

Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj predoktori kategória 2020-2021 pályázat

Beszámoló

dr. Joó Kinga

A tanulmányút során két témával foglalkoztunk:

I. Lovak korszerű parazitológiai vizsgálata

II. Lovak felső légúti funkcionális zavarai

A két téma részletei külön kerülnek bemutatásra:

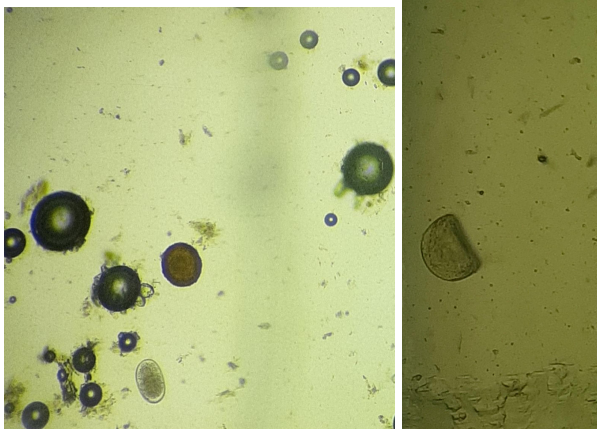
I. Lovak korszerű parazitológiai vizsgálata

A vizsgált lovak

Összesen 140, vegyes fajtájú ló vizsgálata történt. Lovardánként az állatok száma 6 és 53 (23,3 +/- 6,3), életkoruk 8 hónap és 35 év (7,3 +/- 5,2) között volt. Az állományok lovairól a következő adatokat gyűjtöttük össze: ivar, kor, fajta, tartásmód (istállózott, legeltetett vagy karámozott) éjjel és nappal, az utolsó féreghajtó kezelés hatóanyaga és időpontja. Az utolsó parazitaellenes kezelés feljegyzésekor minden esetben meggyőződünk arról, hogy az alkalmazott készítmény hatása már nem fogja befolyásolni a vizsgálat során kapott pete/gramm (PPG) értékeket: tehát, hogy a mintavételt megelőzően a peték újramegjelenésének idejétől (ERP=Egg Reappearance Period) számított 4 hét eltelt.

Mintagyűjtés, bélsár peteszámlálás, peteürítő csoportok / státuszok

Lovanként, a frissen ürített bélsár talajjal nem érintkező részéből egy bélsárgolyót gyűjtöttünk, amit a vizsgálatig, maximum 5 napig hűtve tároltunk. A parazitológiai vizsgálathoz Mini-FLOTAC és Fill FLOTAC 5 eszközöket használtunk. Egy-egy mintából 5 grammot 45 ml túltelített sóoldatban (sűrűsége 1180–1200 g/l) homogenizáltunk a Fill FLOTAC 5 segítségével, majd ebből a Mini FLOTAC kamráit 1-1 ml homogenizátummal feltöltöttük. Tíz perc elteltével, a peték flotációját követően fénymikroszkóp alatt megszámloltuk a strongylida-típusú (és egyéb) petéket (1. ábra). A vizsgálati módszer érzékenységi küszöbértéke 5 pete/gramm, így az eredményt 5-tel szorozva kaptuk meg a PPG-értéket, azaz a grammonként ürített peték számát.



Strongylida-típusú és orsóféreg-peték (bal oldali kép), galandféreg pete (jobb oldali kép)

A lovakat PPG-értékeik szerint az alábbi táblázatban látható 3 kategóriába soroltuk.

Kisszámú petét ürítők	<200 PPG
Közepes-számú petét ürítők	200-500 PPG
Nagyszámú petét ürítők	>500 PPG

A lovak peteürítő csoportokba sorolása PPG-értékek szerint, PPG=pete/gramm

Statisztikai értékelés

Számításainkat a scipy (1.4.1) programcsomag "stats" moduljának segítségével végeztük. A csoportokon belül mért PPG-értékeket Mann-Whitney-próbával hasonlítottuk össze, $p < 0,05$ mellett. A módszer használata azért volt indokolt, mert a mért értékek nem illeszkedtek standard eloszlás függvényekre (pl. normális, lognormális), amit Kolmogorov-Szmirnov teszttel ellenőriztük $p < 0,01$ mellett. A prevalencia értékek 95%-os konfidencia intervallumát (95%CI) Wilson-féle módszerrel becsültük.

