

Kerecsensólymok vérparazita fertőzöttségének felmérése és egy új valós idejű PCR módszer tesztelése

Takács Péter

ELTE SEK BDPK | Biológia-angol szakos
középiskolai tanár, VI. évfolyam

Dr. Gyurácz József

ELTE SEK BDPK | Biológiai Tanszék

Dr. Erdélyi Károly

HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet |
Betegség ökológia és vadegészségügy témacsoport



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM



**HUN
REN**

ÁTKI

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
<i>1.1. A témaválasztás indoklása</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Vérf paraziták és jelentőségük</i>	<i>3</i>
<i>1.3. Ragadozómadarak vérf parazitái</i>	<i>5</i>
<i>1.4. Vérf paraziták diagnosztikájának problémaköre</i>	<i>7</i>
2. Célkitűzések	9
3. Anyagok és módszerek	9
<i>3.1. Referenciaminták</i>	<i>9</i>
<i>3.2. Mintavételezés</i>	<i>11</i>
<i>3.3. Mintaelőkészítés</i>	<i>11</i>
<i>3.4. DNS-kivonás</i>	<i>12</i>
<i>3.5. PCR-eljárások</i>	<i>13</i>
<i>3.6. Adatok feldolgozása</i>	<i>14</i>
4. Eredmények	15
<i>4.1. Referenciaminták PCR-eredményei</i>	<i>15</i>
<i>4.1. Kerecsensólymok vérf parazita fertőzésének felmérése</i>	<i>18</i>
5. Diskusszió	19
<i>5.1. Referenciaminták PCR-eredményei</i>	<i>19</i>
<i>5.2. Kerecsensólyom fiókák vérf parazita fertőzöttsége</i>	<i>19</i>
6. Összefoglalás	20
7. Köszönetnyilvánítás	21
8. Forrás és irodalomjegyzék	21

1. Bevezetés

1.1. A témaválasztás indoklása

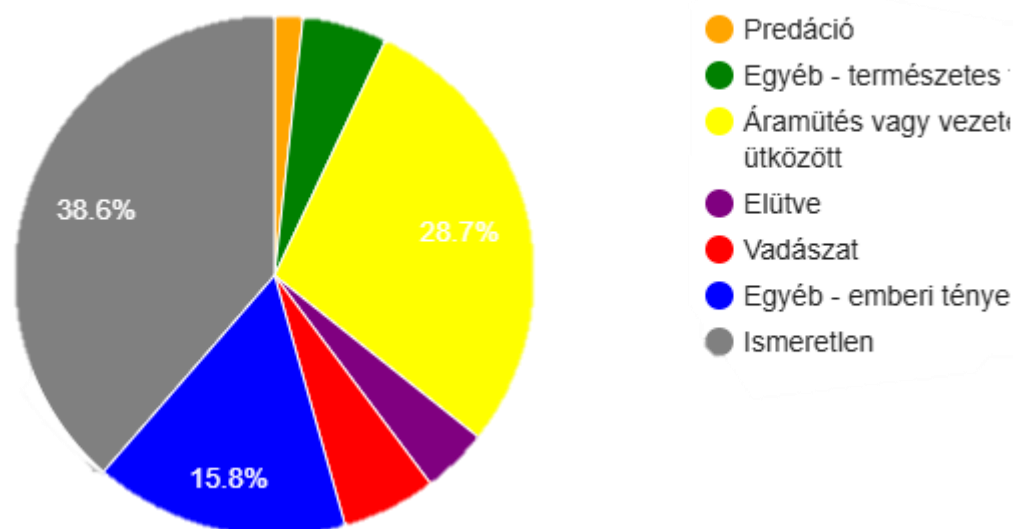
A pályamunkám címében szereplő kerecsensólyom (*Falco cherrug*) egyike Magyarország legnagyobb természetvédelmi értékeinek (1. kép). Mi sem bizonyítja ezt jobban, mint pénzben kifejezett természetvédelmi értéke (1 millió forint), mely a legmagasabb kategóriába esik. Ráadásul a hazai természetvédelemre különösen fontos feladatként hárul ezen eurázsiai elterjedésű faj védelme, hiszen áréájának legnyugatibb területeit a Kárpát-medencében éri el.



1. kép: Kerecsensólyom (*Falco cherrug*) fiatal példánya

A kerecsensólyom európai állományai csökkenő trendet mutatnak, egyedül hazánkban tapasztalható populációjának enyhe növekedése (Szép et al. 2022). Bár ez egy megnyugtatóan hangzó adat - az előbb említettek oka ugyanis a magyarországi fajvédelmi intézkedések sikeressége -, hátra dőlni mégsem szabad. A fajt veszélyeztető tényezők közül kiemelendők az antropogén hatások (fészkelő- és táplálkozóhelyek elpusztítása, vagy feldarabolása, áramütés, mérgezés, gázolás, sólymáztat). Ez aggodalomra adhat okot, hiszen számos szerző utal arra, hogy azok a populációk, melyek az élőhelyek degradációja, vagy fragmentációja miatt szenvednek, nagyobb parazitanyomásnak vannak kitéve, ezáltal pedig módosulhat az adott

gazda-parazita rendszer egyensúlya (Alrefaei et al. 2022). Ráadásul e ragadozót potenciálisan fenyegető faktorok jó része ismeretlen a megjelölt egyedek kézrekerülési adatai alapján (1. ábra).



1. ábra. Jelölt kerecsensólymok kézrekerüléseinek körülményei (forrás: <https://mme.hu/magyarorszagmadarai/madaradatbazis-falche> utolsó elérés: 2025.01.11.)

Egy hosszútávú, sikeres védelmi terv megvalósításának első lépése a veszélyeztető tényezők minél pontosabb ismerete és felmérése. Számos ismertebb fertőző ágens mellett (pl. madárinfluenza, stb.), potenciális veszélyforrások lehetnek olyan kórokozók is, mint például a madár maláriát okozó eukarióta egysejtűek, a *Plasmodium*-, a *Haemoproteus*- és a *Leucocytozoon* fajok. Az említett paraziták terjesztését ízeltlábú vektorok végzik, a patogének pedig gazdaszervezetük vérésejtjeit megszállva teljesítik életmenetüket.

E kórokozók kedvezőtlenül képesek befolyásolni gazdaszervezeteik fitneszt és túlélését, végső soron átírhatják azok földrajzi elterjedését (Ashgor et al. 2011). A betegség következtében gyengeség és anémia (vérszegénység) alakulhat ki, amely súlyos esetben halálos kimenetelű is lehet. Egy olyan fajnál, mint a kerecsensólyom, amely évente egyszer költ és nagyjából 3-5 fiókát nevel (Haraszthy, 2019), különösen fontos ezt szem előtt tartani.

A felsoroltak alapján nyilvánvaló természetvédelmi érdek, hogy az említett paraziták esetleges jelenlétét, kumulatív hatását diagnosztikai eljárásokkal minél pontosabban, megbízhatóbban és lehetőleg minél gyorsabban legyünk képesek vizsgálni. Ennek elérése érdekében fontos lehet

különböző új típusú PCR-módszerek és protokollok tesztelése, összehasonlítása (Bell et al. 2015) és rendszerbe állítása.

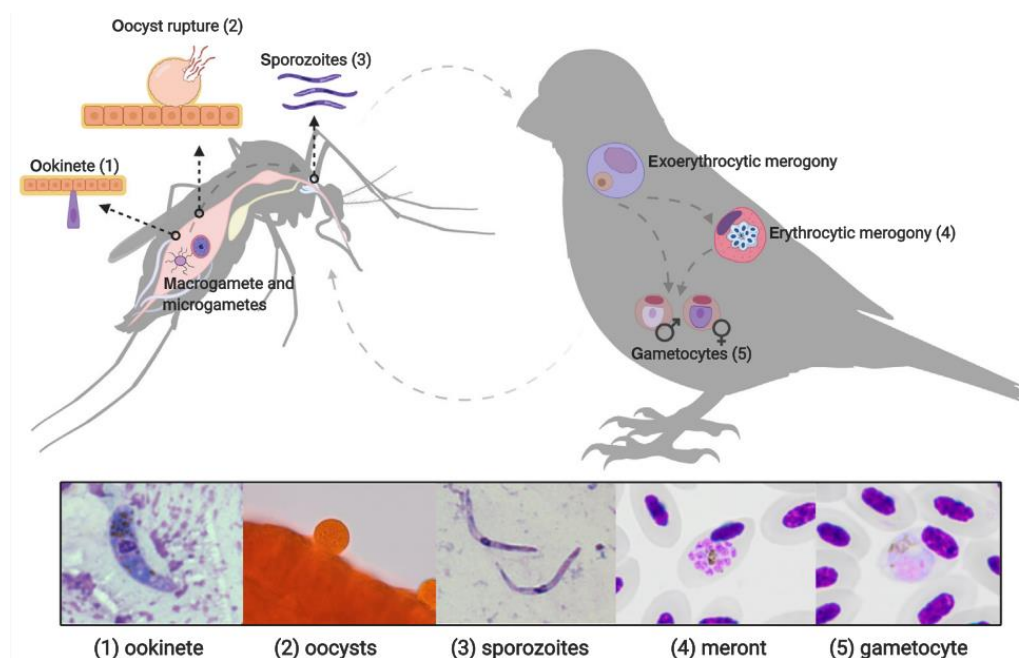
Megjegyzendő továbbá, hogy az ilyen jellegű kutatásokkal betekintést nyújthatunk például a malária kórokozójának terjedésébe, betegség ökológiájába. Ennek humánegészségügyi jelentősége is lehet, hiszen az emberi maláriát is *Plasmodium*-fajok okozzák, melyek közeli rokonai a nemzetség madarakban élősködő tagjainak.

