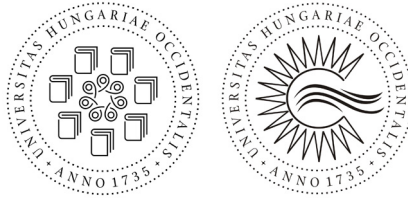


# **SZAKDOLGOZAT**

**Haász Nikoletta**

**2013**

**Nyugat-magyarországi Egyetem**  
**Természettudományi Kar**



**Kutya babesiosis**  
**és kimutatása PCR módszerrel**

Témavezető:  
**Dr. Molnár Péter**  
egyetemi docens

Készítette:  
**Haász Nikoletta**  
biológia BSc szak  
akadémiai szakirány

# Tartalomjegyzék

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. BEVEZETÉS.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2. CÉLKITŰZÉS.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>3.1. Miért Babesia?.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>3.2. Ismertető a kórokozókról.....</b>  | <b>6</b>  |
| 3.2.1. Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1974).....                            | 9         |
| 3.2.2. Babesia sp.....   | 12        |
| <b>3.3. Ismertető a betegségről, kezeléséről, megelőzéséről.....</b>             | <b>14</b> |
| 3.3.1. Babesiosis.....   | 14        |
| 3.3.2. Tünetek.....  | 15        |
| 3.3.3. Kezelés.....  | 15        |
| 3.3.4. Megelőzés.....  | 16        |
| <b>3.4. Előfordulási arány más betegségekhez képest.....</b>                     | <b>17</b> |
| <b>3.5. Babesiás kutyákra vonatkozó éves rendelői statisztika bemutatása....</b> | <b>17</b> |
| <b>3.6. Elterjedettség monitorozása.....</b>                                     | <b>20</b> |
| <b>3.7. Kórokozók kimutatása az állatorvosi gyakorlatban.....</b>                | <b>21</b> |
| <b>3.8. A babesiosis kimutatása az állatorvosi gyakorlatban.....</b>             | <b>28</b> |
| <b>3.9. Miért molekuláris biológia / PCR?.....</b>                               | <b>29</b> |
| <b>3.10. Babesia kimutatása molekuláris biológiai eszközökkel.....</b>           | <b>30</b> |
| <b>3.11. Lehetséges kutatási alkalmazás.....</b>                                 | <b>31</b> |
| <b>4. MÓDSZEREK.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.1. Adatgyűjtés menete az archívumból.....</b>                               | <b>33</b> |
| <b>4.2. Mintagyűjtés folyamata.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4.3. Babesia kimutatása PCR módszerrel.....</b>                               | <b>35</b> |
| 4.3.1. Kimutatás vérmintából.....  | 35        |
| 4.3.1.1. DNS izolálás.....   | 35        |
| 4.3.1.2. DNS amplifikáció PCR módszerrel.....                                    | 36        |
| 4.3.1.3. Gél elektroforézis.....   | 36        |

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| 4.3.2. Kimutatás kullancsból.....  | 37        |
| 4.3.2.1. DNS izolálás.....         | 37        |
| <b>5. EREDMÉNYEK.....</b>          | <b>38</b> |
| 5.1. DNS izolálás.....             | 38        |
| 5.2. Kimutatás vérmintából.....    | 38        |
| 5.3. Kimutatás kullancsból.....    | 39        |
| <b>6. ÖSSZEGZÉS.....</b>           | <b>40</b> |
| <b>7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b> | <b>42</b> |
| <b>8. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>     | <b>43</b> |

# 1. BEVEZETÉS

Öt éve dolgozom egy budapesti kisállatklinikán, a FeliCaVet Állatkórházban. Az itt töltött idő alatt figyeltem fel egy szezonálisan felbukkanó, meglehetősen gyakori és súlyos betegségre, a kutya babesiosisra. A betegség első jelei között meglehetősen általánosnak mondható tünetek szerepelnek, mint például étvágytalanság, kedvetlenség, láz. A kevésbé aggódó tulajdonosok várnak 1-2 napot, mielőtt ezekkel a problémákkal az állatorvoshoz fordulnak, ami ebben az esetben sajnos nagyon nem szerencsés. Az időben felfedezett és célzottan kezelt betegség nagyon jó hatásokkal gyógyítható, az elhanyagolt állatot azonban akár egy hét alatt elviheti a kór.

Bár a gazdák az utóbbi években egyre tájékozottabbak a kutya babesiosist és megelőzését illetően, még mindig akad félreértés. Általánosan elterjedt nézet például még mindig, hogy a babesiosist terjesztő kullancsok meleg időben jelentkeznek, így sokan csak április-május magasságában keresik először a megelőzést segítő kullancsirtó cseppeket, nyakörveket. A *Babesia canis* gazdája, a *Dermacentor reticulatus* azonban már 6 °C fölött aktív, a nagyon meleg és a nagyon hideg időjárást viszont nem szereti. A legtöbb fertőzött állattal március-április és szeptember-október hónapokban találkozunk. A másik félreértés, hogy sokan azt gondolják, magasból (fákról) esnek az állatokra a kullancsok, holott 1,5m-nél magasabban nem fordulnak elő, ennél messzebb történő „vándorlásra” nem képesek.

Mivel Magyarországon a kutya babesiosist túlnyomó többségben a *Babesia canis* nevű faj okozza, az állatorvosi gyakorlat babesiosis gyanúja esetén nem tér ki a faj beazonosítására. Ez a legtöbbször nem okoz problémát. Ritkán, de előfordulnak azonban sajnos olyan esetek, amikor mikroszkópos módszerrel a *Babesia* fertőzés gyanúja beigazolódik, az állat mégsem reagál jól a kezelésre. Ennek több oka is lehet természetesen, de véleményem szerint ilyen esetekben indokolt lenne az adott *Babesia* faj PCR módszerrel történő beazonosítása.

A FeliCaVet Állatkórházban arra is volt példa, hogy az állat mutatta a babesiosis tüneteit ugyan, de csak a harmadik vérvétel alkalmával nyert bizonyítást a fertőzés. A PCR módszer érzékenységének köszönhetően azzal talán már az első esetben is kimutatható lett volna a betegség.

Összességében úgy gondolom, hogy bár már sokan, sokféle megközelítésből foglalkoztak a kutya babesiosissal, még mindig vannak – és a biológiának köszönhetően lesznek is – nyitott kérdések és van hova fejlődni megelőzés és a kórokozók beazonosítása terén. A molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával olyan kérdéseket is feltehetünk (elterjedési térkép, kórokozó beazonosítása) amelyekre a hagyományos laboratóriumi technikák csak nagy munka- és költség befektetéssel adnának választ.

## **2. CÉLKITŰZÉS**

1. Kutya babesiosis bemutatása, figyelemfelhívás a korai kimutatás fontosságára
2. Babesiosis kimutatási lehetőségeinek ismertetése az állatorvosi gyakorlatban, különös tekintettel a molekuláris biológiai módszerekre
3. PCR technikán alapuló módszer beállítása kutya babesiosis kimutatására
4. A beállított módszer felhasználási lehetőségeinek elemzése

## **3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **3.1. Miért Babesia?**

Az utóbbi két-három évtizedben felgyorsult a kullancsok és az általuk közvetített kórokozók kutatása, nem véletlenül. Egyrészt újabb és újabb fajokat fedeztek fel, másrészt a már ismert megbetegedések is érezhetően egyre gyakoribbá váltak (G. Földvári és mtsai. 2005). Ez önmagában érdekessé teszi a Babesia fajokkal való foglalkozást, illetve igény is van rá az állatorvosok, tulajdonosok és természetesen a megelőzést szolgáló szerek gyártói részéről.

Magával a fertőzéssel kapcsolatban is gyakran látnak napvilágot új kutatási eredmények. Ide tartozik mindenképpen az az igen érdekes lengyel tanulmány, ami 82 kutya véréit tesztelte Babesia kórokozó jelenlétére. Ez volt az első leírás arról, hogy látszólag egészséges, sőt, korábban babesiosissal soha nem kezelt állat is lehet a Babesia hordozója (R. Welc-Faleciak és mtsai. 2009).

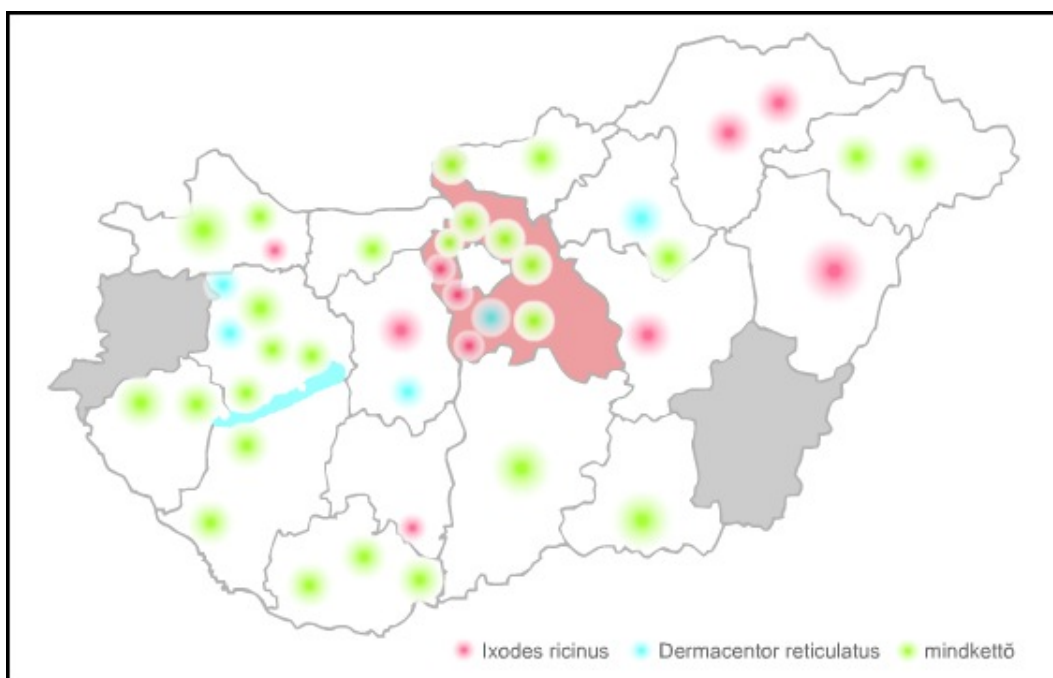
### **3.2. Ismertető a kórokozókról**

A Babesia fajok és az őket terjesztő kullancs fajok között erős kapcsolat van, így a babesiosis jelenléte a vektor kullancs előfordulásától függ elsősorban. (V. Matijako és mtsai. 2011).

Az utóbbi két-három évtizedben a városban tartott kutyáknál is jelentősen nőtt a kullancsok előfordulásának gyakorisága (Farkas R. és Földvári G. 2001). A kullancsok és vektortevékenységük szerepének növekedése több mindennek köszönhető. A lakott területek terjedésével, növekedésével, a turizmussal háziállataink egyre szélesebb körben összeszedik, hurcolják, terjesztik a különféle kullancsokat. Korábban például nem volt ennyi lehetőség arra, hogy magunkkal vigyük nyaralni kutyánkat, macskánkat. Azáltal, hogy szorosabb kapcsolatba kerülünk természetes környezetünkkel (többet járunk kirándulni, utazunk, stb.), nagyobb valószínűség-



gel visszük haza magunkon, állatainkon ezeket az élősködőket. Ennek állat-egészségügyi és közegészségügyi jelentősége is van, ugyanis a kullancsok nem csak háziállatainkra, hanem az emberekre is veszélyes kórokozókat hordozhatnak (Farkas R. és Földvári G. 2001). Mivel a fertőzött kullancs egyedek bekerülhetnek addig fertőzésmentes kullancs populációkba, a betegségek elterjedési területe is nő. A kullancsok terjedésének a globális felmelegedés is kedvez. A különböző kórokozók kimutatására használatos módszerek (pl. PCR) fejlődése lehetővé teszi addig ismeretlen paraziták kimutatását is, tehát egyáltalán nem biztos, hogy egy adott élősködő egy adott területen addig nem volt jelen, lehetséges, hogy csak nem tudták meghatározni. Mint minden állatokhoz kapcsolódó betegségre, a babesiosisra is igaz, hogy régebben kevesebb volt az úgynevezett “házi kedvenc”, kevésbé hordták a gazdák állataikat állatorvoshoz, nem feltétlenül akarták mindenáron meggyógyíttatni, így nem tudni, hogy valóban annyival kevesebb kórokozó volt-e jelen, mint amennyiről a szakirodalom beszámol (Földvári G. és Farkas R. 2005). Európában az *Ixodes*, a *Dermacentor*, a *Haemaphysalis* és a *Rhipicephalus* nemekbe tartozó kullancs egyedek fordulnak elő leggyakrabban. Közülük a *Babesia canis* egyedüli vektoraként ismert a *Dermacentor reticulatus*, legalábbis eddig nem mutatták ki más kullancsfajból a kórokozót. Hazánkban az *Ixodes ricinus* és a *Dermacentor reticulatus* fajok a leggyakoribbak, kutyákon nagyjából egyforma valószínűséggel fordulnak elő.