Rezisztencia vizsgálat

A gyógyszerrezisztencia vizsgálatára az ún. peteszámcsökkenési tesztet (Fecal Egg Count Reduction Test, FECRT) alkalmaztuk. A kezelés előtt közvetlenül (0. nap), és az azt követő 14. napon gyűjtött bélsárminták PPG-értékeiből kiszámoltuk a peték számának százalékos csökkenését. A rezisztenciát állományszinten kell értékelni, így ezt az állományok átlagos PPG-értékeiből számítottuk ki, az alábbi egyenlet segítségével:

$$\frac{\text{Átlagos PPG-érték (0. nap)} - \text{Átlagos PPG-érték (14. nap)}}{\text{Átlagos PPG-érték (0. nap)}} \times 100 = \text{peteszám csökkenés (\%)}$$

Az eredményeket az alábbi táblázat adatai alapján értékeltük.

Hatóanyag	Várható hatékonyság	Hatékony	Feltételezhető a rezisztencia	Rezisztencia
Ivermektin	99,9%	>98%	95-98%	<95%
Fenbendazole	99%	>95%	90-95%	<90%

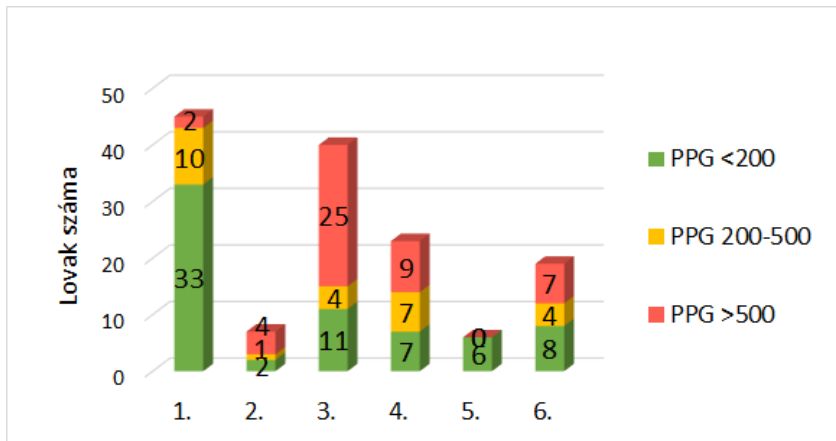
Peteszám-csökkenési teszttel kapott eredmények értékelése

Eredmények

Az általunk vizsgált romániai lóállományok mindezidáig sehol sem a bélsár PPG-érték alapján alakították ki a parazitaellenes kezeléseket, hanem a tradicionális, kontroll nélküli kezeléseket alkalmazták.

Összesen 138 ló és 2 póni vizsgálata történt 7 állományban: 70 kanca (50%), 41 herélt (29%) és 29 mén (21%). A 140 minta közül 105-ben (75%) találtunk strongylida-típusú petéket. A strongylida-típusú peték grammonkénti száma 66 ló (47,14%, 95% CI: 38,66-55,75%) mintájában kisebb volt, mint 200, beleértve azokat a lovakat is, amelyek mintájából nem volt kimutatható pete. Huszonhat (18,57%; 95% CI: 12,5-26,1) mintában ez az érték 200 és 500 között volt. Negyvennyolc (34,29%; 95% CI: 26,48-42,77) olyan ló volt, amelynek egy grammnyi bélsarában több, mint 500 petét találtunk (4. táblázat). Az összes, kvantitatív ovoszkópia során talált strongylida-típusú pete (86702 PPG) 80%-át a vizsgált minták 25%-ában (36/140) találtuk. Egy állományban csak kisszámú petét ürítők voltak, míg 4 állományban ezek aránya kevesebb, mint 50% volt. A különböző peteürítő kategóriába tartozó lovak számát és arányát az állományokban a 3. ábra szemlélteti.

