Diplomamunka

Takács Hunor

2021

Állatorvostudományi Egyetem

Ökológia tanszék

A környezeti hőmérséklet hatása a kétéltűek fertőző betegségeire

Készítette: Takács Hunor

Témavezető: Dr. Herczeg Dávid

ELKH, ATK, Növényvédelmi Intézet, Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport

Budapest, 2021

Tartalom

Rövidítések és idegen szavak jegyzéke 2
1. Bevezetés 3
1.1. Batrachochytrium dendrobatidis (Longcore, Pessier, and Nichols, 1999) 4
1.2. Ranavírusok 6
1.3. Együttes fertőződés Bd és Rv között 8
1.4. Vizsgált kétéltű gazdaszervezet 9
2. Célkitűzések 10
3. Anyag és módszer 11
3.1. Kísérleti állatok gyűjtése és tartása 11
3.2. Kísérleti elrendezés 12
3.3. Fertőzés Batrachochytrium dendrobatidis-szel 14
3.4. Fertőzés Frog Virus 3-mal 14
3.5. DNS izolálás és kvantitatív PCR (qPCR) 14
3.6. Statisztikai elemzés 15
3.6.1 Prevalencia 15
3.6.2 Fertőzési intenzitás 16
4. Eredmények 17
4.1 Rv és Bd prevalencia 17
4.2 Rv és Bd fertőzési intenzitás 20
4.3 Mortalitás 23
5. Diszkusszió 24
Irodalomjegyzék 27
Összefoglalás 33
Abstract 34
Köszönetnyilvánítás 35

Rövidítések és idegen szavak jegyzéke

Abiotikus tényezők – Élettelen környezeti tényezők, mint például a hőmérséklet, páratartalom, oxigéntartalom stb.

Ad libitum – Szabadon történő.

Apoptózis – Programozott sejthalál, a szervezet fiziológiás válaszreakciója specifikus „öngyilkos szignálokra” vagy a „túlélő szignálok” hiányára.

Bd – Batrachochytrium dendrobatidis.

Viselkedési láz – Egy olyan védekező mechanizmus, amely során az állat betegség érzékelése során melegebb környezetet keresve próbál a fertőzés ellen védekezni az immunrendszerének serkentésével. Változó testhőmérsékletű állatokra jellemző.

Biotikus tényezők – Fajon belüli és fajon kívüli kölcsönhatások.

CT_{max} – Hőmérsékleti maximum.

Immunszupresszió – A szervezet immunreakcióját elnyomó tulajdonság.

In situ – Természetes környezetben.

In vitro – Ellenőrzött, kísérletes körülmények között.

Mortalitás – Halálozási arányszám, amely megmutatja, hogy egy adott csoporton belül, vagy egy adott okból hányan halnak meg.

Ödéma – A kapillárisok és a szövetek közötti folyadékcsere folyamatának zavarából adódó fokozott folyadékfelhalmazódás a szövetekben.

Poikilotermikus állatok – Testhőmérsékletüket önállóan szabályozni nem képes állatok.

Prevalencia – A fertőzött egyedek aránya a vizsgált populációra vonatkoztatva.

qPCR (Quantitative Polimerase Chain Reaction) – Valós idejű, vagy kvantitatív PCR.

RSW (reconstituted soft water) – Tisztított, majd újra sózott víz, amelynek ásványianyag-tartalmát manuálisan, tetszés szerint lehet beállítani.

Rezervoár – Olyan szervezet, amelyben a kórokozó nem okoz betegséget, de átadhatja más, arra fogékony gazdaszervezeteknek.

Rv – Ranavírus.

Sporangium – Spóraképző szerv.

Thallus – Teleptest.

Zoospróra – Aktív mozgásra képes spóra, amely rendszerint sejtfal nélküli, csillóval vagy ostorral képes a vizes közegben mozogni.