1.2. Vérparaziták és jelentőségük

Az élősködő életmódú élőlények sajátsága, hogy gazdaszervezeteiket kizsákmányolják, az ő anyagaikat hasznosítják, ezáltal egy kizárólag egyoldalúan előnyös, tartós kapcsolatot alakítanak ki a gazdafajok populációival. A gazdák számára a kapcsolat hátránnyal jár, hiszen parazitáik csökkentik az egyedek túlélési esélyeit illetve rátermettségét (azaz fitneszt), utóbbi révén hatást gyakorolva az adott állományra (Valkuniuas, 2005).

A madárvilág egyik legelterjedtebb és a tudományos figyelem által gyakran középpontba helyezett élősködő a eukarióta (sejtmaggal rendelkező) egysejtű vérparaziták, melyek a gazdaszervezetek vérének alakos elemeit támadva maláriát, vagy malária-szerű kórképeket okoznak. Legjelentősebb képviselőik az *Apicomplexák* törzsébe, *Haemosporidiák* rendjébe tartozó három nemzetség, a *Plasmodium*-, *Haemoproteus*- és *Leucocytozoon*-fajai.

E paraziták terjesztését ízeltlábú vektorok végzik. A *Plasmodium*okat leginkább *Culex*-csípőszúnyogok, a *Haemoproteus*okat törpeshúnyogok (*Ceratopogonidae*) és kullancslegyek (*Hippoboscidae*), míg a *Leucocytozoon*okat púposszúnyogok (*Simuliidae*) viszik át egyik egyedről a másikra (Greenberg & Mossa, 2015). Életmeneteik komplexek, jellemzőjük, hogy az ivartalan, aszexuális szaporodásuk általában a gazdaszervezetben (vérsejtekben), míg ivaros folyamataik a vektorokban (bélfalban) zajlanak (2. ábra).



2. ábra: *Plasmodium relictum* életciklusa (forrás: de la Puente et al. 2021)

A sikeres fertőzéshez szükséges, hogy miután a vektor fertőzött gazdaegyedből táplálkozott, újabb vérszíváskor az ízeltlábúak nyálmirigyéből egy addig egészséges szervezetbe jussanak az egysejtű patogének. A *Plasmodium*-fajok a gazdaegyedek vörösvérsejtjeiben (*erythrocytáiban*) szexuális és aszexuális szaporodást egyaránt végeznek és a madarak maláriájáért felelősek (Ishtiaq et al. 2017). A betegség tünetei széles skálán mozognak, az akut (gyors lefolyású), aszimptomatikus esektől, az *anaemiával* (vérszegénységgel), *dyspnoéval* (nehézlégzéssel), általános levertséggel járó krónikus lefolyásig, mely szélsőséges esetben akár az egyedek halálával is végződhet (Tablott & Ketterson, 2023). A *Haemoproteus*-fajok gazdaegyedekbe jutva szintén a vörösvérsejtben végeznek gaméta-képzést, ezzel malária-szerű kórképet, *haemoproteosist* okozva, míg a *Leucocytozoon*-ok a vörösvérsejt mellett a fehérvérsejteket (*leucocyták*) is megtámadják (Ishtiaq et al. 2017). A gazdaszervezetek túlélése fajtól és egyéni immunstátustól is függ.

A természetben általában egyensúlyt tart fenn egymással a gazdafaj és a parazita populációja, de vérélősködőkre visszavezethető járványszerű elhullásról madarak körében több tanulmány is beszámol (pl. Remple, 2004). Különös jelentősége van ennek izoláltan szaporodó, vagy kis egyedszámban létező madárállományok esetében.

Amellett, hogy terepi kutatásokat végezni madarak vérélősködőről természetvédelmi érdek, az eközben felhalmozott tapasztalatok felhasználhatóak egyéb gazda-parazita rendszerek jellemzésére, ezzel még inkább indokoltá téve jelen dolgozat elkészültét.

1.3. Ragadozómadarak vérparazitái

A ragadozómadarak (pl. *Accipitridae*, *Falconidae*) nélkülözhetetlen szerepet töltenek be társulásaikban. Ezek az állatok általában a tápláléklánc csúcsán helyezkednek el, egészségi állapotuk felméréssel lehetőségünk nyílik a körülöttük lévő életközösség egészségi állapotának felmérésére is (Cooper, 2002). Subaneg et al. (2024) e madárcsoportokat „ökológiai bioindikátoroknak” tartják, hiszen számtalan abiotikus és biotikus tényező (pl. mérgezések, fertőzések) felhalmozódása (bioakkumuláció) ezeket a fajokat érinti leginkább. Ez egyrészt felhívja a figyelmet a már hangsúlyozottakra, miszerint e taxonok megőrzésére kiemelt sérülékenyséjük folytán különös figyelmet kell fordítani a természetvédelemnek, másrészt arra is reflektál, hogy a ragadozómadarak „jelzőrendszerekként” betekintést nyújtanak az ökoszisztéma állapotába. A fent említetteken kívül is számos szerző foglal állást a ragadozómadarak fertőző betegségeiről szóló kutatások fontosságáról, ezért ellentmondásként hat, hogy mennyire keveset tudunk többek között e húsevők vérparazitáiról (Paperna et al. 2007). Ennek számos okát feltételezik a kutatók, Alrefaei et al. (2022) kiemelik, hogy a többi madárcsoporttal (énekesmadarak és vízimadarak) ellentétben a ragadozók befogása sokszor körülményes és nehéz, emiatt nagyon nehéz magas mintaszámot elérni aktív nyomonkövetés (*active surveillance*) jellegű kutatásokhoz. A vizsgálatokat tovább nehezíti, hogy a fertőzések passzív monitoringjához (*passive surveillance*) meglehetősen kevés, az adott fertőző betegség miatt elpusztult tetem jut el a kutatóintézetekhez, hiszen e fajok nagy része nem tűri a bolygatást és az emberi jelenléttől távol él, illetve szaporodik.

A jelen dolgozathoz hasonló kutatások lebonyolításához elengedhetetlen fontosságú, hogy ismerjük az adott gazdafaj (vagy akár a rokon fajok) érintettségét. A fentebb tárgyaltak miatt azonban viszonylag keveset tudunk a világ (és különösen Európa) ragadozómadarainak vérparazita-fertőzöttségéről. A nemzetközi szakirodalom vonatkozó publikációinak nagy része Ázsiában és Észak-Amerikában élő, a kerecsensólyommal azonos genusba (*Falco*) sorolt sólyomféléket érint. Például Subaneg et al. (2024) tájféldi tanulmányukban kimutatták, hogy a vándorsólyom (*Falco peregrinus*) - nem meglepően - fogékony a *Plasmodium*-fertőzésre. A faj *Haemoproteussal* fertőzött, arab országokban fogságban tartott példányairól is született feljegyzés (Pemple, 2004), illetve *Leucocytozoon*-fertőzésre PCR-pozitív brazil egyedekről is (Harl et al. 2022). A vándorsólyom mellett a litván és francia kabasólymokból (*Falco subbuteo*) és spanyol Eleonora-sólymokból (*Falco eleonora*) is mutattak ki *Haemoproteusokat* (Harl et al. 2022).

