22. DABRAZHYNITSKAYA, A. – SOIKA, V. et al.: Genome Sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain DBS 1050. *Genome Announc.*, 2014. 2. e00127–14
23. DARAI, G. – ZÖLLER, L. et al.: Analysis of *Mycoplasma hyorhinis* genome by use of restriction endonucleases and by electron microscopy. *J. Bacteriol.*, 1982. 150. 788–794.
24. DOS SANTOS, L. F. – CLAVIJO, M. J. et al.: Genotyping of *Mycoplasma hyorhinis* using multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *J. Microbiol. Meth.*, 2015. 111. 87–92.
25. DU, G. M. – LIU, M. J. et al.: Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma hyorhinis*. *Clin. Lab.*, 2013. 59. 1363–1371.
26. ENNIS, R. S. – DALGARD, D. et al.: *Mycoplasma hyorhinis* swine arthritis. II. Morphologic features. *Arthritis Rheum.*, 1971. 14. 202–211.
27. ETERPI, M. – McDONNELL, G. – THOMAS, V.: Decontamination efficacy against *Mycoplasma*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2011. 52. 150–155.
28. FERRARINI, M. G.: Metabolic Investigation of the Mycoplasmas from the Swine Respiratory Tract. Bioinformatics [q-bio.QM]. Université Claude Bernard – Lyon I, 2015. English. NNT : 2015LYO10302 .
29. FOUROUR, S. – FABLET, C. et al.: A new multiplex real-time TaqMan® PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs. *J. Appl. Microbiol.*, 2018. 125. 345–355.
30. FOUROUR, S. – TOCQUEVILLE, V. et al.: Pathogenicity study of *Mycoplasma hyorhinis* and *M. flocculare* in specific-pathogen-free pigs pre-infected with *M. hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2019. 232. 50–57.
31. FÖLDI, D. – BEKŐ, K. – FELDE, O. – KREIZINGER, Zs. – KOVÁCS, Á. B. – TÓTH, F. – BÁNYAI, K. – BIKSI, I. – KISS, K. – GYURANECZ, M.: Genotyping *Mycoplasma hyorhinis* by multi-locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Vet. Microbiol.*, 2020. Közlésre benyújtva
32. FREEMAN, M. J. – ARMSTRONG, C. H. et al.: Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. *Can. J. Comparat. Med.*, 1984. 48. 202.
33. FRIIS, N. F. – FEENSTRA, A. A.: *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. *Acta Vet. Scand.*, 1994. 35. 93–98.
34. GAUTIER-BOUCHARDON, A. V.: Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 2018. 425–446.
35. GIMENEZ-LIROLA, L. G. – MEIROZ-DE-SOUZA-ALMEIDA, H. et al.: Early detection and differential serodiagnosis of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* infections under experimental conditions. *PLoS one*, 2019. 14. 1–20.
36. GOMES NETO, J. C. – GAUGER, P. C. et al.: *Mycoplasma*-associated arthritis: critical points for diagnosis. *J. Swine Health Prod.*, 2012. 20. 82–86.
37. GOODISON, S. – URQUIDI, V. et al.: Complete genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain SK76. *Genome Announc.*, 2013. 1. 6–7.
38. HANNAN, P. C. – WINDSOR, G. D. et al.: Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Ch.*, 1997. 41. 2037–2040.
39. HANNAN, P. C.: Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species. *Vet. Res.*, 2000. 31. 373–395.
40. HANNAN, P. C. T. – O'HANLON, P. J. – ROGERS, N. H.: *In vitro* evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res. Vet. Sci.*, 1989. 46. 202–211.
41. HANSEN, M. S. – PORS, S. E. et al.: An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J. Comp. Pathol.*, 2010. 143. 120–131.
42. JANG, J. – KIM, K. et al.: *In vitro* antibiotic susceptibility of field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* from Korea. *Korean J. Vet. Res.*, 2016. 56. 109–111.
43. JIN, L. Y. – HYOUNG-JOON, M. et al.: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* field isolates collected from swine lung specimens in Korea. *J. Swine Health Prod.*, 2014. 22. 193–196.
44. JOHANSSON, K. E. – MATSSON, J. G. et al.: Specificity of oligonucleotide probes complementary to evolutionarily variable regions of 16S rRNA from *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis*. *Res. Vet. Sci.*, 1992. 52. 195–204.
45. KIM, B. – LEE, K. et al.: Development of *in situ* hybridization for the detection of *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from naturally infected pigs with polyserositis. *J. Vet. Med. Sci.*, 2010. 72. 1225–1227.
46. KLEVEN, S. H.: Control of avian *Mycoplasma* infections in commercial poultry. *Avian Dis.*, 2008. 52. 367–374.
47. KOBAYASHI, H. – MOROZUMI, T. et al.: Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. *Antimicrob. Agents Ch.*, 1996. 40. 1030–1032.
48. KOBAYASHI, H. – NAKAJIMA, H. et al.: Macrolides and lincomycin susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA. *J. Vet. Med. Sci.*, 2005. 67. 795–800.
49. KOBISCH, M. – FRIIS, N.F.: Swine mycoplasmoses. *Rev. Sci. Tech. OIE*, 1996. 15. 1569–1614.
50. KORNSPAN, J. D. – LYSNYANSKY, I. et al.: Genome analysis of a *Mycoplasma hyorhinis* strain derived from a primary human melanoma cell line. *J. Bacteriol.*, 2011. 193. 4543–4544.
51. KOTANI, H. – BUTLER, G. H. et al.: Microbiological cultivation of *Mycoplasma hyorhinis* from cell cultures. *In vitro Cell. Dev. B.*, 1990. 26. 91–96.
52. LEE, J. A. – HWANG, M. A. et al.: Reduction of mycoplasmal lesions and clinical signs by vaccination against *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet. Immunol. Immunop.*, 2018. 196. 14–17.
53. LEE, J. A. – OH, Y. R. et al.: *Mycoplasma hyorhinis* is a potential pathogen of porcine respiratory disease complex that aggravates pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunop.*, 2016. 177. 48–51.
54. LEUWERKE, B.: *Mycoplasma hyorhinis*-Field experiences in diagnosis and control. Allen D. Leman swine conference, St. Paul, Minnesota, USA, 2009. 09. 19–22.
55. LIN, J. H. – CHEN, S. P. et al.: *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Vet. Microbiol.*, 2006. 115. 111–116.
56. LIU, WEI. – FANG, L. et al: Complete genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain HUB-1. *J. Bacteriol.*, 2010. 192. 5844–5845.
57. LOBO, E. – POVEDA, C. et al.: *Mycoplasmas hyorhinis* in different regions of Cuba: diagnosis. *Braz. J. Microbiol.*, 2011. 42. 721–725.

58. LUEHRS, A. – SIEGENTHALER, S. et al.: Occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* infections in fattening pigs and association with clinical signs and pathological lesions of Enzootic Pneumonia. *Vet. Microbiol.*, 2017. 203. 1–5.
59. MAINGI, J. W. – XIONG, Q. et al.: Detection, isolation and identification of *M. hyorhinis* isolates and comparison of their antimicrobial susceptibility, immunogenicity and virulence. *Veterinaria*, 2014. 2. 1–8.
60. MAKHANON, M. – THONGKAMKON, P. et al.: *In vitro* susceptibility test of *Mycoplasma hyorhinis* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006. 2. 31–10.
61. MAKHANON, M. – TUMMARUK, P. et al.: Comparison of detection procedures of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, and *Mycoplasma hyorhinis* in lungs, tonsils, and synovial fluid of slaughtered pigs and their distributions in Thailand. *Trop. Anim. Health Pro.*, 2012. 44. 313–318.
62. MARTINSON, B. – MINION, F. C. et al.: Age susceptibility of caesarian derived colostrum deprived pigs to *Mycoplasma hyorhinis* challenge. *Vet. Microbiol.*, 2017. 210. 147–152.
63. MARTINSON, B. – ZOGHBY, W. et al.: Duration of immunity for an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs. *Vet. Microbiol.*, 2019. 230. 273–277.
64. MARTINSON, B. – ZOGHBY, W. et al.: Efficacy of an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs. *Vaccine*, 2018. 36. 408–412.
65. MATTSOON, J. G. – BERGSTRÖM, K. et al.: Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by *in vitro* amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, 1995. 33. 893–897.
66. MORITA, T. – FUKUDA, H. et al.: Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media. *Vet. Pathol.*, 1995. 32. 107–111.
67. MORITA, T. – OHIWA, S. et al.: Intranasally inoculated *Mycoplasma hyorhinis* causes eustachitis in pigs. *Vet. Pathol.*, 1999. 36. 174–178.
68. MÜHLRADT, P. F. – KIESS, M. et al.: Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. *Infect. Immun.*, 1998. 66. 4804–4810.
69. PALZER, A. – HAEDKE, K. et al.: Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis. *Canadian Vet. J.*, 2015. 56. 285.
70. PETERSEN, A. C. – ONEAL, D. C. et al.: Cross reactivity among the swine mycoplasmas as identified by protein microarray. *Vet. Microbiol.*, 2016. 192. 204–212.
71. PILLMAN, D. – NAIR, M. S. et al.: Detection of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in oral fluids and correlation with pig lameness scores. *Vet. Microbiol.*, 2019. 239. 108448.
72. RAZIN, S.: Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). *Microbiol. Rev.*, 1985. 49. 419.
73. RESENDE, T. P. – PIETERS, M. – VANNUCCI, F. A.: Swine conjunctivitis outbreaks associated with *Mycoplasma hyorhinis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2019. 31. 766–769.
74. ROBERTS, E. D. – SWITZER, W. P. – RAMSEY, F. K.: Pathology of the visceral organs of swine inoculated with *Mycoplasma hyorhinis*. *Am. J. Vet. Res.*, 1963. 24. 9–18.
75. ROSENGARTEN, R. – KIRCHHOFF, H.: Untersuchung über die cilienhemmende Aktivität verschiedener *Mycoplasma hyorhinis*-Stämme im Vergleich zu Acholeplasma-und anderen Mykoplasma-Spezies in Trachealorgankulturen. *ZBL Vet. Med. B.*, 1981. 28. 27–45.
76. ROVIRA, A. – CLAVIJO, M. J. – OLIVEIRA, S.: *Mycoplasma hyorhinis* infection of pigs. *Acta Sci. Vet.*, 2010. 38. s9–s15
77. SCHEIBER, T. – THACKER, B.: *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma suis* overview: disease basics, clinical presentations, diagnostics, treatments and prevention/control strategies. Allen D. Leman swine conference, St. Paul, Minnesota, USA, 2012. 09. 15–18.
78. SIQUEIRA, F. M. – THOMPSON, C. E. et al.: New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. *BMC genomics*, 2013. 14. 1–17.
79. SWITZER, W. P.: Studies on infectious atrophic rhinitis. IV. Characterization of a pleuropneumonia-like organism isolated from the nasal cavities of swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1955. 16. 540–544.
80. TAYLOR, M. A. – WISE, K. S. – MCINTOSH, M. A.: Selective detection of *Mycoplasma hyorhinis* using cloned genomic DNA fragments. *Infect. Immun.*, 1985. 47. 827–830.
81. TAYLOR, M. A. – WISE, K. S. – MCINTOSH, M. A.: Species-specific detection of *Mycoplasma hyorhinis* using DNA probes. *Israel J. Med. Sci.*, 1984. 20. 778–780.
82. TAYLOR-ROBINSON, D. – BEBEAR, C.: Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 1997. 40. 622–630.
83. TER LAAK, E. A. – PIJERS, A. et al.: Comparison of methods for *in vitro* testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Ch.*, 1991. 35. 228–233.
84. TOCQUEVILLE, V. – FERRÉ, S. et al.: Multilocus sequence typing of *Mycoplasma hyorhinis* strains identified by a real-time TaqMan PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2014. 52. 1664–1671.
85. TRUEEB, B. S. – BRAUN, R. O. et al.: Differential innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in various types of antigen presenting cells. *Vet. Microbiol.*, 2020. 240. 108541.
86. TRÜEB, B. – CATELLI, E. et al.: Genetic variability and limited clonality of *Mycoplasma hyorhinis* in pig herds. *Vet. Microbiol.*, 2016. 191. 9–14.
87. WEI, Y. W. – ZHU, H. Z. et al.: Efficacy in pigs of a new inactivated vaccine combining porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet. Microbiol.*, 2020. 108588.
88. WEISBURG, W. G. – TULLY, J. G. et al.: A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.*, 1989. 171. 6455–6467.
89. WU, C. C. – SHRYOCK, T. R. et al.: Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet. Microbiol.*, 2000. 76. 25–30.
90. XIONG, Q. – WANG, J. et al.: The functions of the variable lipoprotein family of *Mycoplasma hyorhinis* in adherence to host cells. *Vet. Microbiol.*, 2016. 186. 82–89.
91. XIONG, Q. – ZHANG, B. et al.: Characterization of the role in adherence of *Mycoplasma hyorhinis* variable lipoproteins containing different repeat unit copy numbers. *Vet. Microbiol.*, 2016. 197. 39–46.

Közlésre ér.: 2020. máj. 12.

**Occurrence of
Marek's disease in
Hungarian turkey flocks**

Cs. Nemes^{1*}
E. Simonyai²
D. Dr. Szajkiné Szalay³
J. Turbók²
Á. Thuma³

1. Prophyl KFT. Dr. Marek József
Állategészségügyi Laboratórium
H-7700 Mohács, Szent István u. 18-20.

*e-mail: csnemes@prophyl.hu

2. NÉBIH ÁDI Kaposvári Állategészségügyi Diagnosztikai Laboratórium,
Kaposvár

3. NÉBIH Állategészségügyi
Diagnosztikai Igazgatóság,
Budapest

A Marek-betegség előfordulása a hazai pulykaállományokban

Nemes Csaba^{1*}, Simonyai Erika², Dr. Szajkiné Szalay Dóra³, Turbók Janka², Thuma Ákos³

Összefoglalás

A szerzők a Marek-betegség pulykaállományokban való előfordulásáról számolnak be. A betegséget rendszerint az utónevelés időszakában észlelték. Egy eset részletes leírását is adják, amelynél az állatok 10 hetes korától, folyamatos elhullás jelentkezett (1%/hét). A több alkalommal is vizsgált madarakban következetesen a lép, a máj és a vesék kifejezett megnagyobbodását, az érintett szervek állományában szürkésfehér góccokat, emellett a bursa enyhébb-súlyosabb fokú sorvadását lehetett megfigyelni. A szürkésfehér góccok kórszövettani vizsgálata során polimorf jellegű lymphoidsejt-proliferációt figyeltek meg. Hasonló elváltozást egy esetben, az üldödegekben, ill. a tüdőben is megállapítottak. Molekuláris diagnosztikai vizsgálattal az elváltozott szervekből a Marek-betegség vírusát tudták kimutatni.

Summary

Background: The Marek's disease (MD) is a well-known lymphoproliferative disease of chicken usually characterized by mononuclear cellular infiltrates in peripheral nerves and various other organs and tissues. Recently, cases of MD in turkeys have been reported by some authors in Europe and Israel, but turkey is an unusual host for a virus.

Objectives: The aim of this report was to present the occurrence of MD in Hungarian turkey farms and to describe pathological findings in an infected growing-out flock.

Materials and methods: The turkeys were dissected according to laboratory standard methods. During necropsy tissue samples were collected for histological and molecular diagnostic examinations. After paraffin embedding, histological sections were stained with haematoxylin and eosin. Bacteriological culturing was made from heart blood and liver. The identification of bacteria was carried out by their morphological and biochemical characteristics.

Results and Discussion: Marek's disease can be diagnosed in Hungarian turkey flocks infrequently. The main characteristic lesions in the infected turkeys are the enlargement of the liver, kidney and spleen. Polimorph lymphoid cell proliferation can be seen in the parenchyma of enlarged organs. Rarely, similar lesions can be found in peripheral nerves. Beside all above, another fundamental lesion was the lymphoid cell depletion from the follicles of bursa Fabricii.

A Marek-betegség a baromfik herpeszvírus okozta bántalma, amely elsősorban a csirkéket betegíti meg. Nevét MAREK JÓZSEF magyar állatorvosról kapta, aki először állapította meg a betegség idegekben megjelenő neurális formáját (12). Ezt követően számos egyéb kórforma is leírásra került, majd miután kiderült, hogy ezeket ugyanaz a vírus idézi elő, általánossá vált a Marek-betegség elnevezés. A betegséget a *Herpesviridae* család, *Alfaherpesvirinae* alcsaládjának, *Mardivirus* nemzetségébe tartozó *Gallid alphaherpesvirus 2* vírusfaj okozza (8). A vírusnak különböző virulenciájú változatai ismertek, amelyek változatos kórképeket idéznek elő. Ezek lehetnek a legkülönbébb szervekben daganatképződéssel járó, ill. ún. nem daganatos kórformák. Ez utóbbiak közül messze a legnagyobb jelentőségű a vírus immunszuppresszív hatása. A betegség tyúkállományokban világszerte széles körben megállapításra került. Más madárfajokban, így pulykában való előfordulása – bár nem ismeretlen – jóval kevésbé dokumentált (17). A szerzők a betegség egy utónevelés alatt álló pulykaállományban való előfordulásáról számolnak be részletesen.

A Marek-betegség a baromfik herpeszvírus okozta bántalma, amely elsősorban csirkéket betegít meg

Pulykában való előfordulása sokkal ritkább

SAJÁT VIZSGÁLATOK

Egy pulykautónevelő telepről összesen 10 pulykát vizsgáltak

Egy dél-dunántúli pulyka-utónevelő telepről több alkalommal összesen 10 pulykát vizsgáltunk.

Az állatokat a NÉBIH ÁDI Kaposvári Laboratóriumában szokásos protokoll szerint felboncoltuk.

A kórszövettani vizsgálatra gyűjtött szervmintákat 10%-os pufferolt formaldehid-oldatban fixáltuk, majd víztelenítést és paraffin beágyazást követően 4 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket haematoxilinnal és eozinnel festettünk.

A bakteriológiai vizsgálatot a szívvérből és májból közönséges agar (TSA), Drigalski-agar (BIOLAB) és 5% juhvérrel kiegészített Columbia-agar (BIOLAB) felületére kenve végeztük. A talajokat 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó légkörben 48 órán keresztül inkubáltuk. A véresagar felületén kifejlődött telepekből szintenyészetet készítettünk, majd morfológiai és biokémiai sajátosságai alapján meghatároztuk a baktériumot.

Az elváltozást mutató szervekből (lép, máj, vesék) Eppendorf-csövekbe molekuláris diagnosztikai vizsgálatok céljára mintákat gyűjtöttünk, amelyeket a vizsgálat idejéig –80 °C-ra fagyasztottunk. Ezekből a Marek-betegség vírusának kimutatására irányuló polimerizációs láncreakció vizsgálatot végeztük el BAIGENT és mtsai leírása alapján (3).

Kórszövettani, bakteriológiai és PCR-vizsgálatokat végeztek

EREDMÉNYEK

Egy pulykaállományban megemelkedett az elhullások mértéke

Egy Dél Dunántúli utónevelő telepre 4400 darab pulykát telepítettek vegyes ivarban. A telepítést követő első két hétben 154 állat hullott el. Ezekből a hullákból laboratóriumi vizsgálat nem történt. Helyszíni boncolással az ellátó állatorvos bakteriális fertőzésre jellemző elváltozásokat (máj- és lépduzzanat, bélhurut, fibrines légzsákgyulladás) figyelt meg. Enrofloxacin hatóanyaggal történt antibiotikus kezelés hatására az elhullások mértéke normalizálódott, a madarak egészséges állomány képét mutatták. A 10. élethétől kezdve az elhullások száma ismét emelkedni kezdett. Újabb antibiotikus kezelés történt, ami azonban már nem hozott javulást. Az első laboratóriumi vizsgálat három, 12 hetes pulykából történt. Erre az időpontra az elhullás elérte az 55 madár/hét értéket. Kórbonctani vizsgálattal a lép, a máj és a vesék kifejezett megnagyobbodását, a máj és a vesék állományában szürkésfehér, szalonnás fényű góccok előfordulását, a lép márványozottságát, a Fabricius féle bursa sorvadását, ill. az egyik állatban a máj, jelentős mértékű

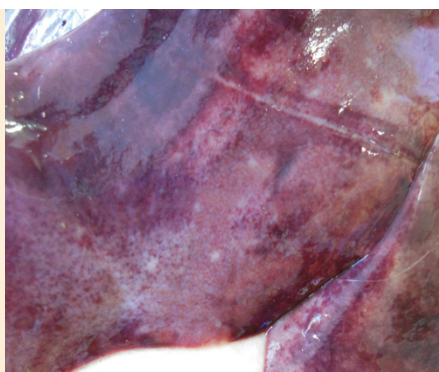
Boncolással lép-, máj-, vesemegnagyobbodást, ill. állományukban szürkésfehér szalonnás fényű góccokat figyeltek meg

tarkázottságát (dystrophiáját) figyeltük meg. (1., 2., 3., 4., 5. ábra). A zúzógyomorban sok alom mellett, kevés darás eleséget találtunk. Egyéb vizsgált szervekben körjelző értékű elváltozás nem volt.



1. ÁBRA. Duzzadt máj, állományában multiplex szürkésfehér góccokkal

FIGURE 1. Swollen liver with multiplex greyish-white foci in its substance



2. ÁBRA. Dystrophiás máj, állományában szürkésfehér góccokkal

FIGURE 2. Liver dystrophy, with greyish-white foci



3. ÁBRA. Duzzadt vesék, állományában szürkésfehér góccokkal

FIGURE 3. Swollen kidney with greyish-white foci



4. ÁBRA. Duzzadt, márványozott lép

FIGURE 4. Swollen, marbled spleen



5. ÁBRA. A bursa Fabricii sorvadása

FIGURE 5. Atrophy of the bursa Fabricii

Az érintett szervek állományában polimorf, lymphoid jellegű sejtek szabálytalan proliferációját figyelték meg

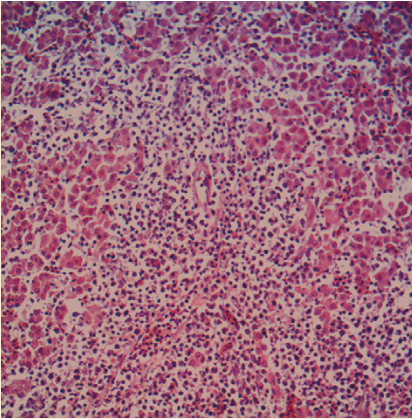
A 13 hetes állatok között lesoványodó, mozgászavaros állatok is megjelentek

A szívvéreből és a májából elvégzett bakteriológiai vizsgálattal egy állatból *Staphylococcus aureus* baktériumokat tenyésztünk ki.

A májból, vesékből, bursából, lépből, ülőidegből készült kórszövetteni metszetek mikroszkópos vizsgálatával a máj, a lép és a vesék állományában polimorf, lymphoid jellegű sejtek szabálytalan proliferációját figyeltük meg (6., 7., 8. ábra). A bursa Fabricii-ben a nyiroktüszők centrumában lymphocytakiürülést láttunk, míg az ülőidegekben körjelző értékű szöveti elváltozás nem volt.

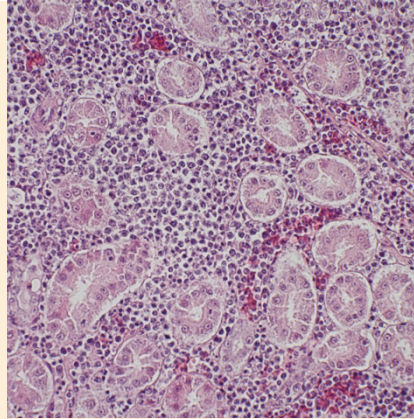
A telepre az állatok 13 hetes korában helyszíni kiszállásra került sor. Az állományban a nagyszámú egészséges állat mellett lesoványodott, ill. nehezen mozgó egyedeket lehetett megfigyelni (9. ábra). A telepről a Laboratóriumba szállított pulykák boncolásával, a korábban már leírt elváltozások mellett, egy tüdőben szintén szalonnás fényű gócot figyeltünk meg (10. ábra). A kórszövetteni elváltozások tekintetében nem volt különbség az első vizsgálathoz képest.

A négy állat bakteriológiai vizsgálata negatív eredményre vezetett.



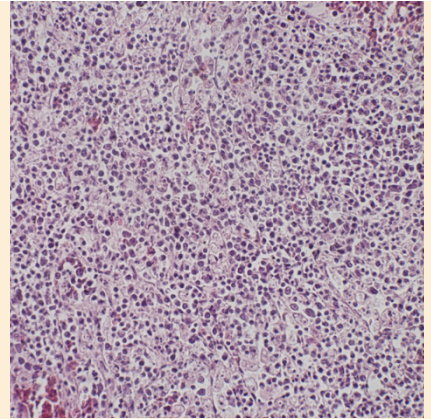
6. ÁBRA. Polimorf jellegű lymphoid sejtek proliferációja a máj állományában

FIGURE 6. Pleomorphic lymphoid cell proliferation in the liver



7. ÁBRA. Polimorf jellegű lymphoid sejtek proliferációja a vese állományában

FIGURE 7. Pleomorphic lymphoid cell proliferation in the kidneys



8. ÁBRA. Polimorf jellegű lymphoid sejtek proliferációja a lép interstitiumában

FIGURE 8. Pleomorph lymphoid cell proliferation in the spleen



9. ÁBRA. Mozcászavar tünete az állományban

FIGURE 9. Locomotor problem in the flock

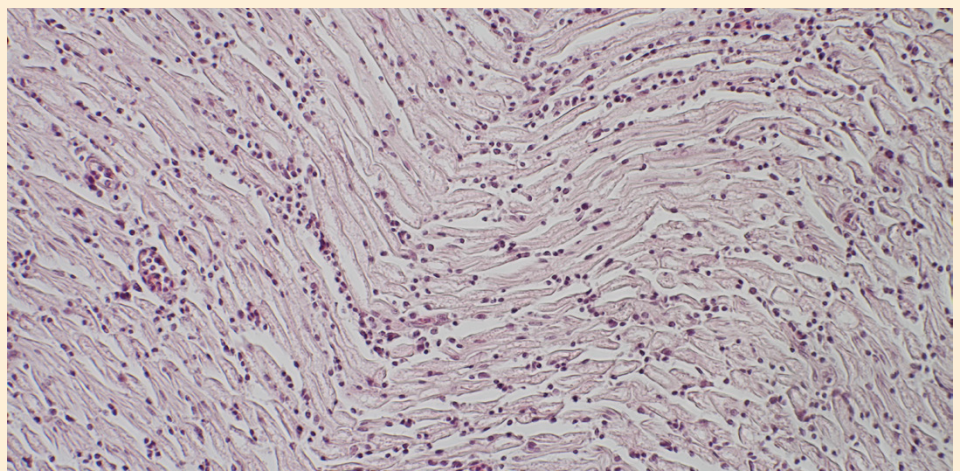


10. ÁBRA. Szürkésfehér góc a tüdő állományában (nyíl)

FIGURE 10. Greyish-white nodule in the lungs (arrow)

11. ÁBRA. Polimorf jellegű lymphoid sejtek proliferációja az ülőidegben

FIGURE 11. Pleomorph lymphoid cell proliferation in sciatic nerve



A 16 hetes állatok esetében már az ülőidegben is megfigyelték a lymphoid proliferációt

A PCR-vizsgálatok is igazolták a Marek-betegséget

Hasonló lymphoid jellegű daganatképződést gammaretrovírusok is okozhatnak pulykában

Pulykában a betegség megjelenését a fertőző vírus sajátosságain túl számos egyéb tényező is befolyásolhatja

Az utolsó vizsgálatra az állatok 16 hetes korában került sor, mivel a heti elhulás továbbra is jelentős, 46 madár/hét volt. Ekkor három lesóványodott állatot kaptunk. Az előzőekhez képest új fejlemény volt, hogy ezeknél a madaraknál az ülőidegekben is megfigyeltünk polimorf lymphoidsejtes beszűrődést (11. ábra).

Az elváltozást mutató szervekből elvégzett polimerizációs láncreakciós (PCR) vizsgálattal a Marek-betegség vírusát mutattuk ki. A kapott PCR-termék szekvenciája génbanki adatokkal való összehasonlítás alapján a legnagyobb hasonlóságot korábban 1-es szerotípusnak (jelenleg *Gallid alphaherpesvirus 2*) nevezett csoportba tartozó vírusokkal mutatta. Egyéb szóba jöhető daganatkeltő vírusokra (Reticuloendotheliosis, Avian leukózis) irányuló vizsgálatok negatív eredményre vezettek.

MEGVITATÁS

Egy utónevelés alatt álló pulykaállományban Marek-betegséget állapítottunk meg. A betegség gyanúja a morfológiai vizsgálatok alapján merült fel. Ezek egyébként alapvetően nem tértek el a mások által már leírtaktól. (6, 9, 11). A bursa vizsgálatáról a fenti cikkekben nem találtunk leírást. Csirkékben tudott, hogy a fertőzés korai szakaszában (korai citolitikus szakasz) a bursában lymphoid kiürülés figyelhető meg (17). Kísérletesen fertőzött pulykákban ez az elváltozás nem olyan kifejezett, mint csirkéken (7). Hogy az esetünkben tapasztalt lymphocita-kiürülés a vírus közvetlen, vagy közvetett hatására vezethető-e vissza, esetleg a fertőzéssel nincs is közvetlen összefüggésben, az a rendelkezésre álló adatok alapján nem eldönthető. A végső diagnózis felállítása a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok eredménye alapján történt. Pulykákban daganatképződéssel járó kórformákat idézhetnek elő a herpesvírusok mellett a gammaretrovírus nemzetségbe tartozó vírusok (REV, LPDV) is (1, 15). Morfológiailag a különböző vírusos hátterű daganatok elkülönítése teljes bizonyossággal nem lehetséges. Bár REV fertőzés esetén a daganatosan transzformálódott sejtek általában monomorf jellegűek (13), Marek-betegség esetén pedig pleomorfak, de ugyanez a helyzet a lymphoproliferatív betegség esetén is (10). Ez utóbbi esetben a diagnózist segítheti, hogy a megbetegedés az érintett állományokban csak egy-egy állatra korlátozódik.