1. Bevezetés

Napjainkban tömeges kipusztulási esemény zajlik, amelyet a hatodik kihalási hullámként emlegetünk (Anthony és mtsai, 2011). Ehhez a globális trendhez a fertőző betegségek felbukkanása és elterjedése is tevékenyen hozzájárul (Daszak és mtsai, 2000). A kétéltűeket rendkívül sokféle parazita és egyéb kórokozó organizmus fertőzheti (Densmore és Green 2007). Ezek egy része által okozott betegségek felelősek a populációik drasztikus mértékű csökkenéséért (Scheele és mtsai 2019; Fisher és Garner 2009). A mikroparazita szervezetek, mint például a különböző vírusok, gombák és baktériumok, illetve a makroparaziták, mint a laposférgek, ízeltlábúak és gyűrűsférgek, továbbá az állati egysejtűek gyakori kórokozói a kétéltűeknek (Densmore és Green 2007). A természetben általános jelenségnek tekinthető, hogy egy gazdaszervezet egyidejűleg több kórokozóval is fertőzött. Ennek ellenére eddig az együttes fertőződést célzó vizsgálatok főleg a háziasított (Andersson és mtsai, 2017; Beugnet és mtsai, 2014) vagy gazdasági céllal tartott állatokra irányultak (Miller és mtsai, 2008; Kik és mtsai, 2012; Warne és mtsai, 2016; Hoon-Hanks és mtsai, 2020; Chege és mtsai, 2013).

A kétéltűek jól fejlett veleszületett és adaptív immunrendszerrel rendelkeznek, amely hasonlít a fejlettebb gerinces csoportokéhoz (Carey és mtsai, 1999; Pasquier és mtsai, 1989). A veleszületett immunrendszerükhöz tartoznak a granulociták, monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, illetve a természetes ölősejtek. Ezeknek a fő funkciója az antigének bekebelezése, illetve azok prezentálása a T és B limfocitáknak. Ezen kívül rendelkeznek még a bőrük által kiválasztott védekező kémiai anyagokkal, például különböző antimikrobális peptidekkel, szteroidokkal, alkaloidokkal vagy biogenikus aminokkal (Daly 1995; Macfoy és mtsai, 2005). A bőrükön élő mutualista baktériumok is a védelmi vonalat erősítik (Harris és mtsai, 2009). Annak ellenére, hogy a kétéltűek immunrendszere a legtöbb kórokozó ellen védelmet nyújt, néhány parazita még így is hatalmas károkat tud okozni egyes populációikban. Ennek több oka is van, például az, hogy mivel a kétéltűek poikilotermikusak, ezért a védelmi rendszerük működését nagyban befolyásolja a környezetük hőmérséklete (Zapata és mtsai, 1992; Maniero és mtsai, 1997). Egy másik lehetséges ok az új parazitáknak való kitettség (Hoverman és mtsai, 2010), illetve amikor ehhez még egyéb stresszfaktorok is párosulnak (Rollins-Smith, 2017; Carey, 1993). Ilyen például a beltenyészet, az élőhelycsökkenés és az azzal járó egyedszám-sűrűsödés (Belasen és mtsai, 2019), a