Harl et al. (2022) összefoglalójából kiderül, hogy az USA-ban számottevő prevalenciával van jelen a *Leucocytozoon californica* a tarka vércsékben (*Falco sparvensis*) (Walther et al. 2016). Bár a szerzők felvetik annak a lehetőségét, hogy ezen élősködő eurázsiai ragadozóknál is valószínűleg megtalálható, a tengerentúl messzinek tűnik ahhoz, hogy az előbb említett kórokozót relevánsnak tekintsük. Nardoni (2020) azonban olaszországi kis sólyomból (*Falco colombarius*) is kimutatta a *L. californicát*, ráadásul a madár *Haemoproteus*-szal mutatott koinfekciót (az egyed két kórokozóval való szimultán fertőződését). Svobodová, et al. (2015) *Trypanosomákat* és *Haemosporidiákat* találtak karvaly (*Accipiter nisus*) fiókákban.

Kisebb testű sólymokról is ismert, hogy fogékonyak vérparazitákra. Számos országban (Kína, Ausztria, Németország, Japán) vörös vércséből (*Falco tinnunculus*) *Haemoproteusokat*, spanyolországi fehérkarmú vércséből (*Falco neumanni*) *Haemoproteusokat* és *Leucocytozoonokat* is mutattak ki (Huang et al. 2020; Harl et al. 2022). A hazai vörös vércsék is fertőzöttek *Plasmodium* és *Haemoproteus* fajokkal (Dr. Erdélyi Károly szóbeli közlése). Az egysejtű vérparazitákról tudvalévő, hogy a madárvilág szinte összes csoportját érintik, nem meglepő tehát, hogy az általunk vizsgált sólyomfaj rokonai sem mentesülnek ez alól.

A kerecsensólyom fogékonyságát vérparazitákra leginkább arab (pl. Szaúd-Arábia) sólymásmadarak példája igazolta (pl. Alefari et al. 2022). Szintén fogságban tartott madarokról tudjuk, hogy a *Plasmodium*-fertőzés halálos kimenetelű is lehet a kerecsensólyomnál. Egy olaszországi madárkórházban ugyanis 2006-ban figyeltek fel halmozódó mortalitásra a rőpdékben gyógyuló ragadozók körében. A bagoly- és sólyomtetemeteket megvizsgálva utóbbi csoportból egy vándorsólyom, két kerecsensólyom és egy kerecsensólyom-északi sólyom hibrid esetében igazolták *Plasmodiumok* jelenlétét (Scaglione et al. 2007). Ez az eset nem csak arra mutatott rá, hogy a tárgyalt sólymok egészségét komolyan veszélyeztethetik egysejtű élősködők, hanem figyelemfelkeltésként is szolgál, hogy a madárkórházakban szabadtéri rőpdékben ápolt egyedek kitettsége nagyobb az ízeltábúak által terjesztett (*vector-borne*) betegségekre. Vadon élő kerecsensólymokról szintén a Közép-Keletről vannak információink. Például Remple (2006) az arab országokban befogott kerecsensólymok olyan magas fokú *Haemoproteus*-prevalenciáját találta, hogy publikációjában úgy értékelt, ritka, ha vérélősködő-mentes madár került kézre. Lierz et al. (2008) az Egyesült Arab Emírségekben befogott sólymok közül a kerecsensólyom vérparazitáltságát tapasztalták a legmagasabbnak, de egy Kínából származó vadon élő egyed *Haemoproteus*-fertőzöttségéről is született feljegyzés (Hunag et al. 2020).

A fenti példák arra mutatnak rá, hogy a kerecsensólyom fogékony gazdaszervezete a *Haemosporidiáknak*, tovább növelve e kutatás relevanciáját.

1.4. Vérparaziták diagnosztikájának problémaköre

Tekintve, hogy a tárgyalt vérélősködők egysejtűek, ráadásul endoparaziták (a gazda szervezetén belül élnek), megbízható kimutatásuk nem egyszerű feladat. Jelenlétük felkutatására alapvetően három eljárás használatos: mikroszkópia, hagyományos PCR és valós idejű PCR.

A mikroszkópos vizsgálat során a gazdaszervezetből vett vérből kenetet készítenek, azt Giemsa-festékkel megfestik majd fénymikroszkóp segítségével teszik láthatóvá a vérsejteket megszálló protozoákat. Ennek a módszernek azonban több feltétele is van, ami részben korlátozza az alkalmazását. Az alapszintű laboratóriumi felszereltség mellett ezek között említendő, hogy az élősködők meghatározása jelentős szakértelmet és tapasztalatot igényel, ráadásul rendkívül időigényes (Hellgren et al. 2004; Bell et al. 2015). A mikroszkópia szenzitivitása (érzékenysége) viszonylag alacsony, különösen, ha parazitémia (élősködők szervezeten belüli szétterjedése a keringési rendszer által) is alacsony. A tapasztalatok szerint, ha a parazitémia kb. 40 fertőzött vörösvérsejt/ μ l alatti (tehát kb. 10 ezer *erythrocytára* esik 1 egysejtű), akkor megnő a hamis negatív (fals negatív) eredmények száma. Ez azért probléma, mert ha a minták között több látens, vagy akut maláriás egyed található, akkor a prevalencia meghatározásánál jelentősen torz eredmény kapható (Ishtiaq et al. 2017). A módszer valódi korlátját viszont a morfológiai alapú fajhatározás objektív határai és a fent részletezett logisztikai tényezői jelentik, amelyeket a molekuláris módszerekkel tudunk kiegészíteni és részben meghaladni.

A polimeráz láncreakciós (PCR) eljárások a molekuláris biológiai módszerek egyik leginkább elterjedt képviselői. A módszer lényege egy célzott nukleinsav (DNS, RNS) szekvencia felszaporítása meghatározott idejű és hőmérsékletű termociklusok alatt. A reakció alapvetően három lépésből áll: a denaturáció alatt a DNS kettős hélixét összetartó, szomszédos nukleobázisok közti hidrogén-híd kötések felbomlanak, az anellálás (*annealing*) során a primerek specializáltan a célszekvenciához kötődnek, majd az extenzió (más néven polimerizáció) során megtörténik a „lánc hosszabítás”, azaz a polimeráz enzim új szálakat szintetizál. Amennyiben a nukleinsav-tartalmú mintában jelen van az amplifikálandó szakasz, a DNS termékek mennyisége a reakció előrehaladtával exponenciálisan növekszik. A *Haemosporidiák* PCR-alapú diagnosztikája leggyakrabban a kellően konzervált mitokondriális genomjuk citokróm b génjén alapul (Hellgren et al. 2004).

A fenti leírás tulajdonképpen teljes mértékben igaz a hagyományos, azaz végpont, vagy konvencionális PCR-re (*endpoint-PCR*), mely után a vizualizáció agaróz gélelektroforézissel történik.

A PCR-eljárásnak azonban ma már számtalan változata ismert. Széles körben használtak a nested-PCR-ek (fészkes PCR). A módszer célja, a pontosság és érzékenység növelése oly módon, hogy két primerpárt használunk két külön PCR-reakcióban. Az elsőben a primerek egy hosszabb célszekvenciát szaporítanak fel, amely a második PCR-reakció (e terméken belül helyezkedő) primerjeinek szolgál templátként, amelyek így specifikusabban kötődve amplifikálják a célszekvenciát, redukálva a további aspecifikus „kísérő” szekvenciák sokszorozódásának valószínűségét (Chang-Hui Shen, 2023). A tárgyalt vérparaziták kimutatására szolgáló nested-PCR-ek közt legszélesebb körben használtak Waldenström et al. (2004) és Hellgren et al. (2004) protokolljai.

Szintén a polimeráz láncreakción alapul a valós-idejű PCR (real-time PCR, vagy quantitative, azaz qPCR). E módszer abban tér el a fent tárgyaltaktól, hogy a primerek mellett fluoreszcens probeokat, vagy fluoreszcens festéket igényel. Ennek jelentősége, hogy PCR gép (thermocycler) számítógépes programja (pl. az általunk is használt Q Rex) segítségével a reakció előrehaladtával nyomon lehet követni az amplifikált DNS mennyiségét. Ez annak köszönhető, hogy a ciklusok alatt a nukleinsav mennyiségi változása a fluoreszcens jel intenzitásának változását indikálja. A vérparaziták kimutatására szolgáló qPCR-ek közt kiemelendők a Bell et al. (2015) és Huang et al. (2020) által kidolgozott eljárások.

A PCR-alapú diagnosztikai módszerek komoly előnyei a magas fokú specificitás és szenzitivitás ami lehetővé teszi alacsony parazitémia kimutatását is, valamint az időhatékonyság (Applied Biosystems, 2023). Szintén mellettük szól, hogy a parazitákat a genetikai anyaguk alapján akár faji szinten is elkülöníthetjük. A PCR-rel amplifikált, majd meghatározott bázisrendű DNS-szakaszok összehasonlíthatók a madarak vérparazitáinak szekvenciáit összegyűjtő MalAvi adatbázisban található minták adataival (Bensch et al. 2009). A PCR-módszerek hátlütője lehet, hogyha nem megfelelő a minták előkészítése (pl. nukleinsav extrakció), illetve az, hogy a nested-PCR esetében magasabb a kontamináció esélye.