A betegség pulykában való kórfejlődését ma sem értjük teljesen. Kísérleti fertőzésekben a pulykák érzékenyek a csirkékből izolált törzsekre, amelyek képesek voltak pulykákban is előidézni a betegség daganatos formáját. Ugyanakkor a betegség lefolyásában számos eltérést is tapasztaltak. Ebben szerepet tulajdonítanak a pulykában a herpesvírusokkal (turkey herpesvirus, HVT) szembeni ellenanyagok előfordulásának (16). A HVT elleni ellenanyagok korai előfordulását későbbi megfigyelések is megerősítették. Ugyanakkor az is valószínű, hogy a HVT ellenanyagok csak mérsékelt védelmet képesek a pulykák számára biztosítani, ha azok a Marek-betegség vírusával fertőződnek (4). A pulykák megbetegedéseiből izolált törzsekkel végzett kísérleti fertőzések során a betegséget sikerült reprodukálni, de az eredetinel kevésbé súlyos formában. Vagyis pulykában a betegség megjelenését magán a fertőző vírus sajátosságain túl, számos egyéb tényező is befolyásolhatja (5).

A fertőzés forrását felderíteni nem sikerült. Az eset érdekessége, hogy ugyanaból az előnevelőből, ahonnan a kérdéses állomány érkezett, egy másik telepre is vittek állatokat. Onnan is kaptunk vizsgálati anyagot az állatok 14 hetes korában, amelyekben a fent leírthoz hasonló morfológiai elváltozásokat találtunk. Ennek alapján felmerül a fertőzés előnevelői eredete. Ez eltér az angliai megfigyelésektől, ahol a vírust az előnevelő állományokban detektálni nem tudták (16). A fertőzést gyakran olyan pulykaállományokban észlelték, amelyek csirkeállományokkal szoros közelségben helyezkedtek el (5). Esetünkben ilyen összefüggést megállapítani nem sikerült. Japán szerzők a vírus széleskörű előfordulását állapították meg vadon

élő vízi szárnyasokban és ez alapján feltételezték, hogy ezek az állatok lényeges szerepet játszanak a vírus fenntartásában, esetleg terjesztésében (14).

A Marek-betegség pulykában való hazai előfordulásáról gyakorlatilag nincsenek publikált adataink. Egyetlen itthoni beszámolót csak évekről korábban találtunk, ami a betegség egy pulyka szülőpárállományban való megállapításáról szól (2). Az ÁDI vizsgálati anyagában az elmúlt másfél évben 3 alkalommal került a bántalom pulykában megállapításra. Az esetek jellemzően utónevelés alatt álló broiler-pulyka állományokban fordultak elő, bár egy esetben a betegség tenyésznövendék állományban diagnosztizáltuk. A kórkép tehát szórványosan, pulykaállományokban, hazánkban is előfordul, differenciáldiagnosztikai szempontból gondolni kell rá. Ezért tartottuk fontosnak esetünk ismertetését.

IRODALOM

1. ALLISON, A. B. – KEVIN KEEL, M. et al.: Avian oncogenesis induced by lymphoproliferative disease virus: a neglected or emerging retroviral pathogen? *Virology*, 2014. 450-451. 2-12.
2. ALBERT M. – HOMONNAY Z. – MATÓ T. – PÁLYA V.: Súlyos formában jelentkező Marek betegség törzspulyka állományban-esetismertetés. XXIV. Derzsy Napok, 2016. Hajdúszoboszló
3. BAIGENT, S. J. – NAIR, V. K. – LE GALLUEG, H.: Real-time PCR for differential quantification of VC1988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *J. Vir. Meth.*, 2016. 233. 23-36.
4. BLAKE-DYKE, C. – BAIGENT, S.: Marek's disease in commercial turkey flocks. *Vet. Rec.*, 2013. 173. 376.
5. DAVIDSON, I. – MALKINSON, M. – WEISMAN, Y.: Marek's disease in turkeys. I. A seven-year survey of commercial flocks and experimental infection using two field isolates. *Avian Dis.*, 2002. 46. 314-321.
6. DEUCHANDE, R. – MURPHY, A. et al.: Marek's disease in turkey. *Vet. Rec.*, 2012. 171. 602.
7. ELMUBARAK, A. K. – SHARMA, J. M. et al.: Induction of lymphomas and tumor antigen by Marek's disease virus in turkeys. *Avian Dis.*, 1981. 25. 911-926.
8. <https://talk.ictvonline.org/>
9. HUGHES, K. – ARCHER, J. et al.: Diagnostic investigation of Marek's disease in turkey. *Vet. Rec. Case Rep.*, 2016. 4: e000291.
10. IANCONESCU, M. – PERK, K. et al.: Reticuloendotheliosis and lymphoproliferative disease of turkeys. *Refu. Vet.*, 1979. 36. 2-9.
11. KUMAR, A. R. – LAKSHMI, M. N. et al.: Marek's disease outbreak among vaccinated flock of broad breasted white turkey breed. *J. Ent. Zool. Stud.*, 2019. 7. 876-879.
12. MAREK J.: Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 1907. 15. 417-421.
13. McDOUGALL, J. S. – BIGGS, P. M. – SHILETTO, W. F. R.: A leukosis in turkeys associated with infection with reticuloendotheliosis virus. *Avian Path.*, 1978. 7. 557-568.
14. MURATA, S. – HAYASI, Y. et al.: Surveillance of Marek's disease virus in migratory and sedentary birds in Hokkaido Japan. *Vet. J.*, 2012. 192. 538-540.
15. PAYNE, L. N. – VENUGOPAL, K.: Neoplastic disease: Marek's disease, avian leukosis, and reticuloendotheliosis. *Rev. Scient. Tech.*, 2000. 19. 544-564.
16. POWELL, P. C. – HOWES, A. M. et al.: Marek's disease in turkeys: The induction of lesions and the establishment of lymphoid cell lines. *Avian Path.*, 1984. 13. 201-214.
17. SCHAT, K. A. – VENUGOPAL, N.: Marek's disease In: SWAYNE D. E. (ed. in chief) *Diseases of poultry* 13th ed. Wiley-Blackwell. Ames. 2013. 515-552.

Közlésre érkező: 2020. márc. 16.

**Flow cytometer as
a diagnostic tool for
lymphoma in veterinary
oncology**

E. Karai*
V. Dékay
P. Vajdovich

Állatorvostudományi Egyetem,
Kórleletani és Onkológiai Tanszék
H-1078 Budapest, István utca 2.

*e-mail: Karai.Edina@univet.hu

Az áramlási citométer, mint a lymphoma diagnosztikájában alkalmazható eszköz az állatorvosi onkológiában

Karai Edina*, Dékay Valéria, Vajdovich Péter

Összefoglalás

Jelen tanulmányukban a szerzők ismertetik az áramlási citométer alkalmazási lehetőségeit az állatgyógyászatban, különös tekintettel az onkológia területére, bemutatva a módszer előnyeit, lehetséges korlátait. Munkájuk során a szerzők kutyákból származó lymphomamintákon meghatározták a daganatsejtek immunfenotípusát áramlási citométer és immunhisztokémia segítségével. Ezt követően 35 lymphomás kutya mintája esetében összehasonlították a B- és T-sejt markerek arányát, a két módszer elvégzésével bizonyítva az áramlási citometria megbízhatóságát. Az áramlási citométer egy viszonylag gyors diagnosztikai módszer, amely nagymértékben segíti a helyes kórismét, kevésbé invazív, de morfológiai elemzésre nem alkalmas, szemben az immunhisztokémiai vizsgálattal.

Summary

Background: According to the new molecular diagnostic methods in oncology, patient tailored therapy is more effective instead of using standard chemotherapeutic protocol. To use modern treatment, the immunophenotype, which is a prognostic factor, and many other properties of the tumour should be measured. The immunophenotype of lymphoid tumour cells can be determined by flow cytometry (FC) or by immunohistochemical staining (IHC) or even by PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) in veterinary and human medicine.

Objectives: The FC measurement was compared to the "golden standard" IHC technique in 35 patients diagnosed with lymphoma. The ratio of B and T-cell markers were determined by FC and IHC. The authors aim was to evaluate the usefulness of the FC measurements as a part of the routine diagnostic method.

Materials and Methods: 35 canine patients were included in this study with multicentric lymphoma. All dogs were staged and sub-staged. Tissue samples were taken by fine needle aspiration and monoclonal antibodies were added to the samples in case of FC, while surgical excision and polyclonal antibodies were used during IHC analysis. The expression pattern of antibodies was measured by FC and by IHC. The correlation between the two methods was determined by different statistical analysis.

Results and Discussion: The correlation between the T-cell markers ($CD3_{IHC}$ compared to $CD3_{FC}$) and B-cell markers ($CD79a_{IHC}$ compared to $CD21_{FC}$) were positive, $R = 0.8334$ ($p < 0.00001$) and $R = 0.6560$ ($p = 0.00002$), respectively. However, comparing the two methods, a significant difference was detected in the percentage of individual CD-markers. The bias of the FC-method was more than 100% in each group compared to IHC. This difference did not hamper the diagnostic efficacy, and it can be concluded that FC analysis is a reliable method to distinguish B-cell and T-cell lymphoma/leukaemia. The method is faster and fine needle aspiration is relatively non-invasive in case of FC. Morphological analysis however can only be performed upon IHC.

Az áramlási citometria (flow cytometry, FC) egy minőségi és mennyiségi vizsgálatra is alkalmas diagnosztikai módszer. Nagyobb sejtmennyiség gyors, multiparaméteres vizsgálatát teszi lehetővé, vagyis amellet, hogy rövid időn belül 10^6 nagyságrendű sejtet vizsgál, egyetlen vizsgált sejtről egyidejűleg több jellemzőt is megad (sejtméret, belső szerkezet, fehérjék jelenléte a felszínen, jelöléstől függően egyéb 4–6 fluoreszcens molekula jele). A technológiát számos területen használják, így nélkülözhetetlen az immunológia, a diagnosztika és a humán onkológiában végzett prognosztikai vizsgálatokhoz (7, 21). Az áramlási citometria, mint diagnosztikai módszer a 20. század végén jelent meg az állatorvógyászatban (29) és egyre nagyobb szerepet kap az állatorvosi onkológia és immunológia területén (5, 27). Továbbá kutatási célra is gyakran használt módszer. A rosszindulatú hematológiai kórképek differenciál-diagnosztikáján kívül DNS- és RNS-tartalomról is nyerhetünk információt, így a sejtciklus-elemzés és az apoptózismérés is megvalósítható (24, 37). Funkcionális vizsgálatok is elvégezhetők a műszerrel, így meghatározható a proliferációs index, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, valamint a sejtfelszíni P-glikoprotein membrántranszporter (Pgp) funkció (23).

Az áramlási citometria egy minőségi és mennyiségi vizsgálatra is alkalmas diagnosztikai módszer

A módszer rövid idő alatt nagyszámú sejtet vizsgál, egyidejűleg több jellemző alapján

A daganatok pontos azonosítása gyakran csak immunfenotipizálással lehetséges

A Pgp okozta multidrog-rezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében a különböző állatmodelleknek is nagy szerepe van (10). Az áramlási citométerrel meghatározott immunfenotípus és Pgp funkcionális vizsgálat alkalmazásával egyaránt megvalósíthatók az újszerű, egyénre szabott kezelések. A molekuláris diagnosztika új szemléletmódja is ebbe a kezelési irányba mutat, miszerint a hagyományos kemoterápiás szerek alkalmazása helyett a célzott és egyénre szabott kezelések hatékonyabbak (2). A korszerű terápia megválasztásához szükséges a daganatos betegség széleskörű ismerete, így a daganat típusa és sok egyéb tulajdonsága (13). A pontos diagnózis felállításához nélkülözhetetlen az immunfenotipizálás, amelyet áramlási citometriával is meghatározhatunk. Ez a módszer pár órán belül eredményt adhat az adott beteg daganatának típusáról, szemben a többi vizsgálattal (20). Továbbá a mintavételi eljárásnál elegendő a vékonytű-aspirációs technika (fine needle aspiration, FNA), tehát minimálisan invazív beavatkozást igényel (20).

IMMUNFENOTIPIZÁLÁS

Az eljárás fő célja, hogy meghatározzuk a kóros daganat, így pl. a lymphoma B- vagy T-sejtes jellegét, valamint érettségi stádiumát és jellegzetes sejtfelszíni struktúráit, ezáltal lehetőség nyílik a betegség alcsoportokba sorolására is, ezen felül a módszer segítségével meghatározható a stage, továbbá a minimális reziduális betegség is (1, 35). Az immunfenotípus-meghatározást gyakran alkalmazzák lympho-hematopoetikus rendszer rosszindulatú betegségeinek vizsgálatában. Az állatorvosi onkológiában nélkülözhetetlen a pontos diagnózis, amely a kezelés és a prognózis szempontjából egyaránt fontos.

A lymphoma a kutyák egyik leggyakoribb daganatos betegsége

A lymphoma a kutyák egyik leggyakoribb daganatos betegsége, 100 000 kutyából évente 84 esetet diagnosztizálnak (9), amelyek 70%-a diffúz, nagy B-sejtes lymphoma (11). Ez a kórkép, általában az idősebb, 9 év feletti kutyákat érinti, de előfordulhat bármely életkorban és minden kutyafajtában (33). Kutatócsoportunk egy 2018-as tanulmánya is igazolja a 70%-os előfordulási arányt, amely szerint a medián túlélési idő (overall survival time, OST) 253 nap, míg a relapszus mentes túlélési idő (relapse free survival, RFS) 167 nap volt (34). A kisebb százalékban kialakuló T-sejtes lymphoma kevésbé jól reagál a kemoterápiás kezelésre 150 nap OST és 81 nap RFS volt jellemző (34), ezért az immunfenotípus-meghatározás prognosztikai faktorként fontos a kezelés megállapításában (15).

**A lymphomatípusok
elkülönítése történhet
immunhisztokémiai
módszerrel vagy
áramlási citometriával**

A lymphomatípusok elkülönítése történhet immunhisztokémiai (IHK) módszerrel vagy direkt, jelölt ellenanyagokat használva áramlási citométer segítségével. Az immunfenotipizálás esetében megkülönböztetünk direkt és indirekt módszert a fluoreszcens festék és a specifikus kötődést biztosító monoklonális antitest kapcsolata szerint. Előbbi esetében a jelölésre használt festékhez a vizsgálni kívánt antigénre specifikus monoklonális antitest (primer antitest) kapcsolódik, míg indirekt módszer esetében a primer antitest jelöletlen, ezért a láthatóvá tételéhez valamilyen második, jelzett antitestre van szükség (szekunder jelzett antitest).

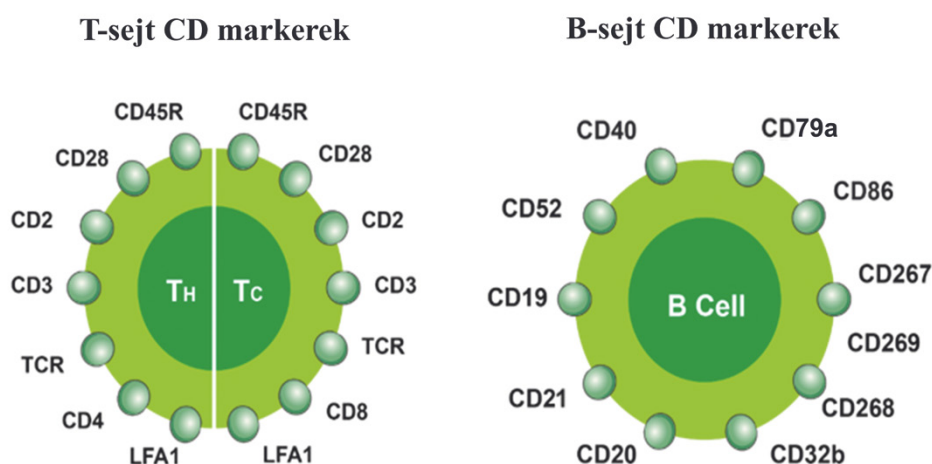
Immunfenotipizálás immunhisztokémiai módszerrel

Az állatorvosi gyakorlatban általános diagnosztikai módszerként az indirekt eljárás terjedt el az immunhisztokémiai vizsgálatok esetében, amely azonban időigényes (4). A formalinos fixálás során a fehérjék háromdimenziós morfológiája módosul, vizsgálatra alkalmatlanná téve így az antigéneket. Ennek okán az immunhisztokémiai munkafolyamat első lépése az antigének feltárása. Az egyik leggyakrabban használt feltárási módszer az úgynevezett „hőindukálta epitopfeltárás”. Ezen módszer alapja, hogy a formaldehid és a fehérjék közötti kémiai reakció visszafordítható bizonyos puffer-oldatokban (pl. citrát), magas hő hatására. A megfelelő magasságú hőmérsékletet általában mikrohullámú sütővel érik el. A feltárás sikerességéhez elengedhetetlen a megfelelő pH-jú oldat használata, a megfelelő hőmérséklet, valamint inkubációs idő (26). Az immunhisztokémiai reakció lényege, hogy a vizsgálni kívánt antigénhez specifikusan és erősen képes kötődni a használt antitest. Ezen antigénekben megtalálható epitopok jellemzően 5–6 aminosavból álló molekulák, amelyekhez általában többféle antitest is képes kötődni. A felhasznált ellenanyag leggyakrabban monoklonális, amely lehetőleg egyetlen antigénre specifikus, elkerülve így a kereszt-reakciókat, fals pozitív reakciót (12). Az immunhisztokémiában lymphoma-diagnosztizálására leggyakrabban használt antitestek az anti-CD3, anti-CD20 vagy anti-CD79a. A „cluster of differentiation” (CD) molekulák általában olyan membránhoz kötött glikoproteinek, amelyeknek lehet receptor-, jelátviteli funkciója, szerepük lehet sejtek közötti kommunikációban, lehet enzimatikus aktivitásuk, továbbá gyakran sejt-specifikusan expresszálódnak (1. ábra) (39).

**Az immunhisztokémiai
reakció során
formalinban fixált
szövetekben azonosítanak
antigéneket primer és
jelölt, szekunder ellen-
anyagok segítségével**

1. ÁBRA. A lymphoma diagnosztikájában használt markerek

FIGURE 1. A list of commonly-used markers



A CD3-antigén több glikoprotein-molekulában is megtalálható T-sejt receptorokhoz kötődően. Kifejeződése a sejtmembránon és a citoplazmában vizsgálható. Az onkológiai diagnosztikában nagy specifitása miatt T-sejtes lymphoma elkülönítéséhez használatos. CD20-antigén egy transzmembrán proteinhez tartozik,

*A CD3 a T-sejtes,
a CD20 és a CD79a
a B-sejtes lymphomák
diagnosztikájában
használatos*

amely az éretlen és érett B-sejtek membránján fejeződik ki. Az onkológiai diagnosztikában kiváló B-sejtes lymphoma marker, mintázata hasonló a CD79a megoszlásához. Az esetek kevesebb, mint 20%-ban plazmasejtes elváltozásokban is előfordul pozitivitás. A CD79a-fehérje a CD79 transzmembrán immunoglobulinhoz kötődően fordul elő, leggyakrabban citoplazma-reaktivitást eredményez. Az éretlen és érett B-sejteken kívül ritkán kifejeződhet plazmasejteken is, valamint megjelenhet simaizomrostokban (16). Az antigén-antitest reakció önmagában nem látható fénymikroszkóp alatt, ezért szükség van további jelölésre, ami láthatóvá teszi a kötődést. Ehhez leggyakrabban a másodlagos ellenanyagokhoz kötött enzimek használatosak (pl. peroxidáz), amely specifikus szubsztrát jelenlétekor a hozzáadott kromogén molekulát láthatóvá teszi az antigén-antitest kapcsolat helyén. A leírt antigének esetében ez leginkább vörös, vagy barna színreakciót eredményez, amely már értékelhető fénymikroszkóp alatt (25).

Az immunhisztokémiai feldolgozás utolsó lépése során patológus mikroszkóp alatt értékeli a reakciót. Figyelembe kell venni a vörös vagy barnás festődés, tehát a pozitivitás helyét, a mintázatot, az intenzitást, valamint az expresszáló sejtek százalékos megoszlását (12).

Immunfenotipizálás áramlási citométerrel

Az immunhisztokémiai elemzés hosszabb időt vesz igénybe, ezen vizsgálatok eredményére gyakran egy hetet is kell várni a kezelőorvosnak, ezzel szemben az áramlási citometriai vizsgálatoknál csupán pár óra elteltével választ kaphatunk a lymphoma típusáról. Az módszer további előnye, hogy a vizsgálat elvégezhető vékonytű-aspirációs technikával vett mintából is, így kevésbé invazív. Azonban a diagnózis megállapításához tanácsos citológiai vizsgálattal együttesen értékelni (7). FC esetében direkt, jelölt ellenanyagok használata terjedt el.

A lymphoma FC-vel történő diagnosztizálásához leggyakrabban használt markerek a következők: a perifériás T-sejtes lymphoma karakterizálásához (CD3, CD5 – általános T-sejt marker, CD4 – helper T-sejt marker vagy CD8 – citotoxikus T-sejt marker), a diffúz nagy B-sejtes lymphoma meghatározáshoz (CD21 – B-sejt marker, CD79a – pre-B-sejt marker), de találunk monocyta markert (CD14), myeloid markert (CD11/18), ill. hematopoetikus őssejt markert is (CD34). Míg immunhisztokémia esetében B-sejtek detektálására a CD20 vagy CD79a markerek használata terjedt el általános módszerként (32), addig áramlási citometria esetében a CD21 markert alkalmazzák a B-sejtek kimutatására, a CD79a markerrel csak a korai érési fázisban lévő éretlen B-sejtek különíthetők el a plazmasejtektől kutyák esetében. A CD79a ráadásul intracelluláris marker, szemben a sejtfelszíni CD21 markerrel, így előbbi használatához szükség van a sejtek fixálására, továbbá a membrán permeabilitásának csökkentésére is, ezáltal már nem az élő sejtek vizsgálata történik (38).

Mindezek ismeretében a megfelelő CD-markerpanellel történő immunfenotípus-meghatározásával és a betegség altípusokba sorolásával lehetőség nyílik, hogy a leghatékonyabb vegyületeket vagy azok kombinációját, jól megtervezett gyógykezelést alkalmazzunk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

BETEGADATOK, MINTAVÉTEL

A mintagyűjtés 2014 és 2019 között történt az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban. 35 multicentrikus lymphomával diagnosztizált beteg átlagéletkora 7,6 ($\pm 2,5$) év volt, 17 nőtény és 18 hím szerepelt a vizsgálatban, a kutyafajtákat tekintve 7 keverék, 3 magyar vizsla, 3 golden retriever, 2 német juhász, 2 jack russel terrier volt, de előfordult argentin dog, francia bulldog, fox terrier, husky, welsh corgi, shi-tzu is a betegek között. A kutyák stage és substage meghatározása a WHO által létrehozott rendszer szerint történt (35). A diagnózist tekintve

*Az áramlási citometria
direkt, jelölt ellen-
anyagokat használ, ill.
vékonytű-aspirációs
mintán is elvégezhető*

*Lymphomák áramlási
citometriai jellemzéséhez
számos T- és B-sejt
marker felhasználható*

*A vizsgálatba 35
lymphomás kutyát
vontak be*

gyakoribb volt a B-sejtes lymphoma, a diffúz nagy B-sejtes lymphoma (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 22 esetben fordult elő, de találkoztunk kis B-sejtes, nagy sejtes immunoblasztos, T-sejt gazdag B-sejtes lymphomával is, míg T-sejtes lymphomák közül 5 esetben volt perifériás T-sejtes lymphoma-más csoportba be nem sorolt (peripheral T cell lymphoma not otherwise specified, PTCL-NOS) és szerepelt T-sejtes cutan, T-lymphoblasztos lymphoma is.

Vékonytű-aspirációs mintavétel

Az alapbetegség citológiai diagnózisához, valamint áramlás citometriai vizsgálathoz vékonytű-aspirációs mintát vettünk. A mintavételhez előkészítettünk két darab tárgylemezt, az FC-hez használatos mintavételi csövet, két 5 ml-es fecskendő, valamint egy 22G (fekete) és egy 18G (rózsaszín) tűt. A kiválasztott, megnagyobbodott nyirokcsomót egyik kezünkben rögzítettük, másik kezünkkel a tűs fecskendőt beszúrtuk a szövetbe. Ugyanezen kezünkkel a fecskendővel vákuumot képeztünk, majd reszelő mozdulatokkal aspiráltuk a sejteket. A citológiai vizsgálathoz a 22G tűt levettük a fecskendőről, a fecskendőt megszívtuk levegővel, majd visszatéve a tűt határozott mozdulattal kinyomtuk a levegőt, így applikálva a mintát a tárgylemezre. Ezt a mozdulatsort két-három alkalommal elvégeztük, majd a két tárgylemezt összeillesztettük, és a lemezek összenyomása nélkül finom és gyors mozdulattal széthúztuk. A citológiai vizsgálathoz alkoholos fixálást követően mindkét tárgylemezt gyors festést lehetővé tévő készlettel megfestettük (REAGENT Ltd., Budapest). A citológiai mintavételhez hasonló módon végeztük el az áramlás citometriai vizsgálathoz az aspirációt, ezúttal 18G tűvel. A mintát komplettált RPMI (Life Technologies, Carlsbad, USA) folyadékot tartalmazó csőbe applikáltuk további feldolgozásig.

Mintavétel kórszövetteni vizsgálathoz

A kezelés megtervezéséhez szükséges kórszövetteni mintákat általános anesztézia során nyertük. A betegeket intravénás kanülálást követően fentanyl (0,003–0,005 mg/ttkg) és propofol (5 mg/ttkg) bolussal szedáltuk. Ezt követően légcsőstubust helyeztünk be, és az altatás a továbbiakban izoflurán (1,5–2,5 V/V%), valamint oxigén gáz keverékén folyt, folyamatosan monitorozva a pácienset. A kiválasztott duzzadt nyirokcsomó felett a bőrt előkészítettük a műtéti beavatkozáshoz, majd a nyirokcsomót a bőrön ejtett metszésen keresztül kipreparáltuk a környező szövetekből. Ezt követően a sebet két rétegben zártuk, és a beteget ébredésig megfigyelés alatt tartottuk. A varratokat a műtétet követő második héten eltávolítottuk. A teljes nyirokcsomót 10%-os (v/v) formaldehid-oldatba helyeztük, majd tovább küldtük külső laboratóriumba további feldolgozás céljából.

A műtéti vagy biopsziás mintavételt követően a tumormintát RPMI (Life Technologies) médiumban tároltuk 4°C-on további feldolgozásig, amelyet legkésőbb 24 órán belül megkezdtünk. A tumort apró darabokra vágtuk, majd speciális disszociációs médiumba helyeztük (RPMI médium, 200 U/ml II-es típusú kollagenáz és 0,6 U/ml dispáz; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) 37 °C hőmérsékleten. A disszociált tumorsejteket steril fülke alatt 40µm-es szűrővel szűrtük, majd centrifugáltuk. A sejtszámot Sysmex XT-2000iV™ (Sysmex, Kobe Hyogo, Japán) segítségével határoztuk meg.

IMMUNFENOTIPIZÁLÁS ÁRAMLÁSI CITOMÉTERREL

A vizsgálatban kétféle CD markert használtunk a B- és T-sejtpopulációk elkülönítésére, valamint ezek izotípus-kontrolljait (CD3 klón CA17.2A12 és CD21 klón CA2.1D6, Bio-Rad Laboratories, USA) (1. táblázat). Az immunfenotipizálás elvégzéséhez 10⁶ sejtet osztottunk FACS-csővekbe, majd hozzáadtuk a direkt jelölt monoklonális ellenanyagokat és 30 percig 37 °C-os vízfürdőben jelöltük a mintákat. A jelölést 1ml hideg PBS-sel állítottuk le, majd 300 ×g centrifugálást követően 270 µl PBS-be

A diagnózishoz vékonytű-aspirációs mintát vettek citológiai és áramlási citometriai vizsgálatra

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz nyirokcsomó-biopsziás mintákat vettek

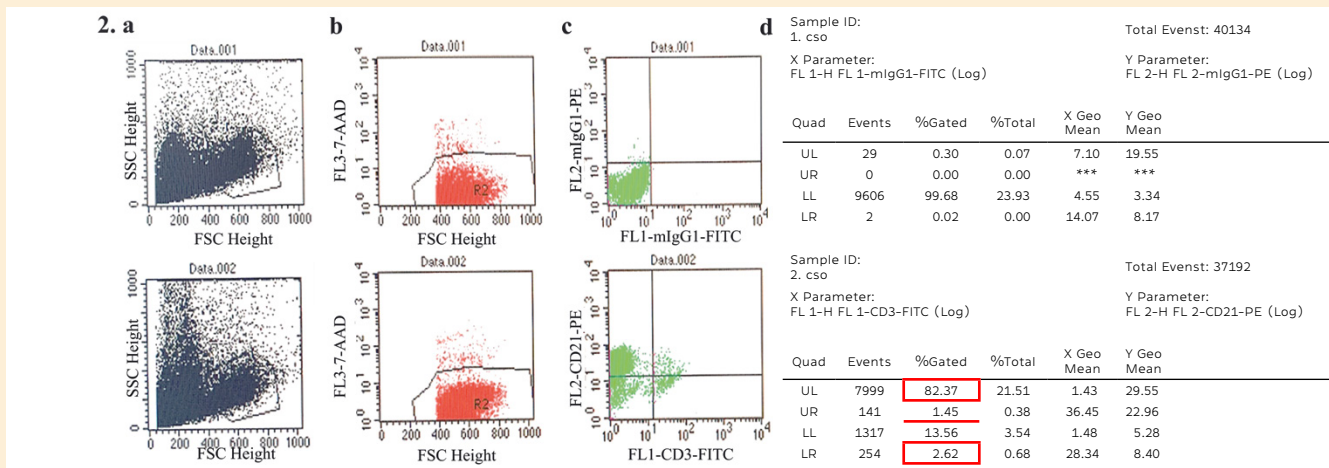
Az áramlási citometriai vizsgálatokhoz jelölt anti-CD3 és -CD21 ellenanyagokat használtak

vettük vissza a sejteket, amelyeket FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) áramlási citométer segítségével vizsgáltunk. A domináns sejtpopulációt „kapuzással” méret (FSC > 400) és granuláltság szerint (kb. 200 < SSC < 500) választottuk ki, ahol az elkülönülő populációt R1 kapuval jelöltük (7, 19) (2a ábra). Az FC-mérés megkezdése előtt 0,8 µl 7-Amino-aktinomicin D-t (7-AAD, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) festéket adtunk minden mintához, az élő és a holt sejtek elkülönítésére, ezt R2 kapuval választottuk ki (2b ábra). A mérés befejezéséhez az R1 és R2 kapunak 10 000 darab sejtet kellett tartalmaznia. A mérést abban az esetben tekintettük megbízhatónak, ha a sejtpopuláció legalább 15%-a pozitív volt valamelyik markerre az izotípus-kontrollhoz képest, ez az érték 10–30% között mozoghat más tanulmányok szerint (3, 28) (2c ábra). A CD3 és CD21 markerek százalékos kiértékeléséhez a BD CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, USA) statisztikai programját használtuk (2d ábra).