1. Ábra: Kullancs fajok előfordulása Magyarországon

(Forrás: <http://kemecsementok.lapunk.hu/?modul=oldal&tartalom=436468>)

Egy 2001-es kutatás (Farkas R. és Földvári G. 2001) azt mutatta, hogy a vizsgált kutyákon talált kullancsok túlnyomó többsége (83,7%) adultusz, melyből 71,7% nőstény, a nimfák aránya 15%, a lárváké 0,5% volt. Kutyákon a leggyakoribb előfordulási helyük a fej volt, ezt követte a nyaki terület, de összességében gyakorlatilag mindegyik testrészen megkapaszkodott kullancs. A faji meghatározás a következő eredményt hozta: 58% *Ixodes ricinus*, 38% *Dermacentor reticulatus*, 3% *Ixodes hexagonus*, 1% *Dermacentor marginatus*. Szignifikáns kapcsolatot mutatnak ki a *Dermacentor reticulatus* okozta fertőzöttség és a kutya babesiosis tüneteinek megjelenése között. Kutyán, macskán a kullancsok nem ivarérett fejlődési alakjai csak ritkán fordulnak elő, mert a nimfák elsősorban erdei vadakon, a lárvák pedig rágcsálókön élősöknek. Elhelyezkedésük az állat testén külföldi vizsgálatokkal is alátámasztott, vagyis leggyakrabban az állat fején, nyakán fordulnak elő. Ezt azzal magyarázzák, hogy olyan testfelületen próbálnak megtelepedni, ahol pár napos tartózkodásuk alatt a gazdaállat nem képes hozzájuk férni a fogával, amivel kitéphetné őket.

### 3.2.1. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1974)

A kullancsfaj első leírója Fabricius volt. Először az *Acarus reticulatus* nevet adta neki, ezt változtatta *Dermacentor reticulatus*-ra. 1804-ben Hermann D. pictusként írta le a fajt, ezzel a későbbi szakirodalomban kis bonyodalmat okozott.

Előfordulására jellemző, hogy leginkább Európa és Ázsia mérsékelt meleg területein található meg. A *D. reticulatus* elsősorban a magas páratartalmú élőhelyeket, főként az elegyes lombhullató erdőket kedveli, de gyakorlatilag bárhol előfordul, ahol a gazdái is: mezőkön, parkokban, legelőkön, kertekben. A magasabb hegyekben nem jellemzőek. Számukra az ideális évi csapadék mennyiség 400 és 1000 mm közötti (Földvári G. és Farkas R. 2005).

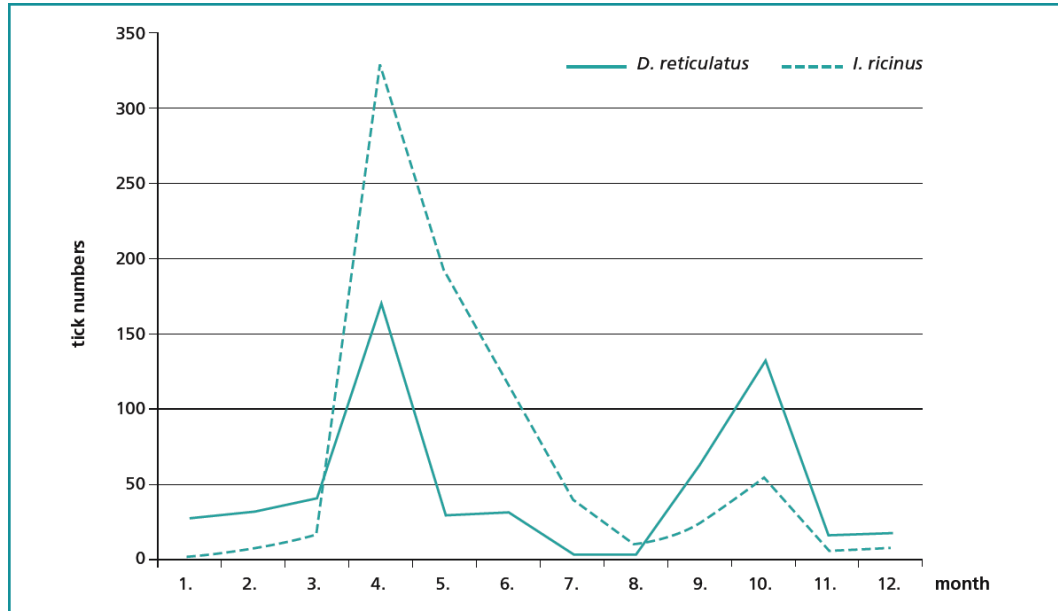
Életciklusa három szakaszra bontható, van lárva, nimfa és adult alakja, ennek megfelelően háromgazdás parazita. Mindhárom alakja egyszer táplálkozik, a vérszívás befejezése után kezdődik meg átalakulásuk, illetve adult példány esetén a peterakás. A megtermékenyített nőstény a talajra hullva rakja le petéit, általában 3-4 nappal a megtermékenyítés, illetve a táplálkozás után. Egy kullancs több ezer petét rak, de nem kel ki mindegyik. Az átlagos tojásrakási idejük 20 °C-on és 95%-os relatív páratartalom mellett 31,6 nap (Meyer-König és mtsai. 2001).

A **lárvaalak** könnyen megkülönböztethető méretéről (kb. 0,5 mm) és mindössze 6 pár lábáról. 14-47 nap alatt kelnek ki (Zahler 1994). 5-7 napig nyugalmi állapotban vannak, általában nem egyszerre kerülnek aktív állapotba. Ennek köszönhető, hogy egy gazdaállaton egyszerre általában csak 1-4 egyed szív vért (Filchagov és mtsai. 1988). Kikelésük helyétől legfeljebb 1-1,5 méter távolságra képesek eljutni. Napi aktivitásuk alkalmazkodik a kisemlős gazdaállathoz, melyek a teljesség igénye nélkül: erdei egér (*Apodemus sylvaticus*), közönséges hörcsög (*Cricetus cricetus*), erdei pocok (*Clethrionomys glareolus*), mezei pocok (*Microtus arvalis*), erdei cickány (*Sorex araneus*), törpecickány (*S. minutus*), közönséges vízicickány (*Neomys fodiens*), közönséges vakondok (*Talpa europea*), mezei nyúl (*Lepus europaeus*), üregi nyúl (*Oryctogalus cuniculus*), közönséges menyét (*Mustela nivalis*). A lárvák 3-6 napig szívnek vért, majd a földre hullás után nimfává alakulnak. Június közepétől szeptemberig aktívak.

A **nimfák** már 4 pár lábbal rendelkeznek. Még nem ivarérett példányok, 1,4-1,8 mm hosszúak. Gazdaállataik megegyeznek a lárvákéval, illetve megtalálták már

őket görényen (*M. putorius*), kutyán és emberen is. Ha rövid időn belül táplálékhoz jutnak, még ugyanabban az évben adulttá alakulhatnak (12-40 nap), de a táplálkozott egyedek valószínűleg képesek túlélni a telet. Június vége és október eleje között aktívak.

Az **adultok** szintén 4 pár lábbal rendelkeznek, 3,8-4,8 mm hosszúak. Igen nagy a tűrőképességük, akár 2 évig is kibírják táplálkozás nélkül. Egy vizsgálat szerint 95%-os relatív páratartalom mellett 5 °C-on 618 napig, -10 °C-on 150 napig, -18 °C-on 3 napig élnek túl (Meyer-König és mtsai. 2001). Alacsony páratartalom mellett is hosszú ideig kibírják, nedvesség hatására rehidratálódnak (Zahler 1994). A nyári diapauza a számukra túl magas hőmérsékletnek és a túl alacsony relatív páratartalomnak köszönhető. A minimum hőmérsékleti határ aktivitásuk szempontjából 6 °C. A mi klímánkon jellemző, hogy enyhe tél esetén aktívak lehetnek, nyáron azonban szinte minden esetben van 1-2 hónap nyugalmi állapot. A *D. reticulatus* adult alakjának aktivitása így kétszcúsos görbével írható le, leggyakoribb előfordulása március-április és szeptember-október hónapokra tehető (Földvári G. és Farkas R. 2005).



2. Ábra: Kutyákról gyűjtött *D. reticulatus* adultok havonkénti előfordulása (G. Földvári és mtsai. 2007)

Gazdaállataik lehetnek: kutya, szarvasmarha, juh, kecske, sertés, szamár, ló, görény, közönséges menyét, farkas, közönséges róka, vaddisznó, däm vad, gímzar-

vas, jávorszarvas, őz, európai bölény, mezei és üregi nyúl, erdei cickány, nyugati sün, keleti sün, patkósorrú denevér, hosszúszárnyú denevér.

A nőstények háti pajzsa kicsi, így eredeti méretük többszörösére képesek megszívni magukat. A hímek pajzsa gyakorlatilag az egész háti részüket befedi, nem tágulékony, így a nőstényeknél kevesebbet tudnak táplálkozni. A nőstények akár 5-28 napig is szívhatnak vért, míg a hím csak rövid ideig (pár nap) (Nosek 1972).

A két leggyakoribb kullancsfajunk, az *I. ricinus* és a *D. reticulatus* háti pajzsuk alapján könnyen elkülöníthetőek egymástól. Az *I. ricinus* pajzsa egyszínű fekete, míg a *D. reticularis* fekete-fehér mintázatot mutat.



3. Ábra: *Ixodes ricinus* hím és nőstény

(G. Földvári: Studies of ticks (Acari: Ixodidae) and tick-borne pathogens of dogs in Hungary, 2005)



4. Ábra: *Dermacentor reticulatus* hím és nőstény

(G. Földvári: Studies of ticks (Acari: Ixodidae) and tick-borne pathogens of dogs in Hungary, 2005)

A kullancsok az aljnövényzeten (pl. fűszál csúcsán) várakoznak, hogy felkapaszkodhassanak a gazdaállatra. Tájékozódásukat a Haller-féle szervük segíti.

A Babesiával fertőzött kullancs utódai is fertőzöttek lesznek, az egysejtűeket az egyedek transzovariálisan örökítik át nemzedékről nemzedékre. Még vitatott, hogy hány nemzedéken vihető keresztül a fertőzés (Beugnet 2002; Zahler 1994). Olyan állatfajon is fertőződhetnek, amelyik nem fogékony a parazita iránt, akkor, ha ugyanabban az időben fertőzött kullancs is táplálkozik az állat véréből (M. Zahler és R. Gothe 2000).

A *D. reticulatus* a babesiosison kívül a következő betegségek hordozójaként ismert: tularaemia, Lyme-borreliosis, rickettsiosis, brucellosis, listeriosis, yersiniosis, kullancsencephalitis, bunyavírusok okozta kórképek.

### **3.2.2. Babesia sp.**

A kutya babesiosist az Apicomplexa törzsbe tartozó *Babesia* fajok okozzák, melyek között megkülönböztetünk nagy (4-5µm) és kis (1-2,5µm) *Babesia* fajokat. (V. Matijako és mtsai. 2011; G. Földvári és mtsai. 2004) A nagy *Babesia* fajok közé tartoznak: *B. canis*, *B. rossi*, *B. vogeli*. Korábban ezeket a fajokat a *Babesia canis* alfajaiként tartották nyilván, de földrajzi elterjedésükben, vektor specificitásukban, genetikai tulajdonságaikban és a kutyákban okozott klinikai tünetek alapján elég nagy különbségeket mutatnak, ezért ma már külön fajokként kezelik őket (V. Matijako és mtsai. 2011). A kis *Babesia* fajok képviselői: *B. gibsoni*, *B. microti*, *B. conradae*, *Theileria annae* (Dr. Máthé Á., A kutyák babesiosisa, egyetemi jegyzet).

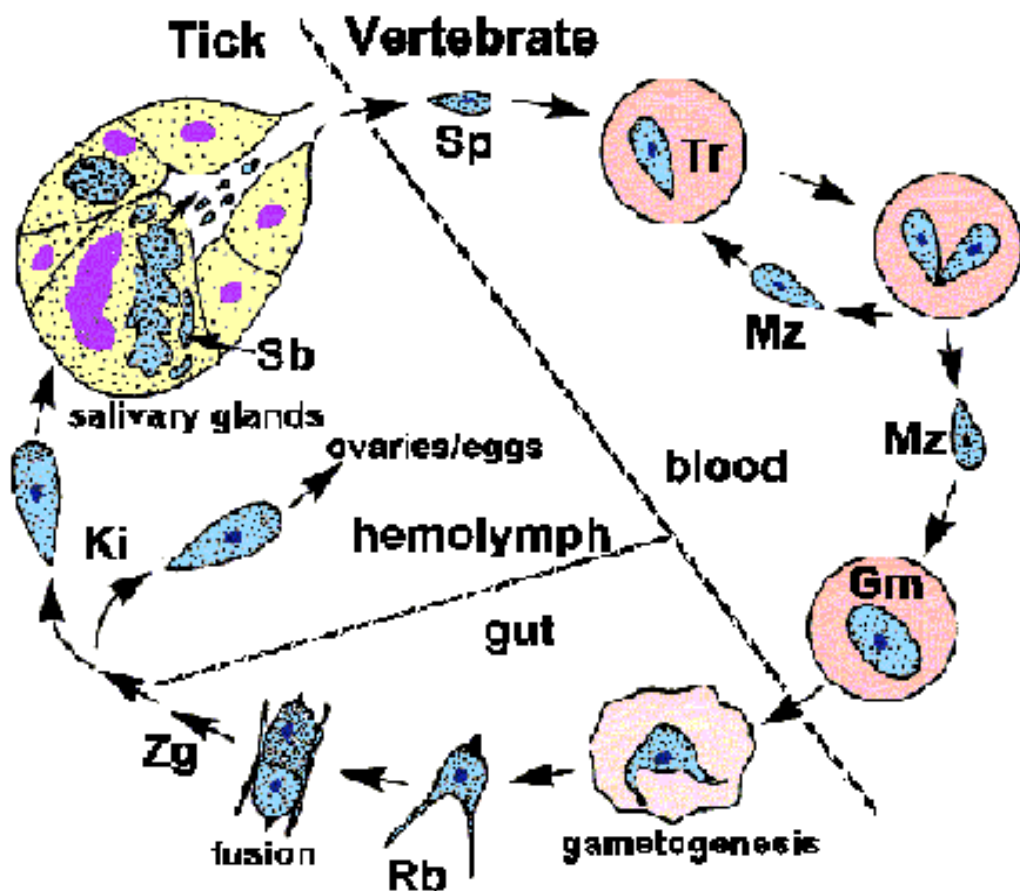
Az egyes nagy *Babesia* fajok földrajzi elterjedése és kullancs vektoraik (Földvári G. és mtsai. 2005):

*B. canis* – Európa – *Dermacentor reticulatus*

*B. rossi* – Dél-Afrika – *Haemaphysalis leachi*

*B. vogeli* – trópusi, szubtrópusi területek – *Rhipicephalus sanguineus*.