Ahhoz, hogy minél pontosabb képet kapjunk az adott eljárások általános diagnosztikai értékéről és pontosságáról, elengedhetetlen a protokollok összehasonlítása és a megerősítő vizsgálatok elvégzése, mint ahogyan az jelen dolgozatban is tárgyalásra kerül.

2. Célkitűzések

A Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME) Ragadozómadár-védelmi Szakosztályának és az Európai Unió SakerRoads Life projektjének célkitűzése a magyarországi kerecsensólyom populációt veszélyeztető tényezők felmérése és kezelése (Bagyura et al. 2023). E komplex feladatkör egyik szelete a mortalitás-monitoringból, valamint a faj egyedeinek általános egészségi állapotának felméréséből, fertőző ágensek (különböző vírusok, baktériumok, gombák és protozoák) előfordulásának feltérképezéséből áll.

Jelen dolgozatom célja 2024-ben kelt hazai kerecsensólyom fiókák vérparazita fertőzöttségének felmérése, tehát a madarak vérmintáinak vizsgálata a három tárgyalt *Haemosporidia* nemzetség tagjaira.

Célul tűztük ki továbbá egy, nemrég publikált qPCR-protokoll (Huang et al. 2020) specificitásának és szenzitivitásának meghatározását. Az eljárás specificitása a ténylegesen negatív minták pontos azonosításának mércéje, hogy ezáltal minimalizálni tudjuk a hamis pozitív (fals-pozitív) eredményeket. A szenzitivitás (érzékenység) pedig a ténylegesen pozitív esetek kimutatására való képesség, célja a hamis negatív (fals-negatív) eredmények kizárása, különösen az alacsony intenzitású fertőzéseknél. Ahhoz, hogy képet kapjunk e módszer hatékonyságáról, egy már bevált nested-PCR (Waldenström et al. 2004) referenciamintákon tapasztalt eredményeivel hasonlítottuk össze.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Referenciaminták

Ahhoz, hogy a Huang et al. (2020) protokollján alapuló rendszer diagnosztikai pontosságát elemezzük, referenciamintákon hasonlítottuk össze specifikusságát és érzékenységét egy már széles körben régóta használt nested-PCR (Waldenström et al. 2004) eredményeivel.

Az 1. táblázat által összefoglalt mintákat azért tekinthetjük referenciának, mert a pozitívakból már meghatározott szekvenciák álltak rendelkezésünkre (tehát a táblázatban feltüntetett paraziták jelenléte teljes mértékben bebizonyosodott), a negatív minták pedig semelyik korábban alkalmazott eljárás során sem mutattak DNS-amplifikációra utaló nyomokat.

	Jelölés	Gazdafaj	PCR (Waldenström et al. 2004)	MALAVI törzs azonosító (nukleotid szekvencia egyezés alapján)	Vérparazita-faj
1.	D13	dolmányos varjú	pozitív	GRW11	<i>Plasmodium relictum</i>
2.	D56	dolmányos varjú	pozitív	SGS1	<i>Plasmodium relictum</i>
3.	D34	dolmányos varjú	pozitív	LINN1	<i>Plasmodium matutinum</i>
4.	D66	dolmányos varjú	pozitív	DELURB4	<i>Plasmodium sp.</i>
5.	D79	dolmányos varjú	pozitív	hiányos szekvencia (SGS1, SYCON02, PARUS75, PADOM38) L_COCOR11 ReverseED	<i>Plasmodium sp.</i> <i>Leucocytozoon sp.</i>
6.	KT2	szarka	pozitív	H-BLUTI09	<i>Haemoproteus sp.</i>
7.	NR12	dolmányos varjú	pozitív	H-CXPIP18 L_GAGLA06	<i>Haemoproteus sp.</i> <i>Leucocytozoon sp.</i>
8.	NR14	dolmányos varjú	pozitív	L-COCOR13	<i>Leucocytozoon sp.</i>
9.	D1	dolmányos	negatív		
10.	D54	dolmányos	negatív		
11.	KS22 (22)	kerecsensólyom	negatív		
12.	KS32 (28)	kerecsensólyom	negatív		
13.	KS62 (50)	kerecsensólyom	negatív		

1. táblázat: A PCR-eljárások összehasonlításához felhasznált referenciaminták jegyzéke (az 5 és 7. sorszámú dolmányos varjú esetében koinfekció mutatkozott)

3.2. Mintavételezés

Kutatásom részeként 58 kerecsensólyom fióka vérmintáját elemeztük. A fiókák egyrészt alföldi (pl. Borsodi Mezőség, Jászság) területeken lévő közép feszültségű villanyoszlopokra helyezett költőládákban (2. kép), másrészt fákon elhelyezkedő fészkekben illetve költő-tálcákban keltek. Tekintve, hogy jelen tanulmányom egy, a dolgozat elkészültéig javában zajló európai szintű projekt részeként íródott egy fokozottan védett madárfajról, a fészkek pontos helyét etikai okokból nem közlöm. A vérvételt állatorvosok (Dr. Sós Endre, Dr. Sós-Koroknai Viktória és konzulensem, Dr. Erdélyi Károly) végezték a madárvédelmi és etikai szabályoknak megfelelően. A fiókákból 0,6 ml vér került levételre a felkari visszérből (*vena brachialis*).



2. kép: Kerecsensólyom fiókák közép feszültségű oszlopra kihelyezett költőládában

3.3. Mintaelőkészítés

A minták vizsgálatát a HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézetben végeztem. Az alvadt vér - szérum szétválasztása centrifugálással történt (10 perc/4000 rpm), melynek során a vörösvérsejteket is tartalmazó véralvadék az eppendorf-csövek aljára süllyedt, míg a vérszérum (vérsavó) a felülúszót alkotta. Erre az eljárásra azért volt szükség, mert a projekt keretein belül több patogénre teszteltük a mintákat és az adott kórokozók kimutatása eltérő típusú mintát igényel (pl. Nyugat-Nílusi vírus ellenanyagok kimutatása vérszérumból). A mintákat a felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

3.4. DNS-kivonás

A vérárvadékból való DNS-kivonás a Zymo Research Quick-DNA/RNA™ Viral Kittel történt (Zymo Research, 2023). Ennek lépései a következők voltak:

I. Puffer előkészítés

A 100 ml-es Viral DNA/RNA pufferhez 500 µl 0,5 %-os béta-merkaptóetanolt adagoltunk, illetve 96 ml 100%-os etanolt adtunk a Viral Wash pufferhez. A liofilizált proteináz-K enzimet feloldottuk és 1040 µl tároló puffert (Storage Buffer) adtunk hozzá, majd a kapott oldatot összekevertük.

II. Mintaelőkészítés

A mintákat nagyjából 24 °C-on nukleázmentes-vízzel (1:1) két 3 mm átmérőjű acélgolyóval homogenizáltuk (3 perc/50 Hz). Ezt követően a homogenizált mintákból 200 µl-t pipettáztunk át új 1,5 ml-es eppendorf csövekbe. E mintákhoz 20 µl proteináz-K-t adtunk (v/v= 5), szuszpendáltuk és szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 percig. Ehhez adtunk hozzá 200 µl DNA-RNA 2x Shield™-et, majd alapos összekeverés után 14 percig 40 °C-on inkubáltuk.

III. Nukleinsav tisztítás

Első lépésként 800 µl Viral DNA/RNA puffert adtunk a mintákhoz, majd alaposan összekevertük őket. A szuszpenziókat egyesével gyűjtőcsövekbe helyeztük (Zymo-Spin™ IIC-XLR Column in a Collection Tube) és az oszlopokra pipettáztuk, majd centrifugáltuk (2 perc/11000g). A centrifugálás után az oszlopokat új gyűjtőcsövekbe helyeztük. Az oszlopokra 500 µl Viral Wash puffert adtunk és újra centrifugáltuk (30 másodperc/11000g), majd az oszlopokat ezúttal is új gyűjtőcsövekbe helyeztük át. Ezt a lépést megismételtük. Következőben 500 µl abszolút etanolt pipettáztunk az oszlopokra, majd centrifugáltuk őket (1 perc/11000g). Az oszlopokat nukleázmentes eppendorf csövekbe helyeztük át és 50 µl DNáz/RNáz mentes vizet adagoltunk az oszlopokra, majd centrifugáltuk őket (30 másodperc/11000g). A mintákban lévő DNS tisztaságát és koncentrációját spektrofotométerrel leérték (Thermo Scientific™ SPECTRONIC 200™), majd -80 °C-on tároltuk.