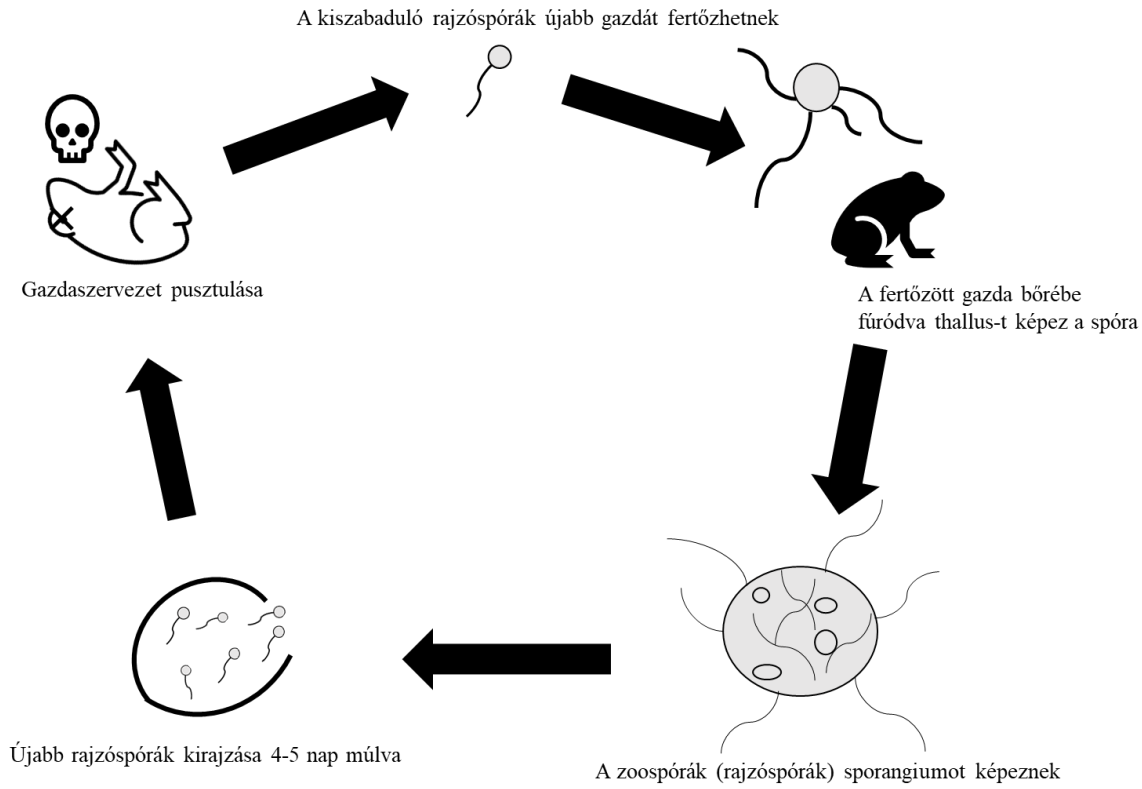
környezetszennyezés (Koprivnikar, 2010), továbbá a hőmérsékletváltozás, és nem utolsósorban más paraziták egyidejű jelenléte (Love és mtsai, 2016).

Az immunrendszer mellett egyéb viselkedési változások is segíthetik a harcot a kórokozókkal szemben, mint például a „viselkedési láz" nevű jelenség. A láz egy evolúciósan megőrzött védekezési mechanizmus, amely megfigyelhető az állandó és változó testhőmérsékletű állatokban egyaránt. Lázas reakció során a testhőmérséklet az optimális érték fölé emelkedik, amivel a legtöbb kórokozó szaporodása meggátolható. A megemelt testhőmérséklet egy fiziológiai szindrómaként értelmezhető, amelyet különböző hormonális és viselkedési mechanizmusok is kísérnek, ezzel növelve a gazdaszervezet túlélési esélyeit főként, de nem kizárólag, az immunvédekezés fokozásával (Roth és mtsai, 2014). Míg az állandó testhőmérsékletű állatok képesek belülről szabályozni a testhőjüket, a változó testhőmérsékletű élőlények esetében ezt az aktuális környezeti hőmérséklet befolyásolja (Rakus és mtsai, 2017). A viselkedési lázat először 1974-ben írták le sivatagi leguánon (Vaughn és mtsai, 1974), azóta pedig már minden változó testhőmérsékletű gerinces csoportban megfigyelték (Vaughn és mtsai, 1974; Reynolds 1977; Murphy és mtsai 2011), sőt egyes gerinctelenekben is (Campbell és mtsai, 2010). A viselkedési lázzal kapcsolatos kutatásokat főleg laboratóriumi körülmények között végezték, annak érdekében, hogy megfigyeljék a gazdaszervezet hőmérsékleti optimumának változását a kórokozókkal történő fertőzés után (Rakus és mtsai, 2017).

