



# **Gemenci kisémlősök és kullancsok járványtani és ökológiai vizsgálata**

Készítette:

**Szekeres Sándor**

Biológia MSc.

II. évfolyam

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

Témavezetők:

Dr Földvári Gábor, Ph.D.

SZIE-ÁOTK

Rigó Krisztina



Budapest

2013.

## Tartalomjegyzék

Bevezetés és célkitűzések.....	4
Irodalmi áttekintés.....	5
Magyarországon előforduló gyakoribb kismélsős fajok.....	5
Pirók erdeiegeér, <i>Apodemus agrarius</i> (Pallas, 1771).....	5
Sárganyakú erdeiegeér, <i>Apodemus flavicollis</i> (Melchior, 1834).....	6
Vöröshátú erdeipocok, <i>Myodes glareolus</i> (Schreber, 1780).....	7
Mezei pocok, <i>Microtus arvalis</i> (Pallas, 1778).....	8
Törpeegér, <i>Micromys minutus</i> (Pallas, 1771).....	9
Házi egér, <i>Mus musculus</i> (Linnaeus, 1758).....	10
Kismélsősök és kullancsaik.....	11
Kismélsősök és szerepük a kórokozók fenntartásában.....	12
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	14
Hepatozoon-fajok.....	16
Módszerek.....	17
Helyszín.....	17
Kullancsok gyűjtése.....	18
Ektoparazita és szövetmintagyűjtés a befogott állatokról.....	19
Léplenyomat.....	20
DNS kivonás.....	20
Kullancsok.....	20
Szövetminták.....	20
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l PCR.....	21
Hepatozoon PCR.....	22
Gél-elektroforézis.....	23
Szekvenálás.....	23
Vadon élő kismélsősök kullancsfogyasztása.....	24
Adatok elemzése.....	24
Eredmények.....	24
Csapdázott kismélsősök.....	24
Növényzetről és rágcsálóról gyűjtött kullancsok.....	25
<i>Borrelia</i> -fertőzöttség kismélsősök bőrmintáiban; kismélsősőről gyűjtött és növényzetről gyűjtött kullancsokban.....	27
Kismélsősök <i>Hepatozoon</i> spp. fertőzöttsége.....	28

Vadon élő kisemlősök kullancsfogyasztása .....	28
Megbeszélés .....	29
Összefoglalás.....	33
Summary .....	34
Irodalomjegyzék.....	36

## Bevezetés és célkitűzések

Magyarország természetes és urbánus élőhelyein nagy számban élnek kisméltők, amelyek fontos gazdái a kullancsok nimfáinak és lárváinak. Emiatt nagyon fontos szerepet játszhatnak az élőhelyek kullancs populációjának, ezáltal közvetetten a kullancsok által terjesztett kórokozók (pl. *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp. *Borrelia* spp.) fenntartásában is.

A Lyme-borreliózist okozó *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) baktériumok a Spirochaetales rendbe tartoznak és a gerinces állatok között, kullancsok közvetítésével terjednek. A fajkomplexbe jelenleg 18 faj tartozik, ezek közül hét a Lyme-kór okozója, ami egy gyakori zoonózis. Munkám során a *B. burgdorferi* s.l. fajcsoport és az Apicomplexa törzsbe tartozó *Hepatozoon* protozoon paraziták jelenlétét vizsgáltam Gemencen csapdázott kisméltőkben.

A munka komplex jellegét az adja, hogy a vizsgálni tervezett kórokozók élelciklusa különböző ízeltlábú vektorokat és gerinces rezervoár gazdákat igényel, valamint hogy az egyes gazdák különböző mértékben érzékenyek az egyes kórokozókra.

Vizsgálatunkkal szeretnénk fényt deríteni ennek az egyik legnagyobb vadállománnyal rendelkező dél-magyarországi vadászterületünk ektoparazitáinak és az általuk terjesztett kórokozók néhány fajának előfordulására.

Célkitűzéseink:

- felmérni Gemencen a növényzetről és a rágcsálókról gyűjtött kullancsok faji összetételét
- megvizsgálni a kisméltők és kullancsaik fertőzöttségét *B. burgdorferi* sensu.lato-ra és Apicomplexa törzsbe tartozó kórokozókra
- megfigyelni vadon élő rágcsálókon, hogy fogyasztanak-e kullancsokat.

## Irodalmi áttekintés

### *Magyarországon előforduló gyakoribb kisémlős fajok*

A kullancsokkal való fertőződés, a kullancsfogyasztás lehetősége és a várható eredmények könnyebb értelmezése miatt az alábbiakban részletesen bemutatjuk az általunk is vizsgált kisémlősök életmódját és ökológiáját.

#### Pirók erdeiegeér, *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771)

Testhossz: 9,5-12 cm, Farokhossz: 6,6-8,8 cm, Testtömeg: 16-25g

Széles elterjedésű faj, amelynek két jól elkülönülő areája van. Hazánk a nyugati elterjedési területének része, ami Közép- és Kelet-Európától a kínai és mongol területekig terjed. A keleti areája Oroszország déli területeitől egészen Tajvanig terjed. Európában észak-déli elterjedése Finnország déli részétől Görögország északi részéig terjed el, nyugatra pedig a Rajna vonaláig honos. Hazánkban főleg észak-keleten, a nagyobb folyóink közelében és a Dunántúl déli részén közönséges faj. Sík és hegyvidékeken egyaránt előfordul, elsősorban nedves területeket kedvel. A tél folyamán megjelenhet faluszéleken is. Legnagyobb egyedszámban a dús növényzetű erdőszéleken és ártereken figyelhető meg, ahol akár a csapdázott egyedek 90%-át is ez a faj adhatja.

Bátor, nappal is előmerészkedő faj, amely napnyugta után kezdi meg táplálékszerző útját. Mozgáskörzete a búvóhelyétől 20-30 méter, ez akár esetenként 150 méter is lehet. Tápláléka főként magvak, alkalmanként állati fehérjét is magához vehet (csigák, giliszták, ízeltlábúak). Táplálékkeresés közben nagyon jól mászik a bokrok ágain, itt gyűjti össze a gyümölcsöket és rügyeket. Nagyon vízigényes faj, amely fogságban is sokat és rendszeresen iszik. Földalatti járatokat készít, amelyeket lakóüregként és raktárként is használ. A hímek általában magányosan, a nőstények kis családokban utódaikkal élnek együtt. Nagy termete miatt képes kiszorítani a többi egérfajt az élőhelyről.

Kedvező időjárás esetén már áprilisban megkezdheti a szaporodást, rendszerint 3-4 alkalommal, 48 utódot fial. Az utódok 2 hetes korukig szopnak, és 3 hetes korukban már önállóak. Ivaréretté 2-3 hónapos korukra válnak. Az adult egyedek 2-4 évig is élhetnek. Természetes ellenségei között éjjeli és nappali ragadozók is vannak, köztük ragadozó madarak is. Ezen felül rókák, menyétfélék és a sakálók is előszeretettel fogyasztják további emlős ragadozókkal együtt (Bihari, 2007a).

### Sárganyakú erdeiegér, *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834)

Testhossz: 9-13 cm, Farokhossz: 10-13 cm, Testtömeg: 22-48 g

Nagy elterjedési területű faj, areájának határa keleten Irán, északon Skandinávia déli területei, délen Görögország északi része, nyugaton a síkságok kivételével általános faj. Hazánk minden táján előfordul, bár eltérő denzitásban. Elterjedésének vizsgálatát nehezíti az, hogy bagolyköpetekből csonttani bélyegek alapján nehéz elkülöníteni a közönséges erdei egértől.

Fás területeken a sárganyakú erdeiegér a legelterjedtebb faj, középhegységi erdeinkben 75%-os dominanciája is lehet, mezőgazdasági területek szélein ez lecsökkenhet 6-7%-ra. A folyóparti ligeterdőkben is egyenletes elterjedést mutat. Tarvágás után már ez első vegetációs időszakban megjelenik. A vízzel időszakosan elárasztott területek leggyakoribb kisemlőse, köszönhetően a jó migrációs képességeinek. Őszi időszakban épületekben kereshet menedéket. Éjszaka aktív, könnyedén mozog bokrok és fák ágain is, olykor elhagyott madárodvakat is elfoglalhat. Zavarásra kevésbé érzékeny, agresszív faj, amely akár más kisemlősöket is képes kiűzni lakóodvaikból. Ősz közeledtével a talajszinten mozgó és táplálkozó állatok a lombkorona szintben keresnek táplálékot. Egyedszáma a rágcsálókra jellemző éves mintázatot mutatja, tavasztól őszig növekvő egyedszámmal. Ciklikus mintázat az évenkénti egyedszámokban nem figyelhető meg. Nagymértékű elszaporodása alkalomszerűen, a jó magtermő években fordul elő. Téli tartalékait gyökerek közé vájt járataiban raktározza. Erős hátsó lábával nagy ugrásokra képes, és ezekre állva figyeli a környezetét, és táplálkozik. Territóriumának nagysága a táplálékviszonyokhoz igazodva változik.

Táplálékspektruma széles: magvakat, makkot, diót, rügyeket és gyümölcsöket is szívesen fogyaszt, alkalmanként gerinctelenekkel is táplálkozik. A szaporodási időszaka márciustól októberig tart, egy évben 2-4 alkalommal 2-8 utódot hozhat a világra. Bő makktermésű években a téli fialás is megfigyelt. A baglyok egyik legfontosabb táplálékállata, de megtalálták már barna kánya köpetében is maradványait. A közepes méretű ragadozó emlősök (pl. nyestfélék, róka) kedvelt táplálékállata. Az erdős területek gyakori fajaként jelenlegi ismeretek szerint nem veszélyeztetett (Cserkész & Horváth, 2007).

### Vöröshátú erdeipocok, *Myodes glareolus* (Schreber, 1780)

Testhossz: 8-12 cm, Farokhossz: 3,5-7 cm, Testtömeg: 15-35 g

Palearktikus elterjedésű faj, az Atlanti-óceántól a Bajkál-tóig terjedt el, Kis-Ázsia északi részén is előfordul. Európában általánosan elterjedt, de az Ibériai-félszigeten, Görögországban és a Földközi-tenger szigetein nem fordul elő. Nálunk országos elterjedésű, az erdős területek gyakori faja. Nyílt területeken nem fordul elő, de a homoki akácokban is fellelhető. Túlnyomórészt lombdombokban, cserjésekben, erdőszegélyekben, ligeterdőkben és akár gyümölcsösökben található meg. Északon túlevelű erdőkben is gyakori. Ősszel szereti felkeresni az állóvizes élőhelyeket övező nádasokat és sással borított parti zónákat. A hegyvidékekben 2200 méter magasságig fordul elő.

Elsősorban alkonyattól pirkadatig aktív, zavartalan helyeken nappal is előjön. Gömbölyű fészket épít a földbe, odvakba, farönkök alá repedésekbe, vastag lombtakaró alá. A fészket mindig megvédi a beszivárgó csapadéktól. Nem alszik téli álmat, egész télen az avar és a hótakaró alatt jár élelem után. Télen széna-, szalmakazlak, vadetetők alá, olykor épületekbe is behúzódik. Elsősorban rügyeket, lombot, fűvet és magvakat fogyaszt, de az erdei gyümölcsöket és a rovarokat sem veti meg. Mezőgazdasági területek közelében gabonát is fogyaszt. Téli tartalékot nem halmoz fel, ezért jár télen is táplálék után, ekkor megrágcsálja az erdészeti ültetvényeket.

Szaporodási időszakban a nőstények dominanciája jellemző. A hímek és a nőstények csak a szaporodási időszakban keresik fel egymást. Évente 3-4 almot hozhat a világra, egy alomban akár 3-7 utód is lehet. Kölykeit agresszíven védi. A fialás után a nőstény újra kész a párzásra. Az utódok nagyon gyorsan érik el ivarérettségüket, a hímek 2-3, a nőstények 6-8 hetesen már szaporodóképesek. Gradációra hajlamos, amit a bükkfák nagy makktermésével hoznak összefüggésbe.