A kis *Babesia* fajok közül a *B. gibsoni* Ázsiában, Észak-Amerikában, Afrika északi és keleti területein, Ausztráliában és Európában fordul elő, vektora a *Rhipicephalus sanguineus*. *Theileria annae* okozta babesiosist nagy gyakorisággal mutattak ki spanyolországi kutyákban (G. Földvári és mtsai. 2004).



5. Ábra: Babesia fejlődési ciklusa

(Forrás: <http://www.hepatit.com/en/what-is-babesiosis.html>)

Mehlhorn és mtsi. (1980) tanulmányozták először a *B. canis* kullancson belüli fejlődését. A babesiák ivaros szaporodása a vérrel telt nőstények belében történik (tehát a kullancsok a végleges gazdái a Babesia fajoknak). A kinétáknak nevezett fejlődési alakok ezután eljutnak a kullancs különböző szerveibe (pl. Malphigi-csővecskék, petefészek), amelyekben ivartalanul szaporodnak. A nyálmirigyben alakulnak ki belőlük a sporozoiták, amelyek a kullancs vérszívásakor azok nyálával jutnak a gerincesekbe. Mivel a petefészekben és a tojásokban is előfordulnak, kijelenthető, hogy transzovariális úton is átjuthatnak egyik kullancs egyedből a másikba. Még nem tisztázott, hogy hány kullancs generáción keresztül őrzik meg élet- és fertőzőképességüket.

Ha a kullancsfaj fertőzött és fertőzésmentes egyede egyszerre táplálkozik ugyanazon az állaton (nem kell, hogy az állat a parazita iránt fogékony legyen), a táplál-

kozás útján átvihető egyik kullancsból a másikba a betegség (Földvári és mtsai. 2005).

### **3.3. Ismertető a betegségről, kezeléséről, megelőzéséről**

A kutya babesiosist Magyarországon Wetzl írta le először, 1905-ben. A nálunk „honos” faj a *B. canis*, vektora a *Dermacentor reticulatus* (Földvári G. és mtsai. 2005). A nagy *Babesia* fertőzések mellett 2004-ben kis *Babesia* fertőzést mutattak ki Farkas és mtsi. két magyar kutyában.

A fertőzés fejlődésében és megjelenésében több tényező játszik szerepet, úgy mint a kullancs vektor sűrűsége, a fertőzött kullancsok aránya és az érintett *Babesia* faj (V. Matijako és mtsai. 2011).

#### **3.3.1. Babesiosis**

A kutya szervezetébe (véráramába) a kullancs vérszívása során jut a parazita. A *Babesia* a vörösvértesteket támadja meg, azokban kezd szaporodni. A fertőzött vörösvértestek vagy maguktól szétesnek, vagy az immunrendszer idegen anyagként ismeri fel és elpusztítja őket. Gyakran előfordul, hogy az állat immunrendszere elkezd pusztítani az egészséges vörösvértesteket is, ezt nevezik immunmediált hemolitikus anémiának (IMHA). A kiszabaduló vérfesték (hemoglobin) a vesén át a vizeletbe jut, annak vörösesbarna színt adva (Brooks, W. C. 2012).

A kutya babesiosist általában két osztályba sorolják, szövődménymentes és komplikált formáját különböztetik meg.

A szövődménymentes babesia a hemolízisből eredő anémia következménye, míg a komplikált kutya babesiosis a szisztémás gyulladási válasz szindróma (SIRS) és a több szervi elégtelenség szindróma (MODS) kifejlődésének következménye, melyek közül mindkettő citokin-mediált jelenség. Az elmúlt évek növekvő számú kutatásai azt támasztják alá, hogy ugyanaz a mechanizmus vezethet különböző klinikai tünetekhez (V. Matijako és mtsai. 2011).

Európában magasabb a halálozási ráta azokban az országokban, ahonnan olyan komplikációkat jelentettek, mint: MODS, agyi babesiosis, sokk, rhabdomyolízis (izomzat sorvadása), akut veseelégtelenség (ARF), akut légzési distressz szindróma



(ARDS), akut májelégtelenség, és akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP). A legmagasabb halálozási rátát Magyarországon jegyezték, ahol az esetek 16%-ában jelentek MODS-t, 24%-ban májbetegséget, 6%-ban AP-t, 30%-ban ARF-t, 17%-ban disszeminált intravaszkuláris koagulációt (DIC), 8%-ban immun-mediált hemolitikus anémiát (IMHA), 6%-ban ARDS-t, 3%-ban agyi babesiosist (V. Matijako és mtsai. 2011).

### **3.3.2. Tünetek**

A kutya babesiosis klinikai megnyilvánulása változatos, mely az átmeneti sovány-ságtól komplex szindrómáig terjedhet, ami több szervrendszert érint.

A tulajdonos általában akkor viszi állatorvoshoz a kutyáját, ha az a következő tünetek valamelyikét mutatja: étvágytalanság, kedvetlenség, fáradékonyság, láz, sötét vizelet. Ezek a tünetek – a sötét vizelettől eltekintve – elég általánosnak mondhatók, az állatorvos azonban „kullancsos” időszakban elsősorban a babesiosist zárja ki helyben történő és labor vizsgálatok segítségével. Babesiosis esetében előfordul, hogy az állatnak még nem sötét a vizelete, de mintavételt követően tesztsíkkal legtöbbször már kimutatható a vér jelenléte.

Az állat nyálkahártyái sápadtak, gyakran ízületi fájdalmai vannak, ezért nem szívesen mozog, lázas. Ultrahangos vizsgálattal meg lehet állapítani, hogy mekkora a kutya lépe. Ha az az adott fajta normál lépméreténél nagyobb (hyperplasiás lép), babesiosisra utalhat. Ritkán idegrendszeri tünetek is mutatkoznak (<http://kullancsok.parazitak.hu/?Protozoonok&pid=22>).

Amennyiben normál színű a vizelet és tesztsík sem mutat ki vért benne, illetve nem látjuk elváltozottnak a lépét, de a kutya levert, láza van, mindenképpen indokolt a vérvétel. A sötétbarna vizelet, megnagyobbodott lép és a sárgaság együttesen egyértelmű tünetek. A vérvétel azonban ebben az esetben is indokolt, részben azért, hogy kiderüljön, mennyire károsodott az állat veséje.

### **3.3.3. Kezelés**

A *Babesia canis* ellenszere az imidokarb dipropionát injekció (Imizol, Schering-Plough, 0,25-0,5ml/10ttkg). Szubkután vagy intramuszkulárisan adható az állatnak, igen fájdalmas, irritatív. A gyártó 14 napos időközzel ismételt kezelést

ajánl. Az injekció beadása után átmenetileg nyálzás, hányás előfordulhat. Kiegészítő kezelésként infúziós terápia a protokoll, diuretikummal (vízhajtó) kiegészítve (Dr. Máthé Á., A kutyák babesiosis, egyetemi jegyzet).

A fent említett általános kezelés komplikációmentes babesiosisra vonatkozik, komplikációk esetén adott helyzetekben más és más az eljárás.

### **3.3.4. Megelőzés**

A gazdák a kullancsfertőzöttséget általában csak akkor veszik észre, amikor a kullancs (azon belül is főleg a nőstény) már megszívta magát, így többszörösére nő. Ekkor viszont a kórokozót már szinte biztos, hogy beoltotta a gazdába. Ezért fontos a kullancs megkapaszkodásának megelőzése, illetve a már megkapaszkodott kullancstól való mielőbbi megszabadulás. Az állatorvosi gyakorlatban alkalmazott cseppentős készítmények, nyakörvek ezt a célt szolgálják.

A teljesség igénye nélkül, néhány alkalmazott szer hatásmechanizmusát az alábbiakban ismertetem.

Certifect spot on: hatóanyagai a fipronil és az amitráz. Az amitráz a kullancs oktopaminreceptorain gyors neurotoxikus hatást vált ki, aminek következtében a kullancs rendellenes motilitást mutat. A fipronil a GABA receptorokat és a glutamátvezérelte csatornákat gátolja, a kullancsok idegsejtjeit ingerli, azokat elpusztítja. Az amitráz növeli a kullancs érzékenységét a fipronil iránt. (Prullage és mtsai. 2011) Certifecttel kezelt kutyákról 12 órával a kezelés után a kullancsok 80%-a, 24 órával a kezelés után a kullancsok 90%-a lehullott (Prullage és mtsai. 2011).

Advantix spot on: hatóanyagai az imidaklopid és a permetrin. Az imidaklopid a kullancs posztszinaptikus neuronjainak nikotinerger receptoraihoz kötődik. Ez először aktiválja, majd blokkolja a posztszinaptikus receptort, ami felfokozott idegrendszeri működéshez, végül a rovar halálához vezet (Krämer és Mencke, 2001). A permetrin megakadályozza a nátrium csatornák inaktiválását. Repellenes (vérszívásgátló) és kullancsölő hatása is van (Blagburn BL, 2003). Az imidaklopid és a permetrin egymás hatását fokozzák (Methfessel C és Turber, 2003).

Foresto nyakörv: hatóanyagai az imidaklopid (ld. Advantix spot on) és a flumethrin. A flumethrin az idegszövet feszültségfüggő nátrium-csatornáin keresztül hat, úgy, hogy a csatornák a fiziológiailag normálisnál tovább lesznek nyitva, így

megnő a nátriumion-beáramlás időtartama. Csak stimulált szövetben figyelhető meg a hatás, azonban egyszeri stimuláció is kiváltja a hosszabb-rövidebb idegi impulzus kitöréseket amelyek végül a (gerinctelen) szervezet pusztulását okozzák (D. Stanneck 2012).

### 3.4. Előfordulási arány más betegségekhez képest

Ez a kimutatás alátámaszthatja azt, hogy az állatorvosi gyakorlatban jó eséllyel a Babesia az egyik leggyakrabban kimutatott kórokozó. A táblázat a teljesség igénye nélkül készült, nem tartalmazza a mikrobiológiai laborban bélsárból, bőrkaparekból, fülváladékból, stb. kimutatható gombás, bakteriális megbetegedéseket.

| Kórokozó                        | DNS/RNS        | Minta típusa | Laborkérések száma a rendelőben | Pozitív |
|---------------------------------|----------------|--------------|---------------------------------|---------|
| Babesia sp.                     | DNS            | EV           | 44                              | 12      |
| Borrelia Burgdorferi sensu lato | DNS            | V            | 13                              | 0       |
| Coronavirus macska / FIP        | RNS            | V            | 7                               | 5       |
| Ehrlichia canis                 | DNS            | EV           | 4                               | 0       |
| Macska herpes vírus 1           | DNS            | T            | 2                               | 0       |
| FeLV                            | Progenome- DNS | EV           | 16                              | 5       |
| FIV                             | Progenome- DNS | EV           | 14                              | 1       |
| Leishmania spp.                 | DNS            | V            | 3                               | 0       |
| Leptospira spp.                 | DNS            | V            | 2                               | 0       |
| Kutya parvovírus                | DNS            | T, Bs        | 5                               | 2       |
| Szopornyica vírus               | RNS            | RNS          | 16                              | 9       |

1. táblázat. Babesia kimutatása más kórokozókhoz képest a FeliCaVet Állatkórházban 2010.október 1. és 2011. szeptember 30. között. (EV: EDTA-s csőbe vett vér, V: vizelet, T: tampon, Bs: bélsár)

### 3.5. Babesiás kutyákra vonatkozó éves rendelői statisztika bemutatása

Az alábbi táblázat a FeliCaVet Állatkórház azon pácienseinek az adatait tartalmazza, akik 2010. október 1. és 2011. szeptember 30. között babesiosisra jellemző tünetekkel kerültek a rendelőbe. Az adatokat a rendelőben használt Doki for Vets programból szedtem ki, rákeresve, hogy ezen időtartam alatt hány beteg esetében szerepel a kórlapon a babesiosis diagnózisként vagy differenciál diagnózisként.

Mivel előfordulhat, hogy nem minden alkalommal történik meg a kórlapok maradéktalan kitöltése, ezért az itt szereplő adatok a valós számoknak az alsó korlátai. Az itt jelzett egy éves időtartam alatt tehát legalább 45 állat mutatott a Babesia fertőzés tüneteire hasonló tüneteket, melyek közül 20 esetben be is bizonyosodott a babesiosis (12 kan és 8 szuka), 5 kutya gazdája pedig nem kérte a vérvizsgálatot.