1.1. Batrachochytrium dendrobatidis (Longcore, Pessier, and Nichols, 1999)

A *Batrachochytrium dendrobatidis* (a továbbiakban *Bd*) nevű kitridgomba okozza a kitridiomikózist (Daszak és mtsai, 1999), amely igazoltan felelős világszerte több száz kétéltű faj populációinak hanyatlásáért és több mint kilencven faj eltűnéséért (Lips, 2016; Scheele és mtsai, 2019). A magas virulenciával bíró Global Pandemic Lineage (GPL) törzs főleg az emberi tevékenység következtében terjedt el világszerte (O'Hanlon és mtsai, 2018; Byrne és mtsai, 2019). A *Bd* vizes közegben fertőzi meg a kétéltűeket szabadon úszó zoospóráival (1. ábra). A zoospórák áthatolnak a kültakarón, és sporangiumot képeznek az elszarusodó (keratinizált) szövetekben. Az ebihalaknál, mivel a bőr nem keratinizált, az egyetlen elszarusodó régióban, a szájképleten telepednek meg. A megbetegedett egyed ionháztartása felborul, ami akár szívleállással és pusztulással is járhat. A metamorfózison átesett állatok esetében további neurológiai tüneteket is okozhat a fertőzés, mint például a menekülési ösztön

elvesztése (Duffus és mtsai, 2010). A *Bd* igen széles gazdaspektrummal rendelkezik, de főként a farkatlan kétéltűek mutatnak magas fogékonyságot a betegségre, ám megfigyelték már halakon is (Nicole és mtsai, 2017).



1. ábra; A *Bd* életciklusának a menete.

Számos biotikus és abiotikus tényező befolyásolja az egyes patogén gombák megtelepedési és fertőzési képességét a gazdáikon (Paré, 2003; Fisher és Garner, 2009). Biotikus tényező például a fejlődési stádium, ugyanis a kétéltűek eltérő fogékonysággal rendelkeznek a gombákkal szemben a különböző életszakaszaikban. A lárva állapotú állatok kevésbé érzékenyek a *Bd*-vel szemben, mint a már kifejlett egyedek (Van Rooij és mtsai, 2015). Továbbá a peték egy helyen történő lerakása és az ebihalak csoportosuló viselkedése is hozzájárulhat ezeknek a gombás betegségeknek a terjedéséhez (Malagon és mtsai, 2020).

Az abiotikus faktorok közül fontosabbak a hőmérséklet, a páratartalom és az UV-B sugárzás, amely a *Bd* fertőzést jelentősen befolyásolja, mivel negatívan hat a kórokozóra (Ortiz és mtsai, 2011). A legfontosabb abiotikus faktor a környezeti hőmérséklet, amelynek emelkedése a *Bd* esetén célzottan képes elpusztítani a zoospórákat, illetve a már megfertőzött kétéltűek bőrén lévő sejteket (Berger és mtsai, 2004). *In vitro* tanulmányok bebizonyították, hogy a *Bd* optimális szaporodási hőmérséklete 20 °C, és a 24 °C alatti hőmérsékleten még megőrzi szaporodóképességét. A kórokozó hőmérsékleti maximuma (CT_{max}) 28 °C , az ezt meghaladó környezeti hőmérsékleten nem életképes (Piotrowski és mtsai, 2004; Cohen és mtsai, 2019). Ezzel szemben a kétéltűek hozzávetőlegesen 80 %-ának nagyobb a CT_{max} -a, mint 32 °C , és csak 7 %-ának kisebb, mint 30 °C (Sunday és mtsai, 2014; Gutiérrez-Pesquera és mtsai, 2016). A *Bd* leginkább a párás és nedves környezetben fertőzőképes, továbbá az élőhely szezonális kiszáradásának hiánya kedvez egyéb patogén gombáknak is, ezáltal alkalmat adva a kórokozóknak az együttes fertőzés lehetőségére (Becker és mtsai, 2012). Az, hogy ezek a tényezők hogyan befolyásolják az együttes fertőződést, egyelőre még nem tisztázott, és további kutatásokra van szükség.