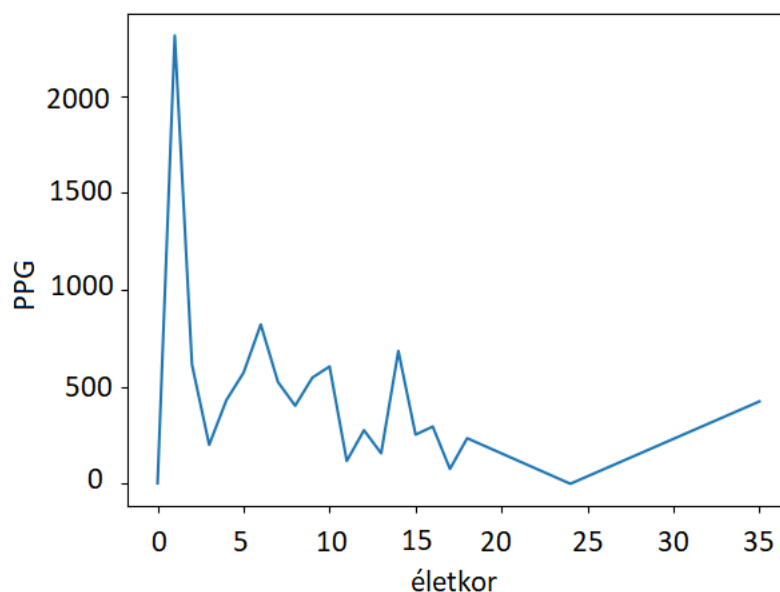
Vizsgálatunk során a nem strongylida-típusú peték grammonkénti száma az alábbiak szerint alakult: Parascaris petéket 9 mintából mutattunk ki, 6 esetben 3 éves vagy annál fiatalabb csikók mintáiból.



Különböző peteürítő kategóriába tartozó lovak száma és aránya

Az életkor és a PPG-értékek közötti összefüggés

Az életkor és a PPG-értékek összefüggéseit vizsgálva (5. ábra) megállapítottuk, hogy a 3 éves és annál fiatalabb lovak bélsármintáinak PPG-értékei (1481.92 ± 1932.47 ; $n=41$) szignifikánsan nagyobbak voltak (Mann-Whitney-próba, $p=0.0017$), mint a 3 évnél idősebbeké (422.56 ± 591.18 ; $n=99$)



PPG-értékek az életkor függvényében, $PPG = \text{pete/gramm}$

Az ivar és a PPG-értékek közötti összefüggés

A hím ivarú lovak (beleértve a herélteket és méneket is) és a kancák PPG-értékei szignifikánsan nem tértek el egymástól sem vizsgált lópopulációban.

Tartásmód

A lovakat a tartásmód szerint két csoportra osztottuk: kint tartott lónak tekintjük, amelyet legalább nappal a szabadban tartanak, istállózott lónak pedig az éjjel-nappal istállóban tartózkodókat.

Vizsgálatunk során 89 esetben éjjel-nappal bokszban/állásban, 51 esetben pedig legelőn/karámban is tartották a lovakat. A mindig istállóban tartott állatok bélsármintáinak PPG-értékei (318.84 ± 536.58) szignifikánsan kisebbek voltak (Mann-Whitney-próba, $p=1.68 \cdot 10^{-8}$), mint a karámozott lovaké (1143.63 ± 1477.99).

Rezisztencia vizsgálat

A rezisztenciavizsgálat során a fenbendazol nem bizonyult hatékonynak a strongylidákkal szemben, így a hatóanyag alkalmazása a vastagbélférgék kontrollálásának céljából a továbbiakban nem javasolt a vizsgált állományokban. Az orsóférgék ellen a fenbendazol hatékonynak bizonyult, így a *Parascaris* spp. elleni védekezésre továbbra is alkalmas ez a hatóanyag a vizsgált állományokban. Az ivermektin a strongylidákkal szemben hatékony, így a strongylidák elleni védekezésre továbbra is alkalmas. Az orsóférgék világszerte gyakran rezisztensek az ivermektinre, de jelen állományokban a hatékonyság megítélésére túl kevés adat állt rendelkezésre.

Következtetések

A lovak bélsarával ürülő strongylida-típusú peték kapcsán 20/80 arányról szoktak beszélni, miszerint a peték 80%-át a lovaknak mindössze nagyságrendileg 20%-a üríti (1, 2). A lovak által ürített peték egyenlőtlen eloszlását a mi eredményeink is igazolták: a kvantitatív ovoszkópia során számlált peték 80%-áért a lovak 25%-a volt felelős.