1. TÁBLÁZAT. Az áramlási citometriai mérés során használt antitestek és a hozzá tartozó izotípus-kontrollok

TABLE 1. Antibodies and their isotype controls used for the flow cytometry analysis

Antigén	Antitest/Klón	Gyártó	Izotípus ktr
CD3 FITC	CA17.2A12	Bio-Rad	egér IgG1
CD21 PE	CA2.1D6	Bio-Rad	egér IgG1



2. ÁBRA. Áramlási citométer dot plot ábrák

(a) Lymphocyták kiválasztása FSC > 400 és SSC alapján (R1 kapu). (b) 7-AA-D festékekkel élő sejtek kiválasztása (R2 kapu). (c) Izotípus kontroll segítségével a megfelelő kvadránsok elhelyezése a CD3-CD21-panelen. (d) Statisztikai kiértékelés, például bal felső kvadránsban (Upper Left [UL]) 82,37% CD21 pozitív sejt, jobb alsó kvadránsban (Lower Right [LR]) 2,62% CD3-pozitív sejt

FIGURE 2. Dot plots measured by flow cytometry

(a) Gating lymphocytes by FSC > 400 and SSC (R1 gate). (b) Gating living cells by 7-AAD fluorescent dye (R2 gate). (c) Setting right quadrants on CD3-CD21 panel by using isotype controls. (d) Statistical analysis, on Upper Left (UL) quadrant 82.37% CD21 positive cells can be observed, on Lower Right (LR) quadrant there are only 2.62% CD3 positive cells

IMMUNFENOTIPIZÁLÁS IMMUNHISZTOKÉMIA VIZSGÁLATOKKAL

Műtéti eltávolítást követően a nyirokcsomót 10%-os (v/v) formaldehid-oldatban rögzítettük, átlagosan 24 órára. A kórszövettani vizsgálatokban a Mátrix Kórszövettani és Citológiai Laboratórium, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének Laboratóriuma volt segítségünkre. A fixálást követően a szövetek felszálló alkoholsor segítségével víztelenítésre kerültek, majd xilolt helyettesítő intermediert követően (Ottix plus, Diapath S.p.A, Martinengo, I), végül 56 °C -os, folyékony paraffinvaszba lettek merítve. A folyamat utolsó lépéseként a nyirokcsomó-részletek paraffinvaszban blokkok formájában kerültek beágyazásra. Beágyazást követően 3 µm vastagságú lemetezett szöveteket tárgylemezre helyeztük. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz speciális bevont lemezekre (Superfrost Ultra Plus, TSLabor, Budapest) kerültek a metszetek. Ezt követően a minták deparaffinálása, majd rehidrációja történt. A pontos diagnózishoz a minták hematoxin-eozin festését, ill. CD3 és CD79a/CD20 immunhisztokémiai marker jelölést is elvégeztük. A CD3 és CD79a/CD20 immunhisztokémiai vizsgálatához poliklonális ellenanyag kit-eket használtunk fel. A CD3 antitest esetében (DAKO Ltd., High Wycombe, UK) a T-lymphocytákat kívántuk jelölni, CD79a/CD20 antitesttel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pedig a B-lymphocytákat különböztettük meg.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz anti-CD3, ill. -CD20/CD79a ellenanyagokat használtak

A szöveten helyeződő antigének feltárásához hőindukált epitop-kinyerési technikát kellett alkalmazni speciális feltáró oldatban. A vizsgálatunkhoz szükséges CD3 feltárása pH 9 oldat (Dako Target Retrieval Solution pH9: S2368), a CD79a és a CD20 feltárása pH 6 citrátos keverék segítségével történt. A feltárást követően a jelölés a kit-ek gyártóinak utasításai szerint zajlott. A primer antitest hígítása CD3 esetén 1:100-hoz, CD79a/CD20 esetén pedig 1:200-hoz volt. Az elsődleges ellenanyag után a másodlagos antitestek felvitele történt, szintén a protokollban megadottak szerint DAB- (3,3'-Diaminobenzidine) kromogén segítségével. A háttérfestés Hematoxylin Gill II (Merck KgaA, Darmstadt, Németország) jelöléssel történt. Pozitív és negatív kontroll a megfelelő hígítás beállításához készült. Pozitív kontrollként kutya mandulaszövet került vizsgálatra. A negatív kontrollhoz a primer ellenanyag felhasználása nélkül lett végig vezetve a jelölési protokoll.

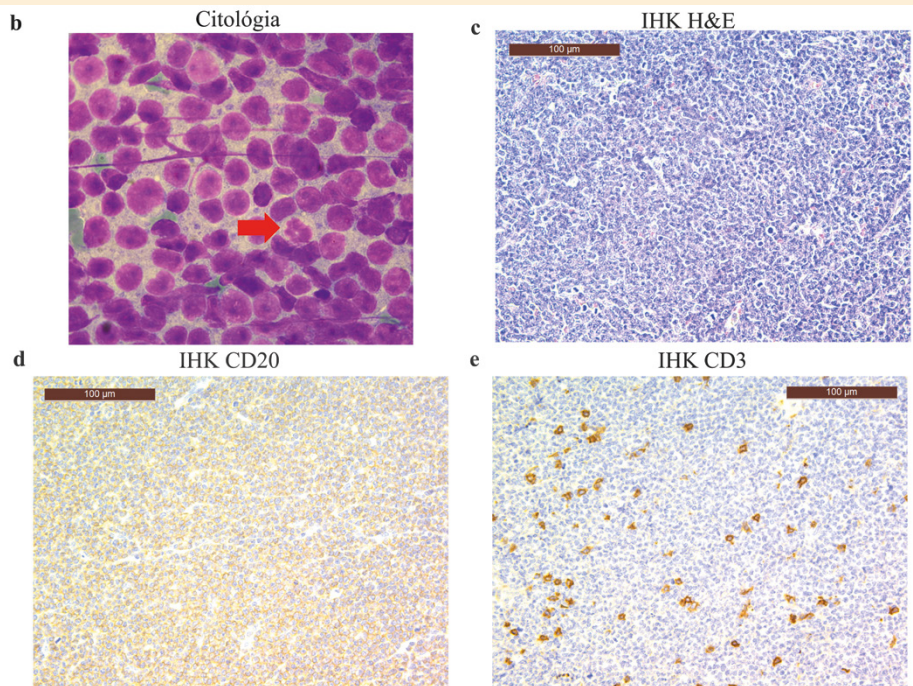
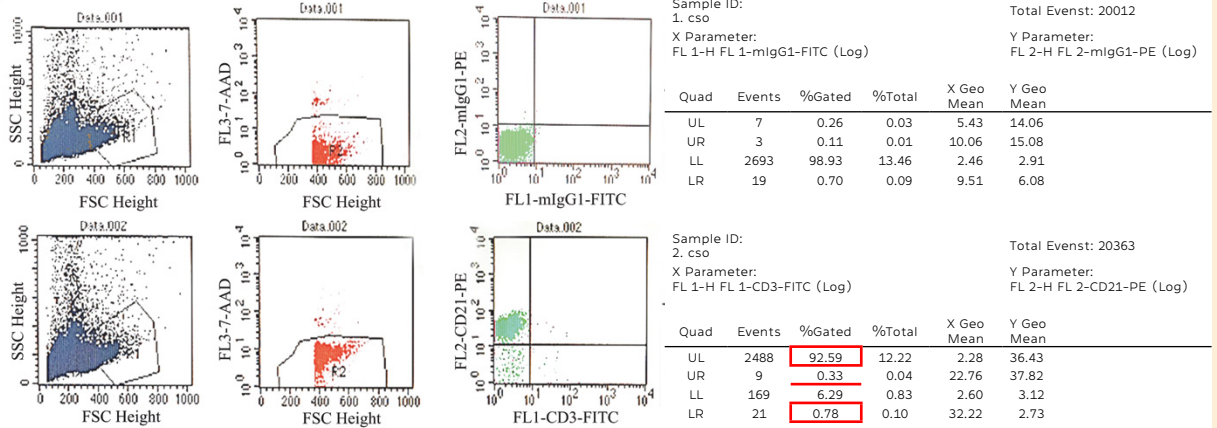
Értékelés: A betegek lymphoma-diagnózisa a nyirokcsomó-szövetekből a WHO osztályozása szerinti, állatokra adaptált ajánlás alapján történt (36). A végső diagnózis felállításához a hematoxilinnal és eozinnal festett, CD3- és CD79a/CD20-jelölt metszeteket együttesen értékeltük. Az immunhisztokémiai pozitivitás százalékos meghatározásához mindkét festés esetében a legnagyobb mértékben expresszálo területeket választottuk, és 5 nagy nagyítású látótérben, látóterenként 200 sejtet számoltunk meg (3, 22).

STATISZTIKAI VIZSGÁLAT

A T- és B-sejtek arányát százalékban kifejeztük az áramlás citometriai és az immunhisztokémiai vizsgálat során egyaránt, majd Pearson-féle korrelációs analízissel összehasonlítottuk a két módszer közötti kapcsolatot (Microsoft Excel 2019, Microsoft, Washington, USA), ill. a szignifikanciaszintet $p < 0,05$ értékben határoztuk meg. Kiszámoltuk a variációs koefficienseket (CV%), $CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$, amely alkalmas különböző átlagú változók szórásainak összevetésére, valamint a $\Delta CV\%$ értékeiből meghatároztuk az FC-torzítás mértékét az IHK-módszerhez képest az összes egyedre, majd a T- és B-sejtes lymphoma csoportokon belül is. A $\Delta CV\%$ meghatározásához előzetesen megállapítottuk a két módszer közötti különbséget az egyes markerekre vetítve, majd azok átlagából és szórásából számoltunk tovább az előző képlet segítségével.

Az immunfenotipizálás eredményeit statisztikai módszerekkel hasonlították össze

3. a

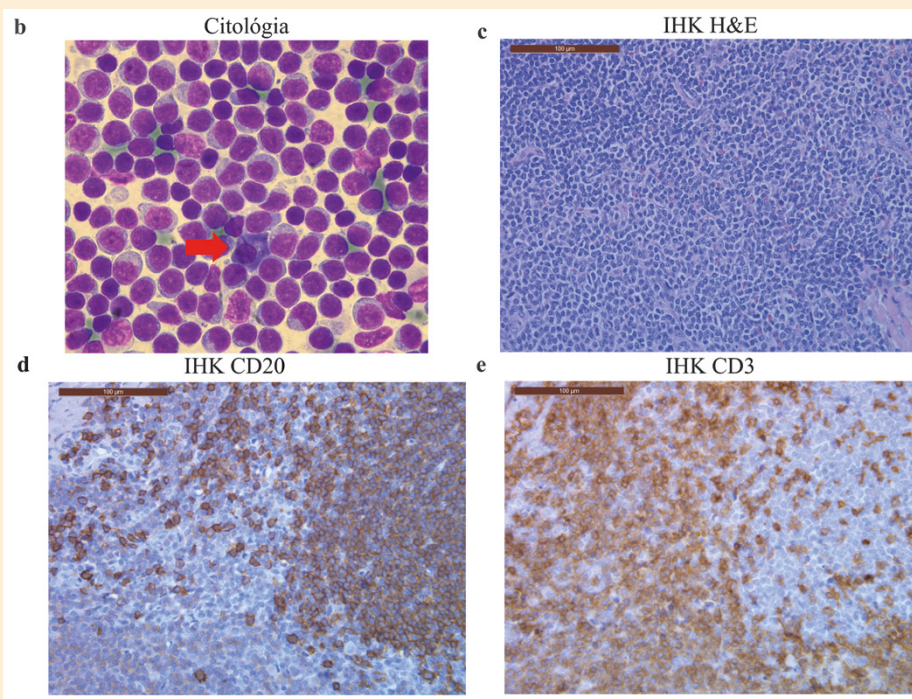
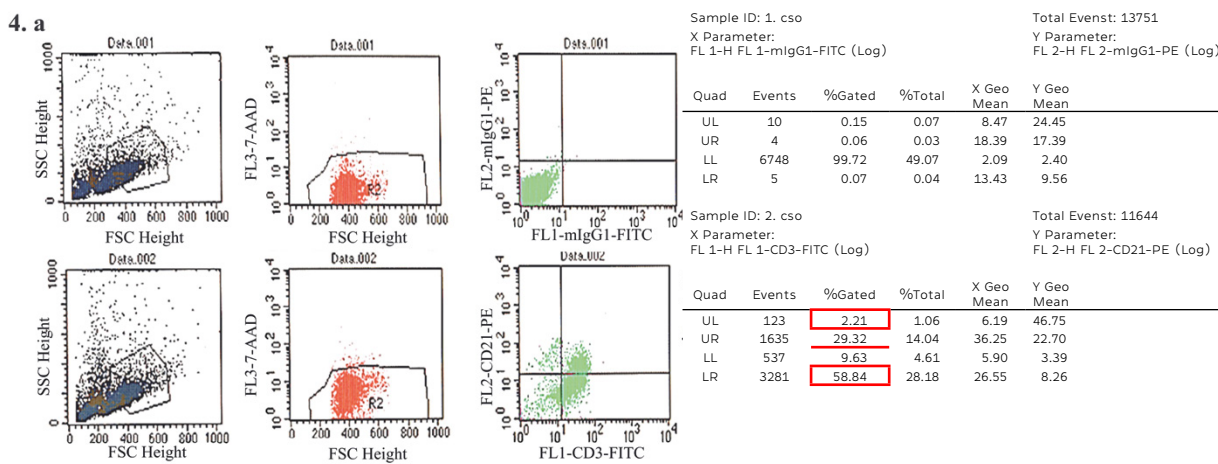


3. ÁBRA. Tipikus B-sejtes lymphoma. Diagnózis: diffúz nagy B-sejtes lymphoma

(a) FC-méréssel a CD21-pozitív sejtek aránya 92,59%, míg a CD3-pozitív sejtek aránya 0,78%. (b) Citológiai vizsgálat: A citológiai mintában számos közepesen nagy lymphoid sejt jelenik meg. Ezek mérete a vörösvérsejtek 1,5–1,7×-ese. A citoplazmák alig festődőek, kifejezetten halványan bazofilok. A magok nagyok, kerek, magbehúzóásokat többnyire nem tartalmaznak. A magvacskák halványak, esetenként több látható, nagy méretűek. A mitotikus alakok aránya 0,5/10 1000×-es látótér (piros nyíl). A sejtek között a károsodott sejtek maganyaga megnyúlt szálak formájában látszik. (c) A kórszövetteni vizsgálat hematoxilin-eozin festődése, valamint az IHK-vizsgálat szerinti (d) 90% CD20- és (e) 1% CD3-markerek expressziójának mintázata

FIGURE 3. Typical B-cell lymphoma case. Diagnosis: Diffuse large B-cell lymphoma

(a) The ratio of CD21 positive cells was 92.59%, while ratio of CD3 positive cells was 0.78% by FC measurement. (b) Cytology examination: A number of medium-sized lymphoid cells appear in the cytological sample. Their size is 1.5–1.7× that of red blood cells. Cytoplasm are hardly stained, pale basophilic. The nuclei are large, round, generally without core indentations. The nucleoli are pale, sometimes multiplex, and large. The ratio of mitotic figures is 0.5 / 10 field (1000×) view (see arrow). Among the cells, the nuclear material of the damaged cells appears in the form of elongated fibres. (c) The immunohistochemistry analysis with haematoxylin eosin stain can be seen, moreover (d) 90% of CD20 and (e) 1% of CD3 markers expression pattern by IHK analysis



4. ÁBRA. Tipikus T-sejtes lymphoma. Diagnózis: Perifériás T-sejtes lymphoma, más csoportba be nem sorolt

(a) FC-méréssel a CD3-pozitív sejtek aránya 58,84%, míg a CD21-pozitív sejtek aránya 2,21%. (b) Citológiai vizsgálat: A kenetekben számos nagy, kerek, sejt jelenik meg kb. 50%-ban kis lymphocyták, immunocyták, plazmasejtek (piros nyíl) a néhány kis, a vörösvérsejtek átmérőjének az 1–1,5×-esének megfelelő magvú, rövid nyúlványt mutató citoplazmával rendelkező T-lymphoid sejt mellett. A nagy sejtek alakja kissé egyenetlen. Ezek lymphoid sejtek, és méretük a vörösvérsejtek 2–2,5×-öse. A citoplazmák halványan granuláltak, közepesen szélesek. A magok egyenetlenek, durván szemcsézettek. Magvacskák nem láthatók. A mitotikus alakok aránya 2/10 1000×-es látótér. (c) A kórszövettani vizsgálat hematoxinil-eozin festődése, valamint az IHK-vizsgálat szerinti (d) 16% CD20- és (e) 57% CD3-markerek expressziójának mintázata

FIGURE 4. Typical T-cell lymphoma case. Diagnosis: Peripheral T-Cell Lymphoma, not otherwise specified.

(a) The ratio of CD21 positive cells was 58.84%, while ratio of CD3 positive cells was 2.21% by FC measurement. (b) Cytological examination. A number of large, round, cells appear in the smears for approx. 50% with small lymphocytes, immunocytes, plasma cells (see arrow) and some small T-lymphoid cells (with nuclei equal to 1–1.5× the diameter of red blood cells) with short protrusions. The shape of large cells is slightly uneven. These are lymphoid cells and are 2–2.5× the diameter of red blood cells. The cytoplasm are faintly granulated, moderately broad. The nuclei are uneven, coarsely grainy. The nucleoli are not visible. The ratio of mitotic figures is 2/10 field of view (1000×). (c) The immunohistochemistry analysis with haematoxylin eosin stain can be seen, moreover (d) 16% of CD20 and (e) 57% of CD3 markers expression pattern by IHK analysis

2. TÁBLÁZAT. Az eredmények összefoglalása**TABLE 2.** Summary of our results

Állatkód	kórszövetten	CD3 IHK	CD79a /CD20 IHK	CD3 FC	CD21 FC
5090-5508	DLBCL	17,00	56,00	2,00	21,00
5132-5553	DLBCL	6,00	90,00	4,00	41,00
460-491	DLBCL	2,00	92,00	13,00	2,00
5343-5749	DLBCL	1,00	80,00	1,00	60,00
4526-4925	DLBCL	10,00	96,00	1,00	4,00
4796-5196	DLBCL	11,00	96,00	0,00	61,00
6449-6895	DLBCL	4,00	73,00	0,00	80,00
4772-5172	DLBCL	3,00	86,00	1,00	87,00
4819-5221	DLBCL	2,00	94,00	0,00	98,00
4424-4828	DLBCL	22,00	52,00	1,00	17,00
5351-5756	DLBCL	3,00	85,00	2,00	80,00
5546-5945	DLBCL	7,00	82,00	3,00	61,00
6763-7236	DLBCL	5,00	65,00	1,00	69,00
6860-7341	DLBCL	15,00	58,00	6,00	24,00
6889-7371	DLBCL	7,00	52,00	6,00	40,00
6933-7417	DLBCL	12,00	82,00	3,00	82,00
7021-7507	DLBCL	1,00	55,00	3,00	12,00
7106-7597	DLBCL	8,00	85,00	1,00	35,00
7164-7656	DLBCL	3,00	90,00	1,00	93,00
7171-7664	DLBCL	3,00	41,00	1,00	24,00
7250-7751	DLBCL	2,00	87,00	4,00	52,00
5761-6169	DLBCL	9,00	79,00	1,00	17,00
981-5458	Kis B-sejtes	21,00	93,00	0,00	30,00
5020-5433	Nagy sejtes immunoblasztos	5,00	89,00	2,00	60,00
6279-6707	Follicularis lymphomára utaló kórszövet- tani és immunhisztokémiai kép	16,00	81,00	0,00	46,00
7239-7740	T-sejtgazdag B-sejtes lymphoma	27,00	43,00	14,00	62,00
7288-7793	PTCL-NOS/T-zóna lymphoma	85,00	47,00	11,00	6,00
7503-8035	T-sejtes cutan lymphoma	96,00	8,00	69,00	0,00
6946-7431	PTCL-NOS	96,00	5,00	97,00	1,00
6729-7198	PTCL-NOS	97,00	2,00	65,00	1,00
7581-8120	PTCL-NOS	89,00	11,00	28,00	0,00
7729-8288	PTCL-NOS/T-zóna lymphoma	98,00	16,00	40,00	4,00
6066-6486	T-zóna lymphoma	42,00	2,00	61,00	8,00
6877-7359	T-lymphoblastos lymphoma	89,00	2,00	91,00	0,00
8061-8656	PTCL-NOS	57,00	16,00	59,00	2,00

Kórszövetteni diagnózis, valamint a százalék meghatározás a T- és B-sejt markerekre immunhisztokémiai (IHK) és áramlási citometriai (FC) analízissel
Diagnosis according to the histopathology, moreover the ratio of T and B-cell markers determined by immunohistochemistry (IHK) and flow cytometry (FC) analysis

DLBCL: Diffúz nagy B-sejtes lymphoma, PTCL-NOS: Perifériás T-sejtes lymphoma-más csoportba be nem sorolt

DLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma, PTCL-NOS: Peripheral T-Cell Lymphoma, not Otherwise Specified

EREDMÉNYEK

IMMUNFENOTÍPUS-VIZSGÁLAT

35 multicentrikus lymphomával diagnosztizált kutya mintájából végeztük az összehasonlítást. A betegek immunfenotípusát meghatároztuk áramlási citométerrel és immunhisztokémiai módszerrel egyaránt. A B-sejtes (3. ábra) és T-sejtes (4. ábra) lymphomák aránya 26:9 volt.

Az összes esetben számított $CD3_{IHK}$ marker átlaga 27,74 ($\pm 34,55$), a $CD3_{FC}$ markerénél 16,9 ($\pm 27,72$), míg a B-sejt markereknél a $CD79a/CD20_{IHK}$ átlagértéke 59,74 ($\pm 32,34$), a $CD21_{FC}$ esetében 36,57 ($\pm 31,38$) százalékot mértünk. Pearson-féle korrelációs analízissel szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az FC-analízisnél és az IHK-festésnél használt $CD3$ T-sejt markerek között, $R = 0,8334$ ($p < 0,00001$), valamint a B-sejt markerek között is $CD21$ (FC) és $CD79a/CD20$ (IHK), $R=0,6560$ ($p = 0,00002$) (2. táblázat). Az összes esetből ($n = 35$) 4 olyan mérés volt, amelyiknél az FC-vizsgálat során a sejtpopuláció nem érte el a 15%-os pozitivitást egyik markerre sem, és ezek közül 1 esetben volt ellentmondás az immunhisztokémiai eredményhez képest.

A két módszer (IHK és FC) értékei között különbséget is felfedeztünk a B-sejtes és T-sejtes lymphomás betegek esetében. A B-sejt markereknél mindkét módszerre jellemző volt, hogy a variabilitás (CV%) nagyobb a T-sejtes lymphomák csoportjában és a T-sejtes markerekre nézve a B-sejtes lymphomákban (3. táblázat CV%). Elvégeztük ezeknek a csoportoknak az átlagértékek és CV%-ok korrelációs vizsgálatát, amelyek fordítottan arányosak voltak a B-sejtes ($R = -0,9320$), ill. a T-sejtes ($R = -0,9936$) lymphomák esetében is. Ezt azt jelenti, hogy ha az adott markerre gyenge pozitivitást mutatott a minta IHK- és FC-vizsgálatnál, akkor kicsik voltak a %-ok átlagértékei, így a variációs koefficiensek magas értékeket adtak.

Szignifikáns pozitív korrelációt találtak a két módszerrel végzett immunfenotipizálás eredményei között

3. TÁBLÁZAT. Statisztikai eredmények

Az összes egyedre nézve, a T- és B-sejtes lymphoma csoporton belül átlag, medián, szórás, variációs koefficiens (CV%). Kiszámoltuk a CV%-ok alapján az FC torzítását az IHK-hoz képest

TABLE 3. Results of statistical analysis

For all patient, in T- and B-cell lymphoma groups, mean, median, SD, coefficient of variation (CV%). Statistical distortion of FC was calculated from CV% compared to IHK

	Összes				T-sejtesek				B-sejtesek			
	T-sejt marker		B-sejt marker		T-sejt marker		B-sejt marker		T-sejt marker		B-sejt marker	
	IHK	FC	IHK	FC	IHK	FC	IHK	FC	IHK	FC	IHK	FC
Átlag	27,7	16,9	59,7	36,6	83,2	57,9	12,1	2,4	8,5	2,7	76,2	48,4
Medián	10,0	3,0	73,0	30,0	89,0	61,0	8,0	1,0	6,5	1,0	82,0	49,0
\pm SD	34,5	27,7	32,3	31,4	18,8	26,3	13,4	2,8	7,0	3,5	17,0	27,9
CV%	124,5	163,9	54,1	85,8	22,6	45,4	110,9	112,6	82,4	129,1	22,3	57,7
FC torzítása az IHK-hoz (T-sejt) CV%	176,6				124,2				123,6			
FC torzítása az IHK-hoz (B-sejt) CV%			114,1				130,0				101,7	

A csoportokon belüli variabilitásvizsgálat mellett a két módszer %-os arányában is találtunk különbséget, amely szignifikáns ($p < 0,05$) volt, kivéve a T-sejtes lymphomás betegek B-sejt markerei esetében. Ezt a különbséget mutatja a torzítás mértéke ($\Delta CV\%$), amit az IHK és az FC-%-ok értékeinek különbségéből számoltunk ki. A módszerrel meghatároztuk az összes egyedre vetítve az IHK-eredményekhez képest az FC-eredmények torzításának mértékét, amely 176,6% volt a T-sejt markerekre nézve, míg 114,1% volt a B-sejt markerekre számolva. Következő lépésként külön-külön vizsgálatuk a két lymphoma csoport paramétereit, így a B-sejtes lymphoma csoportban 123,61% (T-sejt markerre) és 101,67% volt (B-sejt markerre), míg a T-sejtes lymphoma csoportban 124,19% (T-sejt marker esetében) és 130,03% volt (B-sejt marker esetében) (3. táblázat).

MEGVITATÁS

A daganatos betegségek kutyák esetében vezető halálozási okok közé sorolhatók, amelyek közül a lymphoma az egyik leggyakoribb daganattípus (18). A túlélést tekintve intenzív kemoterápiás kezelés mellett a lymphomás kutyák 20%-a él további 1 évig, és mindössze 10% esetén beszélhetünk 2 éves túlélésről (17). A túlélési időt tekintve lymphoma esetén prognosztikai tényező a kor, az ivar, a stage, az immunfenotípus és a proliferációs index (31). A változók közül az utóbbi három is meghatározható áramlás citométerrel, akár egyetlen tűaspirációs mintából (7, 14, 35).

Kutatásunkban az immunfenotípus-meghatározást áramlási citométerrel és immunhisztokémiai vizsgálattal is elvégeztük 35 lymphomás kutya esetén.

A B- és T-sejt markerek arányát meghatároztuk, majd korrelációs analízissel megállapítottuk, hogy a két módszer diagnosztikai eredményei között erős szignifikáns pozitív korreláció van ($p < 0,0001$). Azonban kimutattuk, hogy nagy a CD-markerek betegek közötti %-os variabilitása. Vagyis minél kisebb volt a markerek %-os értéke, annál nagyobb volt a változékonyság. Nagyobb %-os értékeknél jobban közelített a két módszer eredménye. Habár diagnosztikai szempontból nem okozott különbséget és jó korrelációs értéket mértünk, az IHK- és az FC%-os értékek arányaiban eltértek egymástól. Ha az IHK-módszer %-os értékeit vettük alapul és ehhez hasonlítottuk az FC-értékeket, akkor jelentős torzítás jelentkezett, amelyek minden esetben nagyobbak voltak 100%-nál.

A módszerek közötti erős korreláció megfelelő diagnosztikai lehetőséget biztosít, azonban ezek a vizsgálatok nem képesek egymást teljes mértékben helyettesíteni. Az immunhisztokémiai vizsgálatok hátránya, hogy limitált számú sejt elemzésével nyerjük a %-os arányokat, míg az FC-vizsgálattal minimum 10000 db sejtet elemzünk. Ugyanakkor az immunhisztokémiai elemzés során morfológiailag jól elkülöníthetők a daganatsejtek az ép sejtektől, és ezeknek a sejteknek az immunfenotípusát tudjuk számolni. Ez a lehetőség az FC-vizsgálatban csak annyiban adott, hogy a sejteket a méretük és granuláltságuk alapján külön vizsgálhatjuk a megfelelő kapuzással, így a kisebb és a nagyobb sejtek populációjának az immunfenotípusa külön is vizsgálható, de sejt-sejt kapcsolaton alapuló információt nem ad. Az FC-vizsgálatokat szükségszerűen ki kell egészíteni citológiai vizsgálattal, amely a daganatsejtek morfológiai elemzését teszi lehetővé. Ez viszont jó lehetőséget ad a sejtek részletes morfológiai vizsgálatára. A kórszöveti vizsgálatok során is az IHK-elemzéseket ki kell egészíteni a metszetek haematoxin-eozin-festéssel történő diagnosztikájával, így a kettős vizsgálat itt is szükséges. Azonban a kórszöveti vizsgálat során a szöveti szerkezet is elemezhető, amely ennek a vizsgálatnak a diagnosztikai értékét jelentősen javítja.

Összességében, más kutatók vizsgálataihoz hasonlóan bizonyítottuk, hogy a B- és T-sejtes lymphoma elkülönítésére az FC, citológiai vizsgálattal együttesen

Az eredmények hasonlósága ellenére a két módszer nem képes egymást teljes mértékben helyettesíteni

**Az áramlási citometria
gyorsabb eredményt
szolgáltatót és a
mintavételezés is
kevésbé invazív**

alkalmas diagnosztikai módszer (7, 8, 30). Ugyanakkor, más szakirodalomban a százalékos összehasonlítást lymphománál vizsgálva nem olvastuk.