1.2. Ranavírusok

Az *Iridoviridae* családba tartozó *ranavírusok* (a továbbiakban *Rv*) tagjai rendkívül széles gazdaspektrummal bírnak, és változó testhőmérsékletű gerinceseket képesek fertőzni (Gray és Chinchar, 2015). A kétéltűekre különös fenyegetést jelentenek, mivel mára már 18 család több mint 105 fajából izoláltak őket (Brunner és mtsai, 2015). A *Bd*-hez hasonlóan az *Rv*-k is jelentős szerepet játszanak a kétéltűeket sújtó járványokban (Kik és mtsai, 2011; Price és mtsai, 2014). Ami igazán veszélyessé teszi őket, hogy képesek számos más alsóbbrendű gerinces taxon megfertőzésére, sőt a kétéltűek és a halak között a gazdaváltást is megfigyelték, így ezek a csoportok egymásnak is átadhatják a betegséget (Jancovich és mtsai, 2010; Brenes és mtsai, 2014). Ez rendkívüli fenyegetést okoz, ugyanis a legtöbb esetben a halak és a kétéltűek azonos élőhelyen fordulnak elő. Egy másik veszélyes tulajdonsága ezeknek a kórokozóknak, hogy gyakran nem okoznak látható tüneteket, így észrevétlenül terjedhetnek (Wynne, 2020; Vörös és mtsai, 2020). A vírus a gazdaszervezetbe jutva a sejtek citoplazmájában kezd szaporodni, ahol az építőegységeit termeli. Ezek jelenléte pedig a sejtek apoptózisához vezet. A fertőzött állatoknál szisztémás belső vérzések alakulnak ki, illetve az ebihalaknál ödémák is megjelenhetnek (Duffus és mtsai, 2010).

A kezdeti víruskoncentráció egy fontos biotikus változó a betegség lefolyásában. A *Bd*-hez hasonlóan az *Rv* fertőzésre való fogékonyság is függ az egyes kétéltű fajok fejlődési stádiumától, illetve a nagy koncentrációban megjelenő stressz-hormonoktól (Brunner és mtsai, 2005; Warne és mtsai, 2011). Továbbá az intra- illetve interspecifikus rezervoárok jelenléte is meghatározhatja a fertőzés dinamikáját (Brunner és mtsai, 2004). A vírus terjedése történhet indirekt módon, víz közvetítésével. Továbbá direkt módon, az állatok fizikai kontaktusán keresztül, illetve a fertőzött fajtársaik elfogyasztása által (Langdon és mtsai, 1988; Brenes és mtsai, 2014). Megfigyelték továbbá azt is, hogy a bőrön keresztül is átadódhat a fertőzés, ám ez a fertőzési út inkább az ebihalakra jellemző (Brunner és mtsai, 2007), mivel a kifejlett kétéltűek bőre több antibakteriális és antivirális anyagot termel, amely védelmet nyújt a legtöbb ilyen típusú kórokozóval szemben (Chinchar és mtsai, 2001).

Az abiotikus faktorok közül az *Rv*-nél is fontos szerepe van a környezeti hőmérsékletnek, ugyanis a vírus szaporodásában és a fertőzőképességében is meghatározó (Rojas és mtsai, 2005; Allender és mtsai, 2013; Echaubard és mtsai, 2014; Price és mtsai, 2019). A *Bd*-vel ellentétben azonban a ranavírus törzsek esetében a magasabb hőmérséklet gyorsabb replikációt eredményez (Ariel és mtsai, 2009). Laboratóriumi körülmények között azt figyelték meg, hogy a vírus sikeresen szaporodik 8 és 30 °C között. A replikációs ráta lelassul 15 °C alatt, míg a legsikeresebben 30 °C-on szaporodnak (Cunningham, 2001). Ez a hőmérsékletfüggés lehet az oka annak, hogy a ranavírusokhoz köthető megbetegedések jelentősen magasabb mortalitással járnak a meleg nyári hónapokban (Chinchar, 2002). Végezetül a megemelt környezeti hőmérsékletnek az *Rv*-re való fogékonyságra kifejtett hatásait vizsgáló kísérletek ellentmondásos eredményre jutottak (lásd pl. Rojas és mtsai, 2005; Allender és mtsai, 2013; Cohen és mtsai, 2017; Price és mtsai, 2019). Rojas és munkatársai (2005) azt találták, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten (18 és 10 °C) tartott közönséges tigrisszalamandra (*Abystoma tigrinum*) lárváknál nagyobb mortalitás volt megfigyelhető, mint a magasabb hőmérsékleten (26 °C) tartottaknál. Ezt a mintázatot az egyedek immunrendszerének az alacsonyabb hőmérsékleten mutatott alulműködése magyarázhatja. Allender és munkatársai (2013) hasonló eredményeket kaptak vörösfülű ékszerteknősöket (*Trachemys scripta elegans*) vizsgálva. Ebben a kísérletben az állatokat az FV3 ranavírus törzzsel fertőzték, és 22, illetve 28 °C-on tartották. Az eredmények azt mutatták, hogy a 22 °C-on tartott állatoknál magasabb volt a vírus kópiaszám, a mortalitás 100% volt és átlagosan csak 24 napig éltek az állatok. Ezzel szemben a 28 °C-on tartott teknősöknél alacsonyabb kópiaszám volt, 50% mortalitással, és átlagosan 30 napig maradtak életben. Ezzel ellentétben