A PPG-érték a minták 53%-ában volt 200 felett. Négy állományban a kisszámú petét ürítő lovak aránya $<50\%$ volt, az általában jellemző 50-75% helyett. Erre lehetséges magyarázatok az alábbiak: a nagy állománysűrűségű tartásmód, fenbendazol rendszeres, állományszintű használata, továbbá a 3 éves vagy annál fiatalabb csikók nagy aránya. A fenbendazzal szemben az irodalmi adatok szerint a kis strongylidák gyorsan rezisztenssé válnak (3), továbbá a hatóanyag sokkal kevesebb ideig képes korlátozni a peteürítés mértékét (1). A nagy állománysűrűség következtében a lovak környezetének strongylidákkal való szennyezettsége nagyobb (1). A fiatal és idős lovak együtt tartása szintén hajlamosító tényezőként szerepel a peteürítés szempontjából a szakirodalomban (4). A felnőtt lovak fiatalokkal való együtt tartása kiemelendő, mint kockázati tényező. Fontos megjegyezni, hogy még megfelelő

állománysűrűség esetén is fontos a legelő menedzsmentje, karbantartása, mert ez szintén jelentősen képes befolyásolni a paraziták feldúsulásának mértékét az állatok környezetében.

A vizsgált állományokban a peteürítés egyenlőtlen eloszlása mutatkozott, sőt, bizonyos esetekben a lovak nem ürítettek petét. Ezek az eredmények a szelektív terápia jelentőségére hívják fel a figyelmet, egy olyan protokoll, ami szerint az összes lovat egyformán kezelik, nem biztosítja hosszú távon a paraziták elleni hatékony védekezést.

Az antihelmintikumokkal szembeni rezisztencia kialakulását úgy lehet hatékonyan késleltetni, ha állományonként a kezelések száma átlagosan kevesebb, mint 2/ló/év. Eredményeink alapján valószínűsíthető, évi egyre is korlátozni lehetne a féregellenes kezelések számát (a kisszámú petét ürítő lovak esetében). Mindemellett, ha a közepes számú petét ürítő lovak évi 2, a nagyszámú petét ürítő lovak évi 3 kezelést kapnának, csökkenthető lenne a terület parazitás terheltsége, így az ezekkel együtt tartott lovak fertőződési esélye is.

A strongylida PPG-értéket, a genetikai hajlamon túl számos tényező befolyásolhatja, amelyeket jelen tanulmány során igyekeztünk vizsgálni. Vizsgálatok azt igazolják, hogy a fiatal lovak a strongylida fertőzöttség egyik fő forrásai, így erre a korcsoportra különös figyelmet kell fordítani a parazitaellenes terápia kidolgozásakor.

A lovak tartásmódja és a peteürítésük összefüggéseinek vizsgálatánál, a bokszban tartott lovak kisebb valószínűséggel fertőződtek, mint azok az egyedek, amelyeket nappal vagy akár éjjel-nappal bokszon kívül tartottak, ami nem meglepő, hiszen a kis és nagy strongylidák a legelőn tartott lovak parazitái.

Az utolsó féregellenes szer használatát illetően azt találtuk, hogy azon lovak, amelyek parazitaellenes kezelése során rendszeresen, legalább évente egyszer fenbendazol hatóanyagú készítményt használtak, szignifikánsan nagyobb PPG-értékek voltak kimutathatóak. Ez a jelenség a kis strongylidák benzimidazolokkal szembeni rezisztenciájával magyarázható.

Az ivermektin gyakori használata ellenére 100%-os hatékonyságot mutatott a rezisztenciavizsgálat során. Ez összhangban van azzal, hogy gyakori alkalmazásához képest világszerte ritka a kis strongylidák e hatóanyaggal szembeni rezisztenciája, azonban ez sajnos nem zárja ki, hogy nincs kialakulóban a rezisztencia.

Összegzés

Romániában nem alkalmazzák rutinszerűen bélsár peteszámlálást lovak féregellenes kezelési programjainak kialakításánál. Jelen kutatás igazolta a bélsár peteszám meghatározás

jelentőségét lovakban és a célzott, egyedre szabott kezelés szükségességét. A 3 éves és annál fiatalabb lovak PPG-értékei szignifikánsan nagyobbak voltak, mint az 3 évnél idősebbeké. A kis állománysűrűségnél kisebb PPG-értékeket találtunk, ezért javasolt a legelőkön 1-2 ló/hektárnál nem nagyobb állománysűrűségeen tartani a lovakat. A tartástechnológia tekintetében az állásban tartott lovak ürítették a legkevesebb petét, de ez nem javasolt állattjóléti szempontból. A fenbendazol valószínűsíthetően napjainkban már nem nyújt megfelelő védelmet a strongylidák elleni védekezésben. Összefoglalóan, a PPG-érték alakulását a genetikán túl számos tényező egyidejűleg befolyásolja.