Az áramlási citometria további előnye, hogy pár órán belül eredményt ad, szemben az időigényesebb immunhisztokémiai vizsgálattal, valamint nem igényel invazív mintavételi beavatkozást, nem szükséges altatás, hiszen a vékonytű-aspirációs minta is megfelelő és nem költségesebb a vizsgálat, mint IHK esetén (6, 7). A feltételek közül fontos, hogy a minta friss legyen (24 órán belül feldolgozásra kerüljön), szállítás/tárolás 4 °C-on történjen, a minta nagy része élő sejteket tartalmazzon és elérje a 10⁶ darab sejt számot, valamint abban az esetben tekinthető megbízhatónak a vizsgálat, ha a sejtpopuláció legalább 15%-ban pozitív az egyik markerre és az eredmény nem tér el jelentősen a citológiai vizsgálat eredményétől (6). A módszer hátránya lehet, hogy Magyarországon az állatorvosságban kevés helyen található áramlási citométer, ami korlátozza az állatorvosok és ügyfelek lehetőségét. Azonban az FC irodalma folyamatosan bővül és egyre több monoklonális antitest érhető el, így a daganattípusok esetén, beleértve a lymphomát is, egyre pontosabban állapítható meg a daganat altípusa, ami segít a személyre szabott gyógykezelés megtervezésében is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak a Mátrix Kórszövettani és Citológiai Laboratórium csapatának, valamint az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszék munkatársainak a kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott segítségükért, továbbá az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központban dolgozóknak a lymphomás betegektől való mintavételért.

IRODALOM

1. ARESU, L. – ARICÒ, A. et al.: Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *Vet. J.*, 2014. 200. 318–324.
2. CAMICIA, R. – WINKLER, H. C. – HASSA P. O.: Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Mol. Cancer.*, 2015. 14. 207–269.
3. CANIONI, D. – DEAU-FISCHER, B. et al.: Prognostic Significance of New Immunohistochemical Markers in Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: A Study of 59 Cases. *PLOS ONE.*, 2009. 4. e6341.
4. CHEN, X. – CHO, D-B. – YANG, P-C.: Double staining immunohistochemistry. *N. Am. J. Med. Sci.*, 2010. 2. 241–245.
5. COMAZZI, S. – AVERY, P. R. et al.: European canine lymphoma network consensus recommendations for reporting flow cytometry in canine hematopoietic neoplasms. *Cytometry. B. Clin. Cytom.*, 2017. 92. 411–419.
6. COMAZZI, S. – COZZI, M. et al.: Effects of pre-analytical variables on flow cytometric diagnosis of canine lymphoma: A retrospective study (2009–2015). *Vet. J.*, 2018. 232. 65–69.
7. COMAZZI, S. – GELAIN, M. E.: Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet. J.*, 2011. 188. 149–155.
8. CULMSEE, K. – SIMON, D. et al.: Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2001. 48. 199–206.
9. DORN, C. R. – TAYLOR, D. O. – SCHNEIDER, R.: The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibl. Haematol.*, 1970. 36. 403–415.
10. FÜREDI A. – TÓTH SZ. – HÁMORI L. – NAGY V. – TÓVÁRI J. – SZAKÁCS G.: Állatmodellek szerepe a multidrogrezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében. *Magyar Onkológia*, 2015. 59. 338–345.
11. HAHN, K. A. – RICHARDSON, R. C. et al.: Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma? *J. Vet. Intern. Med.*, 1992. 6. 3–10.
12. HEWITT, S. M. – ROBINOWITZ, M. et al.: Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assays; approved guideline, 2nd edition. *Clinical & Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., USA*, 2011. 4. 1–39.
13. JOHNSTON, S. A. – THAMM, D. H. – LEGUTKI, J. B.: The immunosignature of canine lymphoma: characterization and diagnostic application. *BMC Cancer.*, 2014. 14. 657–668.
14. KATZ, R. L. – WOJCIK, E. M. et al.: Proliferation markers in non-Hodgkin's lymphoma. A comparative study between cytophotometric quantitation of Ki-67 and flow cytometric proliferation index on fine needle aspirates. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 1993. 15. 179–186.
15. KIUPEL, M. – TESKE, E. – BOSTOCK, D.: Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.*, 1999. 36. 292–300.
16. LEONG, A. S-Y. – COOPER, K. – LEONG, F. J. W-M.: *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*, 2nd edition. Greenwich Medical Media, London; 2003. 1–496.
17. MARCONATO, L. – ARESU, L. et al.: Opportunities and challenges of active immunotherapy in dogs with B-cell lymphoma: a 5-year experience in two veterinary oncology centers. *J. Immunother. Cancer*, 2019. 7. 146–155.

18. MARCONATO, L. – GELAIN, M. E. – COMAZZI, S.: The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol. Oncol.*, 2013. 31. 1–9.
19. MARCONATO, L. – MARTINI, V. et al.: Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: prognostic significance and proposal of a cut-off value. *Vet. J.*, 2013. 197. 776–781.
20. MARTINI, V. – MELEGA M. et al.: A retrospective study of flow cytometric characterization of suspected extranodal lymphomas in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2018. 30. 830–836.
21. MCKINNON, K.: Flow Cytometry: An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2018.120. 1–16.
22. NANETS – ENETS.: A Patológiai Szakmai Kollégium ajánlása a gastrointestinalis neuroendokrin tumorok leleteinek minimális tartalmára. *Magyar Onkológia*, 2011. 55. 53–54.
23. VAN DER POL, M. A. – BROXTERMAN, H. J. et al.: Novel multiparameter flow cytometry assay using Syto16 for the simultaneous detection of early apoptosis and apoptosis-corrected P-glycoprotein function in clinical samples. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 2003. 55. 14–21.
24. POZAROWSKI, P. – DARZYNKIEWICZ, Z.: Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.*, 2004. 28. 301–311.
25. RAMOS-VARA, J. A.: Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, 2005. 42. 405–426.
26. RAMOS-VARA, J. A. – BEISSENHERZ, M. E.: Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2000. 12. 307–311.
27. REGGETI, F. – BIENZLE, D.: Flow cytometry in veterinary oncology. *Vet. Pathol.*, 2011. 48. 223–235.
28. SELLIAH, N. – ECK, S. et al.: Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Current Protocols in Cytometry*, 2019. 87. 1–28.
29. TARRANT, J.: The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet. J.*, 2005. 170. 278–288.
30. TASCA, S. – CARLI, E. et al.: Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002–2006). *Vet. Clin. Pathol.*, 2009. 38. 2–12.
31. TESKE, E. – VAN HEERDE, P. et al.: Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994. 205. 1722–1728.
32. THALHEIM, L. – WILLIAMS, LE. et al.: Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *J. Vet. Intern. Med.*, 2013. 27.1509–1516.
33. THAMM, DH. – MACEWEN, E. G. et al.: Preclinical study of dolastatin-10 in dogs with spontaneous neoplasia. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2002. 49. 251–255.
34. VAJDOVICH, P. – KOLTAI, Zs. – DÉKAY, V. – KUNGL, K. – HARNOS, A.: Evaluation of Pgp (MDR1) immunohistochemistry in canine lymphoma – prognostic and clinical aspects. *Acta Vet. Hung.*, 2018. 66. 309–328.
35. VALLI, V. E. – KASS, P. H. et al.: Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet. Pathol.*, 2013. 50. 738–748.
36. VALLI, V. E. – SAN MYINT, M. et al.: Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet. Pathol.*, 2011. 48. 198–211.
37. WARD, M.: The use of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of malignant hematological disorders. *Pathology*, 1999. 31. 382–392.
38. WILKERSON, Mj. – DOLCE, K. et al.: Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005. 106. 179–196.
39. List of human clusters of differentiation. *Wikipedia*. 2019.

Közlésre érkező: 2020. máj. 24.

Characterization of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by MALDI-TOF MS technique

B. Horváth^{1*}
F. Peles¹
E. Albert²
Á. Erős³
R. Sipos³
K. D. Szűcs⁴
A. Micsinai⁴

1. Debreceni Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar H-4032 Debrecen, Böszörményi u. 138.

*e-mail:
horvath.brigitta920108@gmail.com

2. Állatorvostudományi Egyetem, H-1078 Budapest, István u. 2.

3. BIOMI Kft. H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

4. WESSLING Hungary Kft. H-1045 Budapest, Anonymus u. 6.

Állati eredetű, meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek vizsgálata MALDI-TOF MS-módszerrel

Horváth Brigitta^{1*}, Peles Ferenc¹, Albert Ervin², Erős Ágnes³, Sipos Rita³, Szűcs Kata Dorina⁴, Micsinai Adrienn⁴

ÖSSZEFOGLALÁS

Az állati eredetű meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) fertőzések egyre nagyobb állategészségügyi és gazdasági problémát okoznak a világ számos területén. A MALDI-TOF MS-technika, a mikroorganizmusok faji és altípus szintű elkülönítésén túl, lehetővé teszi a *Staphylococcus aureus* törzsekben egyes antimikrobiális hatóanyagokkal szembeni rezisztencia meglétének igazolását, valamint egyes klonális komplexek (CC) elkülönítését. Jelen vizsgálatban a szerzők MALDI-TOF MS-technikával elemeztek állatokból izolált MRSA-törzseket. Korábbi vizsgálatokban meghatározott specifikus csúcsokat teszteltek CC398-as és CC1-es LA-MRSA-törzseken, amelyek alkalmasnak bizonyultak a meticillin-rezisztencia meghatározására, valamint a vizsgálatba bevont CC-típusok elkülönítésére.

SUMMARY

Background: The livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) infections are growing animal health and economic problem in many parts of the world. In Europe, the strains of CC398 LA-MRSA clonal lineage were identified in pigs for the first time between 2003 and 2005, however have since been isolated from several species. Colonization is usually asymptomatic, however it can cause infections both in human and animals.

Objectives: In the present study, strains isolated from animals (horse, swine, cattle) were analysed by MALDI-TOF MS technique. Specific peaks as defined in previous studies were tested on CC398 and CC1 LA-MRSA strains, which were allow determining the methicillin resistance and distinguishing the CC types.

Materials and methods: During the examination 12 MRSA strains were analysed, from which 8 strains belonged to the clonal complex 398 and 4 belonged to the clonal complex 1. From the sample-preparation protocols, formic acid suspension method was used with α -HCCA matrix. During the identification, 6 technical replicates were performed for each strain. Isolates were identified using MALDI BioTyper 2.0 software, furthermore the specific peaks of antibiotic resistance and CC were analysed in FlexAnalysis software.

Result and discussion: Based on the result of best matches and best score values all strains were identified as *S. aureus* and *S. aureus* ssp. *aureus* by MALDI BioTyper. 7 out of 9 antibiotic resistant specific peaks were detected in more than 40% of the strains, however the peaks at 5070 m/z and 9632 m/z appeared in all strains. The peaks at 3037 m/z and 4511 m/z allow to distinguish CC398 and CC1 strains. The MALDI technique is suitable for the identification of MRSA strains and distinguish the tested CC types, thereby it offers new opportunities in veterinary diagnostic and surveillance.

Az állattenyésztéssel összefüggő meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (livestock-associated, LA-MRSA) okozta fertőzések egyre nagyobb állategészségügyi és gazdasági problémát okoznak a világ számos területén. Az LA-MRSA a 2000-es évek elején vált ismertté (23), Európában először 2003 és 2005 között azonosítottak CC398-as LA-MRSA-törzset sertésekéből, azóta azonban már több fajból izolálták. Megjelenése óta számos vizsgálat mutatott rá arra, hogy a fertőzött állatokkal hosszantartó, ismételt érintkezésben lévő személyeknél nagyobb az esélye a zoonózis kialakulásának (2). Gyakori a tünetmentes hordozás, azonban az erősen kolonizált állatokban és emberekben nagyobb valószínűséggel okozhat akár halálos kimenetelű fertőzéseket (4, 8). Az európai országokban a sertések 24–86%-a, a szarvasmarhák 31–37%-a, a baromfitegyesítő 9–37%-a, míg a sertéstelepeken dolgozó állatorvosok 44–45%-a volt MRSA-hordozó (12). Ennek ellenére úgy gondolják, hogy a kolonizáció az állatokkal való érintkezések gyakoriságától és intenzitásától, valamint az expozíció időtartamától függ, mivel feltételezések szerint az állatok inkább átmenetileg, nem pedig véglegesen válnak hordozóvá (3). A jelenlegi Európai Unió jogszabályok alapján az LA-MRSA ellenőrzése önkéntes, ezáltal vannak olyan tagállamok, amelyek ebben nem vesznek részt (2008/55/EK).

Az állattenyésztéssel összefüggő MRSA-fertőzések egyre nagyobb gondot okoznak világszerte

A MALDI-TOF MS-módszer lehetővé teszi a baktériumok elkülönítését egyedi fehérjeprofíljuk alapján

Az *S. aureus* fajok populációs szerkezete nagyrészt klonális, azaz a genom részeinek rekombinációs cseréje ritka a különféle törzsek között. Ezért a Multi Locus Sequence Typing (MLST), amellyel a 7 háztartási gén allélvariánsait és az ezekből származó szekvenciatípusokat (ST) tudják meghatározni, alkalmas az MRSA evolúciós eredetének és terjedésének nyomonkövetésére. Azokat a szekvenciatípusokat, amelyekben legalább 5 háztartási gén allélprofilja megegyezik, közös klonális komplexbe (CC) sorolják (11). Az LA-MRSA típusainak prevalenciája összefüggésben van a földrajzi elhelyezkedéssel, Európában a CC398-as a leggyakoribb típus, míg Ázsiában a CC9-es típus figyelhető meg leginkább (5). A 398-as klonális komplexbe sorolható *spa* típusok közül, a t034-es és t011-es *spa* típus volt a leggyakrabban megfigyelhető (10, 20).

A technika fejlődésével megjelentek olyan új módszerek és vizsgálatok, amelyek lehetővé teszik a mikroorganizmusok gyorsabb, költséghatékonyabb valamint megbízhatóbb azonosítását és a rutindiagnosztikai labormunkába is beilleszthető. Ilyen módszer a mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight, mass spectrometer – MALDI-TOF MS), amely lehetővé teszi a mikroorganizmusok elkülönítését az egyedi fehérjeprofíljuk alapján. A baktériumok azonosításán és altípus szintű elkülönítésén túl megjelentek olyan vizsgálatok, amelyek az antibiotikum-rezisztencia meghatározására és a különböző CC-típusok valamint ezen belül az *spa*-típusok biomarkereinek azonosítására irányultak. Jelen vizsgálat célja, az előző tanulmányokban meghatározott specifikus csúcsok tesztelése, haszonállatokból izolált MRSA-törzseken, amelyek a meticillin-rezisztencia megállapítására és a CC-típusok elkülönítésére szolgálnak. Továbbá összefüggések keresése a spektrumprofilok valamint a meghatározott MLST-típusok között.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A VIZSGÁLATBA BEVONT LA-MRSA-TÖRZSEK

A vizsgálatba bevont, ismert *spa* és MLST-típusú LA-MRSA-törzseket az Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék Haszonállat-diagnosztikai Központja biztosította számunkra. A MALDI-TOF MS-vizsgálatokat a WESSLING Hungary Kft. Mikrobiológiai Osztályán végeztük. Összesen 12 MRSA-törzset vizsgáltunk,

Összesen 12 MRSA-törzset vizsgáltak MALDI-TOF MS-módszerrel

amelyből 8 törzs a 398-as, 4 törzs pedig az 1-es klonális komplexbe tartozott. A CC398-as törzsek fele az spa típusa alapján a t011-es ($n = 4$), míg a másik fele a t034-es ($n = 4$) genotípusba volt sorolható. A CC1-es törzsek ($n = 4$) a t127 spa-típusba tartoztak. A törzseket szarvasmarhából, lóából és sertésből izolálták (1. táblázat). Az azonosításhoz a törzseket Columbia-véresagaron (Neogen, UK) tenyésztettük, 37 °C-on 24 órán keresztül.

MALDI-TOF MS-VIZSGÁLAT

A minta-előkészítési eljárások közül, a hangyasavas szuszpendálási módszert alkalmaztunk, amely során egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőben, az adott törzs egy telepét 40 µl hangyasavban szuszpendáltuk. A 30 mp örvénykeverővel történő keverést követően, 40 µl acetonitril adtunk a szuszpenzióhoz, újra megkevertük, majd lecentrifugáltuk (13 000 rpm, 3 perc). A szuszpenzió felülúszójából 1 µl-t a mintatartó lemez egyik pozíciójára cseppentettünk fel. Minden izolátum esetében párhuzamos mintafelvitelt alkalmaztunk, azaz a mintatartó lemez hat egymás alatti pozíciójára ugyanazt a mintát vittük fel. Az oldószer elpárolgása után 1 µl (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) α -HCCA (10 mg/ml) mátrix oldatot cseppentünk a mintára és lamináris boksban hagytuk beszáradni a mintát.

Bruker Microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométer alkalmazásával, 2,0–25 kDa molekulatömeg-tartományban, pozitív lineáris módban kaptuk meg az izolátumok tömegspektrumjait. A kalibrációt, a vizsgálati paraméterek beállítását, valamint a módszer fájlok aktiválását, a *flexControl* szoftver (Bruker Daltonik, Németország) alkalmazásával állítottuk be. A *Staphylococcus* spp. törzsek azonosítását a MALDI BioTyper 2.0 szoftver (Bruker Daltonik, Németország) segítségével végeztük, a szoftver a kapott tömegspektrumot a könyvtárában található referenciaspektrumokhoz hasonlítja. Az értékelés eredményeként egy pontszámot kapunk, ami az azonosításra vonatkozó számszerűsített információ, amely egy 0 és 3,000 közötti érték. Amennyiben az azonosítási pontszám nagyobb 2,000-nél, azonosítottak tekintjük a mikroorganizmust.

Az antibiotikum-rezisztencia és a CC-típusok biomarkereinek vizsgálatához a FlexAnalysis 3.4 szoftvert (Bruker Daltonik, Németország) alkalmaztuk, ahol a felvett spektrumok simítását és alapvonal korrekcióját, valamint részletes elemzését végeztük. A csúcsokhoz tartozó tömeg/töltés értékeket (m/z) Excel programba exportáltuk, ezáltal megkönnyítve a detektált csúcsok vizsgálatát.

EREDMÉNYEK

Az azonosítás során, minden törzs esetében 6 párhuzamos mérést végeztünk és az átlag azonosítási pontszám minden esetben nagyobb volt, mint 2,400, tehát azonosítottak tekinthető a faj és az alfaj egyaránt (1. táblázat). A törzsek azonosítási pontszámainak átlaga 2,485, a legkisebb érték 2,408, a legnagyobb pedig 2,543, amit a megfelelő minta-előkészítési eljárás tett lehetővé. Szabados és mtsai etanolos kivonás alkalmazásával, 239 MRSA-törzs 35%-át 2,000–2,300 pontszám között azonosították, valamint az összes törzs azonosításának átlagos pontszáma 2,323 volt (22). Az azonosítási pontszámok alapján, a gyorsabb és egyszerűbb minta-előkészítési technika alkalmazásával is, mint amilyen a hangyasavas szuszpenzió, elérhető a biztonságos azonosítás.

A MALDI BioTyper szoftver lehetővé teszi az altípusok azonosítását is, mivel 4 *S. aureus* (ATCC 33862, ATCC 33591, ATCC 29213 és az ATCC 25923) referenciaspektrumán túl, 9 *S. aureus* ssp. *aureus* (DSM 799, DSM 4910, DSM 3463, DSM 346, DSM 20652, DSM 20491, DSM 20232, DSM 20231T, DSM 11822) és 1 *S. aureus* ssp. *anaerobius* (DSM 207) referenciatörzs tömegspektrumát is tartalmazza az adatbázis. A szoftver könyvtárában szereplő referenciaspektrumok közül, a legtöbb törzs ($n = 9$) a *S. aureus* ssp. *aureus* DSM 799 tömegspektrumával mutatta a legnagyobb hasonlóságot,

Megvizsgálták az antibiotikum-rezisztencia és a klonális komplexek biomarkereit is

Minden törzs esetében 6 párhuzamos mérést végeztek

1. TÁBLÁZAT. Az LA-MRSA-törzsek azonosításának eredményei MALDI-TOF MS-technikával

TABLE 1. The results of identification of LA-MRSA strains by MALDI-TOF MS technique

Azonosító	spa típus	MLST típus	Faj	Azonosítási pontszám	Azonosítás eredménye
127	t011	ST398	szarvasmarha	2,453	1
146	t011	ST398	szarvasmarha	2,534	1
297	t011	ST398	ló	2,467	1
136	t011	ST398	sertés	2,543	1
237	t034	ST398	szarvasmarha	2,465	1
034	t034	ST398	sertés	2,467	1
113	t034	ST398	sertés	2,474	1
126	t034	ST398	sertés	2,408	3
116	t127	ST1	szarvasmarha	2,483	2
121	t127	ST1	szarvasmarha	2,526	2
145	t127	ST1	szarvasmarha	2,488	1
329	t127	ST1	ló	2,517	1

1: *Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 799*; 2: *Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 20231T DSM*; 3: *Staphylococcus aureus ATCC 33862 THL*

2. TÁBLÁZAT. Előző tanulmányokban meghatározott MRSA-specifikus csúcsok vizsgálatának eredménye

TABLE 2. Results of testing of MRSA specific peaks identified in previous studies

Tanulmány	MRSA specifikus csúcs (m/z)	CC398						CC1					
		t011			t034			t127					
		127	146	297	136	237	034	113	126	116	121	145	329
EDWARDS-JONES és mtsai, 2000	2127			+				+					
SOGAWA és mtsai, 2017	3043	+	+	+	+	+		+	+			+	
JUNG-MIN és mtsai, 2019	4607		+					+	+	+			
KWON és mtsai, 2017	5070	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CHARYULU és mtsai, 2012	6576		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
CHARYULU és mtsai, 2012	6885	+		+					+			+	
JUNG-MIN és mtsai, 2019	9216			+				+		+		+	+
MANUKUMAR és mtsai, 2017	9632	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KWON és mtsai, 2017	10152							+					

a csúcsok jelenléte és szimmetriája alapján. Továbbá 2 izolátum spektrumprofilja alapján, a *Staphylococcus aureus ssp. aureus DSM 20231T* referenciatörzs, 1 törzs tömegspektruma alapján pedig a *Staphylococcus aureus ATCC 33862* referenciatörzs volt a legközelebbi azonosítási találat. Az azonosítás eredményei alapján tehát kizárható, a *S. aureus ssp. anaerobius* jelenléte, amely fontos tényező volt a specifikus csúcsok kimutatása szempontjából, az alfajra jellemző eltérő fehérjeprofili miatt (19). Az CC398-as LA-MRSA-törzsek (n = 8) közül 1, míg az CC1-es törzsek (n = 4) közül 2 törzs esetében eltérő azonosítási eredményt kaptunk.

A jelenlegi vizsgálatban összesen 12 csúcspot teszteltünk, amelyet előző tanulmányok határoztak meg az MRSA-törzsek, valamint egyes CC-típusok biomarkereiként. EDWARD-JONES és mtsai 500–2000 m/z tartományban kerestek olyan csúcspot, amelyek alkalmasak lehetnek az meticillin-rezisztens *S. aureus* törzsek azonosítására (9). Az általuk meghatározott egyik csúcs a 2127 m/z, amely a tesztelt törzsek közül, összesen 2 CC398-as izolátum esetében volt detektálható, azonban egyik CC1-es törzsből sem volt jelen (2. táblázat). SOGAWA és mtsai által meghatározott 3043 m/z MRSA-specifikus csúcs, amely a szekvenálási eredményeik alapján a (penicillin binding protein 2A) PBP2a fehérje egyik fragmentuma, a törzsek 77%-ában volt detektálható, azonban ez a csúcs a szoftver adatbázisában szereplő meticillin-érzékeny *S. aureus* ssp. *aureus* DSM 799 törzs referenciaspektrumában is megfigyelhető volt (21). A 4607 m/z csúcs 4 CC398-as törzsből jelen volt, azonban egyetlen CC1-es törzsből sem volt megfigyelhető. KWON és mtsai tanulmánya alapján az 5070 m/z és 10152 m/z specifikus csúcs a vizsgált MRSA-izolátumok ($n = 34$) 79,4%-ában megtalálhatóak voltak (16). Jelen vizsgálat során két csúcs, az 5070 m/z és a 9632 m/z volt kimutatható minden izolátumban, azonban a 9632 m/z csúcs az azonosítás eredményeként megjelölt meticillin-érzékeny *S. aureus* törzsek referenciaspektrumaiban is megtalálható volt. A 10152 m/z csúcs csak a t034-es t034-*spa* típusú törzsből volt kimutatható.

A 3037 m/z fehérje, amely JOSTEN és mtsai szekvenálási eredményei alapján egy delta-toxin, a specifikus csúcsa a CC1-es törzseknek (13), amely jelen vizsgálatban is csak ezekben az MLST-típusú izolátumokban volt jelen (3. táblázat). A 4511 m/z és az 5004 m/z specifikus marker, csak a CC398-as törzsek esetében volt kimutatható a jelenlegi vizsgálatban is. Az 5004 m/z azonban egyetlen t034-*spa*-típusú törzsből volt megfigyelhető.

3. TÁBLÁZAT. Előző tanulmányokban meghatározott CC specifikus csúcsok vizsgálatának eredménye

TABLE 3. Result of testing of CC specific peaks identified in previous studies

Tanulmány	CC-specifikus csúcs (m/z)	CC398						CC1					
		t011			t034			t127					
		127	146	297	136	237	034	113	126	116	121	145	329
JOSTEN és mtsai, 2014	3037									+	+	+	+
JOSTEN és mtsai, 2013 ØSTERGAARD és mtsai, 2018	4511	+	+	+	+	+	+	+	+				
CAMOEZ és mtsai, 2015	5004												

MEGVITATÁS

A MALDI-TOF MS-technika alkalmas a *S. aureus* faj, valamint alfajok megbízható azonosítására

A MALDI-TOF MS-technika alkalmas a *S. aureus* faj, valamint alfajok megbízható azonosítására, mivel minden izolátum esetében nagyobb azonosítási pontszámot kaptunk, mint 2,400. A vizsgált törzsek csúcsprofilja, valamint a csúcsok szimmetriája alapján a legtöbb törzs ($n = 9$) a *S. aureus* ssp. *aureus* DSM 799, 2 izolátum a *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* DSM 20231T, egy törzs pedig a *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 tömegspektrumával mutatta a legnagyobb hasonlóságot.

A vizsgálat során, 9 meticillinrezisztencia-specifikus csúcspot, valamint 2 CC398-as és 1 CC1-es biomarkert teszteltünk. A vizsgált meticillinrezisztencia-specifikus csúcsok közül, csak az 5070 m/z és a 9632 m/z volt kimutatható minden izolátumban.

Az eljárás meticillin-rezisztenciával kapcsolatos vizsgálatokra is alkalmas

A 9 specifikus csúcsból 7-et, a törzsek több mint 40%-ában tudtuk detektálni, azonban a 3043 m/z és 9632 m/z csúcs az azonosítás eredményeként megjelölt meticillin-érzékeny *S. aureus* törzsek referenciaspektrumaiban is megfigyelhetőek voltak. A CC398-as törzsek közül a 136-os és a 237-es, valamint a 113-as és 146-os törzsek, a CC1-es törzsek közül pedig a 116-os és 121-es törzsek azonos rezisztencia-csúcsprofilut mutattak, valamint az azonosítás legjobb eredménye is megegyezett. A 2127 m/z, a 4607 m/z, valamint a 10152 m/z csúcsok nem voltak kimutathatóak egyetlen CC1-es törzsből sem, ezért feltételezhető, hogy ezek a csúcsok alkalmasak lehetnek a vizsgálatba bevont 2 CC típus elkülönítésére, azonban további vizsgálatok elvégzése szükséges. A 3037 m/z és a 4511 m/z csúcsok alkalmasnak bizonyultak a CC398-as és CC1-es törzsek elkülönítésére, azonban az 5004 m/z csúcs mindössze 1 izolátumban volt jelen.

Az előzetes tanulmányokban meghatározott meticillinrezisztencia-specifikus csúcsok, két csúcs kivételével, alkalmazhatónak bizonyultak LA-MRSA-törzsek esetében is. Azonban a vizsgált specifikus csúcsok biztonságos alkalmazhatósága érdekében, további meticillin-érzékeny/rezisztens *S. aureus* referenciatörzsek vizsgálatára van szükség. A gyors, költséghatékony és pontos azonosítási módszernek, valamint az egyszerű minta-előkészítési eljárásnak köszönhetően, a MALDI-TOF MS-technika könnyen beilleszthető a rutin laboratóriumi munkába, ezáltal új lehetőségeket kínálva az állatorvosi diagnosztika, valamint fertőzés leküzdése területén.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a WESSLING Hungary Kft. támogatta.

IRODALOM

- 2008/55/EK: A Bizottság határozata (2007. december 20.) a tenyésztés-állományban a *Salmonella* spp. és a meticillinrezisztens *Staphylococcus aureus* előfordulásának a tagállamokban végrehajtandó felméréséhez a Közösség pénzügyi hozzájárulásáról (az értesítés a C (2007) 6579. számú dokumentummal történt).
- ALBERT E. – BIKSI I.: Állati eredetű meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* nagyállatokban és haszonállatokban – 1. rész. Az MRSA előfordulása és jelentősége lovakban és a lovakkal kapcsolatban lévő emberekben. Irodalmi összefoglaló. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 2020. 142. 503–512.
- BANGERTER, P. D. – SIDLER, X. et al.: Longitudinal study on the colonisation and transmission of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms. *Vet. Microbiol.*, 2016. 183. 125–134.
- BRADLEY, S. F.: Eradication or decolonization of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: what are we doing and why are we doing it? *Clin. Infect. Dis.*, 2007. 44. 186–189.
- BUTAYE, P. – ARGUDÍN, M. A. – SMITH, T. C.: Livestock-Associated MRSA and Its Current Evolution. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.*, 2016. 3. 19–31.
- CAMOEZ, M. – SIERRA, J. M. et al.: Automated categorization of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2015. 22. 161.
- CHARYULU, E. M. – GNANAMANI, A. – MANDAL, A. B.: Identification and Discrimination of Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Burn Wound Sites Using PCR and Authentication with MALDI-TOF-MS. *Indian J. Microbiol.*, 2012. 52. 337–345.
- CUNY, C. – KOCK, R. – WITTE, W.: Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2013. 303. 331–337.
- EDWARDS-JONES, V. – CLAYDON, M. A. et al.: Rapid discrimination between meticillin-sensitive and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.*, 2000. 49. 295–300.
- ENANY, S.: *Frontiers in Staphylococcus aureus*. Intech. Horvátország, Rijeka, 2017. 50–51.
- FEIL, E. J. – COOPER, J. E. et al.: How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.*, 2003. 185. 3307–3316.
- GOERGE, T. – LORENZ, M. B. et al.: MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: prevalence, preventive options and evidence. *Vet. Microbiol.*, 2017. 200. 6–12.
- JOSTEN, M. – DISCHINGER, J. et al.: Identification of agr-positive meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2014. 304. 1018–1023.
- JOSTEN, M. – REIF, M. et al.: Analysis of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum of *Staphylococcus aureus* Identifies Mutations That Allow Differentiation of the Main Clonal Lineages. *J. Clin. Microbiol.*, 2013. 51. 1809–1817.
- JUNG-MIN, K. – KIM, I. et al.: Rapid Discrimination of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS. *Pathogens*, 2019. 8. 214.