3.5. PCR-eljárások

Nested-PCR

A kerecsensólyom fiókák véreinek haemoparazitákra való szűréséhez Waldenström et al. 2004 protokollját vettük alapul. A PCR-reakciókhoz a PCRBIO Taq Mix™ kitet használtuk (<https://pcrbio.com/app/uploads/PB10.12-PCRBIO-Taq-Mix-v1.4.pdf> utolsó elérés: 2025.01.11.).

Első PCR-reakció

Az első PCR-reakció célja a paraziták mitokondriális genomjában található citokróm b gén egy 580 bázispárnyi szakaszának felsokszorozása. Az eljárásban alkalmazott törzsoldatba 9,50 µl nukleázmentes vizet; 12,5 µl PCRBIO Taq Mixet; 0,5 µl HaemNF és HaemNR2 primert, valamint 2 µl templát DNS-t adagoltunk.

E PCR termociklusai a következők: 95 °C 1 percre (aktiváció), 95 °C 15 másodpercre (denaturáció), 48 °C 15 másodpercre (anellálás), 72 °C 30 másodpercre (extenzió) 30 cikluson át, majd 72 °C 5 percre.

Második PCR-reakció

A második PCR-reakció törzsoldatába 9,50 µl nukleázmentes víz; 12,5 µl PCRBIO Taq Mix; 0,5 µl HaemF és HaemR2 primer, valamint 2 µl templát DNS került.

Termociklusai a következők voltak: 95 °C 1 percre, 95 °C 15 másodpercre, 54 °C 15 másodpercre, 72 °C 30 másodpercre 35 cikluson át, majd 72 °C 5 percre.

A klasszikus PCR vizsgálatokat Biometra TAdvanced thermocycler készüléken (Analytik Jena GmbH) végeztük.

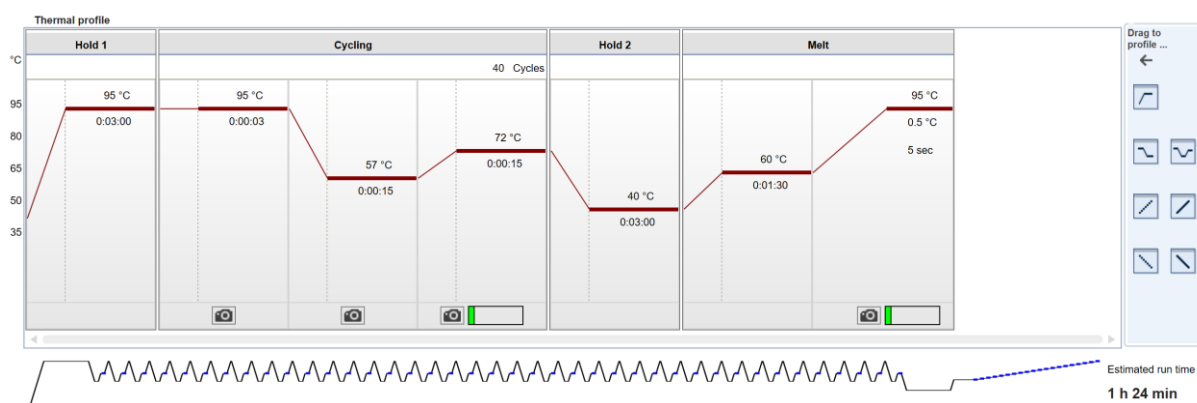
Valós idejű PCR

A valós idejű PCR-eljáráshoz Huang et al. (2020) protokollját vettük alapul. A reakcióhoz a Takyon™ No Rox SYBR® Core Kit dTTP Blue B0205-öt, illetve a 3524F és 3655R primereket használtuk. A pontosabb elemzés érdekében két PCR-reakciót végeztünk, az egyiknél a primerek végkoncentrációja 50 nanomól (nM), míg a másikonál 100 nm volt.

Utóbbi törzsoldatába 13,1 µl nukleázmentes víz, 2 µl 10-szeresre hígított puffer; 0,6 µl hígított SYBR, 1 µl MgCl₂ (50mM), 0,8 µl dNTP (5mM); 0,1 µl Takyon™ enzim (5U/µl), 0,2 µl

forward és reverse primer, illetve 4 µl templát DNS került. Előbbibe pedig 13,30 µl nukleázmentes vizet, 2 µl 10-szeresre hígított puffert; 0,60 µl hígított SYBR-t, 1,00 µl MgCl₂-ot (50mM), 0,8 µl dNTP-t (5mM); 0,10 µl Takyon™ enzimet (5U/µl), 0,10 µl forward és reverse primert, valamint 2 µl templát DNS-t adagoltunk.

A termociklusok a következők voltak: 95 °C 3 percig (aktiváció), 95°C 3 másodpercig (denaturáció), 57 °C 15 másodpercig (anellálás), 72 °C 15 másodpercig (extenzió) 40 cikluson át (3. ábra).



3. ábra: Az általunk elvégzett qPCR hőprofilja.

A valós idejű PCR vizsgálatokhoz Rotor-GeneQ (Qiagen Inc.) qPCR készüléket használtunk és a reakciók eredményeit a Qiagen által biztosított Q-Rex szoftverrel elemeztük.

3.6. Adatok feldolgozása

A két PCR-eljárás specificitásának és szenzitivitásának összehasonlításához 2x2 kontingencia táblázatot szerkesztettem a qPCR eredményeiről (2. táblázat).

	Jósolt pozitív mintaszám	Jósolt negatív mintaszám
Tapasztalt pozitív mintaszám	VP	HP
Tapasztalt negatív mintaszám	HN	VN

2. táblázat: Kontingencia táblázat a tapasztalt és jósolt eredményekről

Valós pozitív (VP): a helyesen pozitívnak értékelt minták száma

Hamis pozitív (HP): a helytelenül pozitívnak értékelt minták száma

Valós negatív (VN): a helyesen negatívnak értékelt minták száma

Hamis negatív (HN): a helytelenül negatívnak értékelt minták száma

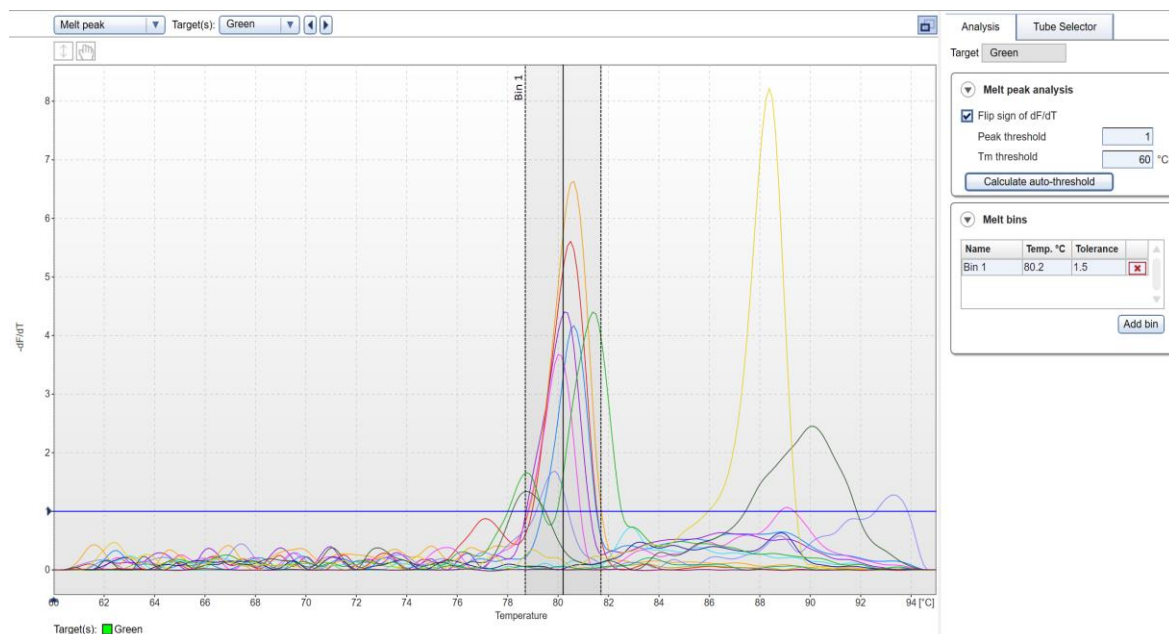
Az elemzést a WinEpi 2.0-val (<http://www.winepi.net/uk/> utolsó elérés: 2025.01.10.) végeztem el, 95%-os konfidencia szintet beállítva a nemzetközi szakirodalmakat alapul véve (de Blas et al. 2006).