A sün, a róka és más, kis- és közepes testű emlős ragadozók kedvelt tápláléka. A pockokat a nagytestű ragadozók közül a hiúz, valamint a medve is fogyasztja. A fészkeket a vaddisznók és a cickányok tizedelik. Más rágcsálókhoz hasonlóan baglyok és más ragadozó madarak, hüllők is gyakran fogyasztják. Az erdei ragadozók legfőbb tápláléka az erdei egerek mellett (Gubányi, 2007).

### Mezei pocok, *Microtus arvalis* (Pallas, 1778)

Testhossz: 9-12 cm, Farokhossz: 3-4,5 cm, Testtömeg: 14-50 g

Észak-Portugáliától keletre Oroszországon és Mongólián keresztül egészen Kínáig terjed az areája. Európában a Skandináv-félsziget nagyobb részét, Nagy-Britanniát és a mediterrán területeket kivéve általános. Hazánk minden részén honos, sík és hegyvidéki élőhelyen is tömegfaj. Előnyben részesíti a szántókat, nyílt, mezőgazdasági területeket, de gradáció idején a sásos társulásokban is megtalálható. Kisebb parcellás és nagy monokultúrákban is jól érzi magát. Hegyvidékeken, 2000 m tengerszint feletti magasságig is előfordulhat.

Elsősorban éjszakai állat, de kedvezőtlen időben és gradáció idején - amikor kevés a táplálék - nappal is aktív. A gradáció néhány évente kialakul a szinte korlátlan táplálékbázis miatt, amit a mezőgazdasági táblák nyújtanak. Fűves területeken a mozgását megkönnyítő ösvényeket készít, ezeket veszélyhelyzetben is használja menekülési útvonalként. Gömbölyű fészket a felszín alá 10-15 cm-rel készíti, ezt a többi rágcsálóhoz hasonlóan száraz növényi részekkel bélel ki. A központi üregből sugár irányban indulnak a kivezető járatok. Télen a hó alatt is mozog. A vizet kerüli, ezért a fészket magasabb helyre készíti. Télre szalmakazlak, szénaboglyák vagy akár trágyadombok alá is húzódhat, és itt akár télen is szaporodhat.

Táplálkozása és üregei építése miatt a legnagyobb mezőgazdasági kártevő. Tavasztól gyommagvakkal, friss vetéssel, fűvel és lucernával táplálkozik. A termény beérésekor a gabonát töből rágja el, és húzza be a kalászokat az üregeibe, a kukoricán pedig felmászva rágja meg a csöveket. Káposztában és cukorrépában is komoly károkat tud okozni a rágásával. Gyümölcsösökben és szőlőskertekben is előfordul. Nagyon szapora állat, évente képes 7 almot is felnevelni, amelyben 4-12 utód is lehet almonként. Az utódok rövid, 2 hetes szoptatás után a harmadik héten már ivaréretté válnak. Nyílt területen vadászó ragadozóink kedvelt és gyakori csemegéje. A fészkeket a vaddisznó is károsítja. Aratáskor a traktor által felzavart állatokat ragadozó madarak, gólyák, sirályok és varjak pusztítják. A mezei pocok az időszakos gradációi miatt az egyik legismertebb emlősfajunk. Rendszeres védekezési programokat alkalmaznak ellene. A leggyakoribb, legtömegesebb rágcsálóként a mezei pocok nagyon sok más állat populációjának fenntartásában játszanak szerepet (Gubányi & Horváth, 2007).



### Törpeegér, *Micromys minutus* (Pallas, 1771)

Testhossz: 5,5-7,5 cm, Farokhossz: 5,2-7,2 cm, Testtömeg: 4,5-6 g

Szelés körben elterjedt faj, a palearktikus régióban az Atlanti-óceán partvidékétől egészen Japánig előfordul. Elterjedési területe Európában északon Finnország közepéig, délen pedig Olaszország közepéig terjed. Szerbiában és a Balkánon szigetszerű előfordulásai ismertek, míg az Ibériai-félszigeten egyedei eddig nem kerültek elő. A bagolyköpetekből származó adatok alapján hazánkban mindenütt megtalálható, de területenkénti egyedszám változásáról kevés adattal rendelkezünk.

A törpeegér lassú folyású vizek zsombékos, sásos, náddal benőtt partjai mentén, gyomtársulásokban, valamint mezőgazdasági területek és erdőket szegélyező, bokros területek lakója. A magas fűvel borított területeken szintén előfordul, de az ártéren kialakuló erős lágyszárú vegetáció is kedvez a fészkelése szempontjából. A gyenge lágyszárú szinttel rendelkező erdőkben és hegyvidékeken a faj nem található meg. Károkozása gabonatóblákon minimális. A törpeegerek kapaszkodó farkuknak köszönhetően nagyon jól mozognak a magas fűben. Nappal is aktívak, de javarészt reggel és a késő délutáni órákban mozognak. Az egész életét a magasban tölti, csak a hideg telek elől húzódik a föld alá, ahova előzőleg már tartalékokat is felhalmozott. Nem alszik téli álmot. Aktivitása 3 órás ciklusokban zajlik, a pihenési periódusokat járataiban vagy fészkeiben tölti. Ökol nagyságú fészket épít, amelyet 20-100 cm magasságban helyez el, és fűszálakkal béleli. Az nőstény minden alomnak külön fészket épít. Melegigényes faj, amely nagyon szívesen napfürdőzik. Jól úszik, tavasszal szívesen fészkel a nádasokban. Kicsi mozgásterületű, fragmentációra érzékeny. A fészke közelében elhelyezkedő gabona és fűfélék hajtásaival és magvaival táplálkozik, de időnként gyümölcsöket és rovarokat is fogyaszt. Téli időszakban gyakran táplálékának nagy részét állati fehérje teszi ki.

Szaporodási időszakban (április-november) 2-3 vagy akár 4 almot is fialhat, mindegyiket külön fészekbe. Az utódok (3-9 darab/alom) csupaszak és vakok. Az anya egyedül nevel. Szaporodása szorosan összefügg a táplálék ellátottsággal és a fészkelő helyet biztosító növényzet növekedésével. Rövid életű faj, a természetben körülbelül 18 hónapig élhet, de fogságban akár 4 évig is. A baglyok kedvelt tápláléka, de nappali aktivitása miatt a nappali ragadozók is gyakran fogyasztják. A róka, a borz, a hermelin és a kígyók is szívesen vadásszák. A törpeegerek élőhelyeinek száma csökken. A faj Európában visszaszorulóban van

a magas vegetációjú élőhelyek eltűnése miatt. A hazai szegély élőhelyek megőrzése és az aktív ökológiai kutatás jelentős szerepet tölthet be a faj védelmében (Horváth, 2007a).

### Házi egér, *Mus musculus* (Linnaeus, 1758)

Testhossz: 7-10 cm, Farokhossz: 7-10 cm, Testtömeg: 13-32 g

Öt alfaja eredetileg eurázsiai eredetű, de az emberi közlekedésnek és kereskedelemnek köszönhetően mára kozmopolita fajként tartjuk számon. Megtalálható elvadulva, de legtöbbször emberi környezetbe kötődik. Hazánkban mindenhol közönséges. Erősen kötődik a településekhez. Állattartó telepeken és terményraktárakban tömeges lehet a jelenléte. Lakóházakban bárhol előfordulhat. A kedvező élőhelyet nem hagyja el, mozgásteret a kedvelt létesítmények 1-2 km-es mozgáskörzetére korlátozódik. Az egerek főként az esti órákban aktívak, de kevés zavarás mellett nappal is rágcsálnak. Rönkök, szénaboglyák, elhagyott házak padlója alatt ássák hosszú, szerteágazó járataikat. A járatok végén kiszélesedő üreget papírdarabokkal, rongydarabkákkal és egyéb összegyűjtött anyaggal bélelik. Kiválóan másznak és ugranak, ügyesen használják farkukat is kapaszkodásra. Szaguk jellegzetes, orrfacsaró bűz. Társas lények, ahol a csoporton belül a promiszkuitás a jellemző.

A házi egér szinte minden szerves anyagot elfogyaszt, de a többi rágcsálóhoz hasonlóan alapvetően magvakkal, termésekkel táplálkozik. Raktárakban károsítja a diót, mogyorót, olykor a füstölt húsárut is. Zöld növényi részeket ritkán fogyaszt, minimális a vízigénye. Az év bármely szakaszában képes a szaporodásra, ha megfelelőek a körülmények. Évente többször akár 8-10 almot is világra hozhat, amelyekben akár 12 kölyök is lehet. A kicsik 3 hetes korukban már ivarérettek. A felnőtt egyedek akár a 3 éves kort is megélhetik. A gyöngybagoly táplálékában tömegesen fordul elő, egyéb ragadozó madarak és az emlős ragadozók is előszeretettel fogyasztják. A házi egér komoly gazdasági kártevő. Rágásával, ürülékével hatalmas károkat okoz. Csapdákkal, mérgekkel irtják. Számos betegség terjesztője lehet, ami háziállatokra is komoly veszélyt jelenthet. Tömeges megjelenése miatt nagyon fontos táplálékbázis a ragadozóknak (Bihari, 2007b).

## *Kisemlősök és kullancsaik*

A kullancsok a Parasitiformes öregrenden belül az Ixodida rendbe tartozó pókszabásúak. Testüket feji részre (capitulum) és idiosomára oszthatjuk. Az idiosoma további két testtájra osztható: a podosomára, amelyen a lábak helyezkednek el és az opisthosomára. A testüket kemény pajzs és lágy kutikula fedi. Az ivarok között különbségek vannak, a hímek opisthosomáját egészen pajzs fedi, a nőstényekét pedig csak részben. Szájszervük a test csúcán helyezkedik el. Első pár lábukon lévő Haller-féle szervvel -amely sensillákból és árkokból áll- kiválóan érzékelik a környezetüket (CO<sub>2</sub> és páratartalom, vajsav és ammónia koncentráció, hőmérséklet, légmozgás, feromonok, levegő rezgései). Ennek a szervnek a segítségével, és a lábaik külön-külön mozgásával képesek az ingerek forrásának észlelésére, ezzel a gazdaállatok lokalizációjára is.

A legtöbb kullancs háromgazdás, tehát a fejlődésük során három különböző gazdán kell táplálkoznia. Minden táplálkozás után leválnak a gazdáról, és továbbfejlődve új gazdát keresnek. Előfordulnak kétgazdás (*Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp.) és egygazdás (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) fajok is. Az Ixodidae család tagjai nagyon változatos élőhelyeken élnek. A füves területektől a bozótos, erdős vidékekig, a szárazabb és a nedves élőhelyeken egyaránt előfordulnak. Táplálékkeresési viselkedésük szerint vannak exofil és endofil kullancsok. Az előbbiek a növényzeten várakozva keresnek gazdát, utóbbiak a gazda fészkeiben vagy üregében élnek. Az exofil kullancsok között léteznek aktívan gazdát kereső (vadász) fajok is (*Amblyomma*, *Hyalomma* genus) (Bowman & Nuttall, 2008).

Az exofil fajok, mint például az *I. ricinus* gyakran széles gazdaspektrummal rendelkeznek, vannak azonban szűkebb gazdakörűek is (például a denevéreket parazitáló fajok), de egyes (főleg endofil) fajok specializálódhatnak egy gazdafajra, például az *Ixodes lividus*, amely kizárólag parti fecskék (*Riparia riparia*) fészkeiben él.

A hazánkban gyakori vadonélő kistrágyászolókon, mint például a sárganyakú erdei egéren (*A. flavicollis*), a pirókegéren (*A. agrarius*), vöröshátú erdei pocakon (*M. glareolus*) és mezei pocakon (*M. agrestis*) a következő kullancsfajok találhatóak meg: az *Ixodes* nemből az *I. acuminatus*, *I. apronophorus*, *I. hexagonus*, *I. ricinus* és *I. trianguliceps*; a *Dermacentor* nemből a *D. marginatus* és a *D. reticulatus* és a *Haemaphysalis* nemből a *H. concinna* és *H. inermis*. (Hillyard, 1996). A törpeegér (*M. minutus*) ezeknél a fajoknál ritkább, szintén egész

Magyarországon elterjedt faj, rajta is ezek a kullancsfajok táplálkozhatnak (Hillyard, 1996, Rigó et al. 2011; Gyuranecz et al., 2011).