16. KWON, S. S. – HONG, S. K. et al.: Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Rapid Discrimination of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): First Report of a Relation Between Protein Peaks and MRSA *spa* Type. *Ann. Lab. Med.*, 2017. 37. 553–555.
17. MANUKUMAR, H. M. – UMESHA, S.: MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.*, 2017. 7. 11414.
18. ØSTERGAARD, C. – MØLLER, J. K.: Subdivision of MRSA CC398 isolates using MALDI-TOF MS. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2018. 308. 476–485.
19. PÉREZ-SANCHO, M. – VELA, A. I. et al.: Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* subspecies based on MALDI-TOF MS profiles. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2018. 30. 813–820.
20. SHARMA, M. – NUNEZ-GARCIA, J.: Livestock-Associated Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) Clonal Complex (CC) 398 Isolated from UK Animals belong to European Lineages. *Front. Microbiol.*, 2016. 9. 1741.
21. SOGAWA, K. – WATANABE, M. et al.: Rapid Discrimination Between Meticillin-Sensitive and Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biocontrol Sci.*, 2017. 22. 163–169.
22. SZABADOS, F. – WOLOSZYN, J. et al: Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database. *J. Med. Microbiol.*, 2010. 59. 787–790.
23. VOSS, A. – LOEFFEN F. et al.: Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005. 11. 1965–1966.

Közlésre érk.: 2020. febr. 14.

SAJTÓKÖZLEMÉNY

Az MSD Animal Health, a Merck & Co., Inc. (Kenilworth, N.J., Egyesült Államok) egyik divíziója bejelenti, hogy sikeresen befejezte a VECOXAN® (diklazuril) – egy, a borjak és a bárányok kokcidiózisának megelőzésére és kezelésére szolgáló, szájon át adandó szuszpenzió – világméretű forgalmazási jogainak korábban bejelentett megvásárlását az Elanco Animal Health vállalattól.

A VECOXAN hatásos a bárányok *Eimeria crandallis* és *Eimeria ovinoidalis* okozta kokcidiózisa, valamint a borjak *Eimeria bovis* és *Eimeria zuernii* okozta kokcidiózisa ellen. A VECOXAN Európában, Dél-Afrikában, Dél-Koreában és Japánban van forgalomban.

A paraziták elleni védekezés és védettség nélkülözhetetlen és jelentős része a kérődző állatok általános egészségügyi menedzsmentjének és annak sikerességének. „Az állatok jólétének biztosítását célzó és a technológiánk kulcsfontosságú részeit képező fejlett digitális és diagnosztikai megoldásainkkal elköteleztünk vagyunk az állatok és az őket gondozó emberek egészségének és jólétének javítása mellett” – jelentette ki Rick DELUCA, az MSD Animal Health elnöke. „A fiatal állatok számára kifejlesztett, ezen kiegészítő készítmény jól kibővíti meglévő állatgyógyyszer-, vakcina- és szolgáltatás-portfoliónkot, és hangsúlyozza a Tudomány az állatok egészségéért® alapelv melletti elkötelezettségünket. Rendkívül széles és mély termékportfolióknak köszönhetően kiegészítő megoldások teljes körét tudjuk kínálni vevőinknek az állatok és az őket gondozó emberek egészségének és jólétének javítása érdekében.”

„Egy borjú vagy bárány életének első hónapjai hatással vannak a későbbi egészségére. A VECOXAN kibővíti a fiatal állatok betegségeinek megelőzésére szolgáló termékeink körét, amely magában foglalja a közelmúltban bevezetett Bovilis® INtranasal RSP™ Live intranasalis vakcinát, amely segít megvédeni a fiatal szarvasmarhákat a légzőszervi betegségekkel szemben” – mondta PHILIPPE HOUFFSCHMITT állatorvos, az MSD Animal Health Kérődző Divíziójának Globális Vezetője. „A fehérje iránti globális igény növekedésével párhuzamosan elköteleztünk vagyunk amellett, hogy olyan átfogó megoldásokat nyújtsunk, amelyek támogatják az élelmiszer-ellátás biztonságosságát és fenntarthatóságát.”

A szarvasmarhatelepeken és a juhtartó gazdaságokban rendkívül gyakori kokcidiózis a bárányok és a borjak hasmenésének gyakori oka, amelyet az *Eimeria* nemzetségbe tartozó egyszéjtű paraziták idéznek elő. E paraziták a bél falában elszaporodva fekális-orális úton terjednek állatról állatra. A betegség klinikai tünetei közé tartozik a fájdalmas, véres vagy vér nélküli hasmenés, a csökkent étvágy és a levertség, ami a betegség súlyosbodása esetén kiszáradáshoz és fogyáshoz vezethet. A kokcidiózis elsősorban a fiatal állatokat betegíti meg: már akár három- vagy négyhetes borjaknál és bárányoknál kialakulhat.

A kokcidiózis tetemes gazdasági veszteséget okoz a gazdáknak és a termelőknek a takarmányértékesítés romlása, a csökkent testtömeg-gyarapodási arány, a teljesítmény-

csökkenés és az elhullások miatt, valamint azért, hogy növeli az állatok más fertőzések, például a bélbetegségek vagy a szarvasmarhák légzőszervi betegsége (BRD) iránti fogékonyságát.

A VECOXAN BEMUTATÁSA

A VECOXAN a benzol-acetonitril csoportba tartozó, antimikrobiális aktivitás nélküli, az *Eimeria* fajokkal szemben kokcidiomellenes hatású szer. A készítmény környezeti korlátozások nélkül, bármely menedzsment-rendszerben használható bármilyen testtömegű borjakban és bárányokban, húsmarhákban és tejelő szarvasmarhákban. A készítmény a húsról nulla napos élelmezés-egészségügyi várakozási idővel rendelkezik.

AZ MSD ANIMAL HEALTH BEMUTATÁSA

Az MSD a világ egyik vezető vakcina- és gyógyszergyártó vállalata, amely már több mint egy évszázada folytat tudományos kutatásokat a világ legnagyobb kihívásokat jelentő betegségei elleni gyógyszerek és vakcinák kifejlesztése érdekében. Az MSD Animal Health, a Merck & Co., Inc. (Kenilworth, N.J., Egyesült Államok) divíziója az MSD globális állategészségügyi üzletága. A „Tudomány az állatok egészségéért®” alapelv melletti elkötelezettségének megfelelően az MSD Animal Health az állatgyógyászati, vakcinák, egészségügyi menedzsment megoldások és szolgáltatások egyik legszélesebb körét, valamint digitális kapcsolaton alapuló azonosító, nyomkövető és monitoring-termékek széles skáláját kínálja az állatorvosok, az állattartók, a hobby- és kisállat-tulajdonosok és a szakhatóságok számára. Az MSD Animal Health elkötelezett az állatok, valamint az őket gondozó emberek egészségének, jólétének és teljesítményének megőrzése és javítása mellett. Jelentős erőforrásokat fordít a dinamikus és átfogó kutatás-fejlesztési tevékenységre és egy modern, globális ellátási lánc kialakítására. Az MSD Animal Health több mint 50 országban van jelen, termékei pedig mintegy 150 ország piacán kaphatók. További információkért látogasson el a www.msd-animal-health.com/ weboldalra vagy lépjen kapcsolatba velünk a LinkedIn-en és a Twitter-en.

IRODALOM

1. EU Summary of Product Characteristics. Vecoxan 2.5 mg/ml Oral Suspension for lambs and calves [EU SPC – A készítmény jellemzőinek összefoglalója. Vecoxan 2,5 mg/ml orális szuszpenzió bárányok és borjak számára]. Elérhető: http://mri.cts-mrp.eu/download/FR_V.0113.001_FinalSPC.pdf.
2. Agneessens J, Goossens L, Veys P, Gradwell D (2005). Efficacy of diclazuril (Vecoxan) against naturally acquired *Eimeria* infections in suckling beef calves and economic benefits of treatment [A diklazuril (Vecoxan) kezelés hatékonysága a szopós húsborjak természetes eredetű *Eimeria* fertőzései ellen és a kezelés gazdasági előnye]. *Cattle Practice*, 13, 231–234.
3. Agneessens J, Goossens L, Louineau J, Dauschies A, Veys P. (2006) Build-up of immunity after a diclazuril (Vecoxan) treatment in calves [Az immunitás kialakulása borjakban egy diklazuril- (Vecoxan-) kezelést követően]. Poszter, 24. Buiatikus Világkongresszus, Nice, Franciaország.
4. Willemsen MHA, Zechner G, Goossens L, Jacobs J, (2011). Coccidiosis under German field conditions: the importance of immunity [Kokcidiózis németországi üzemi körülmények között: az immunitás fontossága]. Poszter, European Conference of Bovine Health Management [Európai Szarvasmarha-egészségügyi Menedzsment Konferencia], Beerse, Belgium.

**Coprological examination
of red fox (*Vulpes vulpes* L.)
droppings**

G. Majoros*
L. Udvari
A. Juhász

ÁTE, Parazitológiai és Állattani Tanszék,
H-1078 Budapest, István u. 2.

*e-mail: Majoros.Gabor@univet.hu

A vörös róka (*Vulpes vulpes* L.) ürülékének parazitológiai vizsgálata

Majoros Gábor*, Udvari Lilla, Juhász Alexandra

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők vörös rókák ürülékének parazitológiai vizsgálatát végezték el. Az eredmények azt mutatták, hogy még a kiszáradt, mállott bélsárból is lehetséges a legtöbb olyan élősködő mikroszkópos kimutatása, amely lárvát, petét, oocystát vagy cisztát juttat a béltartalomba. Az embert fertőzni képes parazitákat, így a *Taenia*-típusú petéket is meg lehetett találni a földről gyűjtött, majd fertőtlenítő hatású kezelések alávetett hullatékokban. Annak ellenére, hogy a morfológiájának segítségével faji szinten nem minden parazita azonosítható – így pl. az *Echinococcus*-peték sem – a szisztematikus bélsárvizsgálatot alkalmazni lehet az erdei ragadozók parazitáinak kimutatására. A mikroszkópos vizsgálattal elkülöníthető parazitacsoportok értékes információt adnak a vadon élő kutyafélék által a környezetbe juttatott élősködőkről, amiket máskülönben csak a kilőtt állatok tetemének felboncolásával tudnánk megtalálni. A hullatékából egyaránt kimutathatók a járványtani szempontból fontos, gyakori paraziták és a nagyon ritka fajok is, ezért ez a vizsgálati eljárás állatorvosi és zoológiai szempontból is kifejezetten hasznos.

SUMMARY

Certain parasites of red foxes threaten human health as they can cause diseases with serious consequences in humans. *Echinococcus* species in particular are dangerous, but other tapeworms and *Toxocara* nematodes can also infect people. European foxes are increasingly invading human settlements, therefore their parasites are more likely infect dogs, too.

The most accurate procedure for finding wildlife parasites is the examination of the carcasses of shot animals, however, we have explored the possibility of detecting parasites in droppings on the ground. If the parasites can be detected with sufficient confidence in the scats of foxes, useful data on parasite eggs, oocysts, cysts and larvae actually released into the environment could be obtained at less cost and with a larger sample size.

The coprological results of 198 faecal samples collected in natural habitats showed that decomposing faeces, even when it had spent a long time on the ground, can be used for parasitological examination, as almost all parasites that are excreted by foxes in faeces could be identified by morphology. Protozoan cysts (amoebas, *Isospora*, *Sarcocystis*), trematodes (*Alaria*), tapeworm eggs (*Taenia*-type, *Hymenolepis*), eggs or larvae of nematodes (*Uncinaria*, *Acylostoma*, *Toxorara*, *Toxascaris*, *Physaloptera*, *Spirocerca*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Angiostrongylus* and *Crenosoma*) were found in old stools, which had been exposed to the effects of weather.

To avoid the possibility of the infection of humans by zoonotic parasites, each sample was frozen by deep freezing for one month prior to processing or was treated with formalin. In the course of these processes all parasites died. Nevertheless, not only cysts and eggs but also larvae were detected. Some of the parasites found in the scats were also detected in 27 frozen fox carcasses, and some parasites were also present in the faecal content of the intestinal tracts that had escaped our attention during autopsy (e.g., *Capillaria* species). *Mesocestoides* tapeworms which were found in foxes were not detected by conventional coprological examination. The examination of droppings collected from natural habitats may complement our knowledge of parasites of foxes or other wild canines.

Az alábbi áttekintés egy vörös rókákon (*Vulpes vulpes*) végzett vizsgálatsorozat eredményére alapozva tárgyalja azt, hogy zoonotikus vagy állategészségügyi jelentőségű élősködőket vagy egyáltalán a paraziták fejlődési alakjait lehet-e és érdemes-e a vadon élő ragadozók bélsárhullatékából kimutatni? A zoonózisok nemcsak közegészségügyi okokból, hanem az állatorvosok szempontjából is fontosak, mert a társadalom elsősorban az állatorvosoktól várja el, hogy törődjenek az állatról emberre terjedő betegségek megelőzésével. Ezt a feladatot a háziállatok esetében a tőlük elvárható hatékonysággal tudják teljesíteni a haszonállatokkal vagy a kedvtelésből tartott állatokkal foglalkozó, különféle beosztásban tevékenykedő állatorvosok, de a vadon élő állatok révén terjedő fertőzések kontrollja sokkal nehezebben kivitelezhető (5).

A vadon élő állatok súlyos, akár gyógyíthatatlan betegségeket is terjeszhetnek

A vadállatok által terjesztett betegségek előfordulására ritkán gondolunk a vizsgálatok során

A rókák számos, zoonotikus jellegű parazitás fertőzésre fogékonyak

A természetes környezetben élő állatok által közvetített fertőzésekre az jellemző, hogy rendszerint súlyos, sok esetben gyógyíthatatlan betegség kialakulásához is vezethetnek, ugyanakkor e betegségek szórványosan, ritkán jelentkeznek, és emiatt az emberek nem gondolnak ezekre. Pedig mind a vírusok, mind a baktériumok, mind az élősködők között vannak olyan, vadállatokban élő fajok, amelyek időnkénti megjelenése meglepetésszerűen érheti az embereket, így pl. a veszettség, a kullancs-encephalitis, a tularaemia, a trichinellosis vagy az echinococcosis. Éppen az általuk okozott emberi megbetegedések kis előfordulási gyakorisága az oka annak, hogy kevésbé törődünk velük, mint a közvetlen környezetünkben élő állatok kórokozóival. Az ilyen kórokozók az állatokban is túl ritkák ahhoz, hogy a velük való találkozás tényleges esélyét reálisan meg tudjuk becsülni. Mivel az egészen ritkán, de mégis biztosan bekövetkező események pontos idejét és helyét nem lehet kiszámítani (19), csak általános óvintézkedéseket tehetünk e betegségek megelőzése érdekében is, voltaképpen olyan elven, mint ahogy egy kullacszipést próbálunk elkerülni.

A rókák által terjesztett ritka betegségek közül a veszettséget a vakcinákkal hazánkban remélhetőleg sikerül teljesen visszaszorítani, és az általuk fenntartott *Trichinella*-fajok átvitele is jól megelőzhető a kilőtt vaddisznók rendszeres vizsgálatával. A rókák embert fertőző galandférgének gyérítése azonban Magyarországon egyelőre még megoldatlan feladat. E fajok között is az *Echinococcus*-fajok a legveszélyesebbek. Szerencsére az emberben kialakuló lárvális echinococcosis Magyarországon ritkán megállapított betegség, de a diagnosztikai módszerek fejlődésével egyre több fertőzöttség derül ki (4). Előrejelzések szerint az *E. multilocularis* okozta tünetek egyre gyakoribb megjelenésével az elkövetkező években számolni kell (25, 26, 31). Az emberi echinococcosis akár évekig tartó lappangási ideje miatt gyakorlatilag nem gyógyítható, s így okkal félhetünk tőle. Be kell látni azt is, hogy galandféregpetékkel történő fertőződés jellemzően egy olyan ritka, kivételes esemény, amire nem lehet igazán felkészülni, bármilyen óvintézkedést teszünk is ellene (6). Amennyiben a teljes kiszáradást elkerülik, a vastag burkú galandféregpeték a környezetben szétszóródva elvileg minden felületen tartósan életben maradnak (11, 32). A peték forrása minden olyan kutyaféle, amelyiknek alkalmá nyílik *Echinococcus*-lárvákat hordozó emlősök nyers húsát, pontosabban azok belsősegeit fogyasztani, s ezért hazánkban a vörös róka és az aranysakál (*Canis aureus*) van kitéve leginkább annak, hogy a belükben *Echinococcus*-férgek fejlődjenek ki.

Annak ellenére, hogy egy adott helyzetben kiszámíthatatlan egy vadon élő kutyafélében a galandférgnek jelenléte, a galandférgesség általános gyakorisága, annak változása és az emberrel való érintkezés valószínűsége megbecsülhető és monitorozható (16). A rókák boncolásával az *Echinococcus* és más férgek időszakos gyakorisága jól követhető (2, 3, 7, 12, 14, 17, 22, 24, 25, 30, 33), de ez a módszer a vizsgálatot végzők fertőződésének nagy veszélye miatt speciális

laboratóriumot és alapos óvintézkedéseket igényel, mindamelllett költséges. Emiatt érdemes megvizsgálni azt, hogy nem lehetne-e a parazitákat kimutatni a vadon élő kutyafélék elhullatott ürülékéből, tekintve, hogy mégiscsak ez az anyag a közvetlen forrása azoknak a fertőzőképes petéknek, amelyek aztán fogékony állatokba és az emberbe juthatnak. Nem minden kifejlett féreg képes ugyanis petéket létrehozni, ezért a féreghordozó rókák nem mindig ürítenek petéket. Az nyilvánvaló, hogy a bélsárvizsgálat specificitása és érzékenysége nem vetekedhet a hullákból történő vizsgálat ugyanezen paramétereivel, de lehetnek olyan előnyei, amelyek miatt érdemes ezt a módszert alkalmazni. A tetemek vizsgálatánál kevesebb ráfordítással, de nagyobb mintaszám felhasználásával szintén hasznos információt lehetne kapni a bélsárral ürülő élősködők jelenlétéről.

Mivel a rókák talajról gyűjtött hullatékát Magyarországon parazitológiai szempontból eddig nem elemezték, megnéztük, hogy abban valójában hányféle parazitát, ill. ezek különféle fejlődési alakjait lehet kimutatni olyan egyszerű módszerrel, amely az emberi fertőződés lehetőségét minimálisra csökkenti, azonban speciális laboratóriumi eszközöket, munkafeltételeket mégsem igényel. Munkahipotézisünk az volt, hogy ha az ismeretlen ideig a talajon heverő hullatékból a pete, oocisza, ciszta vagy lárva formájában a rókákból kijutó paraziták zömét ki lehet mutatni és ezek előfordulási gyakoriságában észlelni lehet valamilyen különbséget, akkor talán ez az eljárás hasznosítható lehet egy szélesebb körű monitorozási program során. Azért is érdemes megvizsgálni a nem friss bélsárból történő pete- és lárva-kimutatás lehetőségét, mert amennyiben a morfológiai vizsgálatnál érzékenyebb módszerrel, pl. nukleinsavak kimutatásával kívánnánk felkutatni a zoonotikus jelentőségű parazitákat a bélsármintákban, a peték izolálására és koncentrálására akkor is szükség volna (18, 27).

Vizsgálatainkat egy tudományos diákköri munka keretében, viszonylag rövid időtartam alatt, csekély anyagi ráfordítással végeztük, aminek a keretébe csak néhány területen végzett ürülékminta-gyűjtés és néhány rókatetem vizsgálata fért bele.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A MINTÁK GYŰJTÉSE ÉS TÁROLÁSA

A 2016–2019. közötti időszakban az ország különböző területein gyűjtöttük a rókák bélsárürülékét, azaz hullatékait, amikor arra lehetőség adódott. Mivel az ürülékek megtalálásának esélye nagyban függ a rókák aktivitásától, az aljnövényzet vegetációs állapotától, az időjárástól és a terep minőségétől, szervezett mintagyűjtési lehetőség hiányában csak arra vállalkozhattunk, hogy minél több mintát tudjunk összeszedni olyan helyekről, ahol a rókapopuláció sűrű és a terület jól bejárható. Ezért elsősorban a Bükk-hegység nyugati, jól erdőszült feléből, továbbá a Pilis, a Budai-hegység, a gemenci ártér, az ócsai lápok és Szabolcs-Szatmár-Bereg megye néhány erdejéből származó mintákat dolgoztuk fel. Mivel a rókák természetes élőhelyén előforduló élősködőket kívántuk vizsgálni, szinantróp, emberközeli környezetből nem gyűjtöttünk mintákat, hogy lehetőleg ne keveredjen közjük kutyabélsár.

A földön heverő bélsár szaga, emésztetlen táplálékmaradványai és jellegzetes elhelyezkedése szinte minden esetben egyértelművé tette, hogy rókaürülékről van szó, mivel a rókák területhatáruk megjelölésére is használják a hullatékukat. A Bükk-hegységben végzett gyűjtés alkalmával még az is segítette a hullatékok megtalálását és azonosítását, hogy többször bejárt útvonalon, ismételten sor került a minták gyűjtésére, így eleve számítani lehetett arra, hogy azon a területen ismét csak a rókák hullatékai lesznek találhatóak.

Az egyedi ürülékmintákat kézre húzható, lezárható nejlonzacskókba gyűjtöttük, majd WHO kiadványainak ajánlasi alapján a laboratóriumban vagy 1 hónapig –20 °C-os fagyasztásnak vetettük alá azokat, vagy pedig legalább két hétig 5%-os

Magyarországon a rókák talajról gyűjtött hullatékát parazitológiai szempontból eddig még nem elemezték

A 2016–2019. közötti időszakban az ország különböző területein gyűjtöttek róka-ürülék-mintákat

A természetes állomány vizsgálata érdekében emberközeli környezetből nem gyűjtöttek mintákat

A paraziták fertőző-képességét a minták fagyasztásával vagy formalinos kezelésével szüntették meg

Rókatetemeket is vizsgáltak

A bélsármintákon fénymikroszkópos koprologiai vizsgálatot végeztek

A rókatetekben lévő parazitákat sztereo-mikroszkóppal vizsgálták

A talajról 198 hullaték-mintát szedtek, a hullákból pedig 18 béltartalmat vizsgáltak meg, összehasonlításként

A földről szedett hullatékok közül 150 mintában volt parazita

formaldehid-oldatban áztattuk (6). Ez a kezelés elpusztította a mintákban lévő összes parazitát, köztük azokat is, amelyek emberre nézve fertőzőek lettek volna. (A kezelés hatékonyságáról úgy győződünk meg, hogy annak alkalmazása után a macskából származó *Taenia taeniaeformis* petékben lévő oncosphaerák a kezelést követően már enyhe melegítés hatására sem mozdultak meg a peteburokban.) A bélsármintákat ezután szobahőmérsékleten a felengedésükig állni hagytuk, ill. dekantáltuk róluk a formalint, majd koprologiai vizsgálatot végeztünk velük.

A rókahullákat Szeged és Sopron környéki vadásztársaságoktól kaptuk. Az állatok származási helye nem volt megállapítható, mert mindkét esetben több vadászatból származó, több héten át gyűjtött tetemekről volt szó, amelyeket egy-egy nagy teríték céljára szedtek össze, vadászati rendezvény alkalmából. A tetemeket egy hónapig tartó -80°C -os lefagyasztást követően az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének boncolták fel, majd a zsigereket 10%-os formalinba téve tároltuk egy hónapig. Ezután a belső szervek közül elsősorban a vékony- és vastagbelet, a gyomrot és a nyelőcsövet, a húgyhólyagot, a májat és a tüdőt vizsgáltuk át férgek jelenléte szempontjából, továbbá béltartalmat vettünk ki, hogy a bélsármintákkal azonos módon megvizsgáljuk azt. A tetemek erős bomlottsága miatt nem minden szervük volt vizsgálható állapotban, és béltartalmat sem tudtunk mindegyik hullából kinyerni. A boncolás során egyéb szervek vizsgálatára is sor került, de mivel az azokban található élősködők a bélsárvizsgálat szempontjából irrelevánsak, azokkal e közleményben részletesen nem foglalkozunk.

A PARAZITÁK VIZSGÁLATA

A vizsgálandó bélsarat vagy béltartalmat vízzel elegyítettük és pohárban spatulával homogenizáltuk. A szuszpenziót 1 mm lyukbőségű szitán (teaszűrőn) átszűrtük a nagyobb méretű maradványok (növényi részek, szőr stb.) eltávolítása céljából. Az átszűrt keveréket csapvízzel felhígítottuk, legalább 5 percig ülepedni hagytuk, majd az üledék felkeveredése nélkül dekantáltuk róla a folyadékot. Az ülepitési és dekantálási fázist megismételtük akkor, ha az elöntött folyadék annyira zavaros volt, hogy az üledéket nem lehetett látni alatta. Az ülepitő pohár aljában összegyűlt üledéket ezután kis mennyiségű vízzel, 15 ml-es centrifugacsövekbe mostuk át, és $2000 \times g$ gyorsulással 2 percig centrifugáltuk. Az élősködőket tartalmazó üledékréteg letapadt a csövek aljára és a víz egy mozdulattal leönthető volt róla. A nedves üledéket a centrifugacsőben 1300 g/cm^3 sűrűségű cink-szulfát oldattal ráztuk össze, végül ismét az előzőek szerint centrifugáltuk. A szuszpenzió felszínén összegyűlt képleteket laposra csiszolt végű üvegpálca hozzáérintésével emeltünk le és helyeztük tárgylemezre. A tárgylemezeken lévő cseppeket fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

A formalinban fixált szerveket feldaraboltuk és vízzel lemostuk, ill. lekapartuk a nyálkahártyájuk felszínét. A szabad szemmel látható férgeket a mosadékból kiemeltük és példányonként megvizsgáltuk. Sztereomikroszkóppal átvizsgáltuk a finomszemcsés mosadékot a szabad szemmel nem látható paraziták megtalálása érdekében. Az egyes parazitákat a morfológiájuk alapján azonosítottuk olyan taxonómiai szintig, amely a parazitológiai kézikönyvek ajánlásai szerint alaktani vizsgálatlal lehetséges.

EREDMÉNYEK

Összesen 198, talajról szedett hullaték-mintát és 18, hullából származó béltartalmat tudtunk megvizsgálni. A földről szedett hullatékok közül 150 mintában volt parazita, azaz a minták 75,7%-a, legalább egy élősködő fajt tartalmazott. Maximálisan 5 parazita fordult elő egy mintában. A rókatetekből származó bélsárminták közül csak egy nem tartalmazott parazitát, a többiben legalább 2 parazitát találtunk, tehát ezeknek a mintáknak a 94%-a parazitatartalmú volt.

A hullatékmintákban 16, a tetemekből származó bélsármintákban 6 féle parazita jelenlétét igazolták

Akármelyik parazita előfordulását egy mintában, egy esetnek vettük, függetlenül a megtalált parazita mennyiségétől. A talajról gyűjtött hullatékok vizsgálata alkalmával összesen 314 esetben találtunk parazitát, amelyeket 16, egymástól jól elkülöníthető csoportba soroltunk. A boncolás alkalmával a tetemekből kizsedett bélsárban hatféle parazita jelenlétét igazoltuk, összesen 43 előfordulás alkalmával. Mikroszkópos vizsgálattal tehát összesen 357 esetben történt valamilyen parazita kimutatása, azaz az összes, 216 bélsár- és béltartalom minta mindegyikében átlagosan 1,8 parazitafaj volt. Az egyes parazitacsoportok előfordulását a különböző évszakok szerint az 1. táblázat szemlélteti.

1. TÁBLÁZAT. A különféle paraziták előfordulásának száma évszakok szerint a rókaürülékben (hullatékban) és a vizsgált rókák béltartalmában

TABLE 1. Number of occurrence of parasites in foxes' droppings in different seasons and parasites in intestinal content of dissected foxes

A mintákban felismert paraziták (a nemek rendszertani sorrendjében)	Tavasszal megvizsgált hullatékok (n = 86)	Nyáron megvizsgált hullatékok (n = 4)	Ősszel megvizsgált hullatékok (n = 88)	Télen megvizsgált hullatékok (n = 20)	Hullából származó béltartalom (n = 18)
Amoeba-ciszták	1	-	-	-	-
Isospora-oociszták	2	-	6	1	-
Sarcocystis-sporociszták	1	-	1	-	1
Alaria-peték	5	-	3	1	13
Taenia-típusú peték	8	-	4	3	1
Hymenolepis-típusú peték	-	-	1	1	-
Uncinaria-peték	14	-	18	3	1
Ancylostoma-peték	4	-	12	4	-
Angiostrongylus-lárvák	13	1	13	6	-
Crenosoma-lárvák	7	-	1	-	-
Toxocara-peték	1	-	12	3	-
Toxascaris-peték	2	-	1	1	13
Spirocerca-peték	3	-	1	-	-
Physaloptera-típusú peték	-	-	1	1	-
Trichuris-peték	16	1	14	9	-
Capillaria-típusú peték	52	3	47	12	14
Paraziták előfordulása összesen:	129	5	135	45	43
A minták közül parazitát tartalmazott:	68 (79%)	4 (100%)	61 (69%)	17 (85%)	17 (94%)

A felboncolt 27 róka tetemében makroszkópos vizsgálattal 11 féle parazitát tudtak felismerni

A felboncolt 27 róka tetemében 11 parazitafajt tudunk makroszkópos vizsgálattal felismerni (2. táblázat). Közülük 9 fajt a béltartalom mikroszkópos vizsgálatával is megtaláltunk, de a Mesocestoides-féreg mikroszkópos vizsgálattal kimutathatatlanok voltak. Ezen kívül a Thelazia-férget csak a szemben találtuk meg, mert azok semmilyen fejlődési formája nem fordulhat elő az emésztőcsőben. A törékenyebb testű férgek közül csak néhányat lehetett felismerni, mert a belső szervek már a lefagyasztás, ill. konzerválás előtt a lövéstől roncsolt és a tetemek teríték előtti tárolása miatt bomló állapotban voltak.