Irodalom:

1. Nielsen MK, Mittel L, Grice A, Erskine M, Graves E, Vaala W, Tully RC, French DD, Bowman R, Kaplan RM (2019) AAEP Parasite Control Guidelines.
2. Kaplan RM, Nielsen MK (2010) An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. Equine Veterinary Education 22:306–316
3. Kaplan RM (2002) Anthelmintic resistance in nematodes of horses. Vet Res 33:491–507
4. Misuno E, Clark CR, Anderson SL, Jenkins E, Wagner B, Dembek K, Petrie L (2018) Characteristics of parasitic egg shedding over a 1-year period in foals and their dams in 2 farms in central Saskatchewan. Can Vet J 59:284–292

Publikációk

Tudományos megjelenések:

A romániai eredményeinket összevetettük magyarországi vizsgálataink eredményeivel. Tanulmányukat a Magyar Állatorvos Lapja publikálásra elfogadta (igazolás mellékletben).

A Magyar Állatorvosok Lapjánál az alábbi lektori véleményt kaptuk: *“A kézirat egy rendkívül időszerű probléma magyarországi és erdélyi vizsgálatának eredményeit tartalmazza. Ebből a szempontból úttörő jelentőségű, így megjelenése hiánypótló, és a magyar anyanyelvű állatorvosok képzését szolgálja. Külön kiemelendő, hogy a szerzők bizonyították a fenbendazol elleni rezisztencia jelenlétét.”*

Ismeretterjesztő folyóirat

Fontos számunkra, hogy tudományos eredményeink a lópartokhoz is eljussanak, mivel csak az állatorvosok és a lópartók közös munkájával fogjuk tudni bevezetni az újszerű szemléletet a ló parazitológia területén. Így egy általunk színvonalas tartott, lovasoknak szóló ismeretterjesztő online magazinnál (Racionál Horsemanship) készítettünk egy összefoglalót a

munkánkról. Amelyben természetesen feltüntettük a pályázati támogatást is <https://racionalthorsemanship.hu/2021/09/14/318-lo-vett-reszt-az-első-hazai-parazitologiai-felmeresben/>.

Hallgatók részvétele

Nagyon büszke vagyok rá, hogy két állatorvostan hallgató is részt vett a kutatómunkában (Trúzsi Roxána, Lengyel Dóra), akiknek ez által lehetőségük volt újszerű gyakorlati és elméleti tapasztalatot gyűjteni a ló parazitológia területén.

II. Lovak felső légúti funkcionális zavarai

A lovak felső légúti funkciózavarainak vizsgálatára álló és terheléses endoszkópiát alkalmaznak. Azonban a gégeizmok illetve -porcok belső és lateralis részeinek vizsgálatára kiváló kiegészítő eszköz lehet a gége ultrahang diagnosztika.