A 22-es és 23-as sorszámmal ellátott állatokat egy menhelyről, egy napon, ugyanazokkal a tünetekkel (bágyadtság, láz, étvágytalanság) hozták be a rendelőbe, mindkettőben több kullancs is volt. A mikroszkópos vizsgálattal végzett labor-elemzés eredménye alapján azonban csak az egyikük volt babesiás. Lehetséges, hogy PCR vizsgálattal a másik kutyából is ki lehetett volna mutatni a kórokozót.

A 8-as számú páciens érdekessége, hogy a labor (szintén mikroszkópos vizsgálattal) B. gibsoni fertőzést mutatott ki az állat véréből.

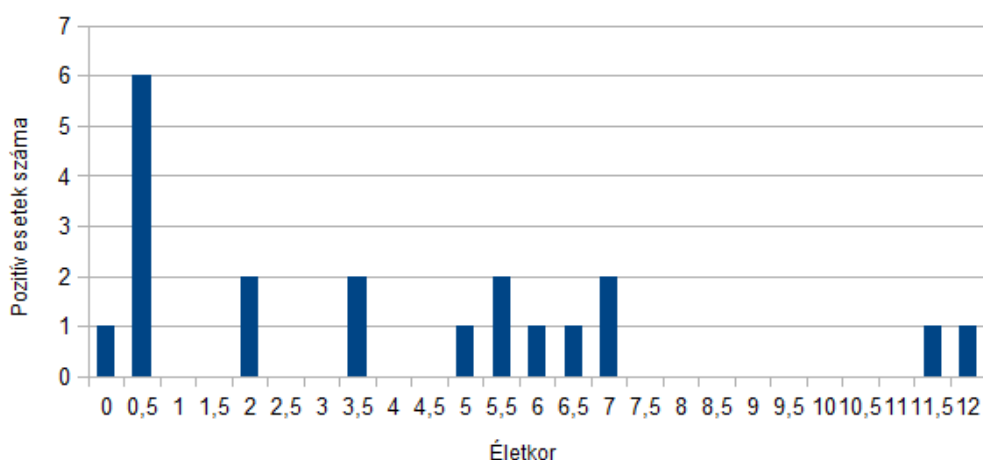
| Sorszám | Dátum                | Ivar         | Kor (év)        | Laboreredmény (Babesia) |
|---------|----------------------|--------------|-----------------|-------------------------|
| 1       | 2011. 10. 01.        | kan          | 6               | ?                       |
| 2       | <b>2011. 10. 02.</b> | <b>kan</b>   | <b>3,5</b>      | <b>+</b>                |
| 3       | <b>2011. 10. 08.</b> | <b>kan</b>   | <b>6,5</b>      | <b>+</b>                |
| 4       | <b>2011. 10. 09.</b> | <b>kan</b>   | <b>7</b>        | <b>+</b>                |
| 5       | 2011. 10. 17.        | szuka        | 0,5             | -                       |
| 6       | <b>2011. 10. 24.</b> | <b>szuka</b> | <b>0,5</b>      | <b>+</b>                |
| 7       | <b>2011. 10. 26.</b> | <b>szuka</b> | <b>11,5</b>     | <b>+</b>                |
| 8       | <b>2011. 11. 06.</b> | <b>szuka</b> | <b>0 (2 hó)</b> | <b>+</b>                |
| 9       | <b>2011. 11. 14.</b> | <b>kan</b>   | <b>3,5</b>      | <b>+</b>                |
| 10      | 2011. 11. 20.        | kan          | 3               | -                       |
| 11      | 2011. 11. 24.        | kan          | 2               | ?                       |
| 12      | <b>2011. 12. 14.</b> | <b>kan</b>   | <b>6</b>        | <b>+</b>                |
| 13      | <b>2011. 12. 15.</b> | <b>kan</b>   | <b>7</b>        | <b>+</b>                |
| 14      | <b>2011. 12. 19.</b> | <b>kan</b>   | <b>5</b>        | <b>+</b>                |
| 15      | 2012. 01. 24.        | szuka        | 10              | -                       |
| 16      | 2012. 02. 26.        | kan          | 0,5             | -                       |
| 17      | <b>2012. 03. 13.</b> | <b>szuka</b> | <b>5,5</b>      | <b>+</b>                |
| 18      | <b>2012. 03. 22.</b> | <b>szuka</b> | <b>0,5</b>      | <b>+</b>                |
| 19      | 2012. 03. 23.        | szuka        | 14              | -                       |
| 20      | 2012. 03. 24.        | szuka        | 5               | ?                       |
| 21      | 2012. 03. 30.        | szuka        | 1,5             | ?                       |
| 22      | <b>2012. 03. 31.</b> | <b>kan</b>   | <b>0,5</b>      | <b>+</b>                |
| 23      | 2012. 03. 31.        | szuka        | 0,5             | -                       |
| 24      | <b>2012. 04. 03.</b> | <b>szuka</b> | <b>2</b>        | <b>+</b>                |
| 25      | <b>2012. 04. 03.</b> | <b>kan</b>   | <b>2</b>        | <b>+</b>                |

| Sorszám   | Dátum                | Ivar         | Kor (év)   | Laboreredmény (Babesia) |
|-----------|----------------------|--------------|------------|-------------------------|
| <b>26</b> | <b>2012. 04. 03.</b> | <b>szuka</b> | <b>5,5</b> | <b>+</b>                |
| 27        | 2012. 04. 14.        | kan          | 12,5       | -                       |
| 28        | 2012. 04. 18.        | kan          | 13         | -                       |
| <b>29</b> | <b>2012. 04. 22.</b> | <b>kan</b>   | <b>0,5</b> | <b>+</b>                |
| <b>30</b> | <b>2012. 04. 24.</b> | <b>kan</b>   | <b>0,5</b> | <b>+</b>                |
| <b>31</b> | <b>2012. 04. 30.</b> | <b>szuka</b> | <b>0,5</b> | <b>+</b>                |
| 32        | 2012. 05. 01.        | szuka        | 3          | -                       |
| <b>33</b> | <b>2012. 05. 18.</b> | <b>kan</b>   | <b>12</b>  | <b>+</b>                |
| 34        | 2012. 05. 25.        | szuka        | 2,5        | -                       |
| 35        | 2012. 05. 29.        | szuka        | 12,5       | -                       |
| 36        | 2012. 05. 29.        | kan          | 1          | -                       |
| 37        | 2012. 06. 08.        | szuka        | 9          | -                       |
| 38        | 2012. 06. 12.        | szuka        | 0,5        | -                       |
| 39        | 2012. 06. 14.        | kan          | 9          | -                       |
| 40        | 2012. 06. 14.        | kan          | 11,5       | -                       |
| 41        | 2012. 06. 17.        | szuka        | 0,5        | ?                       |
| 42        | 2012. 06. 25.        | kan          | 4,5        | -                       |
| 43        | 2012. 07. 18.        | szuka        | 3          | -                       |
| 44        | 2012. 08. 06.        | szuka        | 6          | -                       |
| 45        | 2012. 08. 27.        | kan          | 10         | -                       |

2. táblázat. Babesia-gyanús esetek a FeliCaVet Állatkórházban 2011. 10. 01. és 2012. 09. 30. között

A 6. ábrán lévő diagram a kimutatott babesiás esetek életkori eloszlását ábrázolja. A relatív alacsony esetszám és egyéb viszonyítási adatok hiányában ebből sajnos nem vonhatunk le messzemenő következtetéseket a babesiosis életkori vonatkozásait illetően.

A pozitív esetek számának eloszlása életkor szerint



6. Ábra

### 3.6. Elterjedettség monitorozása

Európában a kutya babesiosis elsődleges okozója a *Babesia canis*. Klinikai eseteket a következő országokból jelentettek: Ausztria, Horvátország, Franciaország, Németország, Magyarország, Olaszország, Hollandia, Lengyelország, Portugália, Szlovénia, Spanyolország, Svájc, Norvégia (V. Matijako és mtsai. 2011).

Feider szerint Magyarország nem tartozik a *D. reticulatus* természetes élőhelyei közé. Korábban a faj populációi Magyarországon mindössze néhány, jól körülhatárolható területen fordultak elő. Az utóbbi években ugrásszerűen nőtt a babesiosisos esetek száma és új területeken is megjelent (G. Földvári és mtsai. 2005).

Az 1960-as években Magyarországon csak Fertőd, Sopron és Tolna környékén tudtak előfordulásukról. Janich 1986-os cikke szerint már a Balaton déli partvidékén, a Mohácsi-szigeten, A Duna alföldi szakaszának partvidékén és a Velencei-tó déli partján is megtalálható volt a *Dermacentor reticulatus* (*D. pictus*).

Farkas R. és Földvári G. egy 2001-es cikkükben a kutyák és macskák kullancsoságának hazai vizsgálatával foglalkoztak. Budapest, Szolnok, Miskolc, Pécs, Veszprém és Zalaegerszeg állatorvosi rendelőiben kezelt állatokról gyűjtötték a

kullancsokat. Összesen 184 kullancsot gyűjtöttek 100 kutyáról és 9 macskáról. Legnagyobb arányban (58%) az *Ixodes ricinus* fordult elő, öt követte 38%-os előfordulással a *Dermacentor reticulatus*. Ez utóbbi fajt hordozó kutyákat a következő településeken tartották vagy sétáltatták: Budapest (Szilas-patak, Pesterzsébet, Pestszentlőrinc), Gödöllő, Vác, Fót, Tata, Veszprém, Szolnok, Zalaegerszeg, Miskolc, Cserkeszőllő, Pécs.

G. Földvári és R. Farkas egy 2005-ös tanulmányukban is foglalkoztak a témával. Ekkor kutyákról és dragging (törülközős) módszerrel terepről gyűjtöttek kullancsokat az ország 13 megyéjéből és Budapest 16 kerületében. 577 kutyáról összesen 1777 kullancsot gyűjtöttek. Leggyakrabban az *I. ricinus* fordult elő (52,4%) szintén, utána következett a *D. reticulatus*, immár 42,5%-kal. Dragging módszerrel 16 terepről összesen 172 kullancsot sikerült gyűjteni, a *D. reticulatus* itt is a második leggyakoribb faj volt (46,3%). Kutatásuk alapján megállapították, hogy a *D. reticulatus* földrajzi előfordulása nagyobb, mint korábban ismert volt. Az addig leírt élőhelyeken túl a Dunántúl további területein, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Csongrád és Pest megyében, illetve Budapest további kerületeiben találták meg a faj példányait. Nógrád, Heves és Békés megyékben nem végeztek gyűjtést, Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar és Jász-Nagykun-Szolnok megyékben a gyűjtött kullancsok között nem fordult elő a *D. reticulatus*. Nógrád és Jász-Nagykun-Szolnok kivételével a többi megye helyi állatorvosai szerint már többször került megállapításra *Babesia canis* okozta fertőzés olyan állatok esetében, amelyek nem hagyták el soha a megyehatárt (G. Földvári és mtsai. 2005).

### **3.7. Kórokozók kimutatása az állatorvosi gyakorlatban**

Az itt bemutatott táblázat a kutyák és macskák néhány fertőző, illetve kullancsok, szúnyogok által terjesztett betegségeit, azok előfordulási gyakoriságát, az állatorvosi gyakorlat legjellemzőbb laborban történő kimutatási módját tartalmazza.

A *Babesia* fajokat a gyakorlatban leginkább mikroszkópos módszerrel mutatják ki vérből, viszonylag megbízható és olcsó módszer. A vizsgált időszakban két ellenanyag-titer típusú vizsgálat történt az állatok véréből. 44 *Babesia*-gyanús esetből 12-nél igazolódott be a fertőzés.

A Lyme-kór terjesztője a Borrelia Burgdorferi sensu lato baktérium, mely szintén kullancs vektor által terjed, vektora az I. ricinus. Kimutatása vérből, ellenanyag titer méréssel történik. A táblázatból látható, hogy a babesiosishoz képest gyanú is ritkábban merül fel a betegségre vonatkozóan, és a vizsgált időszakban egyszer sem sikerült kimutatni a kórokozót.

Az Ehrlichia canis az ehrlichiosis (vérzéses kullancsláz) okozója kutyákban. Kullancs vektora a Rhipicephalus sanguineus. Kimutatása vérből, ellenanyag titer vagy PCR vizsgálattal történik, nálunk (valószínűleg a kullancs vektor ritka előfordulása miatt is) kevésbé gyakori, a vizsgált időszakban egyszer sem volt pozitív eredménye a labornak.

A leishmaniózist egy egysejtű kórokozó, a Leishmania infantum idézi elő, vektora a lepkeszúnyog (Phlebotomus perniciosus). Nagyon súlyos, többnyire az állat elhullásával végződő betegség. Kimutatása az állatorvosi gyakorlatban vérből, PCR módszerrel vagy ellenanyag titer méréssel történik. Nálunk ritka, a vizsgált időszakban nem sikerült kimutatni.

(<http://www.scalibor.hu>)

A Leptospira spp. baktériumok a leptospirozist okozzák, az állat a vizeletével üríti, szájon át terjed, emberre is veszélyes. Tünetei hasonlóak a babesiosishoz. Kimutatása vérből PCR vagy ellenanyag titer vizsgálattal történik. A kérdéses időszakban egy kutya esetében történt erre irányuló vizsgálat, a PCR módszer negatív eredményt hozott, az ellenanyag titer határértéket mutatott az állat vérében.