2. TÁBLÁZAT. A rókatetekben megtalált paraziták**TABLE 2.** Parasites found in carcasses of foxes

A tetemekben talált férgek (a nemek rendszertani sorrendjében)	Prevalencia (n = 27)	Hozzávetőleges intenzitás
<i>Alaria</i> (métely)	9 (33%)	1–20 közötti egyedszám
<i>Taenia</i> (galandféreg)	14 (52%)	1–2 juvenilis, (nem gravid) példány
<i>Mesocestoides</i> (galandféreg)	12 (44%)	Legalább 30, vagy több példány
<i>Uncinaria</i> (kampósféreg)	2 (7,4%)	5–6 egyed
<i>Ancylostoma</i> (kampósféreg)	3 (11%)	1–2 egyed
<i>Crenosoma</i> (intra-bronchiális tüdőféreg)	1 (3,7%)	1 példány
<i>Toxocara</i> (orsóféreg)	2 (7,4%)	1–2 juvenilis, nőstény egyed
<i>Toxascaris</i> (orsóféreg)	7 (26 %)	2–3 példány
<i>Thelazia</i> (szemféreg)	2 (7,4%)	1–1 példány
<i>Trichuris</i> (ostorféreg)	1 (3,7%)	12 példány egy rókából
<i>Capillaria</i> (hajszálféreg)	1 (3,7%)	1 példány egy rókából

A peték, a lárvák és a férgek változatos módon viselkedtek a minták feldolgozása során. Mivel sem a természetes élőhelyeken található ürülékek, sem a rókák tetei nem voltak olyan állapotban, amely ideális lett volna az élősködők megtalálása és azonosíthatósága szempontjából, így a képletek torzulása, idegen anyagokkal való borítottsága néha megnehezítette a vizsgálatot. A boncoláskor talált férgeket 2%-os tejsavat tartalmazó 50%-os etanolba áztattuk, és így vizsgálhatóvá váltak.

ÁBRA. A vörös rókák fagyasztással vagy formalinos kezeléssel kezelt ürülékéből (hullatékából), felszínűsítéssel kimutatott paraziták

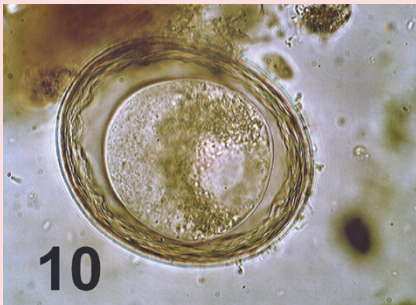
Az 1–16 képek nagyítása azonos mértékű, azaz az 1. képen feltüntetett, 20 µm-t jelölő méretjelzés ezek mindegyikére vonatkozik. A 17. és 18. képek kisebb nagyításúak, az ezeken feltüntetett méretjelzés 100 µm. A fényképek Alpha Bio 3T fénymikroszkóppal, kontrasztosított megvilágítás mellett Opticam 3 digitális kamerával készültek

1: Sporulált *Isospora oocishta*; **2:** Sporulált *Sarcocystis oocishta*; **3:** *Taenia*-típusú pete; **4:** *Spirocerca*-peték; **5:** cf. *Physaloptera*-pete; **6:** *Hymenolepis*-típusú pete; **7:** Lárvát tartalmazó *Ancylostoma*-pete; **8:** Morulát tartalmazó *Uncinaria*-pete; **9:** Összelapult *Alaria alata* pete; **10:** *Toxascaris leonina* petéje; **11:** *Toxocara canis* petéje; **12:** *Trichuris vulpis* petéje; **13:** *Eucoleus aerophilus* petéje; **14:** *Aonchotheca putorii* petéje; **15:** *Eucoleus boehmi* petéje; **16:** *Pearsonema plica* petéje; **17:** *Angiostrongylus vasorum* lárvája; **18:** *Crenosoma vulpis* lárvája

FIGURE. Parasites detected by flotation method in freeze-dried or formalin-treated scats of red foxes

The magnification of the pictures 1–16 is the same, thus the scale bar which indicates 20µm in Picture 1, applies to each of them. Picture 17 and 18 were taken with smaller magnification, and the scale bar on them indicates 100µm. The photos were taken with contrast enhancement illumination by an Opticam 3digital camera using an Alpha Bio 3T light microscope

1: Sporulated *Isospora oocyst*; **2:** Sporulated *Sarcocystis oocyst*; **3:** *Taenia*-type egg; **4:** *Spirocerca* eggs; **5:** cf. *Physaloptera* egg; **6:** *Hymenolepis*-type egg; **7:** *Ancylostoma* egg containing larva; **8:** *Uncinaria* egg containing morula; **9:** Deformed *Alaria alata* egg; **10:** *Toxascaris leonina* egg; **11:** *Toxocara canis* egg; **12:** *Trichuris vulpis* egg; **13:** *Eucoleus aerophilus* egg; **14:** *Aonchotheca putorii* egg; **15:** *Eucoleus boehmi* egg; **16:** *Pearsonema plica* egg; **17:** *Angiostrongylus vasorum* larva; **18:** *Crenosoma vulpis* larva



**Entamoeba jellegű
amőbacisztákat egy
esetben találtak**

**Isospora-fajokat
9 mintában tudtak
azonosítani**

**Csak 3 esetben észleltek
Sarcocystiseket, noha
a fertőzöttség prevalen-
ciája feltételezhetően
ennél jóval nagyobb lehet**

**Gyakran figyeltek meg
Alaria alata mételyeket,
amely vaddisznó köz-
vetítésével zoonotikus
fertőzést is okozhat**

**Összesen
16 mintában találtak
Taenia-típusú petéket**

A bélsárban talált képletek esetében a diagnosztikai szempontból figyelembe veendő fontosabb tapasztalatok az alábbiak voltak:

1. *Entamoeba* jellegű amőbacisztákat egyetlen esetben tudtunk megfigyelni. Ezek egy viszonylag friss bélsármintában az excentrikus sejtmagjukról, chroma-toid testjeik alakjáról voltak felismerhetők. A béllakó amőbák diagnosztizálása általában csak speciális vizsgálatokkal lehetséges, ezért az általunk véletlenül tapasztalt fertőzöttségnek gyakorlati jelentőséget nem tulajdonítunk. A talajban a béllakó amőbákhoz hasonló, többféle amőbafaj él, amelyek kontaminálhatják a földön heverő bélsarat, ezért az endogén amőbiázis felismerése a véletlensze-rűen gyűjtött hullatékban csak kivételes esemény volt.

2. A ragadozók kokcidiumaiként számon tartott *Isospora*-fajokat 9 alkalommal fedeztünk fel a mikroszkópos vizsgálatok során. Sporulálatlan és sporulált állapot-ban is megtalálhatók voltak a mintákban, de a biztos diagnózishoz a jellegzetes, két sporocisztát tartalmazó, tojásdad oocisztájuk kimutatása elengedhetetlen (*Ábra/1.*). Az oociszták néha összezsugorodnak, de általában elegendő mennyi-ségben vannak a bélsárban ahhoz, hogy a torzultak mellett a jól felismerhető, jellegzetes megjelenésű példányaikat is megtaláljuk.

3. A *Sarcocystis*-fajok gyűrött falú oocisztája ritkán marad épen a bélsárban (*Ábra/2.*), mert a vékony oocisztaburok szétöredezése miatt a két sporociszta általában szétválik egymástól. A sporocisztáik fala vastagabb, mint az oociszta hártvás fala. A szabad sporociszták felismerése szinte csak a véletlenül múlik, mert alakjuk és nagyságuk a penészgombák spóráihoz hasonló. A gombaspórák anyaga homogéne szemcsés, a sporociszták megnyúlt sporozoitákat tartal-maznak. A nehezen megtalálható sporociszták miatt csak 3 esetben észleltünk *Sarcocystis*-eket, noha a fertőzöttség valódi gyakorisága (prevalenciája) feltéte-lezhetően ennél jóval nagyobb lehet.

4. A bélben élő *Alaria alata* mételyek gyakori élősködői a magyarországi rókák-nak (29), és ezt látszik alátámasztani a 22 alkalommal tapasztalt pete előfordu-lás, ill. a férgek 33%-os prevalenciája a hullákban. A felszándúsítás alkalmazása során a nagy, vékonyburokú petéik összehorpadnak a sóoldatban, de sárga színük, nagy méretük és tojásdad alakjuk miatt ennek ellenére felismerhetőek (*Ábra/9.*). A métely gyakori előfordulása figyelmet érdemel, mert a lárvája a vaddisznók izmába jutva, nyers hús fogyasztása alkalmával az emberbe is bekerülhet és panaszokat okozhat.

5. Az úgynevezett *Taenia*-típusú peték barnák, sárgák vagy színtelenek voltak a mintákban, de az oociszták többségénél is kisebb példányaikat a bennük lévő tüskék, azaz az oncosphaera horgai alapján lehetett jól felis-merni (*Ábra/3.*). Kontrasztkiemelő megvilágítással vastag burkuk sugárirányú rovátkoltsága is jól látható volt. Összesen 16 esetben találtunk ilyen peté-ket. A természetlen peték nem tartalmaznak lárvát, s emiatt horgokat sem, máskülönb a normális fejlettségű petéhez hasonlóak. Amennyiben egy minta tartalmaz *Taenia*-típusú petéket, akkor a legtöbb esetben igen sok van belőlük a mintában, s így mindig lehet oncosphaerát tartalmazó petét találni. Valószínű, hogy a legtöbb ilyen felépítésű petét a nagyméretű *Taenia*-fajok termelik, de előfordulásuk esetén az *Echinococcus*-fajok jelenlétére mindig számítani kell.

6. Kisebb vagy nagyobb, halvány, vékonyburokú, erős lárvális horgokat tartalmazó, galandféregpetéket két alkalommal találtunk a bélsármintákban. Egységesen ép, az emésztő enzimektől nem károsodott állapotuk, és a bélsárgrammonkénti tízes nagyságrendben való előfordulásuk miatt egyértelműnek vettük, hogy ezek a *Hymenolepis*-típusú peték a róka saját parazitáiból és nem egy elfogyasztott állat beléből származnak (*Ábra/6.*). Mivel ilyen férgek a rókák belében alkalmanként előfordulhatnak, ugyanakkor a rágcsálók belében is gyakoriak, a peték eredetének megítélése nem könnyű feladat.

**A rókában gyakori
Uncinaria stenocephala
petéket 36 alkalommal
találták meg**

7. A jelen vizsgálat során 36 alkalommal detektált *Uncinaria stenocephala* peték nagyon gyakran találhatók a rókák ürülékében (Ábra/8.). Lárvét vagy morula állapotú embriókat tartalmazó, vékonyburkú petéket más féregfajok is létrehozhatnak a rókák belében, de a 80 µm hosszúságot elérő petéket biztosan *Uncinaria*-petéknek vehetjük, mert az alakjukban hozzájuk hasonló peték mind kisebbek nála. Magukat az apró *Uncinaria* kampósférgeket csak az ép bélcsatornában lehet a kellő hatékonysággal megtalálni, ezért a vizsgált tetemek roncsolódott belében csupán két alkalommal találtunk néhány példányt.

8. A 60 µm hosszúságú, az *Uncinaria*-petékhez hasonló, de kisebb, strongylida-típusú petéket (Ábra/7.) *Ancylostoma*-petének vettük, mert ennek a kampósféregnek a példányai jóval gyakoribbak a rókák belében, mint az ugyancsak hasonló, de a még kisebb petéket termelő, *Molineus*-férgek. Az Európában honos *Molineus patens* hasonló felépítésű petéjének hossza 40 µm körüli, ezért az *Uncinaria*-petéknél kisebb, szélesen ovális alakú, összecsavarodott lárvét vagy osztódó sejtek halmazát tartalmazó, vékonyburkú petéket nagy valószínűséggel vehettük *Ancylostoma*-petének. Hús esetében találtunk ilyen petéket, de magukat az adult kampósférgeket csak 3 hullában sikerült felfedezni.

9. Az *Angiostrongylus*-lárvák annak ellenére 33 hullatékmintában megtalálhatók voltak, hogy a felszindúsítással csak az elpusztult lárvákat tudtuk kimutatni. Lapos órarugószerűen görbül meg a kissé zsugorodott lárvák teste, és a farkuk végén lévő görbe rész is segíti a felismerésüket (Ábra/17.). E két jellegzetesség jól elkülöníti őket más fonálféreglárváktól, amelyek pusztulásuk után szabálytalan alakot vesznek fel, és a farki végük egyenletesen keskenyedik el. Gyakorlott vizsgáló számára a tüdőféreglárvák merev kutikulájának erős fénytörése (csillogó felszíne) is segítheti a beazonosítást.

10. Az *Angiostrongylus*-lárvánál valamivel kisebb *Crenosoma*-lárvák holt állapotukban szintén meghajlanak ugyan, de farkuk sohasem kunkorodik be a nagyobb *Angiostrongylus*-lárvára jellemző módon (Ábra/18.). Aszimmetrikusan elhegyesedő farkuk csúcsán nincsen görbe farokcsúcs. Elhegyesedő farka van a szabadon élő, talajlakó férgeknek, és a strongylida-típusú petékből kikelő parazitalárváknak is, de azok nyelőcsőve élesen elválak a test hosszabbik szakaszát kitöltő, mirigyes béltől, és a két bélszakasz nem mosódik egybe, mint a *Crenosoma*-lárvák esetében. A *Crenosoma lupi* lárvját 8 esetben ismertük fel teljes bizonyossággal a talajról szedett hullatékban, és egy adult férget is megtaláltuk az egyik vizsgált rókatetemben.

11. A *Toxocara canis* orsóféreg petéi 16 alkalommal kerültek a mikroszkóp lencséje alá a hullatékok vizsgálata során, de magukat a férgeket csak két tetemben találtuk meg a boncolt rókák közül. A nagyméretű pete lehet ovális vagy gömb alakú, de a finoman recézett burka, és a sötét, buroktól elváló tartalma jól felismerhetővé teszi (Ábra/11.). A rácsos szerkezetű peteburok még akkor is felismerhetővé teszi a *Toxocara* féregnemet, ha a külvilágon heverő ürülékben a lárva már kialakult benne. A *Toxocara*-peték előfordulásának őszi halmozódását tapasztaltuk, aminek magyarázatát nem találtuk a szakirodalomban. Általában sok van belőlük egy bélsármintában, de néha csak egy-kettő.

12. A 17 mintában fellelt *Toxascaris leonina* pete gyakori előfordulása nem meglepő a nagyobb területeket bejáró, kotorékokban lakó róka esetében, mert ez a féreg – a kutyakennelekben tapasztalt elterjedtsége alapján – elsősorban horizontális úton terjed, szemben az általában vertikális fertőzési útvonalat követő *Toxocara*-férgekkel. Sima felületű petéje oldalnézetben széles ovális (Ábra/10.), és valamivel gyorsabban fejlődik benne a lárva, mint a *Toxocara*-peték esetében, ezért a hullatékokban gyakran lehet lárvas petéket találni. A peték eltérő fejlődési képessége miatt egy bélsár egyidejűleg tartalmazhat lárvas vagy zigótatartalmú petét is. Általában sok van ezekből a fertőzött állatok bélsárában. A férgeknek a hullákban tapasztalt 26%-os prevalenciája más országokból közölt adatokhoz képest (14, 33) magasnak tűnt.

**Toxocara canis
petéket hullatékban
16 alkalommal,
a boncolások során
férgeket csak két
alkalommal találtak**

A *Spirocerca*-férgék petéit csak négy alkalommal figyelték meg, noha a féreg ennél gyakoribb lehet

***Trichuris*-petéket 40 esetben figyelték meg**

A fagyasztásos és a formalinos kezelés sem teszi tönkre teljesen a paraziták bélsárral ürülő formáit

A hullatékvizsgálat egyszerű, olcsó és nagy mintaszám kiértékelését teszi lehetővé

13. A *Spirocerca*-férgék apró petéi (Ábra/4.) a sarjadzó gombák sejtjeihez hasonlóak, és biztos felismerésük csak a bennük lévő, összehajlott lárvá kutikulájának gyűrűzött szerkezete alapján lehetséges. Mindössze négy alkalommal figyeltük meg e genus petéit a hullatékokban, de feltételezhető, hogy a parazita gyakoribb annál, mint amit ez a szám sejtetni enged. Általában igen kis mennyiségben fordulnak elő az ilyen peték a bélsárban, ami a kicsinyiségük mellett nehezíti a megtalálásukat. A bélben időnként elszaporodó *Cyniclomyces guttulatus* élesztőgombákat lehet a leginkább összetéveszteni a *Spirocerca*-petékkal, különösen akkor, ha a gombasejtben még nem alakultak ki a rájuk jellemző vakuolumok.

14. A *Physaloptera* (vagy *Rictularia*) csoportba tartozó férgék a rókák ritkább élősködői közé tartoznak. Vastagburrú, hosszú, összetekeredett lárvát tartalmazó petéik ezért csak egészen kivételesen kerülnek a bélsármintákat vizsgáló személyek szeme elé (Ábra/5.). E gyomorférgék a *Spirocerca*-fajokhoz hasonlóan erdei ízeltlábúakban fejlődnek, ezért kutyában még ritkábbak. Nem elképzelhetetlen azonban, hogy a lakott területen kívül sétáltatott kutyák is fertőződjenek velük. Két alkalommal találtunk ilyen petéket a bélsármintákban.

15. A *Trichuris* ostorférgék közül elvileg csak a *T. vulpis* faj petéire lehet számítani a rókákban, ezért a *Trichuris*-petéknek az általunk 40 minta esetében tapasztalt jelenlétét erre az élősködőre vezettük vissza. Noha ezeknek a petéknek a jellegzetes alakja szembeötlő (Ábra/12.), időnként összetéveszthetők a nem sima, hanem felületi mintázatokkal tarkított *Capillaria*-típusú petékkal. Mivel a rókák prédái lehetnek az ugyancsak *Trichuris*-férgéket hordozni képes rágcsálók és nyulak, az ilyen peték pszeudoparazita formájában is előfordulhatnak a rókaürülékben. Ilyen esetben, a fajidegen *Trichuris*-peték ritkák, kisebbek és eltérő színűek a róka saját ostorférgének petéitől.

16. A hajszálférgék (*Capillariidae*) családjába tartozó paraziták közül több faj él a kutyafélékben, s talán ezért is, de főleg azért találtunk belőlük sokat, mert a peték burka ellenálló, és jellegzetes formájuk következtében szembeötlőek a mikroszkópos vizsgálat során. A légutak, az arcüregek, a bél és a húgyhólyag nyálkahártyájában élő hajszálférgék petéit is megtaláltuk a hullatékokban és a tetemekben is, összesen 128 esetben. Közülük az *Eucoleus aerophila* volt a leggyakoribb, az *Aonchotheca putorii* és az *Eucoleus boehmi* jóval ritkább. A *Pearsonema plica* petéit csak néhány esetben észleltük, mert ezek a vizelettel ürülnek és ritkán kerülnek az ürülékbe. Kontrasztkiemelő megvilágítással a peték burkán lévő mintázat feltüntethető (Ábra/13–16.). A hajszálférgék petéi pszeudoparazita formájában is előfordulhatnak a ragadozók bélsárában, mint pl. a *Calodium hepaticum*, amely főleg a rágcsálók élősködője.

MEGVITATÁS

Mivel a vizsgálat elsődleges célja az volt, hogy felismerjük az egyes parazitákat a talajról szedett, sok esetben megszáradt vagy szétmállott, majd a tárolás során inaktiváló kezelésnek alávetett hullatékokban, a talált paraziták mennyiségének és prevalenciájának a vizsgálatunk szempontjából alárendelt fontossága van. A legfontosabb eredmény az, hogy a biztonságos munkafeltételek mellett feldolgozott bélsármintákban kimutathatók voltak olyan paraziták, amelyek egyrészt zoonotikus tulajdonságuk miatt járványtanilag jelentős élősködőnek számítanak, másrészt még a ritka élősködők jelenléte is kiderülhet az ilyen úton végzett vizsgálatok során. A képekkel demonstrált eredményeink azt mutatják, hogy a hosszú ideig történő fagyasztás és a formalinos kezelés sem teszi tönkre teljesen a parazitáknak azokat a formáit, amelyek a bélsárral ürülnek, tehát a legfontosabb élősködők detektálhatóak az igen egyszerű, olcsó és nagy mintaszám vizsgálatát lehetővé tevő hagyományos morfológiai vizsgálattal. Emiatt a módszer hiányosságaiból adódó, és a boncoláshoz képest jogosan feltételezhető érzékenységmentesség is

kompenzálható a nagy mintaszámmal és szisztematikus mintavétellel – amire nekünk nem volt lehetőségünk. Mivel minden bélsármintában átlagosan 1,8 parazita nem (ill. faj) volt, ez azt jelenti, hogy a bélsár a legtöbb esetben legalább egy parazitát tartalmaz, vagyis elég jó esély van arra, hogy valamilyen parazitát tudjunk kimutatni akármelyik róka hullatékából.

A megtalált *Taenia*-típusú peték származhattak *Taenia*- és *Echinococcus*-férgesekből is. Az ilyen peték környezetben való általános elterjedtségének ismerete kívánatos lenne. Ezek a galandféregpeték nem tartoznak a leggyakrabban kimutatott paraziták közé, mert az ilyen peték ürülése a férgek szaporodási módja miatt nem folyamatos. Az adult galandféreg élettartama a rókák élettartamához viszonyítva viszonylag rövid (15), tehát az is előfordulhat, hogy egy bizonyos időszakban a róka galandféregmentes, de előtte vagy utána galandféreghordozó. Adódhat olyan helyzet is, hogy a meglőtt és megvizsgált rókában nem található galandféreg, holott néhány héttel azelőtt nemcsak hogy fertőzött, hanem még Peteürítő is volt. Ha a hullatékát időközönként megvizsgálánk, elvileg volna rá esélyünk, hogy az általa ürített petéket megtaláljuk. Ezért sem indokolatlan ilyen módon monitorozni a külvilágra juttatott parazitapeték előfordulását egy adott területen, ahogyan az sem, hogy bizonyos területeken szabályos időközönként megvizsgáljuk a rókák hullatékait.

Természetesen nehéz megmondani, hogy a rókabélsárból általában kimutatható élősködők közül melyiket nem találtuk meg éppen a koprologiai elemzés alkalmával, még ha esetleg jelen voltak is a mintában. Ugyanakkor az általunk kapott eredmény biztató abból a szempontból, hogy még az egészen ritkán előforduló paraziták (pl. *Physaloptera*), vagy a nehezen észrevehető paraziták (pl. *Sarcocystis*), és a felszándúsítással általában nem vizsgált paraziták (pl. tüdőféreglárvák: *Angiostrongylus*, *Crenosoma*) is megtalálhatók az általunk javasolt módszerrel. Egy Lengyelországban végzett hasonló vizsgálat során azt találták, hogy ugyanazokban a rókákban bélsárvizsgálattal és a lőtt állatok vizsgálatával nagyjából azonos hatékonysággal lehet a paraziták prevalenciáját meghatározni, leszámítva azokat a fajokat, amelyek pete vagy lárvá formájában nem kerülnek a béltartalomba (14).

Az általunk megtalált tizenhatféle, jól elkülöníthető parazita a hazánk területén élő kutyafélékben megtalálható belső élősködők túlnyomó hányadát képviseli (9, 10, 15), és ahogy bemutattuk, ez a 16 csoport valójában még több, tényleges fajt takar. Kiegészítő molekuláris vizsgálatokkal a mintákban lévő egyes galandféregfajok egymástól elkülöníthetőek lettek volna, és ugyanez mondható el az egysejtűek cystáiról is. A „*Capillaria*” gyűjtőnembe sorolt fajok közül négyet mi magunk is fel tudtunk ismerni pusztán a peték alaktani vizsgálatának segítségével: az *E. aerophila* volt a leggyakoribb, amit gyakorisági sorrendben az *E. boehmi*, az *A. putorii* és a *P. plica* követett. (Ez utóbbi fajokat nemcsak a csekély fontosságuk miatt nem tüntettük fel elkülönülve az 1. táblázatban, hanem azért sem, mert nem vizsgáltunk meg minden egyes *Capillaria*-típusú petét, így e fajok reális prevalenciáját nem ismerhetjük.) A vizsgálatok alapján az megállapítható, hogy amennyiben szükség van rá, a Capillariidae családba tartozó különféle féregfajok jelenléte a peték vizsgálata alapján kimutatható, ami azért lehet hasznos, mert magukat a hajszálvékony férgeseket nehéz megtalálni a boncolás során.

A Magyarországon élő kutyafélék bélsárában mikroszkóposan kimutatható, eddig ismert parazitaféreg közül a *Dipylidium*, *Spirometra* és *Strongyloides* nemekbe tartozó fajokat nem találtuk meg e vizsgálatok alkalmával, noha korábbi diagnosztikai tapasztalataink alapján bizonyosak vagyunk benne, hogy ezek az élősködők, legalábbis a kutyákban, ugyancsak jelen vannak az országban. Szerencsére a rókák járványtani szerepe ezeknek a parazitáknak a kutyákra történő terjesztésében kevésbé jelentős. Az uborkamagképű galandféreg kokonjait főleg maguk a kutyák terjesztik, a *Spirometra* galandféreg inkább csak a hullókkal és kétéltűekkel táplálkozó ragadozóknál fordulnak elő, a *Strongyloides*-genus Peteürítő állapotban

**Az alkalmazott
módszerrel nemcsak a
gyakori, hanem a ritka,
ill. nehezen észrevehető
parazitákat is meg-
lehetett találni**

A *Toxocara* és *Toxascaris* orsóférgesek petéi gyakran fordultak elő

***Mesocestoides* galandférgeseket egyetlen hullatékmintában sem mutattak ki, de a férget a hullákban megtalálták**

lévő férgei pedig csak egészen fiatal állatok vékonybelében élnek (1). Ezzel szemben a kutyafélék veszélyesebb élősködőinek tartott galandférgeseket, orsóférgeseket és tüdőférgeseket viszonylag könnyen fel lehet ismerni még az összeszáradt vagy koprofág rovaroktól hemzseggő hullatékokban is. Bár eredményeink a rendszertelen mintagyűjtés miatt nem alkalmasak az alaposabb következtetések levonására használható statisztikai elemzésre, az a tény a szerény adathalmazból is valószínűnek látszik, hogy azok a bélférgesek, amelyek a földdel terjedő „geohelmintózisokat” okozzák, azaz a hajszálférgesek, az ostorférgesek és a kampósférgesek, a leggyakoribb enterális parazitái a rókáknak. Ez a jelenség egy olyan üreglakó állat esetében, mit a róka, tökéletesen érthető.

Nem meglepő a *Toxocara* és *Toxascaris* orsóférgesek petéinek viszonylag gyakoribb előfordulása sem. Ezeknek a petéknek a rókákban való természetes gyakorisága valószínűleg tükrözi azt az állapotot, amikor az ilyen férget hordozó állatokat nem részesítik rendszeres anthelmintikus kezelésben. Az orsóférgespetét tartalmazó rókaürülék veszélyes a kutyákra, mivel a koprofágia révén a kutyák kontaminálódhatnak a fertőzőképes lárvákat tartalmazó petékkel (8). Természetesen ezek a peték is, mint sok más élősködő petéje, pszeudoparazita formájában is előfordulhatnak a bélsárban. A vizsgálataink alkalmával magunk is többféle pszeudoparazitát találtunk a mintákban, amelyek akár koprofágia, akár a zsákmányállatok elfogyasztása révén kerültek azokba. Előfordultak rágcsálók férgeinek és ektoparazitáinak felismerhető maradványai, és rovarokban élő organizmusokat is fel lehetett ismerni a felszínűsített minta felülúszójában. (A parazitákhoz hasonló szervezetekkel a jelen közleményben nem foglalkozunk, mert bár technikai nehézséget jelentettek az rókaparaziták azonosításakor, állatorvosi és közegészségügyi szempontból jelentőségük nincsen, és az ismeretük csak a vizsgáló specialista számára fontos.)

Figyelemre méltó viszont az a tapasztalat, hogy a *Mesocestoides* galandférges jelenlétét egyetlen hullaték minta vizsgálata során sem lehetett felismerni, noha a rókahullákban talált férgek azt sugallták, hogy ez a fertőzés is meglehetősen gyakori, és a férgek mennyisége a bélben esetenként igen nagy. Ugyanezt tapasztalták SZÉLL és mtsai az általuk boncolt rókák férgeinek és bélsarának összehasonlító vizsgálata során (28). Ezek a galandférgesek nem mikroszkópos méretű peték vagy lárvák formájában jutnak az állatból a külvilágra, hanem teljes féregizék, sőt hosszabb féregdarabok formájában ürülnek. Mivel a lárváik fejlődéséhez szükséges első köztigazdát a tudomány még nem derítette fel, a fejlődésük pontos menetét még ma sem ismerjük, ezért nem véletlen, hogy a féregdarabok természetes ürülésének körülményei sem tisztázottak. Egy parazitológia iránt érdeklődő vidéki kisállatpraxisban dolgozó állatorvos tapasztalata alapján, a féregtelenítők használatát követően néha elő szoktak fordulni *Mesocestoides*-darabok a kutyák ürülékében, de általában a rókák eme férgeit inkább csak boncolás alkalmával lehet megtalálni.