A házi egéren (*M. musculus*) az *Ixodes ventalloi*, az *I. hexagonus*, az *I. acuminatus* és az *I. trianguliceps* található. A patkányokat, az *I. acuminatus*, az *I. ventalloi*, az *I. hexagonus*, az *I. ricinus* és az *I. trianguliceps* parazitálja (Hillyard, 1996). A kósza pockot (*Arvicola terrestris*) különleges életmódot folytató faj, ezeket az állatokat a *I. apronophorus*, *I. trianguliceps* és *D. reticulatus* parazitálhatja (Hillyard, 1996).

### *Kisemlősök és szerepük a kórokozók fenntartásában*

A kisemlősök fontos gazdái a kullancsok lárváinak és nimfáinak (Kiffner et al., 2011). Táplálkozásuk során a kullancsok sokféle kórokozót terjeszthetnek, amelyeknek orvosi és állatorvosi jelentőségük is nagy. Az *I. ricinus* például vektora a *B. burgdorferi* s.l., valamint a Rickettsiaceae és az Anaplasmataceae családba tartozó Gram negatív baktériumoknak és a kullancsencephalitis vírusának is (Bowman & Nuttall, 2008; Parola et al., 2005).

A kórokozók általában a fertőzött kullancsból a vérszívás bonyolult folyamata közben kerülnek az emlős gazdába. A kullancsok vérszívásában (és ozmoregulációjában) nagy szerepe van a testük legnagyobb mirigyeinek, a nyálmirigyeknek. Emiatt a kórokozók terjedésében is fontos a működésük. A nyálmirigyekben többféle acinus van. A nőstény egyedeknek ezekből három, míg a hímeknek négyféle van. Az I. típusú acinus higroszkópos anyagot termel, ami segít a levegő páratartalmának felvételében táplálkozás előtt, és táplálkozás közben visszajuttatja a felesleges vizet és ionokat (Rudolph & Knülle, 1974). A II. és III. típusú mirigyvégkamra granuláris jellegű, és a vérszívást segítő anyagokat termel. Méretük a vérszívás során folyamatosan nő, majd a szívás végeztével a funkcióvesztett nyálmirigyek degradálódnak (Harris & Kaufmann, 1981). Ezek termelnek még ún. cementet, amely elsősorban a rövid szájszervvel rendelkező fajok (*Haemaphysalis* spp., *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp.) megfelelő megkapaszkodásában fontos. Véralvadásgátló anyagokat, emésztőenzimeket, vazodilatátor hatású, érzéstelenítő és immunszuppresszív anyagokat is termelnek. A vazodilatátor anyagok az érfalak elernyesztésével azt biztosítják, hogy több vér kerüljön az érintett vérér szakaszba és így jobb, gyorsabb vérfelvételt eredményeznek. Az immunszuppresszív anyagok pedig a gazda immunreakciójának erősségét képesek csökkenteni (Hillyard, 1996). A csak a hímekben megtalálható IV. típusú acinus szintén granuláris jellegű, a táplálkozást segítő anyagokon kívül a szaporodásban szerepet játszó anyagokat is termel (Furquim et al, 2010).

A kullancsok táplálkozása két fázisra osztható. Az első –lassú- fázisban, amely egy hétig is eltarthat, testtömegük a tízszeresére növekedhet. A második gyors fázisban rövid idő alatt (12-24 óra) nagymértékű testtömeg-növekedés történik, ez több mint további tízszeres is lehet. Ezzel a nagy testtömeg-növekedéssel nagy testfelszín változás is jár, erre a kullancsok megnövekedett kutikula szintézissel reagálnak (Hillyard, 1996).

Bizonyos kórokozók (pl *Babesia*-fajok) transzovariálisan is terjednek. Ez azt jelenti, hogy a fertőzött gravid nőstény átadja az utódainak a fertőzést még az ováriumban eltöltött idő alatt, így a lárvák kikelésüktől fogva fertőzőképesek. Ezt a jelenséget még nem sikerült bizonyítani a *B. burgdorferi* s.l. fajcsoport esetében.

A kullancsok a különböző fejlődési stádiumaik között is képesek átadni a fertőzéseket. A fertőzött lárva fertőzött nimfává, majd fertőző adulttá fejlődik. Ezt transzstadiális fertőzésnek nevezzük.

Egyes esetekben a gazda szisztémás fertőzése nélkül is átadhatják egymásnak a vektorok a fertőzést. Ez az ún. co-feeding, más néven együtt táplálkozási fertőzés, ekkor több egyed egyszerre táplálkozik egymáshoz viszonylag közel a gazda testfelületén. A szívás helyén később egy másik egyed is fertőződhet, a már előtte egy másik vektor által ott hagyott kórokozóval (Gern & Rais, 1996). Nem szükséges tehát egy időben jelen lennie a két kullancsegységnek a gazda megfelelő testtáján ahhoz, hogy egymást fertőzzék. A co-feeding transzmisszió egy gazda életében többször is előfordulhat, és nem feltétlenül vált ki immunválaszt. Ha a gazdaegyednek volt már szisztémás fertőzése, és kialakult benne a kórokozó elleni immunválasz, még akkor is fertőződhet az éppen rajta táplálkozó kullancs (Randolph et al., 1996). A *B. afzelii*-vel végzett kutatásokból kiderül, hogy az együtt táplálkozással járó transzmisszió esélye csökken akkor, ha az egyedek messze vannak egymástól, és ha a kullancs kevés ideig szívott vért. Ezeket figyelembe véve a co-feeding általi kullancsfertőzés valószínűsége jóval alacsonyabb, a szisztémásan fertőzött gazdán táplálkozással történő fertőződéshez képest (Richter et al., 2002). A kullancsok tehát képesek a kórokozókat transzstadiálisan, co-feedinggel és egyes fajok a transzovariálisan is fertőzés átadásra. A kullancsok hatékony vektorok; a gazdán észrevétlenül ejtenek sebet, erősen kapcsolódnak a bőrhöz (cement) és hosszú ideig szívnak vért (akár napokig is eltarthat). A kullancsok többsége több gazdafajon is táplálkozik, így a kórokozó kénytelen különböző gazdákhoz alkalmazkodni a túlélése érdekében. Hosszú ideig élnek és nagyszámú petét raknak. A hosszú táplálkozás nélküli időszakot is jól tűrik, és emellett képesek a gazda

immunválaszának a csökkentésére is. A kórokozók nem okoznak bennük jelentősebb károkat jelenlegi ismereteink szerint.

A patogének terjesztésében fontos szerepe van a különböző faktoroknak, ezek lehetnek külső (környezeti) vagy belső faktorok is. Ezek a tényezők befolyásolják a kullancsok előfordulását, viselkedését és így közvetve a kullancsok által terjesztett kórokozók terjedését is. Ilyen külső faktorok az élőhely típusa (Boyard et al., 2008; Paziewska et al., 2010), struktúrája, mikroklimatikus viszonyok és a rágcsálók szezonalitása (Radda et al., 1968; Radda et al., 1969; L'Hostis et al., 1996). A kullancsokra hatással lévő belső paraméterek például a gazda faja, neme, kora és testnagysága (Randolph, 1975; Nilsson and Lundqvist, 1978; Matuschka et al. 1991; Humair et al. 1993; Perkins et al., 2003; Harrison et al., 2010). A kisemlősök szezonalitása összefüggésben van az észlelhető *Borrelia*-fertőzöttséggel (Khanakah et al., 2006).

### *Borrelia burgdorferi* sensu lato

A *Borrelia burgdorferi* s. l. fajcsoport tagjai a Spirochaetales rendbe tartozó spirális alakú, a szövetek között mozogni képes Gram negatív baktériumok, az emberben a Lyme-kór okozói. Willy Burgdorfer és munkatársai az USA-ban 1982-ben izolálták kullancsokból a baktériumot. Ezt később az ő tiszteletére nevezték el *Borrelia burgdorferi*-nek. Később Európában és Ázsiában újabb fajait izolálták. Az eredeti amerikai spirochaeta a *B. burgdorferi* sensu stricto (szűk értelemben vett, rövidítve: s.s.), míg a teljes baktériumcsoport a *B. burgdorferi* sensu lato (tág értelemben vett) elnevezést kapta. A Lyme-kór elnevezését egy connecticuti kisvárosról Old Lyme-ről kapta. Itt írtak le járványos arthritist gyermekeknél (Steere et al., 1977). Erről az ízületi gyulladásról később kiderült, hogy a kór egyik tünete. Először *Ixodes scapularis*-ban, az észak-amerikai vektorában, majd később *Ixodes ricinus*-ban, az európai vektorban is kimutatták a kórokozót. (Burgdorfer et al.; 1982, Burgdorfer et al., 1983). Ezek a kórokozók az emberen kívül több ízeltlábú és nagyszámú gerinces gazdában is képesek hosszabb-rövidebb ideig életben maradni, ezért mind a mai napig nem ismerjük az összes lehetséges fertőződési utat. A bonyolult életciklusuk és a sok lehetséges gazdafaj miatt az összes rezervoárja sem felderített ennek a kórokozónak. Ezen felül az, hogy ezeket a rezervoárok miként tartják fenn szervezetükben a baktériumokat, és fertőzik meg vele a vektorokat. A *B. burgdorferi* s.s., a *B. afzelii* a *B. garinii* régóta bizonyítottan okoz emberi megbetegedéseket (Margos et al., 2008) és a közelmúltban kiderült, hogy a *B. valaisiana* (Diza et al., 2004; Saito et al, 2007), a *B. lusitaniae* (Collares-Pereira et al., 2004),

a *B. bissettii* (Rudenko et al., 2008) és a *B. spielmanii* (Wang et al., 1999; Földvári et al., 2005a) is okozhat emberi megbetegedéseket.

Hazánkban 1985-ben írták le először a Lyme-kórt, de csak 1991-ben mutatták ki kullancsokban is a kórokozót. A pontos baktériumfaj ekkor még nem volt azonosítható (Lakos et al., 1991). Humán megbetegedéseket a *B. burgdorferi* s.s , a *B. garinii* és az *B. afzelii* baktérium okozott, de a közelmúltban a *B. spielmanii* is kimutatható volt egy beteg kokárdakiütéséből vett biopsziás mintából (Lakos, 2009, Földvári et al. 2005b).

A kórokozó egyes állatokban azok megbetegítése nélkül, élethosszig tartó fertőzést okoz. Ilyen rezervoár állatok a rágcsálók (egér, pocok), maguk a kullancsok és madarak (feketerigó, fácán, sirályfélék) egyes fajai, és újabb adatok szerint bizonyos gyík-fajok is (Kurtenbach et al., 2002, Földvári & Rigó, 2009; Földvári et al., 2009). Az egyes taxonok eltérő *Borrelia*-fajokat hordoznak. A rágcsálók többnyire a *B. afzelii*-vel fertőzöttek (Paulauskas et al., 2008;), míg az énekes madarak a *B. garinii* gyakori hordozói (Kurtenbach et al. 2002).

A *B. burgdorferi* s.l. baktériumok a kullancsok közepbelében szaporodnak, és vérszívás során a nyálmirigyen keresztül jutnak be a gerinces gazda szervezetébe (Hillyard, 1996). A gazdán belül vándorlásra képesek, akár passzívan a vérárammal, akár aktív mozgással a szövetek között. Szerepet játszanak különböző felszíni fehérjék (OspA, OspC) a fertőzésben, ezek a spirochaeták sejtfelületéhez kötődve a bejutásukat segítik a gazda szövetébe. A kullancsok bélcsatornájában az OspA, míg a nyálmirigyeiben az OspC felszíni fehérje szintézisét növeli a *Borrelia* (Schwann & Piesmann, 2002).

A *Borrelia* baktériumoknak lineáris kromoszómaszerkezetük van, és változó számú cirkuláris és lineáris plazmidjaik is vannak. A plazmidok kódolják a fertőzőképességet, ezeket akár egyes esetekben el is veszthetik, vagy horizontális géntranszferrel akár fel is vehetnek a környezetükből idegen plazmidokat (Bowman & Nuttall, 2008).