más békafajoknál pedig éppen a hideg környezet serkenti az immunrendszert (Matutte és mtsai 2000), így akár 0 °C-on is képesek inaktiválni a vírust (Chinchar és mtsai 2001).

1.3. Együttes fertőződés Bd és Rv között

Olyan irányú kutatások, amelyek a megemelt környezeti hőmérséklet hatását vizsgálják a patogénekre együttes fertőzöttség esetén (például *Bd* és a melegkedvelő *Rv* törzsek között), teljesen hiányoznak a tudományos irodalomból (Herczeg és mtsai, 2021). Továbbá a kórokozók egymás közötti interakcióját és a betegség lefutási idejét, valamint a gazdaállatra gyakorolt hatásait célzó vizsgálatokból is hiány van. Terepi kutatások leírták, hogy a *Bd* és *Rv* kettős fertőzöttség esetén a két patogén jelenléte pozitívan képes hatni egymásra (Watters és mtsai, 2018), ám más esetekben ezt nem sikerült bizonyítani, vagy akár ellenkezőleg, negatívan befolyásolták egymás jelenlétét (Whitfield és mtsai, 2013). Ez a negatív interakció magyarázható azzal, hogy a két patogénnel történő megbetegedés fokozott immunreakciót válthat ki, vagy interspecifikus kompetíció léphet fel köztük, ezért lesz a fertőzési intenzitás alacsonyabb a két kórokozó önmagában okozott fertőzéséhez képest (Whitfield és mtsai, 2013). Ezzel ellentétben a pozitív kölcsönhatást pedig az egyik kórokozó által okozott immunszupresszív hatás magyarázhatja (Watters és mtsai, 2018).

A *Bd* és *Rv* együttes fertőződést is nagyban befolyásolhatják az olyan életmenet jellegek, mint a gazda fejlődési stádiuma, illetve a szaporodási viselkedés is (Bielby és mtsai, 2008). A vízben élő ebihalak sokkal fogékonyabbak rájuk, mint a már átalakult, szárazföldön élő társaik. Azonban arra is van példa, hogy épp ellenkezőleg, a kifejlett, szárazföldi életmódú egyedekben vannak jelen inkább a patogének (Love és mtsai, 2016). Ezt súlyosbíthatják még a magas stresszel járó tevékenységek, mint például a párzás vagy az átalakulási időszak, amikor az egyedek fogékonyabbak lehetnek a kórokozókra (Talbott és mtsai, 2018; Warne és mtsai, 2016). Továbbá az élőhelyek tulajdonságai is meghatározzák a patogének előfordulását. Warne és munkatársai (2016) azt figyelték meg, hogy Peruban 900 és 2400 méter tengerszint feletti magasság között a *Bd* prevalenciája csökken 2100 méter felett, míg az *Rv* esetében a prevalencia 1200 méter alatt volt a legalacsonyabb. Az együttes előfordulásuk pedig csak 1400 és 2100 méter között volt megfigyelhető. A vizes területek szennyezettsége szintén egy fontos faktor a patogének megjelenésében, amely valószínűleg a kétéltűek immunrendszerének túlterheléséhez köthető (Talbott és mtsai, 2018). Love és munkatársai megfigyelték, hogy a kettős fertőzöttség nagyobb arányban fordul elő a