Elképzelhető viszont, hogy járványtani megfontolások miatt nem teljesen közömbös, hogy az emberre nézve nem veszélyes *Mesocestoides*-fajok milyen gyakorisággal fordulnak elő a rókákban, mert lehetséges, hogy ezek a férgek versengenek más cestodákkal, így esetleg az echinococcusokkal is. A galandférgesek fajon belüli és fajok közötti fejlődését gátló hatását már több esetben vizsgálták (13, 21), de a *Mesocestoides* és más férgek egymáshoz való viszonyát még nem. Ezért tartjuk említésre méltónak azt a megfigyelést, hogy az általunk 12 rókából kigyűjtött több száz féregpéldány között egyetlen gravid, azaz petehordozó *Mesocestoides* egyed sem akadt, noha számos proglottisuk már levált a strobiláról. Az összes, bélből kiszedett féreg terméketlen volt. Ezért ha az ízeik spontán kiürültek volna is a végleges gazdájukból, további fejlődésre képes utódot nem tudtak volna létrehozni. Infertilis, azaz petét nem képző galandférgesek a haszonállatokban és a társállatokban sem ritkák, ahogy azt az Állatorvostudományi

Egyetem patológiai vizsgálatai alkalmával talált példányokon gyakran tapasztalni lehet (MAJOROS, saját megfigyelés). Mivel a galandférgék fertilitása elsősorban az eredményes kopulációtól függ (23), amely sok féregpéldány egy helyen való előfordulása esetén nem látszik megvalósíthatatlan eseménynek, a csoportban élő férgek sterilitásának valószínűleg valamely interspecifikus vagy intraspecifikus biokémiai hatás lehet az oka. Amennyiben a *Mesocestoides*-férgék nemcsak egymásra, hanem az *Echinococcus*-férgékre is fertilitás- vagy növekedésgátló hatással lennének, az talán képes volna hátráltatni az utóbbi paraziták ivarérését. Ezért érdekes jelenség az, hogy Európában a *Mesocestoides*-férgék prevalenciája szélsőségesen eltérő egyes földrajzi területeken: pl. Görögországban 73% feletti (20), Portugáliában 30% körüli (7), Németország délnyugati részén pedig csak 0,2% (17). Az *Echinococcus*-férgék prevalenciája is szélsőségesen különböző Európa egyes területein (25). Véleményünk szerint nem volna haszontalan összehasonlítani a *Mesocestoides*-fertőzöttség mértékét az *Echinococcus*-fertőzöttséggel, sőt az egyes élősködőfajok egymáshoz viszonyított előfordulását kielemezni abból a szempontból, hogy milyen mértékben hathatnak egymásra.

Ahhoz, hogy a rókák endoparazitáinak szezonális vagy földrajzi eloszlásáról minél hitelesebb képet kapjunk, sok minta vizsgálata szükséges, és ehhez hasznos adalékul szolgálhat a hullatékok elemzése. A bélsárvizsgálatok eredményéből ugyanúgy értékes adatokat lehetne nyerni, mint a lőtt rókák boncolásának segítségével. A kellő sűrűségű mintavétel révén esetleg felderíthető lenne, hogy vannak-e endemikus gócai a féregparazitáknak, vagy mi lehet az oka a fertőzöttségi prevalencia ingadozásának. A magyarországi sakálpopuláció gyors növekedése miatt is fontos lehet az erdei ragadozók kiterjedt parazitológiai vizsgálata, amihez segítséget nyújthat az általunk javasolt, egyszerű módszer.

A szerzők által javasolt módszer alkalmas az erdei ragadozók parazitológiai vizsgálatára

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki VARGA BENCE, KURUCZ ÁDÁM vadászoknak és ORBÁN HENRIKNEK, az OMVK megyei szervezet titkárának, valamint az Országos Magyar Vadász-kamara Győr-Moson-Sopron megyei Területi Szervezetének, a rókákon végzett vizsgálatok lehetővé tételéért.

A munka az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósult meg (a támogatási szerződés száma: EFOP-3.6.2-16-2017-00008). Címe: „A neuroinflammáció vizsgálata a neurodegeneratív folyamatokban: a molekulától a betegágyig”. A munkát Udvari Lilla hallgatói kutatói ösztöndíja, valamint DR. JUHÁSZ ALEXANDRA által elnyert MÁEÖ2018-2019/279479 kutatási projekt, ill. a EFOP-3.6.3-UK-2020 és a NTP-NFTÖ-19-B-0165 pályázatok támogatása segítette. Köszönjük a cikk lektorának hasznos észrevételeit, amivel hozzájárult a közlemény színvonalának emeléséhez.

Kutatásaink sikerességéhez anyagi forrást az EFOP-3.6.3-UK-2020, az NTP-NFTÖ-19-B-0165, ill. az EFOP-3.6.2-16-2017-00008 pályázatok biztosítottak.

IRODALOM

1. BOWMAN, D. D.: *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 9th ed. Saunders Publ., 2003. pp. 464.
2. CONRATHS, F. J. – DEPLAZES, P.: *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Vet. Parasitol.*, 2015. 213. 149–161.
3. CRIADO-FORNELIO, A. – GUTIERREZ-GARCIA, L. et al.: A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.*, 2000. 92. 245–251.
4. DEZSÉNYI, B. – TÓTH, S. – HORVÁTH, A. – SZLÁVIK, J. – MAKRAI, Z. – STRAUSZ, T. – NAGY, T. – DUBÓCZKI, Z. – MERSICH, T. – CSOMOR, J. – SOMORÁČZ, Á. – NEHÉZ, L. – PATONAI, A. – DOROS, A. – DANKA, J. – KUCSERA, I. – AUER, H. – REZZA, G. – BARTH, T. F. – CASULLI, A.: Emerging human alveolar echinococcosis in Hungary. Early experiences in clinical management in a single center study from 2005–2018. *Int. J. Inf. Dis.*, 2019. 79. 118–119.
5. DUSCHER, G. G. – LESCHNIK, M. et al.: Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. *Internat. J. Parasit.: Parasit. Wildlife*, 2015. 4. 88–96.
6. ECKERT, J. – GOTTSTEIN, B. et al.: Prevention of echinococcosis in humans and safety precautions. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*, World Organization for Animal Health (OIE) [ed. ECKERT, J. – GEMMELL, M. A. – MESLIN, F. X. – PAWLOWSKI, S. Z.] Paris, 2001. 258–267.
7. EIRA, C. – VINGADA, J. et al.: The helminth community of the red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effect on host condition. *Wildl. Biol. Pract.*, 2006. 2. 26–36.
8. FAHRION, A. S. – SCHNYDER M. et al.: *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: Is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? *Vet. Parasitol.*, 2011. 177. 186–189.
9. FOK É. – TAKÁTS Cs. – SMIDOVÁ, B. – KECSKEMÉTHY S. – KARAKAS M.: Kuttyák és macskák bélféreg-fertőzőttségének elterjedtsége. I. Bélsárvizsgálat. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1988. 43. 17–25.
10. FOK É. – TAKÁTS Cs. – SMIDOVÁ, B. – KECSKEMÉTHY S. – KARAKAS M.: Kuttyák és macskák bélféreg-fertőzőttségének elterjedtsége. II. Boncolás. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1988. 43. 231–235.
11. FRANK, W.: Survival of *Echinococcus multilocularis* eggs in the environment and potential modes of transmission. *WHO Informal Consultation on Alveolar Echinococcosis*, WHO document VPH/Echin. Res/WP/89, WHO ed., 1989. 1–5.
12. FRANSSSEN, F. – NIJSSE, R.: Increase in number of helminth species from Dutch red foxes over a 35-year period. *Parasit. Vect.*, 2014. 7. 166.
13. FRIGGENS, M. M. – BROWN, J. H.: Niche partitioning in the cestode communities of two elasmobranchs. *Oikos*, 2005. 108. 76–84.
14. KARAMON, J. – DĄBROWSKA, J. et al.: Prevalence of intestinal helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Europe (Poland): a significant zoonotic threat. *Parasit. Vect.*, 2018. 11. 436.
15. KASSAI T.: *Helmintológia*. Magyar Állatorvosi Kamara, 2011. p. 71–80.
16. KÖNIG, A. – ROMIG, T. – HOLZHOFFER, E.: Effective long-term control of *Echinococcus multilocularis* in a mixed rural-urban area in southern Germany. *PLoS ONE*, 2019. 14. 4.
17. LOOS-FRANK, B. – ZEYHLE, E.: The intestinal helminths of the red fox and some other carnivores in Southwest Germany. *Zentr. Parasitenkd.*, 1982. 67. 99–113.
18. MATHIS, A. – DEPLAZES, P. – ECKERT, J.: An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J. Helmit.*, 1996. 70. 219–222.
19. MÉRŐ L.: *A csodák logikája – a kiszámíthatatlan tudománya*. Tercium Kiadó, 2014.
20. PAPADOPOULOS, A. – HIMONAS, C. et al.: Helminths of foxes and other wild carnivores from rural areas in Greece. *Vet. Parasitol.*, 1997. 71. 227–231.
21. RILEY, J. – OWEN, R. W.: Competition between two closely related *Tetrabothrius* cestodes of the fulmar (*Fulmarus glacialis* L.). *Zentr. Parasitenkd.*, 1975. 46. 221–228.
22. SIKÓ BARABÁSI, S. – FOK, É. – GUBÁNYI, A. – MÉSZÁROS, F. – COZMA, V.: Helminth fauna of the small intestine in the European red fox, *Vulpes vulpes* with notes on the morphological identification of *Echinococcus multilocularis*. *Sci. Parasitol.*, 2010. 11. 141–151.
23. SMYTH, J.: Development of cestodes in vitro: production of fertile eggs; cultivation of plerocercoid fragments. *Nature*, 1948. 161. 138.
24. SRÉTER, T. – SZÉLL, Z. – SRÉTER-LANCSZ, Zs. – VARGA, I.: *Echinococcus multilocularis* in Northern Hungary. *Emerg. Inf. Dis.*, 2004. 10. 7.
25. SRÉTER, T. – SZÉLL, Z. – EGYED, Zs. – VARGA, I.: *Echinococcus multilocularis*: An emerging pathogen in Hungary and Central Eastern Europe? *Emerg. Infect. Dis.*, 2003. 9. 384–386.
26. SZÉLL Z. – CASULLI, A. – TOLNAI, Z. – POZIO, E. – SRÉTER T.: Az *Echinococcus multilocularis* elterjedtsége hazánkban. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 2015. 137. 415–426.
27. SZÉLL, Z. – SRÉTER-LANCSZ, Z. – SRÉTER, T.: Evaluation of faecal flotation methods followed by species-specific PCR for detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive hosts. *Acta Parasitol.*, 2014. 59. 331–336.
28. SZÉLL, Z. – TOLNAI, Z. – SRÉTER, T.: Environmental determinants of the spatial distribution of *Mesocestoides* spp. and sensitivity of flotation method for the diagnosis of mesocestoidosis. *Vet. Parasitol.*, 2015. 212. 427–430.
29. SZÉLL, Z. – TOLNAI, Z. – SRÉTER, T.: Environmental determinants of the spatial distribution of *Alaria alata* in Hungary. *Vet. Parasitol.*, 2013. 198. 116–121.
30. TACKMANN, K. – LÖSCHNER, U. et al.: A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiol. Infect.*, 2001. 127. 577–587.
31. TOLNAI, Z. – SZÉLL, Z. – SRÉTER, T.: Environmental determinants of the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* in Hungary. *Vet. Parasitol.*, 2013. 198. 292–297.
32. VEIT, P. – BILGER, B.: Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology*, 1995. 110. 79–86.
33. VERGLES RATAJ, A. – POSEDI, J. et al.: Intestinal parasites of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Slovenia. *Acta Vet. Hung.*, 2013. 61. 454–462.

Közlésre ér.: 2020. márc. 31.

The effects of the
rosmarinic acid in livestock
animals

Literature review

J. M. Pomothy*
R. F. Barna
E. Pásztiné Gere

Állatorvostudományi Egyetem,
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék
H-1078 Budapest, István utca 2.

*e-mail:

Pomothy.Judit.Mercedesz@univet.hu

A rozmaringsav hatásai a haszonállatokban

Irodalmi összefoglaló

Pomothy Judit Mercédesz*, Barna Réka Fanni, Pásztiné Gere Erzsébet

TAKARMÁNYOZÁSTAN

Összefoglalás

A szerzők jelen tanulmányukban bemutatják a rozmaringsavat, amely kémiai szerkezetét tekintve egy α -hidroxidihidroxid kávéssavval észterezett kávéssav. Több növény család képes szintetizálni ezt a vegyületet, kiemelten sok rozmaringsav található az ajakosok (*Lamiaceae*) családjához tartozó rozmaring és a kerti kakukkfű fajokban a többi flavonoid és nem-flavonoid típusú vegyület mellett. A rozmaringsav antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságát *in vitro* eredményekkel, az általános jótékony hatását növényi kivonatokat alkalmazó, haszonállatokon végzett kísérletekben bizonyították. Az utóbbi vizsgálatokban került felhasználásra többek között az említett két fűszer- és gyógynövény is.

Summary

The authors present in this review the *in vitro* and *in vivo* effects of rosmarinic acid, which is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxy-phenyllactic acid. This phenolic acid belongs to the group of non-flavonoid polyphenols. These molecules are synthesized by plants as secondary metabolites in response to various stressful stimuli. The plants of *Lamiaceae* family such as common thyme, lemongrass, rosemary and sage contain high proportion of this substance. In this review rosemary and the common thyme are presented in details as these two species were usually used for *in vivo* experiments. Besides the rosmarinic acid, these two plants contain a lot of flavonoid and non-flavonoid type molecules in their volatile oils or in their other extracts, which have beneficial effects on human and animal health. It is widely known that the phenolic ring can act as proton and hydrogen donor, which can render this molecule antioxidant characteristic. Antitumor, antimicrobial, anti-inflammatory, gastro- and hepatoprotective effects of rosmarinic acid in aglycon form were successfully proven in *in vitro* experiments using cell line models or tissue cultures. In the nature, however, rosmarinic acid is present in glycosylated form; therefore the results of the *in vivo* experiments differ from the *in vitro* data. Studies using farm animals did not apply rosmarinic acid only, but different plant parts or extracts, which involve rosmarinic acid among other active compounds. The application of these rosmarinic acid containing herbs could contribute to the efficient antioxidant defence mechanism in rabbits. Rosmarinic acid appeared to promote elevated growth rate in chickens and provide better quality of meat in broilers. In general, rosmarinic acid in combination with other substances could also improve cholesterol and triglyceride profiles and support antioxidant capacities against oxidative stress in livestock.

POLIFENOL VEGYÜLETEK

Az állati takarmánykiegészítők terén nőtt az érdeklődés a természetes eredetű vegyületek iránt, amelyek hozzájárulhatnak az állatok jóllétéhez és javíthatják az állomány termelékenységét. Emiatt intenzíven kutatják a növényi eredetű polifenol vegyületek különböző csoportjait *in vitro* és *in vivo* kísérletekben. A polifenolok másodlagos anyagcsere-termékek, amelyek legfontosabb szerepe megvédeni a növényt a különböző stresszhatásoktól színanyagokként, antioxidánsokként vagy szubsztrátként (18, 64). SELMAR és KLEINWÄCHTER kimutatta, hogy a vízhiány okozta stressz hatására fokozódik a növényekben a fenolos vegyületek, alkaloidok és izoprenoidok szintézise (85). Egy növény polifenolos összetételét egyaránt befolyásolják a külső stresszfaktorok és az adott növény genetikai állománya. A külső tényezők elsősorban a mennyiséget, míg a növény génekészlete a minőségi különbségeket határozza meg. Minden növényfaj rendelkezik egy rá jellemző polifenol-mintázattal, amely segítheti a taxonómiai besorolást (20), és amelyet fel lehet használni az élelmiszerek hamisításainak leleplezéséhez. Használható ez borok (95) és olívaolajok (35) azonosítására, valamint segíthet a mézek eredetének meghatározásában is, mivel a virágokra jellemző polifenolok belekerülnek a mézbe is (24). A hústermékekben vizsgált polifenol-mintázat a szójafehérjével történő kiegészítésre deríthet fényt (93).

A polifenolok másodlagos anyagcsere-termékek, amelyek a növényeket védik a különböző stresszhatásoktól

A növények egyedi polifenol-mintázata segíti a fajszintű azonosításukat

Flavonoid, ill. nem-flavonoid polifenolokat lehet megkülönböztetni

1. ÁBRA. A polifenolok csoportosítása és a rozmaringsav szerkezeti képlete

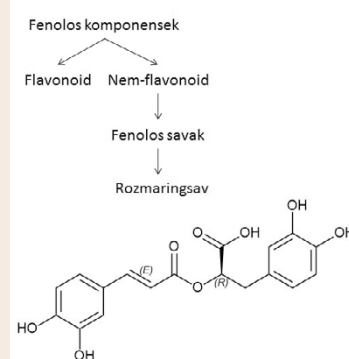
A kémiai szerkezetet DR. VARGA TAMÁS RÓBERT készítette

FIGURE 1. The classification of polyphenols with the implication of the chemical structure of rosmarinic acid

Chemical structure was made by DR. TAMÁS RÓBERT VARGA

A polifenolok csoportja kémiaiilag változatos molekulákat foglal magába, amelyek legalább egy fenolos (aromás) gyűrűt tartalmaznak, a gyűrűhöz pedig különféle szubsztituensek, elsősorban hidroxilcsoportok kapcsolódhatnak (60, 78). A növényt ért stresszhatásokra képződnek ezek a vegyületek aglikon formájában. A bioszintézis fenilalanin vagy tirozin aminosavakból indul ki, amelyek dezaminálásával fahéjsavhoz jut a növény (74). Ehhez az egyszerű vázhoz kapcsolódhatnak cukorkomponensek, karbonsavak, hidroxil-, metil- és szulfátcsoportok, kialakítva ezzel az adott polifenol-származékokat (92). Ezzel a konjugációs lépéssel megváltozhatnak a molekula tulajdonságai az alapvegyülethez képest. Például jelentősen megnőhet a molekulatömege és megváltozhat a hidrofil jellege, amelyek következtében módosulhat a biológiai hatás és hasznosulás is (36, 66). Ha egy cukorkomponens kapcsolódik az aglikon alapvázhhoz, akkor a keletkező vegyületet glikozidnak hívjuk.

A polifenolokat két csoportra lehet bontani: flavonoidok, ill. nem-flavonoidok (38). A nem-flavonoid csoporthoz tartoznak a fenolos savak (80). A fahéjsav fenolgyűrűjéhez kapcsolódó hidroxilcsoportokkal alakulnak ki a hidroxil-fahéjsavak, ahová tartozik a kávéssav, a ferulsav és a p-kumársav is. Ritkán fordulnak elő aglikonként, viszont gyakran észterek képződhetnek belőlük. A kávéssav észterei közé sorolható a rozmaringsav is (1. ábra). A rozmaringsav a kávéssav és az α -hidroxil-dihidroxil kávéssav észtere (6), egy fehéressárga kristályos vegyület. Olvadáspontja 174 °C (73), és jellemzően jobban oldódik szerves oldószerekben, mint vízben (19).



A ROZMARINGSAV ELŐFORDULÁSA A TERMÉSZETBEN

Az ajakosok családjá (*Lamiaceae*) egyike azoknak a növény családnak, amelyekbe több biológiailag és gyógyászatilag is fontos növényt sorolnak. A legismertebb fajok a kerti kakukkfű, a közönséges szurokfű, a bazsalikom, a citromfű, a rozmarin,

Az ajakosok családjába tartozó növényekben lévő legfontosabb antioxidáns a rozmaringsav

a levendula és az orvosi zsálya, amelyek esetében PARK (71) a vizsgálataiban szereplő növénymintákból kimutatta, hogy a legfontosabb antioxidáns összetevő a rozmaringsav volt 2,2–9,7 mg/g nedvestömeg-mennyiségben. A *Lamiaceae* több nemzetségében megtalálhatjuk nagyobb mennyiségben a rozmaringsavat (53, 59, 79, 87), amelyek közül részletesebben bemutatjuk a rozmaringot és a kerti kakukkfűvet (2. ábra).

2. ÁBRA. Rozmaringsavat jelentős mennyiségben tartalmazó gyógynövények: rozmaring (balról) és kerti kakukkfű (jobbról)

FIGURE 2. Medical plants with high concentrations of rosmarinic acid: rosemary (on the left) and garden thyme (on the right)



A rozmaring egy Dél-Európában őshonos, fűszer- és gyógynövényként is használatos örökzöld félcserje

A rozmaring (*Salvia rosmarinus*) egy fűszer- és gyógynövény, amely Dél-Európában őshonos (8). A rozmaring örökzöld félcserje, levelei hosszúkásak, sötétzöldek, fonákjuk szürkés, virágai lehetnek fehérek, lilásak vagy kék színűek is (16). A Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII) (75) tartalmazza a rozmaringolajat (*Rosmarini aetheroleum*) és a szárított rozmaringlevelet (*Rosmarini folium*). Rozmaringsav található a növény gyökereiben, leveleiben, törzsében is, átlagosan $2,15 \pm 0,104$ mg/g mennyiségben (62), de SHEKARCHI és mtsai kísérletében 7,2 mg/g rozmaringsavat találtak az előkészített növényi mintában (86).

Rozmaringsav található a gyökereiben, leveleiben, törzsében is

A rozmaringolaj fő összetétele 37,3 % cineol, 24,8 % pinének, 14,7 % kámfor és 8,8 % kamfén (89). A flavonoidok közül diozmint, luteolint és apigenint, a terpenoidok közül a diterpén karnozolsavat tartalmazza. Polifenolos vegyületek közül a kávéssav, klorogénsav és rozmaringsav fordul elő benne (14).

A rozmaringkivonat tartalmaz fenolos savakat, flavonoidokat és fenolos terpéneket (21, 49, 51). Ezekben a növényi mintákban, a legnagyobb mennyiségben a karnozolsav, a karnozol és a rozmaringsav fordul elő (29, 42, 94). A kivonat rendelkezik gyulladáscsökkentő (10), embereknél májvédő (48), valamint antioxidáns és mikrobaellenes hatással a Gram pozitív baktériumokkal szemben (67). Ezek a hatások főleg a kávéssav, rozmaringsav és karnozolsav jelenlétének köszönhetőek (68, 69). 2008-ban az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) megvizsgálta az emberi fogyasztásra szánt rozmaringkivonatokat, és megállapított határértékeket a karnozol és a karnozolsav napi testtömeg kg-ra vonatkoztatott bevitelére: 0,04–0,2 mg/ttkg közötti a meghatározott érték a gyermekeknél és a felnőtteknél (4).

A kerti kakukkfű évelő, fásodó szárú félcserje

A *Thymus* nemzetségbe tartozó kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris*) szintén fűszer- és gyógynövény. Magyarországon nem őshonos, viszont a *Thymus* nemzetség 5 másik faja megtalálható a természetes vegetációban. Évelő, fásodó szárú félcserje, amely májustól júliusig virágzik, levelei örökzöldek. A Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII) (75) szerint a kerti kakukkfűolaj (*Thymi aetheroleum*) és a növény szárított levele és virága együtt (*Thymi herba*) bizonyítottan rendelkezik gyógyhatással. A *Thymi herba* esetében az előírás a szártalanított drogra vonatkozik (17).

Olajában nagy mennyiségben van jelen a timol, az eugenol és a karvakrol

A kakukkfű olajában nagy mennyiségben van jelen a terpenoidok közül a timol, az eugenol és a karvakrol (52), amelyeknek antioxidáns és mikrobaellenes hatásai

A kerti kakukkfű metanolos és etanolos kivonatában nagy mennyiségben van jelen rozmaringsav

vannak (3, 65, 91, 98). A kerti kakukkfű több kemotípusú variánssal rendelkezik, amely megadja azt, hogy az esszenciális olajában található monoterpenoidok közül melyik a domináns. SCHMIDT és mtsai négy különböző kemotípushoz sorolt kerti kakukkfű mintát elemeztek, amelyekben a timol kemotípusúhoz tartozónak az összes illóolaja közül a timol 41,0%-ban volt jelen (84). A geraniol kemotípusúnak 26,4%-a geraniol, a linalool kemotípusúnak a 72,5%-a linalool, míg a 4-thujanol / terpinen-4-ol kemotípusba sorolhatónak 49,5% sabinen-hidrát és 6,5% terpinen-4-ol volt.

A kerti kakukkfű metanolos és etanolos kivonatában nagy mennyiségben van jelen rozmaringsav (40). BOROS és mtsai kimutatták öt magyar kakukkfűfajban, hogy a domináns polifenolos komponens a rozmaringsav volt, 0,08349 mg/g és 1,436 mg/g koncentráció-tartományban (20). TRÓCSÁNYI és mtsai írták le, hogy a növényben található rozmaringsav mennyisége a növény vízellátottságától függően változik (90). Ezen kívül befolyásolhatták a mért polifenol-arányokat a vizsgált növényeket ért környezeti tényezők, a kivonatok készítéséhez választott oldószer és a kivonási eljárás típusa is. A különböző tanulmányokban ennek megfelelően eltérő mennyiségű rozmaringsav-tartalmat tudtak kimutatni. JANICSÁK és mtsai (53) 1,1 mg/g mennyiségben, ZGÓRKA és GLOWNIÁK (99) 5,5 mg/g, REGNAULT-ROGER és mtsai (79) 7,64 mg/g, WANG és mtsai (96) 4,5–8,7 mg/g, míg KOSAR kutatócsoportja (59) $145 \pm 0,14$ mg/g szárazanyag-koncentrációban mutatta ki a rozmaringsavat kerti kakukkfűben.

A ROZMARINGSAV IN VITRO HATÁSAI

A rozmaringsav antioxidáns hatása a kémiai szerkezetéből eredeztethető. A fenolos (aromás) gyűrű és a hidroxilcsoportok jelenléte jó elektron- és hidrogéndonorra teszi, amelynek következtében semlegesíteni tudja a szabadgyököket és más reaktív oxigén fajtákat (63).

A rozmaringsav elektron- és hidrogén-donorként antioxidáns hatású

Általánosságban elmondható, hogy a sejtben található lipid- és fehérjemolekulák, valamint a DNS szerkezete sérülhet, ha a sejt oxidatív állapota megváltozik, amely megtörténhet akár a sejtben belüli antioxidáns rendszer károsodása miatt, akár a túlzott mennyiségű reaktív oxigén fajták (ROS) hatására. A sejtben megjelenő ROS több jelátviteli út módosításában játszott szerepén túl maguk a vegyületek erősen reaktív molekulák, amelyek megtámadhatják a sejtmembránok többszörösen telítetlen zsírsavait, a DNS-ben található nukleotidokat és a fehérjékben létrejött diszulfidhidakat, ami elvezethet az oxidatív stressz kialakulásáig. Az oxidatív stressz hozzájárulhat a sejt pusztulásához, amely nagyszámú sejt esetén szövetelhalást okozhat. A kényes egyensúly beállítása az endogén antioxidáns védőrendszer segítségével történik, amelynek legfőbb tagjai a glutation, a glutation-peroxidáz, a szuperoxid-diszmutáz és a kataláz.

A rozmaringsav képes csökkenti az oxidatív stressz károsító hatásait a normál humán dermális fibroblaszt (NHDF) sejtben úgy, hogy megakadályozza a hidrogén-peroxid indította ROS termelődést és gyulladást (45). BACANLI és mtsai leírták, hogy patkányokban a rozmaringsav csökkentette a szepszis kiváltotta oxidatív stresszt több mechanizmus révén (13). A rozmaringsav alkalmas a lipidperoxidáció megakadályozására a membránokon történő átjutásával (34), növeli kísérleti egerekben a szuperoxid diszmutáz, a kataláz és a glutation-peroxidáz enzimek aktivitását (100). Patkányokban vizsgálták, hogy a rozmaringsav képes-e az acetaminofen (N-acetil-p-amino-fenol [APAP]) kiváltotta májkárosodás kivédésére, és megállapították, hogy dózisfüggő módon májvédő hatást fejtett ki a citokróm P450 (CYP) családba tartozó CYP2E1 aktivitásának gátlásával és a lipidperoxidáció csökkentésével. Ezen felül növelte a glutation mennyiségét és a glutation-S-transzferáz enzim aktivitását a májsejtekben (47).

A rozmaringsav gyulladáscsökkentő hatását azzal magyarázzák, hogy gátolja az 5-lipoxigenáz (41) és a ciklooxygenáz-2 (83) enzimek aktivitását, valamint csökkenti

**Gyulladáscsökkentő,
daganatellenes és
antibakteriális hatását
is igazolták in vitro**

a gyulladáskeltő citokinek expresszióját (81). Su-JIN és mtsai írták le, hogy a rozmaringsav gátolta az interleukin (IL)-6 és IL-1 β termelődését patkányokban (88).

Tumorelles hatást írtak le hörcsögön végzett kísérletekben, ahol a rozmaringsav megakadályozta a pofazacszóban a tumor kialakulását (9). FURTADO és mtsai egereken végzett kísérletükben kimutatták, hogy a csak doxorubicinnal (DXR) kezelt állatokhoz képest a rozmaringsavat is kapó egyedek vörösvérsejtjeiben nem keletkezett annyi mikronukleusz, vagyis a rozmaringsav képes volt a DXR mutagén hatását csökkenteni (39). Patkányokon végzett kísérletben 1,2-dimetilhidrazin által kísérletesen kiváltott vastagbélrák esetében kimutatható volt, hogy a rozmaringsav bizonyos adagban megakadályozza a karcinogenezist (56).

A rozmaringsav rendelkezik antibakteriális hatással is. EKAMBARAM és mtsai megállapították, hogy a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* baktériumhoz adott antibiotikum (vankomicin) és a rozmaringsav szinergista módon hatott (31). A rozmaringsav a mikróba felületi fehérjéit gátolja, amelyek felismerik azokat a mátrixmolekulákat, ahol meg tudnának tapadni az eukarióta sejten.