A kutya parvovírus súlyos bélrendszeri tüneteket okoz, bélsárral nagy mennyiségben ürül, szájon át fertőz. Kimutatása általában bélsárból történik PCR módszerrel.

A szopornyica vírus sok esetben súlyos, gyógyíthatatlan betegséget okoz, gyakran idegrendszeri tünetekkel, de a parvovírusnál kevésbé ellenálló. Kimutatása szinte kivétel nélkül vérből, PCR módszerrel történik.

(<http://www.homoktovisvet.hu/kutyafertozo.html>)

A macska coronavírus a macskák fertőző vírusos hashártyagyulladásának (FIP) okozója. Bélsárral ürül, a fertőződés orron, szájon át következik be. Kimutatása vérből, ellenanyag titer méréssel történik. A vizsgált 7 esetből 5 hozott pozitív eredményt.



Fertőző léggyulladását okoz a macska herpes vírus. Orrváladékkal ürül, Belégzéssel, érintés útján terjed. Kimutatása orrváladék mintából PCR és vírusneutralizációs módszerrel történik.

A macska leucosis vírus (FeLV) leukóziót okoz, nyállal történik a fertőződés, tartós, közvetlen érintkezés során. Kimutatása vérből, ellenanyag titer méréssel történik. 16 laborkérésből 5 hozott pozitív eredményt.

A macska immundeficiencia vírus (FIV) a macskák AIDS-szerű megbetegedését idézi elő, főként vérrel és nyállal terjed. Kimutatása szintén vérből, ellenanyag titer méréssel történik, a vizsgált 14 minta közül 1 lett pozitív.

(<http://www.homoktovisvet.hu/macskafertozo-1.html>)

A macskák esetében a koronavírusra, a leucosis vírusra és az immundeficiencia vírusra vonatkozó adatok aszerint értelmezendők, hogy erre a három kórokozóra gyakran végeznek szűrés jellegű vizsgálatokat, tehát nem biztos, hogy a vizsgált mintát adó macska betegségre utaló tüneteket mutatott.

### Babesia sp.

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | +        | 2010. 10. 04.     | mikroszkóp       |
| 2           | -        | 2010. 10. 22.     | mikroszkóp       |
| 3           | +        | 2010. 10. 24.     | mikroszkóp       |
| 4           | +        | 2010. 10. 24.     | mikroszkóp       |
| 5           | -        | 2010. 11. 10.     | mikroszkóp       |
| 6           | -        | 2010. 11. 13.     | mikroszkóp       |
| 7           | -        | 2011. 01. 11.     | mikroszkóp       |
| 8           | -        | 2011. 02. 11.     | mikroszkóp       |
| 9           | -        | 2011. 02. 25.     | mikroszkóp       |
| 10          | +        | 2011. 03. 22.     | mikroszkóp       |
| 11          | +        | 2011. 03. 29.     | mikroszkóp       |
| 12          | -        | 2011. 03. 31.     | mikroszkóp       |
| 13          | -        | 2011. 03. 31.     | mikroszkóp       |
| 14          | +        | 2011. 04. 01.     | mikroszkóp       |
| 15          | -        | 2011. 04. 03.     | mikroszkóp       |
| 16          | -        | 2011. 04. 05.     | mikroszkóp       |
| 17          | +        | 2011. 04. 06.     | mikroszkóp       |
| 18          | -        | 2011. 04. 08.     | mikroszkóp       |
| 19          | -        | 2011. 04. 08.     | mikroszkóp       |
| 20          | -        | 2011. 04. 09.     | mikroszkóp       |
| 21          | -        | 2011. 04. 10.     | mikroszkóp       |
| 22          | -        | 2011. 04. 20.     | mikroszkóp       |
| 23          | +        | 2011. 04. 28.     | mikroszkóp       |
| 24          | +        | 2011. 05. 04.     | mikroszkóp       |
| 25          | -        | 2011. 05. 07.     | mikroszkóp       |
| 26          | -        | 2011. 05. 16.     | mikroszkóp       |
| 27          | -        | 2011. 05. 28.     | mikroszkóp       |
| 28          | -        | 2011. 05. 30.     | mikroszkóp       |
| 29          | -        | 2011. 06. 01.     | mikroszkóp       |
| 30          | -        | 2011. 06. 09.     | mikroszkóp       |
| 31          | -        | 2011. 06. 13.     | mikroszkóp       |
| 32          | -        | 2011. 07. 02.     | mikroszkóp       |
| 33          | -        | 2011. 07. 28.     | EA/IFT           |
| 34          | -        | 2011. 08. 11.     | mikroszkóp       |
| 35          | -        | 2011. 08. 12.     | mikroszkóp       |
| 36          | -        | 2011. 08. 31.     | mikroszkóp       |
| 37          | -        | 2011. 09. 12.     | mikroszkóp       |
| 38          | -        | 2011. 09. 12.     | mikroszkóp       |
| 39          | -        | 2011. 09. 14.     | mikroszkóp       |
| 40          | +        | 2011. 09. 14.     | mikroszkóp       |
| 41          | -        | 2011. 09. 14.     | EA/IFT           |
| 42          | +        | 2011. 09. 20.     | mikroszkóp       |

|    |   |               |            |
|----|---|---------------|------------|
| 43 | - | 2011. 09. 22. | mikroszkóp |
| 44 | + | 2011. 09. 28. | mikroszkóp |

### Borrelia Burgdorferi sensu lato

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa    |
|-------------|----------|-------------------|---------------------|
| 1           | -        | 2010. 11. 16.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 2           | -        | 2010. 12. 13.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 3           | -        | 2011. 01. 16.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 4           | -        | 2011. 03. 18.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 5           | -        | 2011. 07. 05.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 6           | -        | 2011. 07. 31.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 7           | -        | 2011. 08. 01.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 8           | -        | 2011. 08. 04.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 9           | -        | 2011. 08. 21.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 10          | -        | 2011. 08. 29.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 11          | -        | 2011. 09. 01.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 12          | -        | 2011. 09. 08.     | C6 ELISA kvalitatív |
| 13          | -        | 2011. 09. 15.     | IgG ELISA           |

### Coronavirus macska / FIP

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | +        | 2010. 10. 02.     | EA/IFT           |
| 2           | +        | 2010. 10. 02.     | EA/IFT           |
| 3           | +        | 2010. 10. 02.     | EA/IFT           |
| 4           | -        | 2010. 11. 15.     | EA/IFT           |
| 5           | +        | 2011. 05. 02.     | EA/IFT           |
| 6           | +        | 2011. 05. 03.     | EA/IFT           |
| 7           | -        | 2011. 09. 13.     | EA/IFT           |

### Ehrlichia canis

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | -        | 2011. 05. 02.     | PCR              |
| 2           | -        | 2011. 05. 09.     | PCR              |
| 3           | -        | 2011. 07. 28.     | ellenanyagtiter  |
| 4           | -        | 2011. 09. 14.     | ellenanyagtiter  |

### Macska herpes vírus

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | -        | 2011. 05. 18.     | PCR és VN        |

### FeLV

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | -        | 2010. 10. 02.     | ELISA/IFT        |
| 2           | -        | 2010. 10. 02.     | ELISA/IFT        |
| 3           | -        | 2010. 10. 02.     | ELISA/IFT        |
| 4           | +        | 2010. 10. 21.     | ELISA/IFT        |
| 5           | +        | 2010. 10. 21.     | ELISA/IFT        |

|    |   |               |           |
|----|---|---------------|-----------|
| 6  | - | 2010. 11. 15. | ELISA/IFT |
| 7  | + | 2010. 11. 21. | ELISA/IFT |
| 8  | + | 2010. 12. 08. | ELISA     |
| 9  | - | 2011. 02. 01. | ELISA/IFT |
| 10 | - | 2011. 02. 08. | ELISA/IFT |
| 11 | - | 2011. 02. 10. | ELISA/IFT |
| 12 | - | 2011. 04. 05. | ELISA     |
| 13 | - | 2011. 05. 02. | ELISA/IFT |
| 14 | + | 2011. 05. 02. | ELISA/IFT |
| 15 | - | 2011. 08. 04. | ELISA     |
| 16 | - | 2011. 09. 13. | screening |

### FIV

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | -        | 2010. 10. 02.     | ELISA/IFT        |
| 2           | -        | 2010. 10. 02.     | ELISA/IFT        |
| 3           | -        | 2010. 10. 02.     | ELISA/IFT        |
| 4           | -        | 2010. 10. 21.     | ELISA/IFT        |
| 5           | -        | 2010. 10. 21.     | ELISA/IFT        |
| 6           | +        | 2010. 11. 15.     | ELISA/IFT        |
| 7           | -        | 2010. 11. 21.     | ELISA/IFT        |
| 8           | -        | 2010. 12. 08.     | ELISA            |
| 9           | -        | 2011. 02. 01.     | ELISA/IFT        |
| 10          | -        | 2011. 02. 08.     | ELISA/IFT        |
| 11          | -        | 2011. 02. 10.     | ELISA/IFT        |
| 12          | -        | 2011. 05. 02.     | ELISA/IFT        |
| 13          | -        | 2011. 05. 02.     | ELISA/IFT        |
| 14          | -        | 2011. 09. 13.     | screening        |

### Leishmania spp.

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | -        | 2011. 04. 21.     | PCR              |
| 2           | -        | 2011. 05. 08.     | PCR              |
| 3           | -        | 2011. 07. 28.     | EA/IFT           |

### Leptospira spp.

| Minta száma | Eredmény   | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|------------|-------------------|------------------|
| 1           | -          | 2011. 04. 19.     | PCR              |
|             | határérték |                   | EA-titer MAT     |

### Kutya parvovírus

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | -        | 2011. 10. 19.     | ELISA            |
| 2           | -        | 2010. 11. 27.     | ELISA            |
| 3           | +        | 2010. 12. 15.     | PCR              |
| 4           | -        | 2011. 04. 06.     | PCR              |
| 5           | +        | 2011. 06. 14.     | ELISA            |

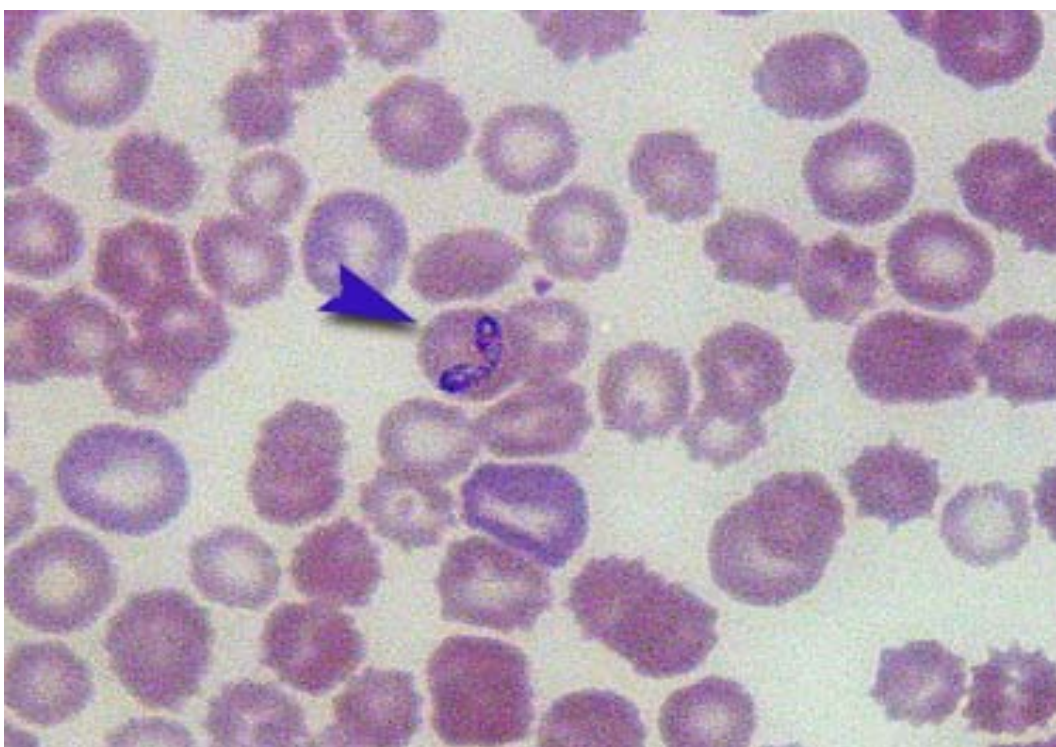
### Szopornyica vírus

| Minta száma | Eredmény | Mintavétel dátuma | Vizsgálat típusa |
|-------------|----------|-------------------|------------------|
| 1           | +        | 2010. 10. 09.     | PCR              |
| 2           | +        | 2010. 10. 15.     | PCR              |
| 3           | +        | 2010. 10. 31.     | PCR              |
| 4           | +        | 2010. 11. 07.     | PCR              |
| 5           | +        | 2010. 11. 27.     | PCR              |
| 6           | +        | 2010. 12. 15.     | PCR              |
| 7           | +        | 2011. 01. 24.     | PCR              |
| 8           | -        | 2011. 01. 26.     | PCR              |
| 9           | -        | 2011. 02. 04.     | PCR              |
| 10          | -        | 2011. 02. 07.     | PCR              |
| 11          | -        | 2011. 02. 27.     | PCR              |
| 12          | -        | 2011. 04. 18.     | PCR              |
| 13          | +        | 2011. 07. 26.     | PCR              |
| 14          | +        | 2011. 08. 30.     | PCR              |
| 15          | -        | 2011. 08. 30.     | PCR              |
| 16          | -        | 2011. 09. 22.     | PCR              |

3. táblázat. Egyes kórokozók kimutatása a FeliCaVet állatkórházban 2010.október 1. és 2011. szeptember 30. között

### 3.8. A babesiosis kimutatása az állatorvosi gyakorlatban

Az állatorvosi gyakorlatban a babesiosis kimutatása alapesetben nem PCR módszerrel történik, mert bár nagyon pontos, megbízható módszer, sajnos meglehetősen drága. A kutyából levett vért laborba küldik, ahol a vérkenetet megfestve Giemsa festéssel, szépen kirajzolódnak a vörösvérsejtek belsejében „ülő” kórokozók. A módszer hátránya, hogy nehézkes meghatározni a konkrét fajt.