nehézfémeket tartalmazó vizes élőhelyeken, mint a szennyezéstől menteseknél (Love és mtsai, 2016). Emellett a túlságosan aktív mezőgazdasági földhasználat szintén hozzájárulhat a két kórokozó együttes megjelenéséhez (Hoverman és mtsai, 2012). Végül pedig a szezonalitás is egy fontos faktor a patogének terjedésében. A *Bd* prevalenciája a nedves, hűvösebb és enyhén melegebb időszakokban (Olori és mtsai, 2018), míg az *Rv* prevalenciája az év legmelegebb időszakaiban volt a legmagasabb (Whitfield és mtsai, 2013). Talbott és munkatársai (2018) azt figyelték meg, hogy a *Bd* és *Rv* kettős fertőzöttség tavasszal és nyáron, esetleg ősszel figyelhető meg a legmagasabb arányban.

1.4. Vizsgált kétéltű gazdaszervezet

Az erdei béka (Rana dalmatina, Bonaparte, 1840) a farkatlan kétéltűek rendjébe (Anura) és a valódibéka-félék családjába (Ranaidae) tartozó faj. Megjelenését tekintve karcsú testfelépítésű, kifejezetten hosszú lábú béka. Az erdei béka európai elterjedése Spanyolország pireneusi részétől a Fekete-tenger kis-ázsiai partvidékéig tart, megtalálható az egész Balkánon, valamint az Appennini-félszigeten Szicíliáig, észak felé csupán Dániáig és Svédország legdélebbi csücskéig hatol. Hazánkban a leggyakoribb barnabéka faj, a számára alkalmas élőhelyeken az egész országban megtalálható. A tölgy- és bükkerdőkben mindenhol közönséges, 1000 méter tengerszint feletti magasság felé nem hatol, e fölött felváltja a gyepi béka.

Magyarországon az erdei béka természetes állományaiban nem mutatták ki sem a Bd, sem pedig az Rv jelenlétét (Vörös és munkatársai 2018, 2020). Ezzel ellentétben számos rokon faját megemlítik bakteriális, gombás és vírusos fertőzéseknél is, például a gyepi békát egyéb gombás fertőzésnél (Densmore és Green 2007). Leírták viszont egy herpeszvírus gazdaállataként (Densmore és Green, 2007). Az erdei béka egy hidegadaptált békafaj. Petézése jóval megelőzi a legtöbb hazai békafaj petézési időszakát, már február végén-március elején előjön párosodni (Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület honlapja, 2021).

1. ábra; *Rana dalmatina* kifejlett egyede (©Bombay Bálint).