4. Eredmények

4.1. Referenciaminták PCR-eredményei

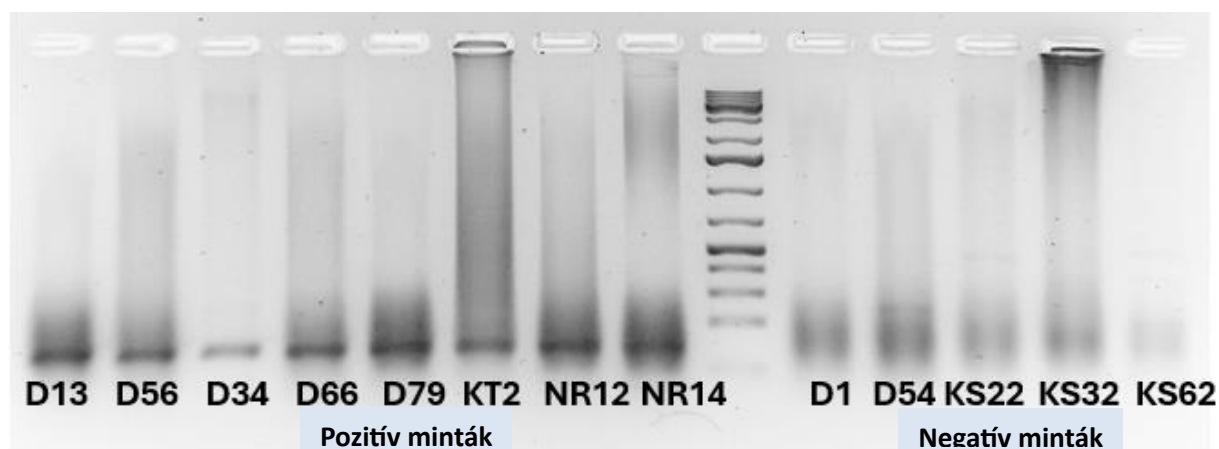
A Huang et al. (2020) protokollja alapján végzett PCR-ek mindegyike azokat a referenciamintákat találta pozitívnak, vagy negatívnak, melyeket Waldenström et al. (2004) PCR-je is (1. és 3. táblázat).

A qPCR termékek várható olvadáshő tartományának előzetes becsléséhez a uMelt Quartz (<https://dna-utah.org/umelt/quartz/> utolsó elérés: 2025.01.10.) szoftvert használtuk (Padmaja et al. 2022). Az NCBI GenBank LN835311.1 azonosítójú, *Plasmodium relictum* SGS1 törzs mitokondriális DNS-szekvenciájának a várható PCR termékkel homológ 130bp hosszú szakaszát felhasználva a uMelt elemzéssel (Unified SL (1998) modell) 81-81,5 °C olvadási hőmérsékletet csúcsot jeleztünk előre, amelyhez képest a valóságban mért értékek végül 1-1,5 °C-al alacsonyabbak lettek (4-7. ábra). Az 50 nM-os végkoncentrációjú primer párral végzett PCR-reakció olvadáshő grafikonjain látszik, hogy a pozitív minták (n=8) mindegyikének egyetlen csúcsa van (*Melt peak*), ráadásul ezek egy jól elkülönülő tartományba (*binbe*) esnek (4-5. ábra). Látható az is, hogy olvadáshő csúcsuk a rendszer által kalkulált statisztikai küszöb értéken felül található, tehát a PCR-reakció egyértelműen pozitívnak értékelhető. A negatív referenciaminták (n=5) a pozitív tartományban nem mutattak jellegzetes olvadáshő csúcsot (4-7. ábra) amit a specifikus méretű termékek hiánya is megerősített az elektroforézis során. Agaróz gélelektroforézissel kimutattuk, hogy a PCR-termékek mérete az elvárt 130 bázispárnak megfelelő, aspecifikus sávok pedig nem láthatóak a gélképen (3-4. kép).



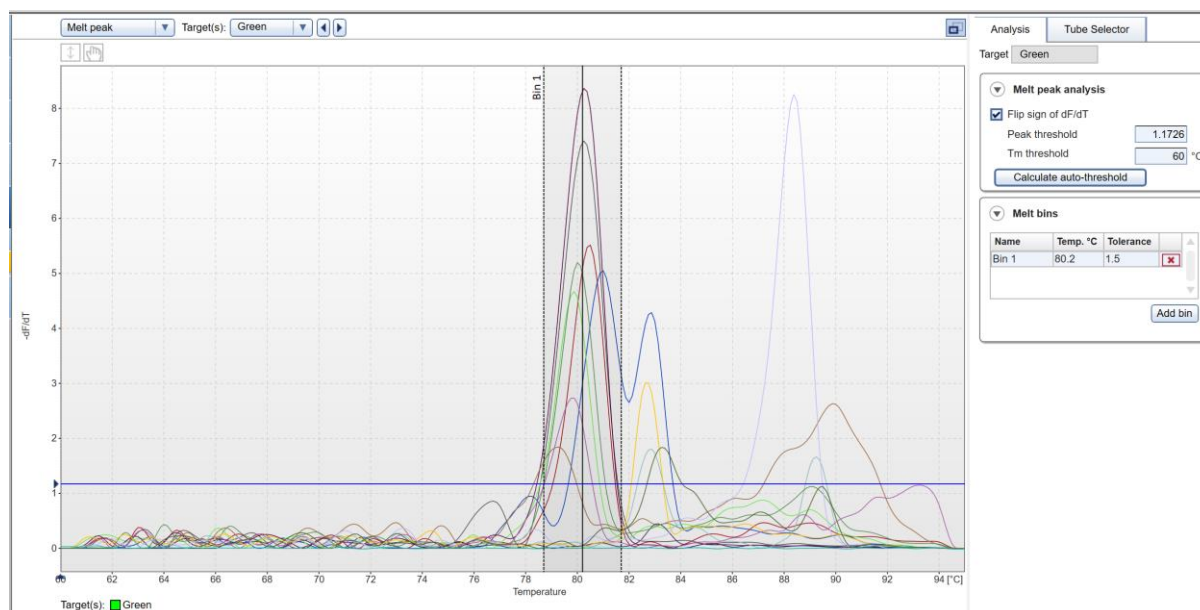
						Green			
Tube	Style	Sample name	Sample type	Genotype	Target	Bins	Bin peaks [°C]	Add. peaks [°C]	Flags
1	Red	D13p 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.5	--	--
2	Blue	D56p 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.6	--	--
3	Green	D34p 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	78.8 81.4	--	Multiple peaks
4	Purple	D66p 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.3	--	--
5	Orange	D79p+I 150nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.6	--	--
6	Dark Green	KT2h 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	78.8	90.1	Peaks without bin
7	Pink	NR12h+I 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.0	--	--
8	Light Blue	NR14h 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	79.9	93.3	Peaks without bin
9	Light Green	D1n 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	--	--	No peak
10	Cyan	D54n 50nM	Sample	--	Green	Bin 1	--	--	No peak
11	Dark Blue	KS22 (6024)n...	Sample	--	Green	Bin 1	--	--	No peak
12	Yellow	KS32 (6047)n...	Sample	--	Green	Bin 1	--	88.4	Peaks without bin
13	Teal	KS62 (6306)n...	Sample	--	Green	Bin 1	--	--	No peak
14	Maroon	NTC 50nM	NTC	--	Green	Bin 1	--	--	--

4-5. ábra: Az 50 nM-os végkoncentrációjú primer párokkal végzett PCR-reakció elemzése, olvadáshő analízise