A Lyme-kór lefolyása három fázisra osztható. A leggyorsabban jelentkező tünete az úgynevezett erythema migrans, a kokárda kiütés. Ez a vándorló bőrpír, a sokszor észrevétlen csípés helyétől kiindulva lassan terjed, a betegségek kb. 70%-ban jelenik meg gyors, kezdeti tünetként (Lakos, 2009). Emellett izom- és ízületi fájdalom, láz is jelentkezhet, de ezek gyakran kezelés nélkül is megszűnnek. A második fázis hetek vagy hónapok múlva jelentkezhet: izomfájdalom, arcidegbénulás, agyvelő- és agyhártyagyulladás alakulhat ki. A harmadik fázis évekkkel vagy évtizedekkel később is kialakulhat, fáradékonyság, ízületi

gyulladás és krónikus bőrgyulladás (*acrodermatitis chronica atrophicans*) a jellemzői. Az *acrodermatitis chronica atrophicans* többnyire idősebb nők lábán jelenik meg, a bőr itt elvékonyodik, tésztás tapintatúvá válik. Ez a tünet erős fájdalommal jár, és kezelés nélkül idővel súlyosodik, spontán gyógyulás nem fordul elő az erős immunválasz ellenére sem (Lakos, 2009).

Az ember fertőződésének korai felismerése növelheti a kezelés hatékonyságát. A kezelés elmulasztása krónikus állapotot okozhat, amely lassú állapotromlással jár. A kezeletlen betegség okozhat szívizomgyulladást is, ez hazánkban ezrelékes gyakorisággal fordul elő. A Lyme-carditisben szenvedő betegek fele ideiglenes pacemaker beültetésére szorul (Lakos, 2009).

### *Hepatozoon-fajok*

A Hepatozoidae családba tartozó fajok az Alveolata superphylumon belül az Apicomplexa törzsbe (korábban Sporozoa) tartozó vérparaziták. Bizonyos fejlődési stádiumukra a csúcsi részen különleges sejszervecske, az apikális komplexum alakult ki. Ezek a csúcssejtes spórások gerinceseket és gerincteleneket egyaránt fertőznek. A *Hepatozoon*-fajok széles körben elterjedt vérparaziták, amelyek több állatfajt is fertőznek. Ezeknek az intracelluláris parazitáknak a heteroxen az életciklusa, gerinces köztigazdára és gerinctelen végleges gazdára is szükségük van. Mindkét típusú gazda (akár a fajtárs, préda, vagy ektoparazita) elfogyasztása eredményezheti a fertőződést (Smith, 1996)

A szaporodási rendszerük egy aszexuális (skizogónia) és egy ivaros szakaszra (sporogónia) osztható. Az ivartalan szakasz az emlős gazda különböző szerveiben mehet végbe, a gamontok a vérsejtekben találhatóak meg. Az ivaros szakasz a gerinctelen végső gazda testfolyadékában megy végbe. A sporozoiták transzmissziója az ízeltlábú gazda nyálmirigyén keresztül nem megy végbe, a fertőződéshez a sporulált oocystákat tartalmazó végleges gazda elfogyasztása szükséges (Laakkonen et al., 2001; Craig, 2001; Smith, 1996). A kisemlősök potenciális *Hepatozoon* vektor fogyasztásának megértésére eddig kevés kutatást végeztek. Eddig két észak-amerikai rágcsálóról, a fehérlábú egérről (*Peromyscus leucopus*) és az amerikai csíkoscókusról (*Tamias striatus*) írták le a véletlenszerű kullancsfogyasztást. (Shaw et al., 2003). Az utóbbi 50 évben a kisemlősök *Hepatozoon*-fertőzöttségének kapcsán Európa több részén is végeztek kutatást. Ezeknek a fajoknak az elkülönítése a gerinces



köztigazda, a gyűjtési hely földrajzi elhelyezkedése és a vérben található fejlődési stádium alapján történt (Laakkonen et al., 2001; Criado-Fornelio et al., 2003; Karbowski et al., 2005). Sok *Hepatozoon*-faj esetében az élelciklusuk és a gazda szervezetek teljes köre még nem ismeretes. A molekuláris módszerek lehetőséget adnak ezeknek a vérparazitáknak a további vizsgálatára.

## Módszerek

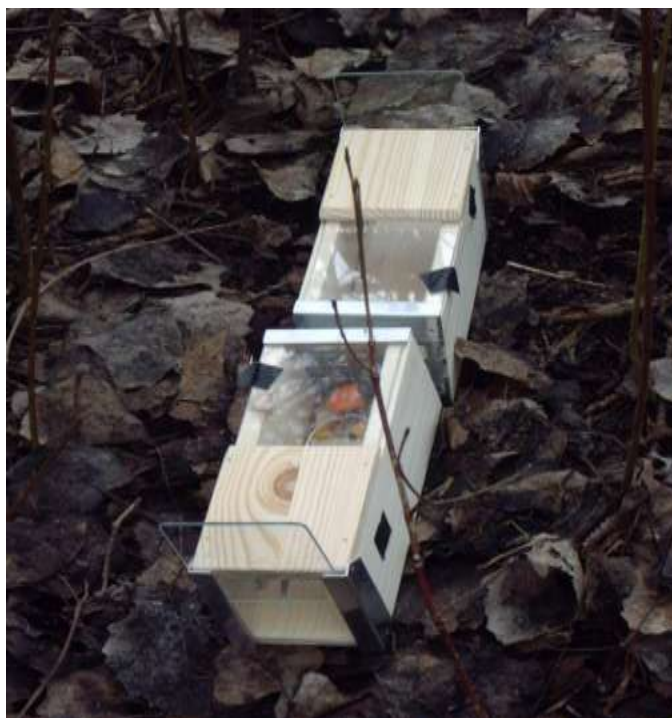
### Helyszín

A vizsgálat helyszíne Gemenc, a Duna magyar szakaszának déli részén elhelyezkedő nagy területű, erős vadgazdálkodással rendelkező, erdőkkel gazdagon borított területe. A mintavételi területünket bátai központtal jártuk be és csapdáztunk az előre meghatározott helyeken (1. táblázat).

#### 1. táblázat: Kisemlős csapdázási helyszínek, és a mintavételezés dátuma

dátum	2010.07.06	2010.09.17	2010.11.12	2011.05.20	2011.10.07	2011.11.25	2012.05.11.
helyszín	Pörböly	Báta	Báta	Báta	Pörböly	Pörböly	Báta

A kisemlős csapdázás 2010-ben kezdték el a tanszék munkatársai Pörböly (é.sz. 46° 11,847' k.h. 18° 49,983') és Báta község közelében (é.sz. 46° 08,002' k.h. 18° 49,142'), módosított Sherman csapdákkal.(1. kép) Ebbe a vizsgálatba kapcsolódtam be 2012-ben. Minden alkalommal két éjszakán át csapdáztunk. A nem védett fajokat túllattuk.



**1. kép:** módosított Sherman csapda

## Kullancsok gyűjtése

Zászlózással (flagging) vagy egy lepel magunk után húzásával (dragging) gyűjtöttük a gazdát kereső kullancsokat (2. kép). Mindkét módszernél egyszerű, de hatékony eszközöket alkalmaztunk, ami egy rúdból és egy ráerősített szövet darabból áll. Egyes esetekben nagyobb testű, gazdaállatra váró kullancsok –például *Dermacentor* fajok- könnyen észrevehetőek ezeket ilyenkor csipesszel vagy kézzel is hatékonyan lehetett begyűjteni. A kullancsok gyűjtését a növényzetről 2012. május 11-én és 12-én, öt helyszínen végeztük.



**2. kép:** Kullancsgyűjtés

## Ektoparazita és szövetmintagyűjtés a befogott állatokról

A nagyméretű, könnyen észrevehető, megszívott kullancsokat a terepen eltávolítottuk a kisemlősökről (3. kép). A kisebb méretű ektoparazitákat pedig a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Parazitológiai és Állattani Tanszékének laboratóriumában a boncolás előtt gyűjtöttük össze. A boncolás után még egyszer átnéztük az alkoholban tárolt állatokat, így valószínűleg az ektoparazitáik többségét sikerült begyűjtenünk. Egyes esetekben a boncolás már a szálláson megtörtént.

A befogott állatokról a megtalált bolhákat és atkákat is összegyűjtöttük későbbi vizsgálatok céljából. Az összes ektoparazitát 70%-os alkoholban tároltuk.

A kullancsokat a begyűjtés után határozókulcs segítségével szétválogattuk fajokra és fejlődési stádiumokra (Hillyard, 1996; Nosek és Sixl, 1972). Az adult egyedeknél a válogatást nemük szerint is megtettük. Az ektoparaziták begyűjtése közben feljegyeztük, melyik kisemlősről gyűjtöttük őket. A kisemlősökről feljegyezésre került, hogy mikor és hol lettek csapdázva, ezen kívül a fajukat, ivarukat, tömegüket és testhossz adataikat (testhossz farok nélkül, farokhossz, talphossz) is regisztráltuk.

A további vizsgálatokhoz az étterrel túlaltatott egyedekből szövetmintákat vettünk különböző szervekből (lép, máj, tüdő, bőr) laboratóriumi körülmények között. A szövetmintákat fagyasztva tároltuk  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A mintavétel során az eszközök leégetésével és alkoholos/hypós mosással előztük meg a kontaminációt.



**3.kép:** Helyszíni ektoparazita gyűjtés kisemlősről

## Léplenyomat

A kisemlősökből a boncolás során lépmintát vettünk. A friss vágási felület ismételt tárgylemezhez érintésével lenyomatokat készítettünk. A tárgylemezeket szobahőmérsékleten megszáritottuk, 70%-os etanollal fixáltuk, majd Giemsa-festékekkel megfestettük. Az így előkészített tárgylemezeken a vérparaziták jelenlétét fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

## DNS kivonás

A megbízhatóbb eredmények érdekében külön helyiségben végeztük a DNS kivonást, a PCR (polymerase chain reaction) összemérését és a gél-elektroforézist. A kontamináció elkerülése érdekében rendszeresen cseréltük a pipettahegyeket, kesztyűket, valamint negatív kontrollt (PCR víz) alkalmaztunk.

## Kullancsok

A DNS kivonása a kullancsokból alkalikus hidrolízissel történt (Guy & Stanek, 1991). A kullancsokat szűrőpapírra helyeztük, hogy elpárologjon belőlük az alkohol, ezután a nagyobb testű nőstényeket kettévágtuk. A mintákat 1,25% ammónium-hidroxid oldatot tartalmazó mikrocentrifuga csőbe helyeztük, ezután a kullancsokat steril szikével legalább 2-3 darabra vágtuk. Az így előkészített csöveket fél óráig zárt fedővel forraltuk, hogy a mintában található DNS oldatba kerüljön. Ezt egy fél órás nyitott fedeles forralás követte, ami során az ammónium-hidroxid elpárolog az elegyből. Az így feltárt DNS-t ezután fagyasztva tároltuk a molekuláris vizsgálatok megkezdéséig. A kisemlősökről gyűjtött kullancsok közül az egy gazdafajról származó lárvákból poolokat készítettünk. A többi stádiumú egyedeket külön-külön kezeltük.

## Szövetminták

A *B. burgdorferi* s.l. jelenlétét bőrmintákban vizsgáltuk. Összesen 355 kisemlős bőrmintájából történt DNS kivonás. A *Hepatozoon*-fajokra irányuló vizsgálataink során (a léplenyomatok eredményei alapján) a vöröshátú erdeipocokból származó lépmintákat egyenként, a többi faj esetében 100 egyedből vontunk ki DNS-t. A szövetmintákat egyesével dolgoztuk fel. Belőlük módosított Miniprep Express Matrix protokoll (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) segítségével nyertük ki a DNS-t. A szövetmintákat egy éjszakán át proteináz-K enzimmel emésztettük. Ezután a lepipettázott felülűszóhoz adtuk a DNS-kötő mártixot, majd

a szennyeződések alkoholos lemosással távolítottuk el. A tiszta mikrogyöngyöket kiszárítottuk, hogy az alkohol teljesen elpárologjon, majd puffer segítségével oldottuk le a gyöngyökről a megkötött DNS-t.