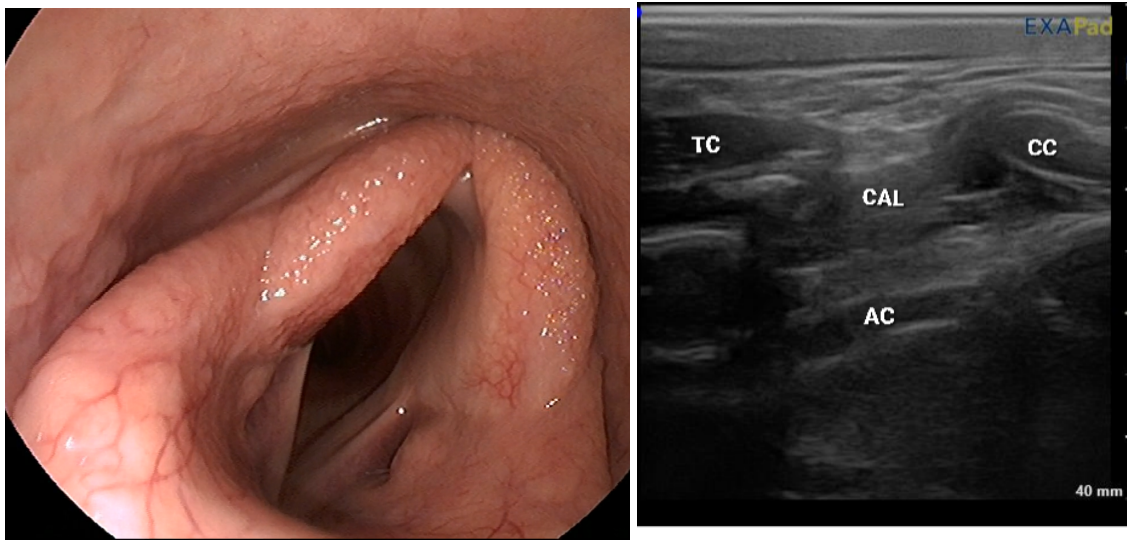
Mind a légyszájpad felső helyzet változásnak mind egyéb felső légúti funkció zavarok esetében (kannaporc kollapszus) elsődlegesen fontos lehet ez a módszer a betegség eredetének meghatározás során, és elengedhetetlen lehet ahhoz, hogy megfelelő kezelési stratégiát tudjunk kialakítani. A tanulmányút során kiemelt figyelmet szenteltünk a gége ultrahang diagnosztikának, amely ma még nem rutinszerűen része az állatorvosi légzőszervi vizsgálatoknak. Pedig egy költséghatékony és a terepi körülmények között dolgozó állatorvos számára is könnyen kivitelezhető vizsgálat van szó, ami kiváló kiegészítő eszköz lehet a felső légúti funkciózavarok diagnosztikában. A Zetavet Lóklinika nagyszámú légzőszervi klinikai betege, lehetőséget biztosított, hogy számos ritka felső légúti problémát is tudjunk ultrahang diagnosztika során vizsgálni az alábbiak szerint:

Gége ultrahang diagnosztika:

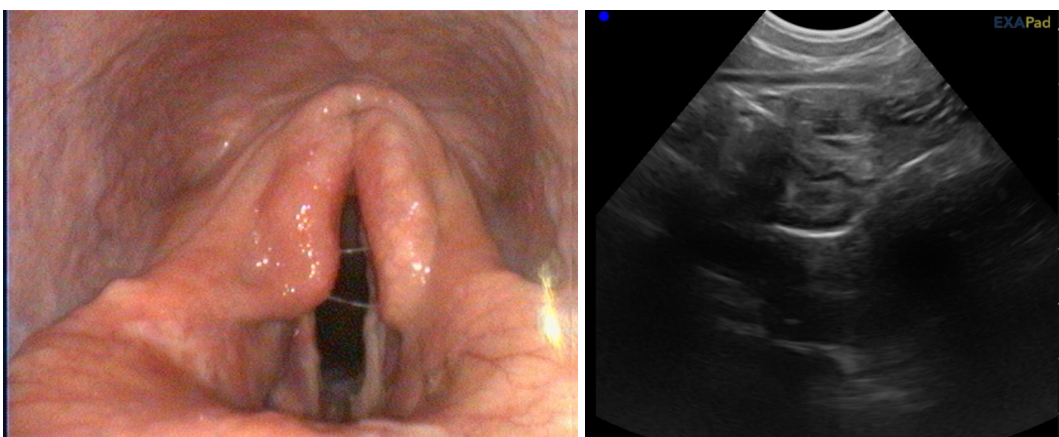
A gége ultrahangos vizsgálata során 4, úgynevezett akusztikus ablakot képeztünk le: a rostroventralis, a midventralis, a caudoventralis és a caudolateralis ablakot. Az ablakok hossz- és keresztmetszetben is vizsgáltuk. A rostroventralis ablak a basihyoideum teste és processus lingualisának csúcsa közötti területet jelenti. A midventralis ablak a basihyoideum és a pajzsporc közötti régió, amely a középvonalra, hosszanti síkba helyezett vizsgálófejjel tűnik elő. A caudoventralis ablak a pajzs- és a gyűrűporc találkozásának (“cricothyroid notch”) régiója, amely akár palpáció során is kitapintható. A bal és a jobb oldali

caudolateralis ablakok a nyak két oldalán találhatóak, amelyeket megtalálunk, ha a caudoventralis ablakból a gyűrűporcot dorsolateralisan követjük

A **gégebénulás** ultrahang vizsgálat során az érintett oldal cricoarytenoid lateralis és vocalis izmai hiperechogénebbek összevetve az ellenoldali izomokkal. A **gége diszplázia** jellegzetességei ultrahanggal igazolhatóak, ezek közé tartozik egyrészt a hiányzó cricothyroid ízület (hosszmetszetben) és a pajzsporc (lamina thyroid) dorsalis extenziója (keresztmetszetben). **Arytenoid chondritis** esetén a kannaporc megnagyobbodik, széle szabálytalaná válik, amelyre abnormális echogenitás lesz jellemző. A **lágyszájpad felső helyzetváltozása** extrinsic eredetének megerősítésére vagy kizárására is alkalmas lehet az ultrahang diagnosztika, a basihyoideum nyugalmi pozíciójának (annak mélységének) meghatározásával (a basihyoideum teste és a processus lingualis junkciójánál).