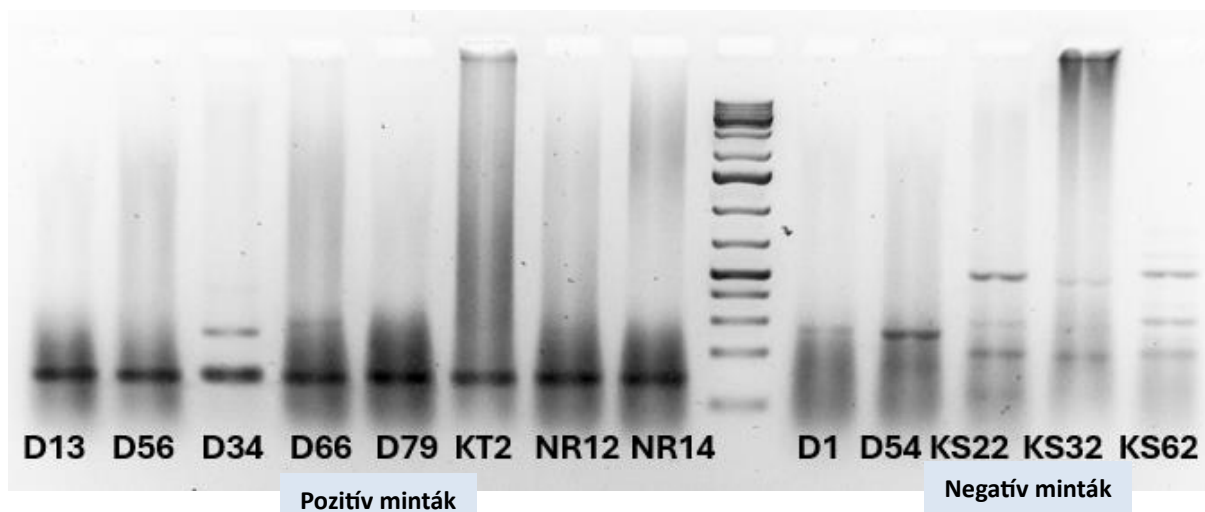
3. kép: Az 50 nM-os végkoncentrációjú primer párokkal végzett qPCR-reakció termékeinek utólagos vizualizációja agaróz gélelektroforézissel

A 100 nM-os végkoncentrációjú primerpárral elvégzett PCR olvadáshő elemzéséből is a fentebb tárgyaltak derülnek ki. Az olvadáshő csúcsok ez esetben is a várt tartományba esnek, bár itt két mintának két csúcsa látszik, melyet valószínűleg a primerek mennyisége okoz. Ennek ellenére a pozitív referencia minták olvadáshője meggyőzően szűk tartományon belülre esik (6-7. ábra). Az agaróz gélelektroforézis is megerősítette a specifikus termékek meglétét illetve a negatív kontrollok esetében azok hiányát, valamint az aspecifikus sávok mennyisége is minimális (4. kép).



						Green				
 Tube		Style	Sample name	Sample type	Genotype	Target	Bins	Bin peaks [°C]	Add. peaks [°C]	Flags
 15			D13p 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.3	--	--
 16			D56p 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.5	--	--
 17			D34p 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	81.0	82.9	Peaks without bin
 18			D66p 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	79.9	--	--
 19			D79p+I 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.3	--	--
 20			KT2h 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	79.3	89.9	Peaks without bin
 21			NR12h+I 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	80.0	--	--
 22			NR14h 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	79.9	--	--
 23			D1n 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	--	--	No peak
 24			D54n 100nM	Sample	--	Green	Bin 1	--	82.8	Peaks without bin
 25			KS22 (6024)n...	Sample	--	Green	Bin 1	--	82.9 89.3	Peaks without bin
 26			KS32 (6047)n...	Sample	--	Green	Bin 1	--	88.4	Peaks without bin
 27			KS62 (6306)n...	Sample	--	Green	Bin 1	--	83.3	Peaks without bin
 28			NTC 100nM	NTC	--	Green	Bin 1	--	--	--

6-7. ábra: A 100 nM-os végkoncentrációjú primer párokkal végzett PCR-reakció elemzése, olvadáshő analízise



4. kép: A 100 nM-os végkoncentrációjú primer párokkal végzett qPCR-reakció termékeinek utólagos vizualizációja agaróz gélelektroforézissel

A referencia mintákon elvégzett PCR-reakciók specifitására és szenzitivitására vonatkozó eredményeket a 3. táblázat foglalja össze. Az eljárás 8 valós pozitív, 5 valós negatív mintát mutatott ki, míg hamis negatív, vagy hamis pozitív eredmény nem volt. Ezek alapján a vizsgált qPCR módszernek mind a szenzitivitása, mind a specifitása 100%-os (3. táblázat).

	Nested-PCR pozitív	Nested-PCR negatív
qPCR pozitív	8	0
qPCR negatív	0	5

3. táblázat: A referencia mintákon elvégzett Huang et al. (2020) protokollján alapuló PCR-teszt eredményei

4.1. Kerecsensólymok vérparazita fertőzésének felmérése

Az 58 kerecsensólyom fióka vérminta a Waldenström et al. (2004) alapján összeállított nested-PCR-en 100%-a negatív eredményt hozott. Egyetlen fióka vérében sem mutattuk ki semelyik haemoparazita jelenlétét.

5. Diskusszió

5.1. Referenciaminták PCR-eredményei

Az általunk végzett Huang et al. (2020) alapján összeállított qPCR-eljárás referenciamintákkal történő összehasonlítása a módszer 100%-os szenzitivitását és specifitását eredményezte. A qPCR módszerrel a Waldenström et al. (2004) alapján elvégzett nested-PCR-rel teljesen megegyező eredményeket kaptunk. Ez alapján kijelenthető, hogy e frissen publikált protokoll általános diagnosztikai pontossága kiváló és minden bizonnyal magasabb mintaszámon is így teljesítene. A módszer feltételezhetően alkalmas lesz a kerecsensólyom minták vizsgálatára is. Szinte biztosra vehető, hogy amennyiben a jövőben magas incidenciával járó vérparazita-eredetű megbetegedést, vagy mortalitást tapasztalunk madaraknál, ezzel az eljárással megbízhatóan meg tudjuk becsülni a kórokozó prevalenciát és nyomon tudjuk követni a fertőzést.

5.2. Kerecsensólyom fiókák vérparazita fertőzöttsége

A Waldenström et al. (2004) alapján összeállított nested-PCR-rel 100%-os negativitást tapasztaltunk a kerecsensólyom fiókák vérparazita fertőzöttségének felmérésében. A madarakban tehát nem mutattunk ki sem *Plasmodium*, sem *Haemoproteus*, sem pedig *Leucocytozoon* fertőzést.

Bár ez egy jó hírek hangzó eredmény a kerecsensólyom fiókákra nézve, de ebből messzemenő következtetéseket nem érdemes levonni. Felmerülhet a kérdés, hogy mi okozhatja e paraziták jelenlétének hiányát a madarakban? Magyarázatként szolgálhat, hogy nem történt expozíció a vektorok és a gazdaegyedek között, hiszen nyilvánvaló, hogy előbbiek jelenléte és abundanciája kulcstényező. A Gutiérrez et al. (2015) által vizsgált Eleonora-sólyom populáció fiókáinak körében a miénkhöz hasonló eredményeket tapasztaltak; kizárólag az adult madarak közt voltak fertőzöttek. A szerzők ezt azzal magyarázták, hogy azokon az élőhelyeken, ahol e ragadozó költ, nem találhatók meg a paraziták terjesztését végző vektorok, míg a felnőttek a fiókaetetés időtartama alatt sokféle élőhelyet felkeresnek, kiteve magukat ezáltal az esetleg vérszívóknak.

Esetünkben is elképzelhető magyarázat lehetne a jelenség, ugyanis a vizsgált kerecsensólymok zöme nagy magasságban, nagyfeszültségű villanyoszlopokon költött. Ugyanakkor a kerecsensólymok költőterületeinek közvetlen közelében arbovírusok (pl. Usutu vírus, Nyugat-Nílus-i vírus) és az általam is vizsgált vérparaziták jelenlétét nem csak madarakban (pl. vörös vércse, kék vércse), hanem szúnyogokban is több ízben kimutatták (Soltész et al. 2017;

Firampong, 2023). A területeken tehát megtalálhatóak a fogékony gazdaszervezetek, a vektorok és a paraziták is, az egysejtűek cirkulációjához tehát látszólag minden adott.

Megállapítható, hogy a magyarországi kerecsensólymok és a vérparaziták kapcsolatának megértése további kutatásokat igényel.

6. Összefoglalás

Jelen dolgozatom elkészültéig 2024-ben kelt 58 hazai kerecsensólyom fióka vérparazita (*Plasmodium*-, *Haemoproteus*-, *Leucocytozoon*-fajok) fertőzöttségének felmérését végeztem el, valamint referenciamintákon hasonlítottam össze Huang et al. (2020) qPCR-protokollját a klasszikus Waldenström et al. (2004) PCR módszerrel.

A madarak vérmintáiban nem találtunk vérparazitát, a közelmúltban publikált PCR-eljárás viszont 100%-os specificitással és szenzitivitással teljesített az ismert pozitivitású és negativitású mintáinkon.

Jelenleg is zajló kutatási irányunk éppen ezért a kerecsensólyom minták fentebb említett qPCR-rel való letesztelése.