### *Borrelia burgdorferi* s.l PCR

Az általunk használt IGSa (5'-CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC-3') és IGSb (5'-AGCTCTTATTCGCTGATGGTA-3') primerpár a riboszómális fehérjéket kódoló régiók közötti nem-kódoló szakasz (intergenikus spacer) felszaporítását végzi (Derdakova et al. 2003). A nagyszámú mintát poolokban (max. 10 minta DNS/pool) dolgoztuk fel, a pozitív poolok mintáit egyesével is megvizsgáltuk. Derdakova et al. (2003) módszeréhez képest némi módosítással egy ún. touch-down hőprofil alkalmaztunk. Ennek a reakciónak az első lépése egy denaturációs szakasz 94 °C-on 5 percig, majd 5-ször ismételt ciklusban denaturációs (94 °C, 15s), anellációs (61 °C, 25s) és extenziós (72 °C, 30s) szakaszok követték egymást úgy, hogy minden ciklusban 0,2 °C-kal csökkent az anellációs hőmérséklet. Ezután ismét 5 ciklusban denaturációs (94 °C, 15s), anellációs (60 °C, 25s) és extenziós (72 °C, 30s) szakaszok követték egymást úgy, hogy minden ciklusban 0,4 °C-kal csökkent az anellációs hőmérséklet. Végül 25 ciklusban denaturációs (94 °C, 15s), anellációs (58 °C, 30s) és extenziós (72 °C, 30s) szakaszok után 4 °C-ra hűtöttük a mintákat.

A PCR termékek azonosításához pozitív kontrollként humán mintából származó tenyészetből izolált DNS szolgált. A mastermix összetevőinek aránya a 2. táblázatban megtalálható.

**2. táblázat:** A IGS reakció összetétele

<b>összetevő</b>	<b>menyiség (µl)/minta</b>
PCR víz	16,5
5x PCR- puffer (+7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5
dNTP 10 mM	0,5
IGSa (0,1 nmol/µl)	0,125
IGSb (0,1 nmol/µl)	0,125
Taq DNS- polimeráz 5U/µl	0,1
templát DNS	1,5

## *Hepatozoon* PCR

A vöröshátú erdeipocokból származó mintákat egyenként, míg a többi faj egyedeiből kivont DNS-eket poolokban (1-5 minta/pool) vizsgáltuk. A gyűjtött lárvákat poolokban (maximum 10 lárva/rágcsáló/pool) a nimfa és a kifejlett állatokat egyenként vizsgáltuk tovább. Először, hogy megvizsgáljuk, melyik egyed hordozott bármely Apicomplexa törzsbe tartozó parazitát RLB-F (5'-GAGGTAG TGACAAGAAATAACAATA-3') és RLB-R (5'-TCTTCGATCCCCTAACTTTC-3') primereket használtunk, amelyek a 18S rRNS gén V4 régiójának kb. 500 bázispár hosszúságú szakaszához kötődnek (Gubbels et al., 1999). A reakció első lépése egy denaturációs szakasz 94 °C-on 15 percig, majd 40-szer ismételt ciklusban denaturációs (94 °C, 1 perc), anellációs (50 °C, 1 perc) és extenziós (72 °C, 1,5 perc) szakaszok követték egymást. Végül egy 72 °C-on 10 percig tartó terminációs lépés után 4 °C-ra hűtöttük a mintákat.

A pozitív mintákból az egész 18S rRNS gént felszaporítottuk egy másik, CRYPTO F (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') és CRYPTO R (5'-GCTTGATCCTTCTGCA GGTTACCTAC-3') primerpárral (Herwladt et al., 2003). Az első PCR reakció azért volt szükséges, mert a nagy DNS tartalmú szövetekben a CRYTO primerpár képes egyes esetekben emlős DNS-t is amplifikálni. A reakció első lépése egy denaturációs szakasz 95 °C-on 15 percig, majd 45-ször ismételt ciklusban denaturációs (94 °C, 0,5 perc), anellációs (65 °C, 0,5 perc) és extenziós (72 °C, 1,5 perc) szakaszok követték egymást. Végül egy 72 °C-on 9 percig tartó terminációs lépés után 4 °C-ra hűtöttük a mintákat.

A termékek azonosításához pozitív kontrollként Dr. Viktória Majláthovától (Szlovák Tudományos Akadémia Kassai Parazitológiai Intézete) kapott ismert *Hepatozoon* DNS-t használtunk. A két különböző primerhez tartozó reakcióelegy összetevői a 3. és 4. táblázatban láthatók.

**3. táblázat:** Az RLB reakció összetevői

<b>összetevő</b>	<b>menyiség (µl)/minta</b>
PCR víz	13,5
5x PCR puffer (+ 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5
dNTP 10 mM	0,5
RLB-F	1,25
RLB-R	1,25
Taq DNS polimeráz	0,1
templát DNS	2,5

**4. táblázat:** A CRYPTO reakció összetevői

<b>összetevő</b>	<b>menyiség (µl)/minta</b>
PCR víz	17,6
5x PCR puffer (+ 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5
dNTP 10 mM	0,5
CRYPTO-R	0,125
CRYPTO-F	0,125
Taq DNS polimeráz	0,15
templát DNS	1,5

## Gél-elektroforézis

Az amplikonokat 1,5%-os agaróz gélen futtattuk, aminek az elkészítéséhez TBE (Tris-Borát-EDTA) puffert használtunk. A futtató közeghez etídium-bromidot adtunk, így UV sugárzás mellett készített fényképen láthatóvá vált a PCR reakció eredménye.

## Szekvenálás

Az összes *Hepatozoon* pozitív PCR mintát megszekvenáltattuk kapilláris szekvenátorral (Macrogen, Szöul, Dél-Korea). A teljes 18S rDNS-t mindkét irányban megszekvenáltattuk, ezt a szekvenciát összevetettük a nemzetközi génbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid adatbázisával.

## Vadon élő kisemlősök kullancsfogyasztása

2012 májusában egy előkísérletben megpróbáltuk bizonyítani azt a hipotézisünket, hogy a csapdázott rágcsálók fogyasztanak kullancsokat. Ezek a kullancsok potenciális vektorai lehetnek a *Hepatozoon* fajoknak. A csapdázott kisemlősök közül három faj (mezei pocok, vöröshátú erdeipocok, pirók erdeieger) egy-egy példányát átlátszó műanyag dobozokba tettük. Összesen két hím és hat, kisebb-nagyobb mértékben megszívott nőstény *Ixodes ricinus*-t helyeztünk be hozzájuk. Kezdetben figyeltük az állatok viselkedését, majd egy estére magukra hagytuk őket, ezután túlaltattuk őket. A dobozokat utána megvizsgáltuk, maradt-e bennük a behelyezett kullancsokból. A rágcsálók tetemeit 70%-os alkoholban tároltuk. Az egész emésztőtraktust és a dobozokban talált ürüléket átvizsgáltuk sztereomikroszkóppal kullancsmaradványok után.

### Adatok elemzése

A statisztikai elemzést, valamint a konfidencia intervallumok számítását az R programcsomag (R Development Core Team 2008) és a Quantitative Parasitology 3.0. program (Rózsa et al. 2000) segítségével készítettük.

A parazitáltság számszerűsítésére többféle értéket szoktak használni. A prevalencia mutatja meg, hogy a gazda populáció egyedeinek hány százaléka volt fertőzött a kérdéses parazitával. Az abundancia megadja az összes vizsgált egyeden az összes parazita számát. Az intenzitás pedig azt, hogy a fertőzött egyedeken hogyan oszlanak el a paraziták.

## Eredmények

### *Csapdázott kisemlősök*

Hat kisemlős fajt sikerült csapdáznunk, ezek mindegyike rágcsáló volt (5. táblázat).

#### **5. táblázat:** Csapdázott fajok és egyedszámok.

<i>A. agrarius</i>	<i>A. flavicollis</i>	<i>M. glareolus</i>	<i>M. arvalis</i>	<i>M. minutus</i>	<i>M. musculus</i>
241	168	36	12	11	5



## Növényzetről és rágcsálóról gyűjtött kullancsok

A kétnapos terepi gyűjtés alatt összesen az öt helyszínen 136 egyedet gyűjtöttünk 4 faj (*Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Ixodes ricinus*) egyedeiből. A *H. concinna* minden fejlődési stádiumát, a többi fajból csak két stádiumot sikerült gyűjtenünk. A legnagyobb számban a *D. marginatus* nőtényei és *H. concinna* lárvái kerültek begyűjtésre. A legkevesebb (2 egyedet) a *D. marginatus* nőtényeiből azonosítottunk. A terepen gyűjtött kullancsok pontos egyedszámait a 6. táblázatban lehet megtekinteni.

**6. táblázat:** Növényzetről gyűjtött kullancsok

<b>faj/stádium/ivar</b>	<b>egyedszám</b>
<i>Dermacentor marginatus</i> nőtény	2
<i>Dermacentor reticulatus</i> hím	18
<i>Dermacentor reticulatus</i> nőtény	31
<i>Haemaphysalis concinna</i> lárva	31
<i>Haemaphysalis concinna</i> nimfa	10
<i>Haemaphysalis concinna</i> hím	8
<i>Haemaphysalis concinna</i> nőtény	11
<i>Ixodes ricinus</i> nimfa	20
<i>Ixodes ricinus</i> hím	5

A kisemlősökről az egész mintavételi periódusban összesen 204 kullancsot gyűjtöttünk be a többszöri átvizsgálások során. A legtöbb egyedet az *Ixodes acuminatus* lárváiból gyűjtöttük. A második leggyakoribbak *Dermacentor marginatus* lárvák voltak. A 475 kisemlősből csak 36-on találtunk kullancsot. A legtöbb, összesen 26 egyedet (20 *I. acuminatus* lárva, 5 *D. marginatus* lárva, 1 *I. ricinus* nimfa) egy hím sárganyakú erdeiegeren találtuk, amelyet 2010 augusztusában csapdáztunk.

**7. táblázat:** Kisemlősökről gyűjtött kullancsok

<b>faj/stádium/ivar</b>	<b>egyedszám</b>
<i>Dermacentor marginatus</i> lárva	50
<i>Dermacentor marginatus</i> nimfa	9
<i>Haemaphysalis concinna</i> lárva	3
<i>Haemaphysalis concinna</i> nimfa	22
<i>Ixodes acuminatus</i> lárva	52
<i>Ixodes acuminatus</i> nimfa	2
<i>Ixodes acuminatus</i> nőstény	4
<i>Ixodes ricinus</i> lárva	20
<i>Ixodes ricinus</i> nimfa	5
<i>Ixodes ricinus</i> hím	1

A kisemlősökről gyűjtött kullancsok pontos száma a 7. táblázatban található. A rágcsáló egyedszámok, amelyekkel a statisztikai elemzések végeztük a 8. táblázatban láthatóak.

A hat csapdázott kisemlős faj közül csak négy faj egyedszáma volt elegendő statisztikai elemzésekhez. A kullancsfertőzöttség prevalenciája és átlagos intenzitása a sárganyakú erdeiegeren volt a legnagyobb. A prevalenciák különbségét Fisher-féle egzakt teszttel vizsgáltuk, amely szignifikáns ( $p=0.000$ ) különbséget mutatott mind a két fajnál (pirók erdeieger, sárganyakú erdeieger). Medián intenzitásukban azonban nincs szignifikáns különbség.