Több kísérlet bizonyítja a rozmaringsav jótékony hatását, azonban nem szabad elfelejteni, hogy ezek a kísérletek legtöbbször a természetes módon jelen lévő vegyület többszörösét alkalmazták aglikon formában, így ezek csak megközelítőleg vagy egyáltalán nem modellezik a természetes körülményeket. A polifenolok jótékony hatásait azért sem tudja minden *in vivo* kísérlet igazolni, mert az aglikon vegyületek prooxidánsként is viselkedhetnek, előidézve a ROS-termelést, a DNS-sérülést és a mutagenezist. Ezt a változást a szervezetben jelen lévő vas és réz fémionok katalizálhatják (30). Az *in vitro* és *in vivo* kísérletek eredményei közötti eltérést a biológiai hasznosulás is okozhatja (27, 77). A táplálékban és a növényi takarmánykiegészítőkben a polifenolok glikolizálva, észteressítve vagy polimerizálva lehetnek más molekulákkal, így nem tudnak azonnal felszívódni, hanem a bélrendszerben található hidrolizáló enzimeknek vagy a mikrobióta tagjainak előbb át kell őket alakítaniuk (28, 82). A vékonybélből fel nem szívódott vegyületeket a vastagbél mikrobái metabolizálják, így azok a molekulák helyi gyulladáscsökkentő hatással rendelkezhetnek, vagy indirekt módon segíthetik a probiotikus baktériumok szaporodását (57, 72).

A ROZMARINGSAV IN VIVO HATÁSAI

A haszonállatokon végzett kísérletek esetében nem rozmaringsavat, hanem azt tartalmazó növényi részekkel vagy növényi készítménnyel kiegészített takarmányt vagy ivóvizet adtak az állatoknak, amellyel egyes esetekben kissé eltérő, de összességében biztató eredményt kaptak. A következőkben az egyes haszonállatainkban tapasztalt hatásokat foglaljuk össze.

A ROZMARINGKIVONAT ANTIOXIDÁNS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA NYULAKBAN

**Nyulakban végzett
kakukkfű- és rozmaring-
kivonattal végzett
kísérletek több esetben
javították a termelési
mutatókat**

Többféle nyúlfajtán folytattak kísérleteket rozmaring (11), kerti kakukkfű (1, 2, 55, 76) növényi rész vagy illóolaj kiegészítéssel. A kísérletek során a kerti kakukkfűvel kísérletező kutatócsoportok megnövekedett takarmányfelvételt és testtömeg-gyarapodást tapasztaltak (2, 55, 76), a fajlagos takarmányhasznosulás egyes esetekben javult (2, 55), míg PLACHA és mtsai ebben nem találtak változást (76). A rozmaringot használó ATTHA és mtsai nem találtak különbséget a testtömeg-gyarapodásában a kontrollcsoporttal összehasonlítva (11). A vér antioxidáns kapacitását, ill. a vese- és májműködésre gyakorolt hatását a kerti kakukkfűnek többen is vizsgálták. A vérben az albumin-, a globulin-, az összfehérje- és a glutation koncentrációja (1), az összantioxidáns-kapacitás (1, 76) és a szuperoxid-dizmutáz, a glutation-S-transzferáz és a kataláz aktivitása emelkedett meg.

Csökkenett viszont az alanin-aminotranszferáz (ALT) és az aszpartát-aminotranszferáz (AST) aktivitása, valamint az összkoleszterin, a trigliceridek, az LDL, VLDL, a húgysav, a karbamid, a kreatinin és a malondialdehid koncentrációja a kontroll mintákhoz képest (1). *Ex vivo* nőtt a máj glutation-peroxidáz aktivitása is a kísérlet végén (76). Szövettanilag sem a máj, sem a vese esetében nem volt látható kóros elváltozás (1), más kísérletben csökkent a vese körüli zsírtok, miközben a vese működését a kiegészítés nem befolyásolta. Ez esetben a hús lipidperoxidációjának csökkenését is tapasztalták (2). A fertilitást bak nyulakon mindkét növény hatását vizsgálva a herék mérete és a vér és ondó tesztoszteronszintje is nőtt, az ondó mennyisége, minősége, így a spermiumok progresszív mozgása és koncentrációja is megemelkedett, az ondó összantioxidáns-kapacitása nőtt (11, 55). Egyes kerti kakukkfű hatásait vizsgáló kutatások foglalkoztak a bélintegritással és a -mikrobiótával is. A kísérlet során a vakbél pH-értéke csökkent, ugyanis mérséklődött az ammónia mennyisége, és megnövekedett az illó zsírsavak együttes koncentrációja (55). A duodenum transzepiteliális ellenállása nőtt, a bélfal malondialdehid-koncentrációja csökkent, a bélben található mikrobióta össz mennyisége kismértékben csökkent a kontrollcsoporthoz képest (76).

A ROZMARINGKIVONAT HATÁSA A BROJLERCSIRKÉKRE ÉS A TOJÓTYÚKOKRA

Házityúkban végzett kísérletek is hasonló eredményre vezettek

A kutatások során többféle növényi résszel és olajjal kísérleteztek, mint a rozmaring (25, 43, 61, 97), a kakukkfű (7, 25), az oregánó (25, 33, 50), a közönséges cickafark, a majoránna (25). Kakukkfűből, cickafarkból (25) és rozmaringból (97) készült növényi olajok hatékonyabbnak bizonyultak a növénytetéshez képest.

Az egyik fő kérdés a vizsgálatok során a termelési paraméterek, így a takarmányfelvétel, takarmányhasznosulás, testtömeg-gyarapodás, ill. a húsminőség alakulása volt. Több esetben megnövekedett testtömeg-gyarapodást tapasztaltak (25, 33, 43), egyes esetekben a fajlagos takarmányhasznosulás is jobb lett (33, 43), a hús fizikai jellemzői is javultak (43), a mellizom megjelenése, puhasága jobb volt a kontrollhoz képest (50), megváltozott a hús színe és pH-ja is. A hús malondialdehid-koncentrációja csökkent a kontrollhoz képest, ill. szignifikánsan csökkent a húsmintákon az *Escherichia coli* (*E. coli*) baktériumok száma (97). Volt kísérlet, ahol nem volt változás a kontrollcsoporthoz képest (7), ill. egyesek kisebb vágósúlyt is megfigyeltek a húspan megnövekedett α -tokoferol-koncentrációval együtt (61). Ezen kívül megnövekedett plazma összfehérje-, albumin- és globulin-koncentrációt, valamint csökkent glükóz-, összlipid- (43) és koleszterinkoncentrációt találtak a vérplazmában (43, 50). A vese- és májfunkciót a növényi kiegészítés nem befolyásolta, de megemelkedett T3- és T4-szintet tapasztaltak a kontrollhoz képest (43). A kezelés hatására hosszabb villusok voltak a duodenumban (50), de nem tapasztaltak változást sem a bélmikrobióta alkotóinak arányában, sem az össz mennyiségben (25, 50).

Tojóttyúk esetén rozmaring (5, 22, 23, 37), oregánó (22), kakukkfű, zsály (23) növényi rész vagy olaj takarmányba kevert hatását vizsgálták. A kísérletek többségében nem volt szignifikáns különbség a takarmányfelvételen, takarmányhasznosulásban (5, 22, 37), ezzel szemben a kontrollhoz képest csökkent takarmányfelvételt, de jobb takarmányhasznosulást tapasztalt BÖLÜKBAŞI és mtsai mindhárom növényi olaj esetén (23). A rozmaringsav tojástermelésre gyakorolt hatására vonatkozóan ellentmondásos szakirodalmi adatok állnak rendelkezésre. Nem találtak szignifikáns különbséget a tojások méretében, alakjában, tömegében, a sárgája átmérőjében és színében a kontrollhoz képest, de a sárgájában csökkent lipidperoxidáció volt tapasztalható, így a rozmaring- és oregánókiegészítésnél antioxidáns hatás volt észlelhető (22, 37). Ezzel ellentétben BÖLÜKBAŞI és mtsai kísérletében a tojásokat vizsgálva a tojások száma nem,

de a tömegük szignifikánsan nőtt, a sárgája aránya pedig csökkent a kontrollhoz képest. A tojások triglicerid- és koleszterintartalma nem változott (23). Más, későbbi kísérletben a tojások tömege nem változott, de a tojások darabszáma, a sárgája/fehérje arány nőtt, az albumin mennyisége csökkent (5). Többen vizsgálták, hogy a növényi részek aktív összetevői hogyan hatnak a vérszérum egyes összetevőire. A triglicerid- és koleszterinkoncentráció (5, 23), valamint az LDL-koleszterin és az immunoglobulin A (IgA) koncentrációja a vérszérumban szignifikánsan csökkent, míg a HDL-koleszterin és IgM ellenanyag szintje növekedett. A rozmaring képes volt a vérszérum szuperoxid-dizmutáz aktivitását is emelni, így antioxidánsként viselkedni (5). Mindezek mellett a bélsárban csökkent coliform és *E. coli* baktériumszámot tapasztaltak mindhárom növényi olaj esetén (23).

IN VIVO KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI EGYÉB HASZONÁLLATOKBAN

Pulykák esetén oregánó növényi résszel vagy olajjal kiegészítve tapasztaltak különbséget a takarmányfelvételben és -hasznosulásban: kezdetben nem befolyásolta, de 42 napos kor után csökkent takarmányfelvételt és javuló takarmányhasznosulást tapasztaltak 82 napos korig (15), míg PAPAGEORGIOU és mtsai nem tapasztaltak változást a 84–112 napos kor közötti vizsgálati időszak alatt. Az oregánó-kiegészítés képes volt késleltetni a lipidperoxidációt és antioxidánsként viselkedni több szövetet is vizsgálva (szív, mellizom) (70). A test és a vágott test tömege, a vérplazma koleszterinkoncentrációja, valamint a szív és máj aránya nem változott a kezelés hatására, de a zúzógyomor és a vékonybél tömege csökkent a kontrollhoz képest (15).

Egy tanulmányban 1–6 hét közötti japán fürjek takarmányát kerti katicavirág (*Nigella sativa*), szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) és rozmaring hidegen préselt olajának 1:1:1 arányú keverékével egészítették ki. A vizsgált idő alatt nőtt a takarmányfelvétel és a testtömeg-gyarapodás mértéke, az ileum és a vakbél területén csökkent a baktériumok összesített száma, valamint a koliform és *E. coli* baktériumok mennyisége (32).

Választáskori malacokat kakukkfű-kiegészítéssel takarmányozva nem csökkent sem a rektális tamponmintával vett kórokozók száma, sem a hemolizáló *E. coli* okozta elhullások mértéke a kontrollcsoporthoz képest (44). A malacnevelés későbbi időszakában sem volt különbség tapasztalható a takarmányfelvétel mértékében, a napi testtömeg-gyarapodásban, és a hemolitikus *E. coli* szerotípusok megjelenésében sem (54).

Összefoglalva, a rozmaringsav egy jótékony hatású vegyület, amely csak növényi táplálék fogyasztásával kerülhet az élő szervezetbe. Annak ellenére, hogy a rozmaringsav *per os* biohasznosulása rendkívül gyenge a kiterjedt glükoronsavas konjugációja miatt (12, 58), a kedvező hatásainak köszönhetően javasolható a vegyület takarmánykiegészítőként való alkalmazása. Feltételezhető, hogy a polifenol-komponensek egymás hatását és hasznosulását is befolyásolják, ezért a jövőben olyan kísérletekkel lehet jobban megismerni a hatásmechanizmusokat, amelyek során több polifenol vegyületet tesztelnek aglikon és glikolizált formában is *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnénk köszönetet mondani DR. VARGA TAMÁS RÓBERTNEK a rozmaringsav kémiai szerkezetének megrajzolásáért.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg. A támogatási szerződés száma: EFOP-3.6.1-16-2016-00024 (projekt címe: Intelligens szakosodást szolgáló fejlesztések az

Szájon át adva a rozmaringsav hasznosulása rendkívül gyenge a kiterjedt glükoronsavas konjugációja miatt

Állatorvostudományi Egyetem és a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának együttműködésében), valamint az EFOP-3.6.2-16-2017-00012 (projekt címe: Funkcionális, egészséges és biztonságos élelmiszer termékpálya modell kidolgozása a szántóföldtől az asztalig elv alapján, tematikus kutatási hálózatban).

Továbbá az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával.

A kutatási témát a 115685 és a 124522 számú OTKA pályázat támogatta és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj kereteiben készült.

IRODALOM

1. ABDEL-GABBAR, M. – AHMED, R. R. et al.: Administration of ginger and/or thyme has ameliorative effects on liver and kidney functions of V-line rabbits: Histological and biochemical studies. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 2019. 103. 1758–1767.
2. ABDEL-WARETH, A. A. A – TAHA, E. M. M. et al.: Thyme oil inclusion levels in a rabbit ration: Evaluation of productive performance, carcass criteria and meat quality under hot environmental conditions. *Anim. Nutr.*, 2018. 4. 410–416.
3. AESCHBACH, R. – LÖLIGER, J. et al.: Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.*, 1994. 32. 31–36.
4. AGUILAR, F. – AUTRUP, H. et al.: Use of rosemary extracts as a food additive—scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. *EFSA J.*, 2008. 721. 1–29.
5. ALAGAWANY, M. – EL-HACK, M. E. A.: The effect of rosemary herb as a dietary supplement on performance, egg quality, serum biochemical parameters, and oxidative status in laying hens. *J. Anim. Feed Sci.*, 2015. 24. 341–347.
6. ALBERTI, Á.: Étrendi hidroxí-fahájsav-szármaszékok jelentősége a májterápiában. *Orv. Hetil.*, 2012. 153. 948–953.
7. ALFAIG, E. – ANGELOVICOVA, M. – KRAL, M.: Effect of probiotics and thyme essential oil on carcass parameters of broiler chickens. *Anim. Sci. Biotechnol.*, 2013. 46. 50–52.
8. ANDRADE, J. M. – FAUSTINO, C. et al.: *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Sci. OA*, 2018. 4. FSO283
9. ANUSUYA, C. – MANOHARAN, S.: Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2011. 30. 199–211.
10. ARRAZ, E. – MES, J. et al.: Anti-inflammatory activity of the basolateral fraction of Caco-2 cells exposed to a rosemary supercritical extract. *J. Funct. Foods.*, 2013. 13. 384–390.
11. ATTIA, Y. A. – HAMED, R. S. et al.: Semen quality, antioxidant status and reproductive performance of rabbits bucks fed milk thistle seeds and rosemary leaves. *Anim. Reprod. Sci.*, 2017. 184. 178–186.
12. BABA, S. – OSAKABE, N. et al.: Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci.*, 2004. 75. 165–178.
13. BACANLI, M. – AYDIN, S. et al.: Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced oxidative damage in Wistar Albino rats? *Hum. Exp. Toxicol.*, 2016. 35. 877–886.
14. BAI, N. – HE, K. et al.: Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.*, 2010. 58. 5363–5367.
15. BAMPIDIS, V. A. – CHRISTODOULOU, V. et al.: Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *Br. Poult. Sci.*, 2005. 46. 595–601.
16. BEGUM, A. – SANDHYA, S. et al.: An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2013. 12. 61–73.
17. BENCZE É.: THYMUS VULGARIS L. IN: BERNÁTH J. (szerk.): (2000) *Gyógy- és aromanövények*. Mezőgazda Kiadó. Budapest, 2000. 560–562.
18. BERINI, J. L. – BROCKMAN, S. A. et al.: Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Front. Plant Sci.*, 2018. 9. 1257.
19. BHATT, R. – MISHRA, N. – BANSAL, P. K.: Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *J. Pharm. Sci. Innov.*, 2013. 2. 28–34.
20. BOROS, B. – JAKABOVÁ, S. – DÖRNYEI, A. – HORVÁTH, G. – PLUHÁR, Z. – KILÁR, F. – FELINGER, A.: Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in Thymus species. *J. Chromatogr. A*, 2010. 1217. 7972–7980.
21. BORRÁS-LINARES, I. – STOJANOVIĆ, Z. et al.: *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014. 15. 20585–20606.
22. BOTSOGLOU, N. – FLOROU-PANERI, P. et al.: The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and α -tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 2005. 35. 143–151.
23. BÖLÜKBAŞI, Ş. C. – ERHAN, M. K. – KAYNAR, Ö.: The effect of feeding thyme, sage and rosemary oil on laying hen performance, cholesterol and some proteins ratio of egg yolk and *Escherichia Coli* count in feces. *Arch. Geflügelk.*, 2008. 72. 231–237.
24. CIULU, M. – SPANO, N. et al.: Recent advances in the analysis of phenolic compounds in unifloral honeys. *Molecules (Basel)*, 2016. 21. 451.
25. CROSS, D. E. – MCDEVITT, R. M. et al.: The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br. Poult. Sci.*, 2007. 48. 496–506.
26. CSEKE, L. J. – KAUFMAN, P. B. – KIRAKOSYAN, A.: The biology of essential oils in the pollination of flowers. *Nat. Prod. Commun.*, 2007. 2. 1317–1336.
27. D'ARCHIVIO, M. – FILESI, C. et al.: Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010. 11. 1321–1342.

28. D'ARCHIVIO, M. – FILESI, C. et al.: Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 2007. 43. 348e61
29. DEL BAÑO, M. J. – LORENTE, J. et al.: Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. postulation of a biosynthetic pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 2004. 52. 4987–4992.
30. EGHBALIFERIZ, S. – IRANSHAHI, M.: Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother. Res.*, 2016. 30. 1379–1391.
31. EKAMBARAM, S. P. – PERUMAL, S. S. et al.: Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, 2016. 5. 358–363.
32. EL-HACK, M. E. A. – MAHGOUB, S. A. et al.: Influences of dietary supplementation of antimicrobial cold pressed oils mixture on growth performance and intestinal microflora of growing Japanese Quails. *Int. J. Pharmacol.*, 2015. 11. 689–696.
33. ERTAS, O. N. – GÜLER, T. et al.: The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.*, 2005. 4. 879–884.
34. FADEL, O. – EL KIRAT, K. – MORANDAT, S.: The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation *in situ*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011. 1808. 2973–2980.
35. FARRÉS-CEBRIÁN, M. – SERÓ, R. et al.: HPLC-UV polyphenolic profiles in the classification of olive oils and other vegetable oils via principal component analysis. *Separations*, 2016. 3. 33.
36. FELGINES, C. – TEXIER, O. et al.: Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2000. 279. G1148–1154.
37. FLOROU-PANERI, P. – DOTAS, D. et al.: Effect of feeding rosemary and α -tocopherol acetate on hen performance and egg quality. *J. Poult. Sci.*, 2006. 43. 143–149.
38. FROND, A. D. – LUHAS, C. I. et al.: Phytochemical characterization of five edible purple-reddish vegetables: Anthocyanins, Flavonoids, and Phenolic acid derivatives. *Molecules*, 2019. 24. 1536.
39. FURTADO, M. A. – DE ALMEIDA, L. C. et al.: Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2008. 657. 150–154.
40. GEDİKOĞLU, A. – SÖKMEN, M. – ÇİVİT, A.: Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Sci. Nutr.*, 2019. 7. 1704–1714.
41. GELLER, F. – SCHMIDT, C. et al.: Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*. *J. Ethnopharmacol.*, 2010. 128. 561–566.
42. GENENA, A. K. – HENSE, H. et al.: Rosemary (*Rosmarinus officinalis*)—A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 2008. 28. 463–469.
43. GHAZALAH, A. A. – ALI, A. M.: Rosemary leaves as a dietary supplement for growth in broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.*, 2008. 7. 234–239.
44. HAGMÜLLER, W. – JUGL-CHIZZOLA, M. et al.: The use of *Thymi Herba* as feed additive (0.1%, 0.5%, 1.0%) in weanling piglets with assessment of the shedding of haemolyzing *E. coli* and the detection of thymol in the blood plasma. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2006. 119. 50–54.
45. HAHN, H. J. – KIM, K. B. et al.: Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts. *Mol. Med. Rep.*, 2017. 16. 9763–9769.
46. HARTMANN, T.: Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta.*, 2004. 219. 1–4.
47. HASANEIN, P. – SHARIFI, M.: Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats. *Pharm. Biol.*, 2017. 55. 1809–1816.
48. HEGAZY, A. M. – ABDEL-AZEEM, A. S. et al.: Hypolipidemic and hepatoprotective activities of rosemary and thyme in gentamicin-treated rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2018. 37. 420–430.
49. HO, C. T. – WANG, M. et al.: Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. *Biofactors*, 2000. 13. 161–166.
50. HONG, J. – STEINER, T. et al.: Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livest. Sci.*, 2012. 144. 253–262.
51. HOSSAIN, M. B. – RAI, D. K. et al.: Characterization of phenolic composition in *Lamiaceae* spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2010. 58. 10576–10581.
52. HUDAIB, M. – SPERONI, E. et al.: GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002. 29. 691–700.
53. JANICSÁK, G. – MÁTHÉ, I. – MIKLÓSSY-VÁRI, V. – BLUNDEN, G.: Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of *Lamiaceae* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1999. 27. 733–738.
54. JUGL-CHIZZOLA, M. – SPERGSE, J. et al.: Effects of *Thymus vulgaris* L. as feed additive in piglets and against haemolytic *E. coli in vitro*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2005. 118. 495–501.
55. KANDEIL, M. A. – MOHAMED, A. E. H. et al.: Ameliorative effects of oral ginger and/or thyme aqueous extracts on productive and reproductive performance of V-line male rabbits. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 2019. 103. 1437–1446.
56. KARTHIKUMAR, V. – SIVAGAMI, G. et al.: Modulatory efficacy of rosmarinic acid on premalignant lesions and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2012. 34. 949–958.
57. KEMPERMAN, R. A. – BOLCA, S. et al.: Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology*, 2010. 156. 3224–3231.
58. KONISHI, Y. – HITOMI, Y. et al.: Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.*, 2005. 53. 4740–4746.
59. KOSAR, M. – DORMAN, H. J. D. – HILTUNEN, R.: Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae* species. *Food Chem.*, 2005. 91. 525–533.
60. KROYMANN, J.: Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2011. 14. 246–251.
61. LOETSCHER, Y. – KREUZER, M. – MESSIKOMMER, R. E.: Oxidative stability of the meat of broilers supplemented with rosemary leaves, rosehip fruits, chokeberry pomace, and entire nettle, and effects on performance and meat quality. *Poult. Sci.*, 2013. 92. 2938–2948.
62. LUIS, J. C. – JOHNSON, C. B.: Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their *in vitro* antiradical activity. *Span. J. Agric. Res.*, 2005. 3. 106–112.
63. LÜ, J. M. – LIN, P. H. et al.: Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.*, 2010. 14. 840–860.

64. MAZID, M. – KHAN, T. A. – MOHAMMAD, F.: Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol. Med.*, 2011. 3. 232–249.
65. MEMAR, M. Y. – RAEI, P. et al.: Carvacrol and thymol strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Rev. Med. Microbiol.*, 2017. 28. 63–68.
66. MORAND, C. – MANACH, C. et al.: Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors*. 2000. 12. 169–174.
67. MORENO, S. – SCHEYER, T. et al.: Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.*, 2006. 40. 223–231.
68. NAIMI, M. – VLAVCHESKI, F. et al.: Rosemary extract as a potential anti-hyperglycemic agent: current evidence and future perspectives. *Nutrients.*, 2017. 9. E968.
69. NIETO, G. – ROS, G. – CASTILLO, J.: Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines (Basel)*, 2018. 5. 98.
70. PAPAGEORGIOU, G. – BOTSOGLOU, N. et al.: Effect of dietary oregano oil and-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkeybreast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2003. 87. 324–335.
71. PARK, J. B.: Identification and quantification of a major anti-oxidant and anti-inflammatory phenolic compound found in basil, lemon thyme, mint, oregano, rosemary, sage, and thyme. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2011. 62. 577–584.
72. PARKAR, S. G. – STEVENSON, D. E. – SKINNER, M. A.: The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008. 124. 295–298.
73. PARNHAM, M. J. – KESSELING, K.: Rosmarinic acid. *Drug. Future*, 1985. 10. 756–757.
74. PEREIRA, D. M. – VALENTÃO, P. et al.: Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 2009. 14. 2202–2211.
75. Pharmacopoea Hungarica (2004) VIII. kiadás, II. kötet. Medicina Könyvkiadó. Budapest.
76. PLACHA, I. – CHRASTINOVA, L. et al.: Effect of thyme oil on small intestine integrity and antioxidant status, phagocytic activity and gastrointestinal microbiota in rabbits. *Acta Vet. Hung.*, 2013. 61. 197–208.
77. PORRINI, M. – RISO, P.: Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2008. 18. 647–650.
78. RAMAKRISHNA, A. – RAVISHANKAR, G. A.: Influences of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.*, 2011. 6. 1720–1731.
79. REGNAULT-ROGER, C. – RIBODEAU, M. et al.: Polyphenolic compounds of mediterranean *Lamiaceae* and investigation of orian-tational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *J. Stored Prod. Res.*, 2004. 40. 395–408.
80. RENTZSCH, M. – WILKENS, A. – WINTERHALTER, P.: Non-flavonoid phenolic compounds. In: MORENO-ARRIBAS, M. V. – POLO, M. C. (szerk.): *Wine chemistry and biochemistry*. Springer. New York, 2009. 509–527.
81. SANBONGI, C. – TAKANO, H. et al.: Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003. 34. 1060–1069.
82. SCALBERT, A. – WILLIAMSON, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 2000. 130. 2073Se85S.
83. SCHECKEL, K. A. – DEGNER, S. C. – ROMAGNOLO, D. F.: Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J. Nutr.*, 2008. 138. 2098–2105.
84. SCHMIDT, E. – WANNER, J. et al.: Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. *Nat. Prod. Commun.*, 2012. 7. 1095–1098.
85. SELMAR, D. – KLEINWÄCHTER, M.: Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant Cell. Physiol.*, 2013. 54. 817–826.
86. SHEKARCHI, M. – HAJIMEHDIPOOR, H. et al.: Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn. Mag.*, 2012. 8. 37–41.
87. SIK, B. – KAPCSÁNDI, V. – SZÉKELYHIDI, R. – HANCZNÉ, E. L. – AJTONY, Zs.: Recent advances in the analysis of rosmarinic acid from herbs in the *Lamiaceae* family. *Nat. Prod. Commun.*, 2019. 14. <https://doi.org/10.1177/1934578X19864216>
88. SU-JIN, K. – JAE-YOUNG, U. et al.: Protective effect of rosmarinic acid is through regulation of inflammatory cytokine in cadmium-induced ototoxicity. *Am. J. Chin. Med.*, 2013. 41. 391–404.
89. TADTONG, S. – KAMKAEN, N. et al.: Chemical components of four essential oils in aromatherapy recipe. *Nat. Prod. Commun.*, 2015. 10. 1091–1092.
90. TRÓCSÁNYI E. – ZÁMBORINÉ NÉMETH É. – GYÖRGY Zs.: A kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) rozmaringsav-tartalma és a rozmaringsav-szintáz gén expressziójának változása eltérő vízellátás hatására. *Kertgazdaság*, 2017. 49. 85–91.
91. TSAI, M. L. – LIN, C. C. et al.: Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011. 75. 1977–1983.
92. TSAO, R.: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010. 2. 1231–1246.
93. VALLEJO-CORDOBA, B. – GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F. et al.: Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *J. Sep. Sci.*, 2005. 28. 826–836.
94. VALLVERDÚ-QUERALT, A. – REGUEIRO, J. et al.: A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.*, 2014. 154. 299–307.
95. VILLANO, C. – LISANTI, M. T. et al.: Wine varietal authentication based on phenolics, volatiles and DNA markers: State of the art, perspectives and drawbacks. *Food Control*, 2017. 80. 1–10.
96. WANG, H. – PROVAN, G. J. – HELLIWELL, K.: Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.*, 2004. 87. 307–311.
97. YESILBAG, D. – EREN, M. et al.: Effects of dietary rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and serum SOD activity. *Br. Poult. Sci.*, 2011. 52. 472–482.
98. ZARRINI, G. – DELGOSHA, Z. B. et al.: Post-antibacterial effect of thymol. *Pharm. Biol.*, 2010. 48. 633–636.
99. ZGÓRKA, G. – GŁOWNIAK, K.: Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001. 26. 79–87.
100. ZHANG, Y. – CHEN, X. et al.: Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food Funct.*, 2015. 6. 927–931.

Közlésre érk.: 2020. jan. 30.



**Hirdetési
felületek már
60 000 Ft-tól**

Többszöri megjelenés esetén
további engedményeket
biztosítunk

Hirdessen Ön is a Magyar Állatorvosok Lapja c. tudományos-szakmai folyóiratban!

Most kedvező áron tesszük közzé hirdetését!

Felület	Méret (mm)	Nettó ár (Ft)					
1/1	200 X 285	130 000					
1/2	200 X 142	110 000					
1/3	200 X 95	75 000					
1/4	200 X 70	60 000					
B2, B3, B4	200 X 285	155 000					
PR	-	100 000					



Bővebb információért keresse kollégáinkat a lenti elérhetőségek bármelyikén:
**Postacím: Herman Ottó Intézet Nonprofit Kft.
 1223 Budapest, Park u. 2.
 Telefon: 06-1/362-8100
 E-mail: info@agrarlapok.hu**

KETTŐS VÉDELEM A BVD ELLENI HARCBAN

3+1 akció!*

A BOVELA® BIZONYÍTOTTAN HUMORÁLIS ÉS CELLULÁRIS IMMUNVÁLASZT IS KIVÁLT!¹

A Bovela méltó ellenfele a BVD-nek.
Az első, kettős delécióval (ún. L2D - live double deleted) előállított élővírusos BVD vakcina.
A BVD 1-es és 2-es genotípusával szemben is védelmet nyújt.
A védettség 12 hónapig tart egyetlen vakcinázást követően.

1: Platt R, et al. (2017): Comparison of humoral and T-cell-mediated immune responses to a single dose of Bovela® live double deleted BVDV vaccine or to a field BVDV strain. Veterinary Immunology and Immunopathology 187:20-27.

Kérjen állatorvosától vagy gyógyszerésztől további felvilágosítást! Alkalmazás előtt, illetve további információért olvassa el a használati utasítást, vagy kérdezze a Boehringer Ingelheim képviselőjét:

**Boehringer Ingelheim RCV Magyarországi
Fióktelepe**
1095 Budapest, Lechner Ödön fasor 10.
Tel.: 06 1 299-8900 • Fax: 06 1 299-8901
ah.hu@boehringer-ingelheim.com

dr. Kerényi Katalin
Tel.: 06 30 977 9961
E-mail: katalin.kerenyi@
boehringer-ingelheim.com

Péter Attila
Tel.: 06 20 394 0325
E-mail: attila.peter@
boehringer-ingelheim.com

BOVELA

Állományvédelem egyszerűen.

*Az akcióban résztvevő termék: BOVELA 50 ml injekció (25 adag), lejárata: 2020.11.02. Az akció részleteivel kapcsolatban érdeklődjön gyógyszerforgalmazójánál.