7. Ábra: Babesia canis kimutatása vérkenetből Giemsa festéssel

(G. Földvári: Studies of ticks (Acari: Ixodidae) and tick-borne pathogens of dogs in Hungary, 2005)

A mikroszkópos vizsgálaton túl a vért általában megvizsgálják több paraméterre is, mert a vérkép a kutya állapotáról (veseparaméterek, májparaméterek), gyógyulási esélyeiről, az alkalmazott kezelés hatékonyságáról sok mindent elárul.

Jellemző elváltozások vérvizsgálat során:

Anémia – általában regeneratív

Trombocitopénia – az egyik legjellemzőbb elváltozás a vérképben

Leukopénia vagy leukocitózis – mindkettő előfordulhat

Azotémia, hypoalbuminémia, hypoglikémia

(Linda Shell, DVM, DACVIM, <http://www.vin.com>)

A kutya babesiosis ellenanyag termelést vált ki a szervezetből, így ellenanyag titer méréssel is igazolható a betegség, az állatorvosi gyakorlatban azonban mégis ritkán alkalmazzák, talán azért, mert az ellenanyag a gyógyulás után még sokáig nem ürül ki a szervezetből (Kovács K. D. 2011).

### **3.9. Miért molekuláris biológia / PCR?**

A molekuláris biológia módszereivel a kórokozó DNS-ének egy szakaszát azonosíthatjuk be, aminél pontosabb eljárást jelenleg nem ismerünk. A vérkenet elbírálásával ellentétben egy objektív módszerről van szó. Bár az állatorvosi gyakorlatban nem jellemző a használata, több esetben is indokolt lenne.

Az egyik ilyen, ha például az állat klinikai tünetei alapján az állatorvos babesiosisra gyanakszik, de a mikroszkópos vizsgálat nem igazolja ezt a feltételezést. A Fel-iCaVet állatkórházban például volt olyan eset, amikor a kutya tünetei egyértelműek voltak, de csak a harmadik mikroszkópos vérvizsgálat igazolta az eredeti differenciál diagnózist.

Előfordulhat, hogy az alkalmazott kezelés nem hoz eredményt, vagy felépülés után esetleg visszaesés következik be. Ilyenkor mindenképpen indokolt lehet a PCR vizsgálat az eredeti diagnózis megerősítése vagy éppen megcáfolása végett.

Pár éve vannak arra utaló vizsgálatok, hogy a Babesia kezelés után nem tűnik el teljesen a szervezetből, az állat tünetmentesen él vele együtt. Sőt, olyan állat véréből is mutattak ki Babesiát PCR módszerrel, akit azelőtt soha nem kezeltek kutya babesiosissal (R. Welc-Faleciak és mtsai. 2009). Mivel vértranszfúzióval az egyik állatból a másikba átvihető a betegség, a teljes bizonyosság végett érdemes a donor állatok vérént ellenőrizni PCR módszerrel, hogy biztosan nem hordozói-e a betegségnek. Annak a kutyának, akinek vértranszfúzióra van szüksége, az átvitt Babesia-fertőzés akár végzetes is lehet.

### **3.10. Babesia kimutatása molekuláris biológiai eszközökkel**

Magyarországon először 2004-ben mutattak ki *Babesia canis* PCR módszerrel. 44 kutyából gyűjtöttek mintát, akik a babesiosis tüneteit mutatták. A mintagyűjtés 2002 és 2004 között zajlott, az ország több állatorvosi rendelőjében. Az állatorvosok vérkenetet készítettek mindegyik kutya véréből, illetve egy-egy EDTA-s csőbe vért vettek tőlük. A keneteket metanollal fixálva Giemsa festéssel festették, az EDTA-s csöveket szállításig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták. A specifikus PCR reakcióhoz PIRO-A-1 és PIRO-B primereket használtak, melyek a kórokozó 18S rRNS génjének egy kb. 450 bázispár hosszú szakaszát erősítik fel. Polimeráz enzimként a Taq polimerázt használták. 1,5%-os agaróz gélen futtatták a mintákat. Öt véletlenszerűen választott PCR terméket szekvenáltak, az eredményt a GenBankból elérhető adatokkal vetették össze. 17 állat esetében nem volt, vagy nem volt értékelhető kenet minta. A többi kenetből mikroszkópos módszerrel *Babesia canis* mutattak ki. A 44-ből 5 kutya véréből a PCR módszer negatív eredményt hozott. Ezeknek az állatoknak nem volt értékelhető vérkenet mintájuk. A 39 pozitív mintából 5-öt szekvenáltak és a GenBank adataival összevetve nagyfokú (99,8 vagy 100%) hasonlóságot mutattak a Caccio és mtsai. (2002) által publikált *Babesia canis* 18s rDNS egy részének szekvenciájával. (G. Földvári és mtsai. 2004)

2004-ben jelent meg az első tudományos cikk, ami igazolta a *Babesia canis* és a *Babesia vogeli* jelenlétét Szlovéniában. 2000 és 2002 között 238, babesiosis tüneteit mutató állat véréét vizsgálták mikroszkópos és molekuláris biológiai (PCR és szekvencia analízis) módszerekkel. A DNS kivonást követően PIRO-A és PIRO-B primerekkel dolgoztak. Minden pozitív PCR terméket szekvenáltak. Az eredményt a Lasergene 5.0 szoftvercsomag SeqMan és EditSeq moduljaival analizálták. 14 kutya esetében kaptak pozitív eredményt, mikroszkópos és PCR módszerrel is a kórokozó jelenlétével kapcsolatban. A szekvencia analízis eredménye szerint 11 kutyánál találtak *B. canis*-t, 3 kutyánál pedig *B. vogeli*-t. A mikroszkópos módszer nem mutatott különbséget a két faj (az idézett cikkben még alfajokként vannak nyilvántartva) között. (D. Duh és mtsai. 2004)



Egy 2006-os szlovák tanulmányban *Dermacentor reticulatus* kullancsból mutattak ki *Babesia canis*. A kullancsokat 2002 októberében gyűjtötték „zászlós” módszerrel. A kullancsokat 70%-os etanolban mosták, homogenizálták. A kullancsokból való DNS kivonás hatékonyságát PCR módszerrel ellenőrizték, melyben a kullancs 16S rRNS génjét amplifikálták. A *Babesia* detektálására szintén a korábban említett PIRO-A1 és PIRO-B primereket használták. Szekvenálás után a kapott eredményeket a Lasargene 5.0 szoftverrel értékelték ki. Az összesen 113 gyűjtött kullancs közül 100 kullancsból történt sikeres DNS kivonás, közülük 5 esetben hozott a PCR módszer pozitív eredményt. A szekvenálás eredménye: 1 *Babesia canis*, 4 *Colpodella edax*. Azokban az esetekben, amikor a 18S rRNS gén konzeratív részeiből előállított primerekkel dolgozunk, érdemes a pontos eredmény érdekében szekvencia analízist végezni (D. Duh és mtsai. 2006).

### **3.11. Lehetséges kutatási alkalmazás**

Jelenleg körülbelül 100 *Babesia* fajt ismerünk és a mai napig fedeznek fel új fajokat (George D. Imes és mtsai. 2011). Ebben nagy szerepe van a PCR módszernek. A tapasztalat és több tanulmány is azt mutatja, hogy a *Babesia canis* egyre szélesebb körben terjed a kullancsok által. Időről időre érdemes lenne felmérni az ország aktuális fertőzöttségi állapotát. A *Dermacentor reticulatus* kullancsok területenkénti begyűjtésével, azok PCR vizsgálatával egyrészt az adott terület kullancs fertőzöttségét, másrészt a kullancsok *Babesiával* való fertőzöttségének mértékét is ki lehet mutatni.

A kis *Babesia* fajok közé tartozó *B. gibsoni* vektora a *Rhipicephalus sanguineus*. A kullancsfaj nálunk is megtalálható, a kórokozót azonban elsősorban a mediterrán térségben és Európán kívül terjeszti

(<http://kullancsok.parazitak.hu/?Protozoonok&pid=22>).

Emiatt hazánkban nem tulajdonítanak nagy jelentőséget neki, azonban 2004-ben megjelent egy tanulmány R. Farkas és mtsai. által, amiben kis *Babesiát* mutattak ki két magyar kutyából, akik azelőtt soha nem jártak külföldön. Ez önmagában indokolná, hogy babesiosis tüneteit mutató kutyák vérének már csak kutatási célból is

megvizsgálják, hogy melyik Babesia faj okozza a problémát. Ezen túl természetesen a *R. sanguineus* gyűjtésével magára a vektorra is irányulhatna a vizsgálat. Bizonyítást nyert, hogy a betegségből sikeresen felépülő állatok még hordozói lehetnek a fertőzésnek. Egy lengyel tanulmány 79 látszólag egészséges kutya vérének PCR módszerrel vizsgálva 20 állat esetében mutatott ki *Babesia canis*. Ezeknek az állatoknak az 1/3-a korábban átesett babesiosis fertőzésen, amiből sikeresen felépültek, 2/3-át azonban korábban soha nem kezelték babesiosissal (R. Welc-Faleciak és mtsai. 2009). Ennek fényében érdekes lenne követéses vizsgálatot végezni arra, hogy a betegségből való felgyógyulás után mennyi ideig mutatható ki a vérből a kórokozó. Egészséges, korábban babesiosissal nem kezelt állatok vérének is lehetne akár szűrőpróbaszerűen vizsgálni, kimutatást készíteni arról, hogy hány százalékukban van jelen mégis a *Babesia canis*.

## **4. MÓDSZEREK**

### **4.1. Adatgyűjtés menete az archívumból**

A dolgozatomban szereplő táblázataim adatait a FeliCaVet Állatkórház archívumából gyűjtöttem. A kórházban a betegekkel kapcsolatos történések adminisztrálására a Doki for Vets programot használjuk. A program segítségével rá lehet keresni egy adott időszakon belüli laborkérésekre, diagnózisokra.

A laborvizsgálatok eredményét a PraxisLab Kft. e-mailben küldi meg. A Gmail levelezőrendszer segítségével keresni lehet az e-mailben szereplő tartalomra. Ezzel a módszerrel csak azt lehet megállapítani, hogy egy adott időszakon belül hány igazoltan pozitív babesias eset fordult meg az állatkórházban, azt nem tudjuk megmondani, hogy összesen hány kérés irányult konkrétan ennek a betegségnek a vizsgálatára. Sajnos ezt a problémát a Doki for Vets programmal történő keresés sem oldja meg teljesen, mert bár van kifejezetten „Babesia profil” elnevezésű kérés, sok esetben nem csak erre irányul a vizsgálat és ilyenkor „Rutin teljes vérkép”, „Nagy rutin”, stb. elnevezéssel futnak a laborkérések. Ezek egyesével történő vizsgálata egyrészt hatalmas mennyiségű adat feldolgozását jelentené (napi 6-8 laborkérés, azaz éves szinten 2-3000 kórlap átnézése), másrészt előfordulhat, hogy nem minden alkalommal kerül bele a kórlapba a labor kérésének oka, így ez a típusú adatfeldolgozás sem volna releváns. A programban a diagnózisra, differenciál diagnózisra, illetve bármiféle kórlap tartalomra rá lehet keresni, ennek segítségével kutattam fel végül a babesias, babesiosis-gyanús eseteket.