**8. táblázat:** A kisemlősök kullancsfertőzöttsége

<b>Faj</b>	<b>összes (db)</b>	<b>fertőzött (db)</b>	<b>prevalencia (%) (CI*)</b>	<b>intenzitás</b>	
				<b>átlagos (CI*)</b>	<b>medián (CI*)</b>
<i>A. agrarius</i>	241	5	2,1 (0,83-4,71)	3,2 (1-5,4)	1 (**)
<i>A. flavicollis</i>	168	28	16,7 (11,52-23,15)	11,82 (6,18-26)	3 (1-5; 95,6***)
<i>M. glareolus</i>	36	2	5,6 (1-18,99)	6,5 (**)	6,5 (**)
<i>M. arvalis</i>	12	1	8,3 (0,43-37,01)	9 (**)	9(**)
<i>összesen</i>	457	36	7,9		

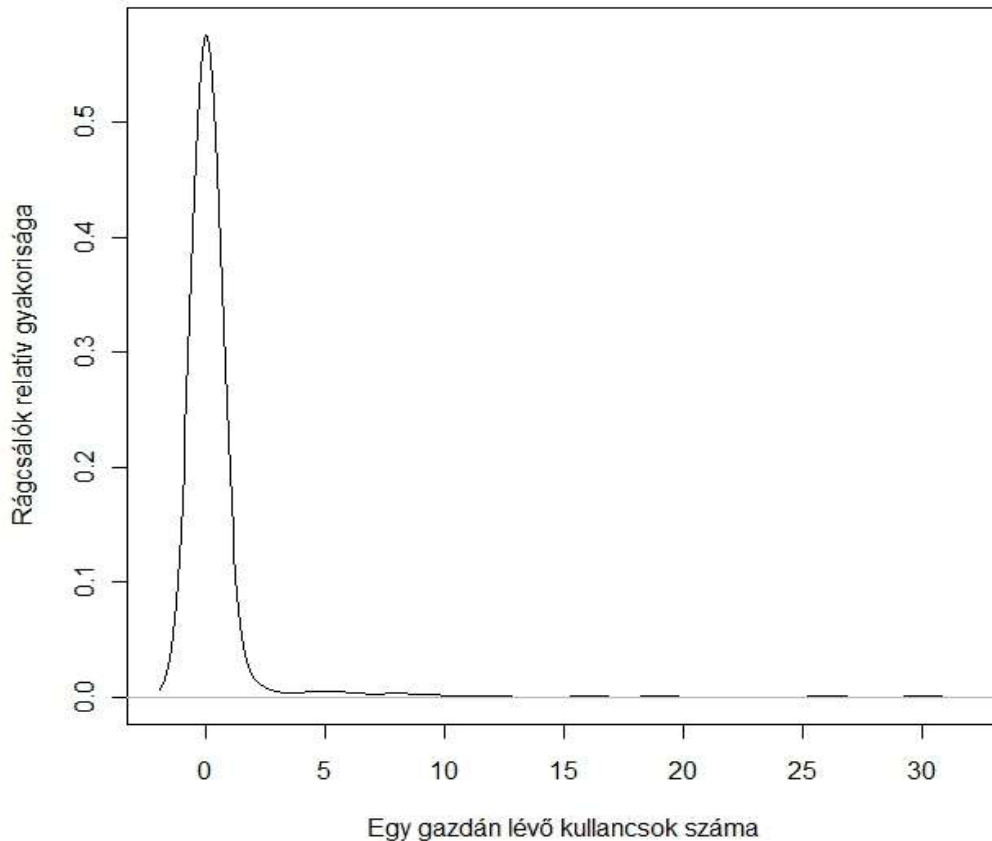
\*95%-os konfidencia intervallummal

\*\* a kis mintaelemszám miatt nem értelmezhető

\*\*\* egzakt CI

A kullancsok rágcsálókra való abundanciájának extrém jobbra ferde eloszlása miatt (1. ábra), lineáris modelleket nem tudtunk használni, de még a ferde eloszlásokra használható nem-lineáris modellek (negatív binomiális, Poisson, Quasipoisson) sem voltak használhatóak.

### A kullancsfertőzöttség intenzitásának eloszlása



1. ábra: A csapdázott rágcsálók kullancs fertőzöttsége

### *Borrelia*-fertőzöttség kisemlősök bőrmintáiban; kisemlősről gyűjtött és növényzetről gyűjtött kullancsokban

A megvizsgált kullancs mintákból négyet találtunk *Borrelia*-pozitívnak. Ezek mind 2011 novemberében lettek gyűjtve. A négy *Borrelia*-val fertőzött szövetmintából három hím pirók erdeiegeérből, egy pedig nőstény sárganyakú erdeiegeérből származott. A négy minta közül egy pirók erdeiegeér hím minta volt fertőzött *B. afzelii*-vel.

A szívott kullancsok közül csak egy minta tartalmazott *Borrelia* DNS-t, ez egy *Ixodes acuminatus* nimfa, amely egy *Borrelia* PCR-negatív hím sárganyakú erdeiegeren volt 2010 júliusában. Ez a szekvenálás után *B. afzelii*-nek bizonyult.

A terepen gyűjtött kullancsokból nem sikerült tiszta DNS szekvenciát kivonnunk.

## Kisemlősök *Hepatozoon spp.* fertőzöttsége

Nyolc vöröshátú erdeipocok léplenyomatában Dr. Majoros Gábor (SZIE ÁOTK) a *Hepatozoon* paraziták gamontjaira emlékeztető intra- és extraerythrocyter formákat azonosított. E rágcsáló faj *Hepatozoon* fertőzöttségének prevalenciája 22,22%-os (95%CI: 10,72-39,58) volt. Ezek a rágcsálók molekuláris módszerekkel is fertőzöttnek bizonyultak az Apicomplexa törzs tagjaira specifikus primerrel. A többi kisemlős faj lép mintái negatívnak bizonyultak mindkét módszerrel.

A leghasonlóbb szekvencia az NCBI adatbázisban RLB-F és RLB-R primerpárral is csak 95-96%-os egyezést mutatott. A teljes 18S rDNS amplikonjaink (génbanki azonosító: JX644996, JX644997, JX644998) nagyon hasonlóknak bizonyultak a Spanyolországban szintén vöröshátú erdeipocokból (AY600625.1, AY600626.1) (Criado-Fornelio et al., 2006) eddig el nem nevezett, és egy királypítóból (*Python regius*) kimutatott *Hepatozoon ayorgbor* (EF157822.1) fajjal (Sloboda et al., 2007).

## Vadon élő kisemlősök kullancsfogyasztása

A kísérlet során mind a három egyed legalább egy kullancsot elfogyasztott. A mezei pocok három megszívott nőtényt és két hímét, a vöröshátú erdeipocok egy hímét és a pirók erdei egér az összes felkínált kullancsot elfogyasztotta. A kullancsok maradványai az ürülékekben vagy az emésztő traktusban megtalálhatóak voltak.

## Megbeszélés

A kisemlősök nagy számban fordulnak elő Magyarország természetes és városi élőhelyein. Ezek gyakran hordoznak különféle ekto- és endoparazitákat. Vizsgálatunk célja az volt, hogy fényt derítsünk egy dél-magyarországi terület kisemlőseinek parazitáltságára, és hogy megtudjuk, hogy a terepen növényzetről gyűjtött kullancsokban jelen van-e valamilyen fertőző ágens.

A csapdázott kisemlősökön összesen 204 kullancsot gyűjtöttünk. Ez 0,43-as abundancia szintnek felel meg, ami hasonló európai vizsgálatok eredményeihez képest alacsonynak mondható (Khanakah et al., 2006; Kiffner et al. 2011). Ezt okozhatják a rendszeres gemenci áradások, de más tényezők is szerepet játszhatnak a rágcsálók alacsony kullancsfertőzöttségének a kialakításában. A következő négy faj egyedeit gyűjtöttük: *D. marginatus*, *H. concinna*, *I. acuminatus* és *I. ricinus*. A talált fajok között vannak exofilek (pl. *I. ricinus*), endofilek (pl. *I. acuminatus*) és vannak olyan fajok, amelyeknek lárvái és nimfái endofilek, majd adultként exofil életmódot folytatnak (*Dermacentor spp.*). A *D. marginatus* subadult alakjainak azonosítása azért is figyelemre méltó, mert e faj adultjai ismert vektorai a háziállatok *Babesia*-fajainak, de lárvái és nimfái gazdáiról korlátozott információink vannak.

A sárganyakú erdeiegereknél szignifikánsan magasabb kullancs fertőzöttségi prevalenciát figyeltünk meg a többi rágcsálófajhoz képest. Ennek a nagyobb méret és a nagyobb mozgástér lehet az oka.

A PCR-rel vizsgált vért szívott *Ixodes* példányok közül csak egy *I. acuminatus* nimfa bizonyult pozitívnak. Ez a faj legtöbbször kisemlősök üregeiben található meg. Nagyobb emlősök, mint a nyestfélék és a róka is fertőződhetnek ezzel a kullancsfajjal, ha a prédáról átmászik a kullancs, vagy feldúlják a rágcsálók fészkeit. Ritkán emberen és madarakon is előfordulhat. Hillyard (1996) szerint a mélyebben fekvő, meleg és párásabb élőhelyeket preferálja, ezeknek a szempontoknak meg is felel Gemenc. Az *I. acuminatus* a Lyme-kórt okozó baktériumon kívül a tularémiát okozó (*Francisella tularensis*) baktérium hordozója is lehet (Hillyard, 1996).

Korábbi hasonló vizsgálatok során Dévaványa mellett csapdázott mezei hörcsögről (*Cricetus cricetus*) leszedett egyetlen *I. acuminatus* nőstény volt *Borrelia*-pozitív (Rigó et al, 2011). A szekvencia meghatározás során *B. afzelii*-nek bizonyult. Az általunk talált *Borrelia*-kat a jövőben fogjuk azonosítani faji szinten.

A terepen gyűjtött kullancsok között a *D. marginatus* és *D. reticulatus* adultjait, a *H. concinna* minden fejlődési stádiumát, az *I. ricinus* nimfáját és adultjaikat találtunk. A terepi és a kisemlősökről gyűjtött kullancsokból egy kisemlősről gyűjtött *I. acuminatus* nimfából tudunk *B. afzelii* fertőzöttséget kimutatni.

A 355 kisemlős bőrmintából 4 bizonyult pozitívnak *B. burgdorferi* s.l.-ra. Ezeket mind 2011. novemberi csapdázás alkalmával fogtuk be. Ebből a négy mintából 3 hím pirók erdeieigérből lett gyűjtve, egy pedig egy sárganyakú erdeieigér nőstényből származik. A *Borrelia*-fertőzöttség prevalenciája pirók erdeieigér esetében 1,2 % és sárganyakú erdeieigér esetében 0,6 %. Ez az érték a hasonló nemzetközi vizsgálatok némelyikéhez képest egy vagy két nagyságrenddel is kisebb. Litvániában a sárganyakú erdeieigér *Borrelia*-fertőzöttségének prevalenciája 0-37% közötti, a pirók erdeieigérben pedig 11-33 % közötti értéket mutatott (Paulauskas et al., 2008). Norvégiában a *Borrelia*-fertőzöttség prevalenciája sárganyakú erdeieigérben 6%-os volt (Paulauskas et al., 2008).

A szekvenálás után *B.afzelii*-t azonosítottunk a mintákban, amely egy általános rágcsáló *Borrelia*.

Az északi féltekén a fertőzésért felelős leggyakoribb vektor az *Ixodes ricinus/persulcatus* csoportba tartozó kullancsok. Ezek a fajok sokféle gazdán táplálkoznak így képesek átvinni a fertőzést egyik gazdafajról a másikra is. A potenciálisan *B. burgdorferi* s.l. fertőzést hordozó kullancsfajok esetenként szívhatnak vért emberből is. A kisemlősök a nagy egyedszámuk és a kullancslárvák és nimfák gazdakereső magasságában való mozgásuk miatt fontos kullancsgazdák. A *B. burgdorferi* s.l. baktériumokra való fogékonyságuk révén pedig rezervoár állatokként nagy szerepet játszhatnak a Lyme-borreliosis természetes ciklusának fenntartásában. Egyetlen fertőzött rágcsáló jelentős mennyiségű aggregáltan előforduló kullancslárvával, és a nagy mozgásterük miatt sok gazdára váró nimfával is találkozhat. Ezeket a vektorokat potenciálisan megfertőzheti, és ezek a kullancsok akár egymást is fertőzhetik (co-feeding) táplálkozás közben (Bowman & Nuttall, 2008).