Számos lehetséges jövőbeli kutatási irány nyílt meg, ezek közül az egyik az adult kerecsensólymok egysejtű vérélősködő fertőzöttségének felmérése, illetve e madárfaj egyedeinek (kifejlett példányainak és fiókáinak) haemoparaziták elleni ellenanyag szeroprevalenciájának feltérképezése

További vizsgálódásra adhat okot fán lévő és nagyfeszültségű oszlopokra kihelyezett mesterséges fészekládákban kelt fiókák fertőzöttségének összehasonlítása, főleg a szúnyogok által terjesztett kórokozókra koncentrálni. Felvetődhet ugyanis annak a lehetősége, hogy a két költőhely-típus különbözőségei (pl. magasság, földrajzi elhelyezkedés) eltérően befolyásolják a madarakra ható vektor-nyomást. Ezen kérdéskör beható tanulmányozása rendkívüli módon hozzájárulna a kerecsensólyom védelmét célzó stratégiák (pl. költési siker növelése) kidolgozásához.

Rendkívül izgalmas vizsgálati terület lehet a vérparazita és flavivírusok (pl. Nyugat-Nílusi vírus) által okozott koinfekciók vizsgálata a természetben. Az említett kórokozók ilyen jellegű viszonyai egyelőre tisztázatlanok. Több szerző talált arra vonatkozó bizonyítékokat, hogy amennyiben az adott madár fertőzött az egyik parazitával (pl. *Plasmodiummal*), akkor az nagyobb vonzó hatást vált ki mind az egészséges, mind pedig az ugyanazzal, vagy más

patogénnel fertőzött vektorból (Cornet et al. 2013; Medeiros et al. 2014). Ezen egyidejű fertőzések vizsgálatának komoly jelentősége lehet a kórokozók és a járványok terjedésének, dinamikájának megismerésében.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálás köszönetemet kifejezni konzulenseimnek, Dr. Erdélyi Károlynak és Dr. Gyurác Józsefnek a kutatás lebonyolításában való összes segítségükért, különösen a számomra új ismeretek bő kifejtéséért!

Köszönettel tartozok Dr. Horváth Enikő és Katia Tuck a terepi- és labormunkában való hosszas és odaadó segítségnyújtásukért!

A Kulturális és Innovációs Minisztérium EKÖP-24 kódszámú Egyetemi Kiválósági Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

8. Forrás és irodalomjegyzék

Alrefaei, Abdulwahed & Rahim, Mohammed & Pizzio, Gaston. 2021. Cytochrome b lineages of *Haemoproteus tinniculi* in the endangered saker falcon (*Falco cherrug*) in Saudi Arabia. Journal of King Saud University. Science 34.

Applied Biosystems. (2023, November 1). Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. Elérés <https://www.gene-quantification.de/abi-rtpcr-pcr.pdf> (utolsó elérés: 2025.01.11.)

Asghar, M., Hasselquist, D., & Bensch, S. 2011. Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? Journal of Avian Biology, 42, 530–537.

Bagyura J., Szitta T., Haraszthy L., Prommer M., Horvath M. 2023. Status of the Saker Falcon in Hungary between 1980 and 2022. – Raptors Conservation 2: 447–449.

Bell, J. A., Weckstein, J. D., Fecchio, A., & Tkach, V. V. 2015. A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians. Parasites & Vectors, 8(1), 383.

Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. 2009. Molecular Ecological Resources 9:1353–8.

Chang-Hui Shen. 2023. Diagnostic Molecular Biology. Academic Press.

Cooper, J.E., 2002. Methods of investigation and treatment. Birds of prey: health and disease, 3rd Ed. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, 28-70.

Cornet S, Nicot A, Rivero A, Gandon S. 2013. Both infected and uninfected mosquitoes are attracted toward malaria infected birds. *Malaria Journal* 3; 12:179.

de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vallejo, A. 2006. WinEpi: Working in Epidemiology. An Outline Epidemiological Tool. 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology Economics.

de la Puente, J. M.; Santiago-Alacron, S.; Palinauskas, V.; Bensch, S. 2021. *Plasmodium relictum*. *Trends in Parasitology* 4: 355-356.

Firampong, N. K. A. 2023. Comparison of Endpoint PCR and Real Time PCR in the Detection of Avian Blood Parasites. MsC szakdolgozat. Eötvös Loránd Tudományegyetem. Budapest.

Greenberg, R., & Marra, P. P. (szerk.). 2005. Birds of Two Worlds: The Ecology and Evolution of Migration (Levin, I.I., & Parker, P.G., Chapter 47, Haemosporidian Parasites: Impacts on Avian Hosts). Johns Hopkins University Press.

Gutiérrez-López, R., Gangoso, L., Martínez-de la Puente, J. 2015. Low prevalence of blood parasites in a long-distance migratory raptor: the importance of host habitat. *Parasites Vectors* 8, 189.

Haraszthy, L. 2019. Magyarország fészkelő madarainak költésbiológiája 1. Pro Vértess Nonprofit Zrt. Csákvár.

Harl, J., Himmel, T., Valkiūnas, G. 2022. Avian haemosporidian parasites of accipitriform raptors. *Malaria Journal* 21; 14.

Hellgren, O., Waldenström, J., & Bensch, S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*, 90(4), 797-802.

Huang X, Huang D, Liang Y, Zhang L, Yang G, Liu B, Peng Y, Deng W, Dong L. 2020. A new protocol for absolute quantification of haemosporidian parasites in raptors and comparison with current assays. *Parasites and Vectors* 17;13(1):354.

Ishtiaq F, Rao M, Huang X, Bensch S. 2017. Estimating prevalence of avian haemosporidians in natural populations: a comparative study on screening protocols. *Parasites and Vectors* 6; 10(1):127.

Lierz M, Hafez HM, Krone O. Prevalence of hematozoa in falcons in the United Arab Emirates with respect to the origin of falcon hosts. 2008. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 22(3):208-12.

Medeiros MC, Anderson TK, Higashiguchi JM, Kitron UD, Walker ED, Brawn JD, Krebs BL, Ruiz MO, Goldberg TL, Ricklefs RE, Hamer GL. 2014. An inverse association between West Nile virus serostatus and avian malaria infection status. *Parasites Vectors* 1; 7:415.

Padmaja M, Singh H, Panwar H, Jyoti, Singh NK, Singh NK. 2022. Development and validation of multiplex SYBR Green real-time PCR assays for detection and molecular surveillance of four tick-borne canine haemoparasites. *Ticks and Tick Borne Diseases* 13(3).

Paperna I, Yosef R, Landau I. 2007. *Plasmodium* spp. in raptors on the Eurasian-African migration route. *Parasite*. 14(4):313-22.

Remple, J.D. 2004. Intracellular Hematozoa of Raptors: A Review and Update. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 18. 75-88.

Soltész Z, Erdélyi K, Bakonyi T, Barna M, Szentpáli-Gavallér K, Solt S, Horváth É, Palatitz P, Kotymán L, Dán Á, Papp L, Harnos A, Fehérvári P. 2017. West Nile virus host-vector-pathogen interactions in a colonial raptor. *Parasites and Vectors* 29; 10(1):449

Subaneg, Sirawit & Sitdhibutr, Ratiwan & Pornpanom, Pornchai & Lertwatcharasarakul, Preeda & Ploypan, Raveewan & Kiewpong, Aksarapak & Chatkaewchai, Benya & To-aditthep, Nithima & Kasorndorkbua, Chaiyan. 2024. Molecular Prevalence and Haematological Assessments of Avian Malaria in Wild Raptors of Thailand. *Birds*. 5. 428-439.

Svobodová M, Weidinger K, Peške L, Volf P, Votýpka J, Voříšek P. 2015 Trypanosomes and haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites. *Parasitology Research* 114(2):551-60.

Szép T., Csörgő T., Halmos G., Lovászi P., Nagy K. & Schmidt A. (szerk.) 2022. Magyarország madáratlasza. 2., javított és kiegészített kiadás. – Agrárminisztérium, Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület, Budapest.

Talbott, K.M., Ketterson, E.D. 2023. Physiological impacts of chronic and experimental *Plasmodium* infection on breeding-condition male songbirds. Scientific Reports 13.

Valkiūnas, G. 2005. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC Press.

Walther, E.L., Valkiūnas, G., González, A.D., Matta, N.E., Ricklefs, R.E., Cornel, A.J., & Sehgal, R.N. 2014. Description, molecular characterization, and patterns of distribution of a widespread New World avian malaria parasite (Haemosporida: Plasmodiidae), *Plasmodium* (Novyella) homopolare sp. nov. Parasitology Research, 113, 3319-3332.

Zymo Research. (2023). <https://zymoresearch.eu/collections/quick-dna-rna-viral-kits> (utolsó elérés: 2025.01.12.)