### **4.2. Mintagyűjtés folyamata**

Vér, illetve kullancs mintából kívántam kimutatni a Babesia canist, az ehhez szükséges mintákat a FeliCaVet Állatkórházból és a Szombathelyi Állatkórházból szereztem be. A kórházakba beérkező babesiosis-gyanús állatokból a tulajdonos bele-

egyezésével az állatorvosok rutinszerűen vért vesznek, azt laborba küldik. A Fel-iCaVet Állatkórházban a mintagyűjtés időszaka alatt (2012. 02. 18 – 2012. 05. 01) ezekből a kutyákból a kollégáim lehetőség szerint egy EDTA-s csővel több vért vettek. A levett mintát sorszámmal megjelölve azonnal fagyasztóba tettük. A mintagyűjtéshez előzetesen összeállítottam egy táblázatot, amin az adott minta sorszáma, a tulajdonos és az állat neve, a fertőződés feltételezett helyszíne és a vett vérmintából végzett laborvizsgálat eredménye (Babesia pozitív vagy negatív) látható. Amennyiben a kérdéses állatban kullancs is volt, azt üvegcsőben, sorszámmal el látva szintén a fagyasztóba helyeztük. Négy állatból sikerült vér és kullancs mintát is gyűjteni, nyolc kutyából csak vér, huszonnégy kutyából csak kullancs minta származott.

| <b>Minta sorszáma</b> | <b>Dátum</b>         | <b>Minta típusa</b>  | <b>Laborvizsgálat (ha volt) eredménye</b> |
|-----------------------|----------------------|----------------------|---|
| <b>1</b>              | <b>2012. 02. 18.</b> | <b>vér</b>           | <b>negatív</b>                            |
| 2                     | 2012. 03. 11.        | kullancs             | -   |
| 3                     | 2012. 03. 14.        | vér                  | pozitív                                   |
| <b>4</b>              | <b>2012. 03. 14.</b> | <b>vér, kullancs</b> | <b>pozitív</b>                            |
| 5                     | 2012. 03. 15.        | vér                  | -   |
| 6                     | 2012. 03. 16.        | kullancs             | -   |
| 7                     | 2012. 03. 20.        | kullancs             | -   |
| 8                     | 2012. 03. 20.        | kullancs             | -   |
| 9                     | 2012. 03. 27.        | kullancs             | -   |
| 10                    | 2012. 03. 23.        | kullancs             | negatív                                   |
| 11                    | 2012. 03. 26.        | kullancs             | -   |
| 12                    | 2012. 03. 28.        | vér, kullancs        | pozitív                                   |
| 13                    | 2012. 03. 30.        | kullancs             | -   |
| 14                    | 2012. 03. 31.        | kullancs             | -   |
| <b>15</b>             | <b>2012. 03. 31.</b> | <b>vér, kullancs</b> | <b>pozitív</b>                            |
| 16                    | 2012. 03. 31.        | vér                  | negatív                                   |
| 17                    | 2012. 04. 01.        | vér, kullancs        | -   |
| 18                    | 2012. 04. 03.        | kullancs             | -   |
| 19                    | 2012. 04. 04.        | vér                  | pozitív                                   |
| 20                    | 2012. 04. 05.        | kullancs             | -   |
| 21                    | 2012. 04. 09.        | kullancs             | -   |
| 22                    | 2012. 04. 10.        | kullancs             | -   |
| 23                    | 2012. 04. 10.        | kullancs             | -   |
| 24                    | 2012. 04. 13.        | kullancs             | -   |
| 25                    | 2012. 04. 18.        | vér                  | negatív                                   |
| 26                    | 2012. 04. 18.        | kullancs             | -   |
| 27                    | 2012. 04. 18.        | kullancs             | -   |
| 28                    | 2012. 04. 18.        | kullancs             | -   |

| Minta sorszáma | Dátum         | Minta típusa | Laborvizsgálat (ha volt) eredménye |
|----------------|---------------|--------------|------------------------------------|
| 29             | 2012. 04. 10. | kullancs     | -                                  |
| 30             | 2012. 04. 11. | kullancs     | -                                  |
| 31             | 2012. 04. 16. | kullancs     | -                                  |
| 32             | 2012. 04. 21. | kullancs     | -                                  |
| 33             | 2012. 04. 24. | kullancs     | -                                  |
| 34             | 2012. 04. 25. | vér          | pozitív                            |
| 35             | 2012. 04. 30. | kullancs     | -                                  |
| 36             | 2012. 05. 01. | vér          | ?                                  |

4. táblázat. Mintagyűjtés eredménye 2012. február 18. és 2012. május 1. között

Az összegyűjtött, lefagyasztott mintákat a FeliCaVet Állatkórházból (Budapest, Gazdagrét) először jégakkuval, hűtőtáskában hazaszállítottam (Tatabánya), ahol szintén jégszekrénybe került, majd ugyanúgy jégakkuval, hűtőtáskában Szombathelyre, ahol a laborban is fagyasztóba tettük. Sajnos az elővigyázatosság ellenére a minták szállítása azok kétszeres felolvadását, újrafagyását eredményezte (vérminták esetében egyértelműen látható volt a vér elfolyósodása). A Szombathelyi Állatkórházból származó mintáknak rövidebb utat kellett megtenniük, kevésbé fordult elő hasonló probléma.

### 4.3. Babesia kimutatása PCR módszerrel

#### 4.3.1. Kimutatás vérmintából

##### 4.3.1.1. DNS izolálás

A vegyszereket a SIGMA vagy a Biocenter Kft., Szeged cégektől szereztük be.

A kísérletekhez az 1-es és 4-es számú mintákat használtuk (ld. 4. táblázat). Kétféle lysis bufferrel dolgoztunk mindkét minta esetében.

- lysis buffer 1: 10ml 50mM TRIS HCl (pH=8) + 0,037g EDTA + 0,029g 0,05M NaCl (TRIS HCl: 100ml desztillált víz + 0,64g TRIS HCl + 0,12g TRIS Base)
- lysis buffer 2: 10ml 0,21M TRIS HCl (pH=8) + 186mg EDTA + 58mg 0,1M NaCl + 50mg 0,5%-os SDS (TRIS HCl: 100ml desztillált víz + 2,67g TRIS HCl + 0,59g TRIS Base)

100µl vérmintához 6µl proteinase-K-t, 4µl triton X-100-at és 300µl lysis buffert adtunk. 56 °C-on 2 órán át inkubáltuk, majd 10 percig 90-100 °C-os vízbe lógtattuk őket. 300µl Fenol-kloroformot adtunk a mintákhoz (a fenol pH-ját a kloroformmal való 1:1 arányú összekeverés előtt TRIS-sel vittük le 8 körülire), majd 12 000 fordulaton 4 percig centrifugáltuk őket.

A felülúszókból (200µl) 100%-os izopropanollal (200µl) csapattuk ki a DNS-t, majd ismét centrifugáltuk a mintákat 14 000 fordulat/perccel 30 percig.

#### 4.3.1.2. DNS amplifikáció PCR módszerrel

A pelletet 30µl desztillált vízzel vortexeltük. 5µl-éhez hozzáadtunk 10µl master mixet (DreamTaq™ Green PCR Master Mix, Biocenter kft, Szeged), 1µl Taq polimerázt (Biocenter) és 2-2µl-t a primerekből.

Babesia reverse primer: *ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA*

Babesia forward primer: *GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC*

A primereket az *L. Halos és mtsai. 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks* cikk alapján a szegedi Biocenter Kft.-től rendeltük.

A PCR vizsgálatokat egy Hybaid Omn-E készülékkel végeztük, a következő protokoll alapján:

1. 95 °C      5 min
2. 95 °C      45 sec
3. 58 °C      45 sec
4. 72 °C      45 sec
5. GOTO 2.    35-ször
6. 72 °C      5 min

#### 4.3.1.3. Gél elektroforézis

2%-os agaróz gélt készítettünk. 1.2g agarózt bemértünk 58ml desztillált vízbe, majd 1.2ml 50xTAE buffert adtunk hozzá. Forralás-hűtés után 100µl (100µg/ml) etídium-bromidot adtunk hozzá. A mintákat 10µl térfogatban bemértük a gél előre elkészített zsebeibe és egy horizontális futtató kádban 100mA-en (kb. 100V) fél órán át futtattuk. A DNS csíkokat egy UV átvilágító asztalon egy SONY nagy érzékenységű videó kamerával (digitalizálás után) fotóztuk.

## **4.3.2. Kimutatás kullancsból**

### **4.3.2.1. DNS izolálás**

A 15-ös és a 4-es számú mintákat használtuk. A 15-ös mintából két preparátum is készült.

Lysis bufferben (lysis buffer 2) homogenizáltuk a kullancsok testének első felét (a nyálmirigyben található a legtöbb kórokozó), majd 800µl mintához 200µl proteinase-K-t adtunk.

A minták termosztátba kerültek 56 °C-on egy éjszakára, majd 10 percig lógattuk őket 90-100 °C-os vízbe, végül 14 000 fordulaton 6 percig centrifugáltuk.

A keletkező felülúszó 200µl-éhez 200µl fenol-kloroformot adtunk, újra centrifugáltuk 14 000 fordulaton 6 percig. A felülúszóból 1:1 arányban 100%-os izopropanollal csapattuk ki a DNS-t.

**A PCR és a gél elektroforézis módszere megegyezik a vérből való kimutatásnál leírtakkal.**

## **5. EREDMÉNYEK**

### **5.1. DNS izolálás**

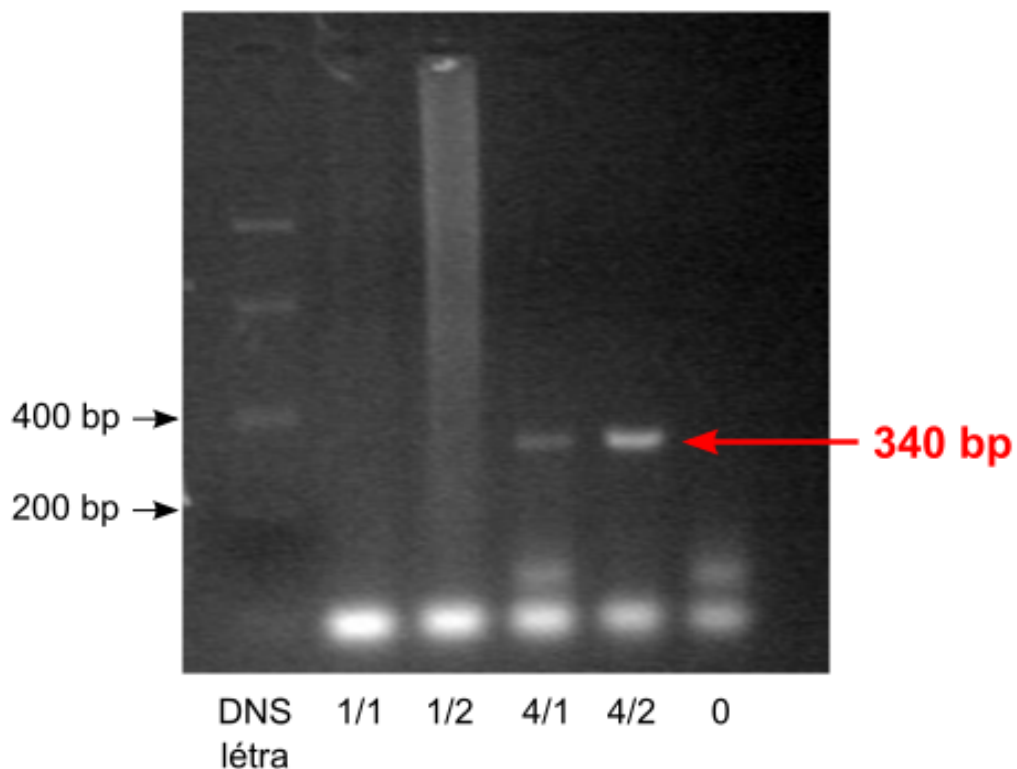
Mind a vérmintákból, mind a kullancsokból sikeresen izoláltunk mérhető mennyiségű DNS-t. Sajnos ebből nem tudtuk megállapítani, hogy mennyi a kórokozó, mennyi a gazdaállat DNS-e.

### **5.2. Kimutatás vérmintából**

Mind az 1-es, mind a 4-es mintáról részletes laboratóriumi adatok álltak rendelkezésünkre (ld. 4. táblázat) Mikroszkópos módszer alapján (PraxisLab) babesiosisra az 1-es minta negatívnak, a 4-es minta pozitívnak bizonyult.

Az általunk végzett PCR módszer ugyanezt az eredményt adta.





8. Ábra: bp: bázispár; 1/1: 1-es minta + lysis buffer 1, 1/2: 1-es minta + lysis buffer 2, 4/1: 4-es minta + lysis buffer 1, 4/2: 4-es minta + lysis buffer 2, 0: kontroll, DNS nélküli minta

A használt primerek a *Babesia* sp. 18S rRNS génjének egy körülbelül 340 bázispár hosszú szakaszát erősítik fel (L. Halos és mtsai. 2004). A használt DNS létra 200 és 400 bázispár közötti szakaszán – utóbbihoz közelebb – helyezkednek el a 4-es mintából amplifikált DNS szakaszok, ami megfeleltethető az említett 340 bázispár hosszú szakasznak.

### 5.3. Kimutatás kullancsból

Laborban a 4-es és a 15-ös számú kullancsot hordozó kutya véréből is kimutatható volt a *Babesia*.

Az általunk végzett PCR módszer nem hozott pozitív eredményt.

## 6. ÖSSZEGZÉS

A kutya babesiosis minden kétséget kizáróan napjaink egyik leggyakoribb, legtöbb odafigyelést igénylő betegsége házi kedvenceink körében. Dolgozatomban összefoglaltam a kórokozókkal és vektoraikkal (valójában végleges gazdáikkal) kapcsolatos legfontosabb tudnivalókat. Kitértem a *Babesia canis* terjesztő *Derma-centor reticulatus* hazánkban való elterjedésére, egyre növekvő számban való jelenlétére, a betegség tüneteire, kezelésére, megelőzésére. Bemutattam néhány adatot a FeliCaVet Állatkórház páciensei körében fellelhető kórokozókkal, azok kimutatásával kapcsolatban. Megnéztük, hogy miért, milyen módszerrel történik a kutya babesiosis kimutatása az állatorvosi gyakorlatban és miért volna érdemes esetleg nagyobb hangsúlyt fektetni a molekuláris biológiai módszerekre.