Tudomásunk szerint ez az első megfigyelés a *Hepatozoon*-fajok hazai előfordulásáról. Csak a vöröshátú erdeipocok szövetmintái bizonyultak magas prevalenciával (22,22%, 95%CI: 10,72-39,58) fertőzöttnek. Az eddigi vizsgálatok nagyobb prevalenciáról számoltak be: Észak –Európában: 18-57 % (Laakkonen et al., 2001) Lengyelországban: 18,9-41,6% (Karbowski et al., 2005). Vizsgálatunk alapján a vöröshátú erdeipocok egyedülálló szerepet játszhat a *Hepatozoon*-fajok fenntartásában. Ezek a pockok nem csak több földrajzi régióban

voltak magas prevalenciával fertőzöttek, hanem több különböző *Hepatozoon*-fajjal is (*H. griseisciuri*, *H. sylvaticus* és *H. erhardovae*) (Craig, 2001). Sajnos nem áll rendelkezésünkre megfelelő mennyiségű DNS szekvencia az NCBI génbankjában a meghatározott *Hepatozoon* fajokra, ahhoz hogy a 96%-os egyezési szintnél jobb faji azonosságot találjunk.

Már Sloboda és munkacsoportja rámutatott a hasonlóságokra az Európában vöröshátú erdeipocokból és Ghánából származó királypiton mintából kimutatott eredmények között. Erről a témáról némileg ellentmondásosak a publikált adatok. Úgy tűnik, néha genetikailag nagyon hasonló paraziták fertőzhetnek sokféle gazdát és vektort (Criado-Fornelio et al., 2006; Sloboda et al., 2007).

Ugyanannak a gazdafajnak a genetikailag különböző *Hepatozoon*-fajokkal való fertőződéséről már beszámoltak (Harris et al., 2011). Arra, hogy tisztázzuk ezeknek a parazitáknak a leszármazási viszonyait, több gént egyidejűleg célzó molekuláris vizsgálatokra lenne szükség.

Az emlős fajok *Hepatozoon* parazitáinak beazonosítása nagyon nehéz, mivel a legtöbbjük 1920-as és 1980-as években került leírásra. Ezek a leírások csak egy fejlődési stádium morfológiai leírásán alapultak (Smith, 1996; Craig, 2001). A közelmúltban számos kutatás foglalkozott különböző közti- és végleges gazdákból gyűjtött *Hepatozoon* minták vizsgálatával, az ezekben talált paraziták sokszor nincsenek elnevezve és beazonosítva (Sloboda et al., 2007; Criado-Fornelio et al., 2006). A kullancsok csak egyike a *Hepatozoon* fertőzést terjesztő vérszívó gerinctelen vektorok csoportjainak (szúnyogok, bolhák, tetvek). A szakirodalomban nem találtunk bizonyítékot arra, hogy ezek az általunk gyűjtött rágcsáló fajok fogyasztanának kullancsokat.

A vadon élő kisemlősök kullancsfogyasztását célzó kísérletünk során megfigyeltük, hogy nem csak az általában mindenevő (vöröshátú erdeipocok, pirók erdeieger), hanem a főleg növényevő fajok (mezei pocok) (Butet and Delettre, 2011) is esetenként fogyasztanak kullancsokat. Tehát megfigyelésünk alátámasztotta, hogy nem csak az omnivor vöröshátú erdeipocok fogyaszt kullancsokat a rágcsálók közül.

Tudjuk, hogy a vizsgálatunk ezen része csak elővizsgálat jellegű a kis mintaelemszám miatt, de tervezzük több rágcsálóval és ellenőrzöttebb körülmények között vizsgálni ezt a jelenséget. Tervezzük a csapdázott kisemlősökről és a terepen növényzetről gyűjtött kullancsok vizsgálatát annak tisztázására, hogy ez a vöröshátú erdeipocokban megtalált *Hepatozoon*-faj megtalálható-e bennük. Ezen kívül a terepen gyűjtött kullancsok *Borrelia*-

fertőzöttségét is meg fogjuk vizsgálni. Legutóbbi, 2012. októberi kiszállásunk alkalmával nem messze a csapdázási területtől nagy mennyiségű bagolyköpetet találtunk és gyűjtöttünk be. Terveink között szerepel ezeknek a köpeteknek az összehasonlító csonttani elemzése. Ennek segítségével kiegészítő adatokat kaphatunk a terület kisemlős faunájáról.



## Összefoglalás

### Gemenci kisemlősök és kullancsok járványtani és ökológiai vizsgálata

Magyarország természetes és urbánus élőhelyein nagy számban vannak jelen a kisemlősök, melyek fontos gazdái a kullancsok nimfáinak és lárváinak, emiatt központi szerepet játszhatnak az élőhelyek kullancs populációjának, ezáltal közvetetten a kullancsok által terjesztett kórokozók (pl. *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp.), fenntartásában is. Vizsgálatunk során Gemencen -a Duna árterében- három helyszínen, módosított Sherman csapdával gyűjtöttünk kisemlősöket 2010. és 2012. között. A csapdázás során 6 faj, a sárganyakú erdeieger (*Apodemus flavicollis*), pírók erdeieger (*A. agrarius*), vöröshátú erdeipocok (*Myodes glareolus*), mezei pocok (*Microtus agrestis*), házi egér (*Mus musculus*), törpeeger (*Micromys minutus*) egyedeit csapdáztuk. A nem védett fajok túlaltatását követően eltávolítottuk róluk a külső parazitákat, és szövetmintákat vettünk belőlük. Az ektoparazitákat és a kisemlősöket alkoholban, a szövetmintákat fagyasztva (-20°C-on) tároltuk. A szövetmintákat molekuláris módszerekkel vizsgáltuk, felszaporítva bennük az esetleges kórokozók DNS-ét. A vizsgálat részeként 2012 májusában növényzetről is megkezdtük a kullancsok gyűjtését, és négy faj (*Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Ixodes ricinus* és *Haemaphysalis concinna*) egyedeit találtuk meg. A kisemlősökön összesen 206 kullancsot találtunk a *D. marginatus*, *I. acuminatus*, *H. concinna* és *I. ricinus* különböző stádiumú egyedeiből.

Nyolc vöröshátú erdeipocok festett léplenyomatában *Hepatozoon* parazitákat figyeltünk meg. Ennek a protozoon fajnak az azonosításához izoláltuk a DNS-t a fertőzött egyedek lépmintáiból, és felszaporítottuk az egész 18S rDNS szakaszt, majd szekvenálással egy, még el nem nevezett fajhoz találtuk leghasonlóbbnak. Előzetes kísérletünk során 3 rágcsáló fajról (*M. glareolus*, *M. arvalis* és *A. agrarius*) bebizonyosodott, hogy megfigyelhetően kullancsot fogyasztott. Ennek a kórokozó terjedésében szerepe lehet.

A bőrmintákból mikroyöngyös módszert alkalmazva DNS-t vontunk ki. A minták esetleges *Borrelia*-fertőzöttségét a *Borrelia burgdorferi* sensu lato baktériumokra specifikus polimeráz láncreakció segítségével mutattuk ki. A szövetminták feldolgozása során 4 fertőzött mintát találtunk, amelyből 3 *A. agrarius* hímekből (1 *B. afzelii* pozitív) és 1 *A. flavicollis* nőtényből származott.

Egy kisemlősről gyűjtött *I. acuminatus* nimfa volt *B. afzelii*-vel fertőzött.

## Summary

### Epidemiological and ecological study of small mammals and ticks in Gemenc

Small mammals abundant in natural and rural habitats of Hungary are important hosts for nymphs and larvae of ticks. Thus they may play a central role in the maintenance of the tick population in the habitat, and so indirectly in the natural cycle of tick-borne pathogens (e.g. *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp.).

In our research at Gemenc – in the flood-basin of the Danube – we collected small mammals from three areas with modified Sherman traps between 2010 and 2012. After the trapping we managed to trap 7 species (yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*; striped field mouse, *A. agrarius*; bank vole, *Myodes glareolus*; common vole, *Microtus agrestis*; eastern house mouse, *Mus musculus*, harvest mouse, *Micromys minutus*). Following the euthanasia we removed their ectoparasites and took tissue samples from them. We stored the ectoparasites and the small mammals in alcohol, while we stored the tissue samples at -20 °C. We analysed the tissue samples with molecular methods, amplifying the DNA of the possible pathogens. In May 2012 we began the collection of ticks from the vegetation as well. During this we found the individuals of 4 species (*Dermacentor reticulatus* 18 male, 31 female; *Dermacentor marginatus* 2 female; *Ixodes ricinus* 4 male, 20 nymph; *Haemaphysalis concinna* 8 male, 11 female, 10 nymph, 30 larva). We found 206 ticks on small mammals: *D. marginatus* larvae and nymphs, all three developmental stages of *I. acuminatus*, *H. concinna* larvae and nymphs, *I. ricinus* larvae, nymphs and a male.

In eight of the stained spleen impression smears of *M. glareolus* we detected *Hepatozoon* pathogens. For the identification of these protozoa, we isolated the DNA of the infected individuals and amplified the whole 18S rDNA sequence. It showed the highest sequence similarity to an unnamed *Hepatozoon* species. Our preliminary experiment proved that three species of rodents (*M. glareolus*, *M. arvalis* and *A. agrarius*) consume ticks. This might play a role in the spreading of this parasite.

We extracted DNA from the skin tissue samples and performed polymerase chain reaction using *Borrelia*-specific primers. The processing of samples we found 4 *Borrelia*-infestation, this samples were from 3 male *A. agrarius* and 1 female *A. flavicollis*. Among the rodent ticks we found only one *I. acuminatus* nymph positive.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Földvári Gábornak és Rigó Krisztinának a sok türelemért, segítségért és a sok segítő munkáért, ami nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm, Dr. Majoros Gábornak a *Hepatozoon* lépkenetek vizsgálatát, a sok hasznos tanácsot és ötletet.

Köszönöm, Prof. Dr. Farkas Róbert, tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított a SZIE-ÁOTK, Parazitológiai és Állattani Tanszéken a munkák elvégzéséhez.

Dr. Viktória Majláthovának és Dr. Lakos Andrásnak a pozitív kontrollok biztosításáért.

A Gemenci Erdő- és Vadgazdaság Zrt.-nak, hogy lehetőséget biztosítottak a vizsgálatok lebonyolítására.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani, az Állatorvos-tudományi Karon meghirdetett TDK hallgatók kutatásaira meghirdetett pályázatnak (TÁMOP 4.2.2B-10/1-2010-0011) és a SZIE-ÁOTK NKB támogatásáért.

A vizsgálatainkat a Közép-Dunántúli Környezetvédelmi Természetvédelmi és Vízügyi Felügyelőség engedélyével végeztük.

## Irodalomjegyzék

- BIHARI, Z (2007a): Pirók erdeiegeér. In: BIHARI, Z., CSORBA, G., HELTAI, M. (szerk), Magyarország emlőseinek atlasza, Budapest, Kossuth Kiadó, 2007. p.179-180.
- BIHARI, Z.(2007b): Házi egér: In: BIHARI, Z., CSORBA, G., HELTAI, M. (szerk), Magyarország emlőseinek atlasza, Budapest, Kossuth Kiadó, 2007. p.193-194.
- BOWMAN, A. S., NUTTALL, P. A. (2008): Ticks: Biology, Disease and Control Cambridge University Press, 507 pp
- BOYARD, C., VOURE'H, G., BARNOUIN, J. (2008): The relationship between Ixodes ricinus and small mammal species at the woodland–pasture interface. *Exp Appl Acarol* 44:61–76
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENACH, J. L., GRUNWALDT E., DAVIS, J. P. (1982): Lyme disease — a tick-borne spirochetosis?, *Science*, 216,p. 1317-1319
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A.G., HAYES, S.F., PÉTER, O., AESCHLIMANN, A. (1983): Erithrema chronicum migrans- as tickborne spirochetosis. *Acta Tropica* 40 (1), p. 79-83
- BUTET, A., DELETTRE, Y.R. (2011): Diet differentiation between European arvicoline and murine rodents. *Acta Theriol.* 56, 297–304.
- COLLARES-PEREIRA, M., COUCEIRO, S., FRANCA, I., KURTENBACH, K., SCHÄFER, S. M., VITORINO, L., GONÇALVES, L., BAPTISTA, S., VIEIRA, M. L., CUNHA, C. (2004): First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient, *J. Clin. Microbiol.*, 42, p. 1316-1318
- CRAIG, T.M., (2001): Hepatozoon spp. and hepatozoonosis. In: Samuel, W.M., Pybus, M., Kocan, A.A. (Eds.), *Par. Dis. Wild Mamm.* Iowa State University Press, Ames, pp. 462–468.
- CRIADO-FORNELIO, A., RUAS, J.L., CASADO, N., FARIAS, N.A., SOARES, M.P., MULLER, G., BRUMT, J.G., BERNE, M.E., BULING-SARANA, A., BARBA-CARRETERO, J.C., (2006): New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *Int. J. Parasitol.* 92, 93–99.