Endoszkópos és ultrahang felvétel a gégediszpláziáról



Endoszkópos és ultrahang felvételek az arytenoid chondritisről

Lágyszájpad felső helyzet változása és az asztmatikus folyamatok összefüggései:

A doktori disszertációm során már bizonyítottuk, hogy az asztmatikus folyamatokkal egyidejűleg gyakran jelentkezik a légyszájpad felső helyzetváltozása is. (Súlyos asztma esetén a lovak több mint 79%-a mutat légyszájpad felső helyzetváltozást állóhelyzetű vizsgálat során /Joó et al 2021/. Jelen kutatás során 12 lóban tudtuk igazolni, hogy az alsó légúti gyulladás megszüntetésével, a felső légúti funkciózavar is megoldódik. Ennek a kezelési stratégia megválasztásában van kiemelkedő szerepe. Feltételezésünk az, hogy azon légyszájpad felső helyzetváltozások, amelyek asztmatikus folyamatokkal hozhatók összefüggésbe, gyulladással indukált neuromuscularis gyengeségre vezethetők vissza. Korábbi feltételezésünket, miszerint a két betegség közötti kapcsolat a nyomás viszonyokra is visszavezethető lenne elvetettük.

Publikációk:

Joó Kinga, Lengyel Dóra Ágnes, Trúzsi Roxána Laura, Jakab Szilárd: A gége ultrahangos vizsgálata lovakban, Magyar Állatorvosok Lapja - Közlésre elfogadva

(igazolás mellékletben)

(További disszemináció előkészületben)

Mellékletek:

1. Közlésre elfogadott publikáció - igazolás (**Bélsárral ürülő strongylida-típusú peték mennyiségét befolyásoló tényezők vizsgálata magyarországi és erdélyi lóállományokban**)
2. Közlésre elfogadott publikáció -igazolás (**A gége ultrahangos vizsgálata lovakban**)
3. Kint töltött időszakról szóló időtartam-igazolás

Elfogadó nyilatkozat

Joó Kinga*, Trúzsi Roxána Laura, Lengyel Dóra Ágnes, Jakab Szilárd

Bélsárral ürülő strongylida-típusú peték mennyiségét befolyásoló tényezők vizsgálata magyarországi és erdélyi lóállományokban

című kéziratát a Magyar Állatorvosok Lapjának szerkesztősége közlésre elfogadta.

pályázati szám: Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj (MÁEÖ 2020-21 / 159033)

Budapest, 2021. augusztus 31.



Balka Gyula
főszerkesztő

Elfogadó nyilatkozat

Joó Kinga*, Lengyel Dóra Ágnes, Trúzsi Roxána Laura, Jakab Szilárd

A gége ultrahangos vizsgálata lovakban

című kéziratát a Magyar Állatorvosok Lapjának szerkesztősége közlésre elfogadta.

**A publikáció a Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj támogatásával
(MÁEÖ 2020-21 / 159033) készült.**

Budapest, 2021. szeptember 24.



Balka Gyula
főszerkesztő



To Whom It May Concern,

Date: 31st of August 2021

Subject: Letter of Acceptance

Hungarian Eötvös State Scholarship

Scholarship Presence Certificate

I, undersigned (Dr. Szilárd Jakab, Head of Equine Clinic, Zetavet Clinic), hereby certify that dr. Kinga Joó (Szent István University Kaposvár Campus, Doctoral School of Animal Science) stayed at our institution between 01/04/21 - 31/08/21 with the aim to accomplish research.

Other remarks: Researches on strongylid egg count and upper airway functional disorders were performed during the scholarship programme.

Direct coordinates (email, telephone):

dr. Szilárd Jakab

+40745859720

dr.jakab.szilard@gmail.com



Dr. Szilárd Jakab
Head of Zetavet Clinic