Polimeráz láncreakciót az egyetemen már több korábbi munka során alkalmaztak, konkrétan a *Babesia* vérből és kullancsból való kimutatásához azonban külön be kellett állítani a PCR módszert. Vér esetében úgy tűnik, a módszer beállítása sikeres volt, a megelőző laborvizsgálat eredményét reprodukálni tudtuk. A két vizsgált kullancs (*D. reticulatus* minkettő) labor által igazoltan fertőző kutyából származott, ugyanakkor nem lehetünk biztosak benne, hogy maguk a kullancsok is fertőzöttek voltak-e, vagy másik kullancs egyedektől kapták el a kutyák a kórokozót. Bár fertőzött állaton vért szívó egyed jó eséllyel gazdájává válik a Babesiának, csak valószínűsíthetjük azt, hogy a módszerünk beállítása volt rossz és nem a kullancsok voltak *Babesia*-mentesek. Ennek a megállapítása mindenesetre egy hosszabb folyamat, kísérletek sorozatának eredménye kell, hogy legyen. Több pozitív eredmény után állíthatjuk csak azt, hogy a kullancsokban található *Babesia* DNS-ének kimutatására nézve a PCR módszer beállítása sikeres.

Igaz ugyan, hogy az állatorvosi gyakorlatban az esetek többségében elegendőnek bizonyul a vérkenetek mikroszkópos vizsgálata babesiosis-gyanús állatoknál, a molekuláris biológiai módszerek használatát alacsony parazitémia, illetve célzott kezelésre történő nem megfelelő reakció esetén mindenképpen indokoltnak tar-

tom. Kutatási munkáknál pedig szinte elengedhetetlen a molekuláris biológiai eszközök használata, időt, energiát és pénzt lehet megspórolni vele a hagyományos módszerekhez képest.

Amennyiben sikerülne egyetemünkön beállítani a PCR módszert kullancsból való kimutatás esetére, elsősorban kutatási célokra lehetne felhasználni. A *Rhipicephalus sanguineus* magyarországi elterjedtségével kapcsolatos vizsgálatokkal nem találkoztam, érdemes volna ennek, illetve ezen belül a *B. gibsoni*-val való fertőzöttség mértékének utánajárni.

Miután bizonyítást nyert, hogy a *B. canis* tünetmentesen akár hordozható is, érdekes téma lehet annak a vizsgálata, hogy fiatal, 1-2 hetes kölykök esetében kimutatható-e parazitémia, vagyis hordozó anyaállat átadhatja-e kölykének a kórokozót. Előfordulhat-e, hogy egy újszülött kutya elhullását, vagy akár magzati elhalálozást „öröklött” babesiosis okozzon?

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Nyugat-magyarországi Egyetem Természettudományi Karának a lehetőséget a kísérletes munkához, konzulensemnek, Dr. Molnár Péternek a dolgozat megírásában nyújtott segítségét, hasznos észrevételeit és hogy szabadidejében is bármikor számíthattam rá, illetve Schmidthoffer Ildikó támogatását és irányítását a gyakorlati munka során. Köszönöm Dr. Földvári Gábornak, a téma egyik hazai szakértőjének rám szánt idejét, hasznos tanácsait a kivitelezéssel kapcsolatban és a tőle kapott szacikkeket. Nagyon hálás vagyok a mintagyűjtésben nyújtott segítségéért a FeliCaVet Állatkórházban dolgozó kollégáimnak, a Szombathelyi Állatkórháznak és Dr. Peresztegi Attilának. Köszönöm munkahelyemnek, a FeliCaVet Állatkórháznak a témát, ami egyébként nem talált volna meg és a lehetőséget az archív adatok felhasználására. Külön köszönöm Dr. Egerszegi Péternek és Dr. Csöndes Juditnak a témához kapcsolódó állatorvosi ismereteik és tapasztalataik megosztását. Köszönöm Dr. Tóth Ádámnak, hogy a gyakorlati munka megkezdése előtt betekintést nyerhettem általa a PCR módszer rejtelseibe.

Köszönöm szüleimnek, nagyszüleimnek a lehetőséget a tanulásra és hogy soha nem álltak útjába az elképzeléseimnek. Köszönöm végül, de valójában elsősorban férjemnek a türelmét, támogatását és a dolgozat kivitelezésében nyújtott segítségét.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

- Beugnet, F. "Guide to Major Vectorborne Diseases of Pets." *Meriel S. AS.* (2002): 19-31.
- Birkenheuer, A. J., M. G. Levy, and E. B. Breitschwerdt. "Development and Evaluation of a Seminested Pcr for Detection and Differentiation of Babesia Gibsoni (Asian Genotype) and B. Canis DNA in Canine Blood Samples." *J Clin Microbiol* 41, no. 9 (Sep 2003): 4172-7.
- BL., Blagburn. "Permethrin, a Type I Synthetic Pyrethroid: History and Properties." *Suppl. Comp Cont Educ Vet Prac* 25 (5A) (2003): 7-10.
- Brooks, W. C. "Babesia Infection in Dogs." (Published: 2004, Reviewed: 2012) <http://www.veterinarypartner.com/Content.plx?P=A&A=1655&S=1&SourceID=42> (2013. 05. 11.)
- Cardoso, L., Y. Yisaschar-Mekuzas, F. T. Rodrigues, A. Costa, J. Machado, D. Diz-Lopes, and G. Baneth. "Canine Babesiosis in Northern Portugal and Molecular Characterization of Vector-Borne Co-Infections." *Parasit Vectors* 3, no. 1 (2010): 27.
- Duh, D., M. Slovák, A. Saksida, K. Strasek, M. Petrovec, and T. Avsic-Zupanc. "Molecular Detection of Babesia Canis in Dermacentor Reticulatus Ticks Collected in Slovakia." *Versita* 61, no. 2 (2006): 231-33.
- Duh, D., N. Tozon, M. Petrovec, K. Strasek, and T. Avsic-Zupanc. "Canine Babesiosis in Slovenia: Molecular Evidence of Babesia Canis Canis and Babesia Canis Vogeli." *Vet Res* 35, no. 3 (May-Jun 2004): 363-8.
- F., Krämer, and Mencke N. "Flea Biology and Control: The Biology of the Cat Flea, Control and Prevention with Imidacloprid in Small Animals." Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 2001.
- Farkas, R. "Piroplasmosis (Babesiosis És Theileriosis)." <http://kullancsok.parazitak.hu/?Protozoonok&pid=22> (2013. 05. 01.)

- Farkas, R., G. Foldvari, B. Fenyves, I. Kotai, A. Szilagyi, and G. T. Hegedus. "First Detection of Small Babesiae in Two Dogs in Hungary." *Vet Rec* 154, no. 6 (Feb 7 2004): 176-8.
- Farkas, R., and G. Földvári. "A Kutyák És a Macskák Kullancsosságának Hazai Vizsgálata." *Magyar Állatorvosok Lapja* 123., no. 9 (2001): 534-39.
- Filchagov, A. V., and N. N. Lebedeva. "Study of the Ecology of Unfed Larvae of *Dermacentor Reticulatus* and Their Relationship with Hosts under Natural Conditions." *Parazitologija* 22 (1988): 366-71.
- Foldvari, G., and R. Farkas. "Ixodid Tick Species Attaching to Dogs in Hungary." *Vet Parasitol* 129, no. 1-2 (Apr 20 2005): 125-31.
- Foldvari, G., E. Hell, and R. Farkas. "Babesia Canis Canis in Dogs from Hungary: Detection by Pcr and Sequencing." *Vet Parasitol* 127, no. 3-4 (Feb 28 2005): 221-6.
- Fourie, J. J., F. Beugnet, C. Ollagnier, and M. G. Pollmeier. "Study of the Sustained Speed of Kill of the Combination of Fipronil/Amitraz/(S)-Methoprene and the Combination of Imidacloprid/Permethrin against *Dermacentor Reticulatus*, the European Dog Tick." *Parasite* 18, no. 4 (Nov 2011): 319-23.
- Fourie, J. J., D. Stanneck, and F. Jongejan. "Prevention of Transmission of *Babesia Canis* by *Dermacentor Reticulatus* Ticks to Dogs Treated with an Imidacloprid/Flumethrin Collar." *Vet Parasitol* 192, no. 1-3 (Feb 18 2013): 273-8.
- Földvári, G. "Studies of Ticks (Acari: Ixodidae) and Tick-Borne Pathogens of Dogs in Hungary." Szent István University, 2005.
- Földvári, G., and R. Farkas. "A *Dermacentor Reticulatus* (Acari: Ixodidae) Kullancsfajjal Kapcsolatos Irodalmi Áttekintés És Újabb Ismeretek a Hazai Előfordulásáról." *Magyar Állatorvosok Lapja* 129., no. 5 (2005): 289-98.
- Halos, L., T. Jamal, L. Vial, R. Maillard, A. Suau, A. Le Menach, H. J. Boulouis, and M. Vayssier-Taussat. "Determination of an Efficient and Reliable Method for DNA Extraction from Ticks." *Vet Res* 35, no. 6 (Nov-Dec 2004): 709-13.

- Hornok, S., R. Edelhofer, and R. Farkas. "Seroprevalence of Canine Babesiosis in Hungary Suggesting Breed Predisposition." *Parasitol Res* 99, no. 6 (Nov 2006): 638-42.
- Imes, G. D. "Babesiosis (Piroplasmosis)." Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 20306, 2011.
- Kovács, K. D. "A Hazai Kutyák Babesia Canis Okozta Fertőzöttség Szerológiai Vizsgálata." Szent István University, 2011.
- Liebenberg, C., A. Goddard, B. Wiinberg, M. Kjelgaard-Hansen, L. L. van der Merwe, P. N. Thompson, P. T. Matjila, and J. P. Schoeman. "Hemostatic Abnormalities in Uncomplicated Babesiosis (Babesia Rossi) in Dogs." *J Vet Intern Med* 27, no. 1 (Jan-Feb 2013): 150-6.
- Lussenhop, J., W. Baumer, M. Kietzmann, T. Schnieder, and S. Wolken. "Dynamics of Distribution and Efficacy of Different Spot-on Permethrin Formulations in Dogs Artificially Infested with Dermacentor Reticulatus." *Parasit Vectors* 4 (2011): 45.
- Máthé, Á. "A Kutyák Babesiosis (C. Egyetemi Előadás Anyaga)." SZIE-ÁOTK Belgyógyászati Tanszék és Klinika.
- Mathe, A., K. Voros, T. Nemeth, I. Biksi, C. Hettyey, F. Manczur, and L. Tekes. "Clinicopathological Changes and Effect of Imidocarb Therapy in Dogs Experimentally Infected with Babesia Canis." *Acta Vet Hung* 54, no. 1 (Mar 2006): 19-33.
- Mathe, A., K. Voros, L. Papp, and J. Reiczigel. "Clinical Manifestations of Canine Babesiosis in Hungary (63 Cases)." *Acta Vet Hung* 54, no. 3 (Sep 2006): 367-85.
- Matijatko, V., M. Torti, and T. P. Schettters. "Canine Babesiosis in Europe: How Many Diseases?". *Trends Parasitol* 28, no. 3 (Mar 2012): 99-105.
- Mehlhorn, H., E. Schein, and W. P. Voigt. "Light and Electron Microscopic Study on Developmental Stages of Babesia Canis within the Gut of the Tick Dermacentor Reticulatus." *J Parasitol* 66, no. 2 (Apr 1980): 220-8.
- Methfessel, C., and A. Turberg. "In Vitro Demonstration of Enhanced Activity with the Combination of Imidacloprid and Permethrin in a Pest Arthropod." *Suppl. Comp Cont Educ Vet Prac* 25 (5A) (2003): 11-14.

- Meyer-König, A., M. Zahler, and R. Gothe. "Studies on the Critical Water Mass and the Rehydration Potential of Unfed Adult *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* Ticks (Acari: Ixodidae)." *Exp Appl Acarol* 25, no. 6 (2001): 505-16.
- Nosek, J. "The Ecology and Public Health Importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* Ticks in Central Europe." *Folia Parasitol (Praha)* 19, no. 1 (1972): 93-102.
- Prullage, J. B., J. A. Hair, W. R. Everett, S. S. Yoon, L. G. Cramer, S. Franke, K. Cornelison, and J. S. Hunter, 3rd. "The Prevention of Attachment and the Detachment Effects of a Novel Combination of Fipronil, Amitraz and (S)-Methoprene for *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis* on Dogs." *Vet Parasitol* 179, no. 4 (Jul 15 2011): 311-7.
- Shell, L. "Babesiosis." <http://www.win.com> (2013. 05. 01.)
- Stanneck, D., Ebbinghaus-Kintscher U., Schoenhense E., E. M. Kruedewagen, A. Turberg, A. Leisewitz, Jiritschka W., and K. J. Krieger. "The Synergistic Action of Imidacloprid and Flumethrin and Their Release Kinetics from Collars Applied for Ectoparasite Control in Dogs and Cats." *Parasites & Vectors* 5 (2012).
- Welc-Faleciak, R., A. Rodo, E. Sinski, and A. Bajer. "Babesia Canis and Other Tick-Borne Infections in Dogs in Central Poland." *Vet Parasitol* 166, no. 3-4 (Dec 23 2009): 191-8.
- Zahler, M., and R. Gothe. "Infections of Horses with *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Germany an Epidemiological Analysis." *Tierartzl* 55 (2000): 655-57.
- Zahler, M., and R. Gothe. "Ökologie Von *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Parasitiformes: Ixodida: Ixodidae)." *Diss. Med. Vet. München* 127 (1994).
- <http://www.scalibor.hu/> (2013. 05. 11.)
- <http://www.homoktovisvet.hu/macskafertozo-1.html> (2013. 05. 11.)
- <http://www.homoktovisvet.hu/kutyafertozo-1.html> (2013. 05. 11.)