- CSERKÉSZ, T., HORVÁTH, GY. (2007): Sárganyakú erdeiegér: In: Bihari, Z., Csorba, G., Heltai, M. (szerk), Magyarország emlőseinek atlasza, Budapest, Kossuth Kiadó, 2007. p. 181-182.
- DERDÁKOVÁ, M., BEATI, L., PET'KO, B., STANKO, M., FISH, D. (2003): Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic., *Appl Environ Microbiol.*, 69(1):509-16.
- DIZA, E., PAPA, A., VEZYRI, E., TSOUNIS, S., MILONAS, I., ANTONIADIS, A. (2004): *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis.*, 9, p.1692-3.
- FÖLDVÁRI, G., FARKAS, R., LAKOS A. (2005a): *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerg Infect Dis*, 11, p, 1794-1795.
- FÖLDVÁRI, G., HELL, É., FARKAS, R. (2005b): *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: Detection by PCR and sequencing. *Vet Parasitol* 127: 221-226.
- FÖLDVÁRI, G., RIGÓ, K. (2009): A Lyme borreliosis járványtana és a gyíkfajok szerepe a betegség fenntartásában. *M. Á. L.*, 131: 494-502.
- FÖLDVÁRI, G., RIGÓ, K., MAJLÁTHOVÁ, V., MAJLÁTH, I., FARKAS, R., PET'KO, B. (2009): Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards and their ticks from Hungary. – *Vector-Borne and Zoonot Dis.* 9: 331-336.
- FURQUIM, K. C. S., BECHARA, G. H., CAMARGO MATHIAS, M. I. (2010): Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in different stages: description of new cell types. *Exp and App Acarol*, 50, p. 59-70.
- GERN, L., RAIS, O. (1996): Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 33, 189–92.
- GUBÁNYI, A. (2007): Vöröshátú erdeipocok: In: BIHARI, Z., CSORBA, G., HELTAI, M. (szerk), Magyarország emlőseinek atlasza, Budapest, Kossuth Kiadó, 2007. p.170-171.
- GUBÁNYI, A., HORVÁTH, GY. (2007): Mezei pocok: In: BIHARI, Z., CSORBA, G., HELTAI, M. (szerk), Magyarország emlőseinek atlasza, Budapest, Kossuth Kiadó, 2007. p.162-163.

- GUBBELS, J.M., VOS, A.P., WEIDE, M., VISERAS J., SCHOULS, L.M., DE VRIES, E., JONGEJAN, F. (1999): Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 37, 1782–1789.
- GUY, E.C., STANEK, G. (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* Jul; 44(7):610-1.
- GYURANECZ, M., RIGÓ, K., DÁN. Á., FÖLDVÁRI, G., MAKRAI, L., DÉNES, B., FODOR, L., MAJOROS, G., TIRJÁK, L., ERDÉLYI, K. (2011): Investigation of the Ecology of *Francisella tularensis*-During an Inter-Epizootic Period, *Vector-Borne and Zoonot Dis*, Volume 11, Number 8, 2011, Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/vbz.2010.0091
- HARRIS, R., KAUFMAN, W. R. (1981): Hormonal control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma herbarium*. *J Ins. Physiol.*, Vol. 27, Issue 4. p. 241-245, 247-248.
- HARRIS, D.J., MAIA, J.P., PERERA, A., (2011): Molecular characterization of Hepatozoon species in reptiles from the Seychelles. *J Parasitol* 97, 106–110.
- HARRISON, A., SCANTLEBURY, M., MONTGOMERY, W.I. (2010): Body mass and sex biased parasitism in wood mice *Apodemus sylvaticus*. *Oikos*.doi:10.1111/j1600-0706.2009.18072.x
- HERWALDT, B.L., CACCIÒ, S., GHERLINZONI, F., ASPÖCK, H., SLEMENDA, S.B., PICCALUGA, P., MARTINELLI, G., EDELHOFER, R., HOLLENSTEIN, U., POLETTI, G., PAMPIGLIONE, S., LÖSCHENBERGER, K., TURA, S., PIENIAZEK, N.J., (2003): Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 9, 942–948.
- HILLYARD, P.D. (1996): Ticks of north-west Europe. Dorset, Dorchester, 178 pp.
- HORVÁTH, GY. (2007a): Törpeegér: In: BIHARI, Z., CSORBA, G., HELTAI, M. (szerk), Magyarország emlőseinek atlasza, Budapest, Kossuth Kiadó, 2007. p. 191-182.
- HUMAIR, P.F., TURRIAN, M.N., AESCHLIMANN, A., GERN, L. (1993): *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol* 40:65–70

- KARBOWIAK, G., RYCHLIK, L., NOWAKOWSKI, W., WITA, I. (2005): Natural infections of small mammals with blood parasites on the borderland of boreal and temperate forest zones. *Acta Theriol* 50, 31–42.
- KHANAKAH, G., KOCIANOVA, E., VYROSTEKOVA, V., REHACEK, J., KUNDI, M., STANEK, G. (2006): Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria, *Wien klin. Wochensh*, 118/23–24: 754–758 DOI 10.1007/s00508-006-0730-y
- KIFFNER, C., VOR, T., HAGEDORN, P., NIEDRIG, M., RÜHE, F. (2011): Factors affecting patterns of tick parasitism on forest rodents in tick-borne encephalitis risk areas, Germany. *Parasitol Res* 108:323–335 DOI 10.1007/s00436-010-2065-x
- KURTENBACH, K., DE MICHELIS, S., ETTI, S., SCHÄFER, S. M., SEWELL, H. S., BRADE, V., KRAICZY, P. (2002): Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement. *Trends. in Microbiol*, 10(2), p. 74-9.
- LAACKONEN, J., SUKURA, A., OKSANEN, A., HENTTONEN, H., SOVERI, T. (2001): Haemogregarines of the genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina) in rodents from northern Europe. *Folia Parasitol (Praha)* 48, 263–267.
- LAKOS, A. (2009): Lyme-borreliosis – 25 év hazai tapasztalatai, *Orvosi Hetilap*, 150. évfolyam, 16. szám 725–732. DOI: 10.1556/OH.2009.28576
- LAKOS, A., NAGY, GY., JANKOVICS, I. (1991): A *Borrelia burgdorferi* (Lyme spirochaeta) első hazai izolálása kullancsokból. *Orvosi Hetilap*, 132, 129–134.
- L'HOSTIS, M., DUMON, H., FUSADE, A., LAZAREFF, S., GORENFLOT, A. (1996): Seasonal incidence of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: ixodidae) on rodents in western France. *Exp Appl Acarol* 20:359–368
- MARGOS, G., GATEWOOD, A.G., AANENSEN, D.M., HANINCOVÁ, K., TEREKHOVA, D., VOLLMER, S.A., CORNET, M., PIESMAN, J., DONAGHY, M., BORMANE, A., HURN, M.A., FEIL, E.J., FISH, D., CASJENS, S., WORMSER, G.P., SCHWARTZ, I., KURTENBACH, K. (2008): MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105(25):8730-5. EPUB 2008 JUN 23.

- NILSSON, A., LUNDQVIST, L. (1978): Host selection and movements of *Ixodes ricinus* (Acari) larvae on small mammals. *Oikos* 31:313–322
- NOSEK, J., SIXL, W.(1972): Central-European Ticks (Ixodoidea). Key for determination. – Jahrbuch der naturwissenschaftlichen Abteilung Joanneum: **1/2**: 61–92.
- PAROLA, P., PADDOCK, C. D., RAOULT, D. (2005): Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts, *Clin Microbiol Rev*, 18,4, p.719-756
- PAZIEWSKA, A., ZWOLIŃSKA, L., HARRIS, P.D., BAJER, A., SIŃSKI, E. (2010): Utilisation of rodent species by larvae and nymphs of hard ticks (Ixodidae) in two habitats in NE Poland. *Exp Appl Acarol* 50:79–91
- UILENBERG, G., FRANSSSEN, F. F. J., PERIÉ, N. M., SPANJER, A. A. M (1989): Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature, *Vet Quart*, 11:1, 33-40
- PAULAUSKAS, A., AMBRAISINE, D., RADZIJEVSKAJA, J., ROSEF, D., TURVINAVICIENE, J. (2008): Dispersity in prevalence and genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodent in Lithuania and Norway. *Int J Med Microbiol*, 298, p. 180-187.
- PERKINS, S.E., CATTADORI, I.M., TAGLIAPIETRA, V., RIZZOLI, A.P., HUDSON, P.J. (2003): Empirical evidence for key hosts in persistence of a tickborne disease. *Int J Parasitol* 33:909–917
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2008): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- RADDA, A. (1968): Populationsstudien an Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780) durch Markierungsfang in Niederösterreich. *Oecologia* 1:219–235
- RADDA, A., PRETZMANN, G., STEINER HM (1969): Bionomische und ökologische Studien an österreichischen Populationen der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*, Melchior 1834) durch Markierungsfang. *Oecologia* 3:351–373
- RANDOLPH, S.E. (1975): Patterns of distribution of the tick *Ixodes trianguliceps* Birula on its hosts. *Anim Ecol* 44:451–474



- RANDOLPH, S.E., GERN, L., NUTTALL, P. A. (1996): Co-feeding of ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogens transmission. *Parasitol Today*, 12, p. 472-479.
- RICHTER, D., ALLGÖWER, R., MATUSCHKA, F.R. (2002): Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg Infect Dis*, 8(12):1421-5.
- RIGÓ, K., GYURANECZ, M., TÓTH, Á.G., FÖLDVÁRI, G. (2011): Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ectoparasites in Hungary. *Vector-borne and Zoonot Dis* 11: 1499-1501.
- RÓZSA, L., REICZIGEL, J., MAJOROS, G. (2000): Quantifying parasites in samples of hosts. *J Parasitol*, 86, 228-232.
- RUDOLPH, D., KNÜLLE, W. (1974): Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ticks. *Nature*, 3; 249 (452), p. 84-85
- SAITO, K., ITO, T., ASASHIMA, N., OHNO, M., NAGAI, R., FUJITA, H., KOIZUMI, M., TAKANO, A., WATANABE, H., KAWABATA, H. (2007): Case report: *Borrelia valaisiana* infection in Japanese man associated with traveling to foreign countries. *J Trop Med & Hyg*, 77, p. 1124-1127
- SCHWAN, T. G., PIESMAN, J. (2002): Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever Spirochetes associated with transmission by ticks, *Emerg Infect Dis.*, 8(2): 115–121. doi:10.3201/eid0802.010198
- SHAW, M.T., KEESING, F., MCGRAIL, R., OSTFELD, R.S (2003): Factors influencing the distribution of larval blacklegged ticks on rodent hosts. *Am J Trop Med Hyg*. 68, 447-452.
- SLOBODA, M., KAMLER, M., BULANTOVA, J., VOTYPKA, J., MODRY, D. (2007): A new species of Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *J. Parasitol.* 93, 1189–1198.
- SMITH T.G., 1996. The genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina). *J. Parasitol.* 82, 565–585.
- STEERE, A.C., MALAWISTA, S.E., SNYDMAN, D.R., SHOPE, R.E., ANDIMAN, W.A., ROSS, M.R., STEELE, F.M. (1977): Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities *Arthr Rheum*;20(1):7-17

WANG, G., VAN DAM, A.P., DANKERT, J. (1999): Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis, *J Clin Microbiol.*;37:3025–8.

# Nyilatkozat

Alulírott Szekeres Sándor kijelentem, hogy a „Gemenci kisémlősök és kullancsok járványtani és ökológiai vizsgálata” c. pályamunkát saját munkám.

Budapest, 2013. január 8.

Szekeres Sándor