2. Célkitűzések

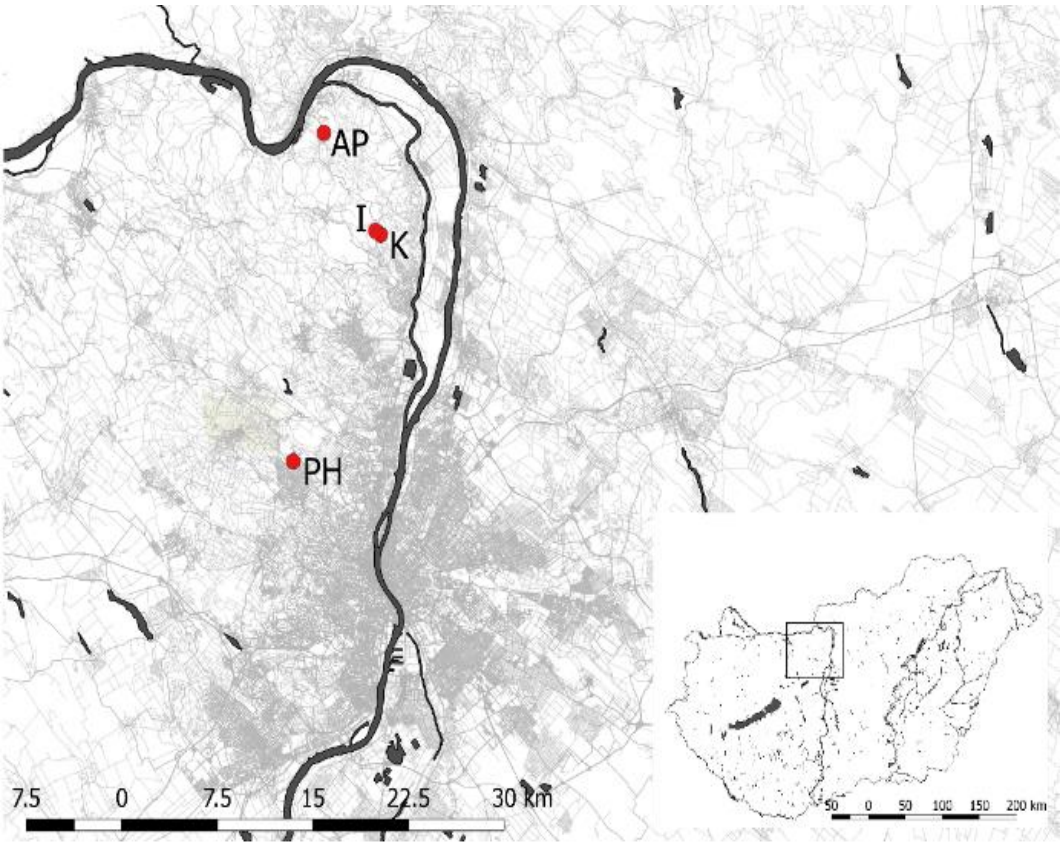
Kutatásunk elsődleges célja, hogy megfigyeljük a megemelt környezeti hőmérséklet hatását egy patogén kitridgomba izolátum (*Bd*-GPL), és egy ranavírus törzs (FV-3) erdei béka ebihalakban mutatott együttes jelenlétére, valamint a fertőzés időbeli lefolyására. A kísérletünk egy természetes körülmények között is alkalmazható (*in situ*) melegítésen alapuló kezelés egyes elemeit hivatott tesztelni. Ezen kívül a kutatás fontos információkat szolgáltathat a kórokozók hőtűrési képességéről, illetve az általuk okozott betegségek dinamikájáról is. Azt várjuk, hogy a megemelt környezeti hőmérsékletnek (28 és 30 °C) kitett ebihalakban csökkenni fog a *Bd* prevalenciája és a fertőzés intenzitása, de ez magasabb mortalitással fog járni, amikor az *Rv* is jelen van.

3. Anyag és módszer

3.1. Kísérleti állatok gyűjtése és tartása

A vizsgált fajunk az erdei béka volt. A petegyűjtésre 2019 márciusában került sor, melynek során 10-10 petecsomót gyűjtöttünk természetes populációkból a Pilis hegységben, négy különböző élőhelyen (3. ábra). A családokat külön-külön neveltük műanyag dobozokban (30 x 20 x 15 cm) laborkörülmények között: 1 liter RSW-ben (APHA 1985), 20 °C-on, és 13:11 órás fény-sötét ciklusban. A kikelés után minden petecsomóból 10 egyedet válogattunk ki, és ezeket külön neveltük családonként 20 literes műanyag dobozokban (nevelődobozok mérete: 40 x 30 x 17 cm), 10 liter RSW-ben a fent említett körülmények között. Az állatok a Gosner 25-ös állapotig (2. ábra) lettek nevelve, mivel ekkor alakul ki a szájképletük, amelyből a *Bd* gombát izolálni lehet. Az ebihalakat így tartottuk egészen az *Rv* fertőzés megkezdéséig. Hetente kétszer történt a vízcsere, illetve az ebihalakat darabolt és megfőzött spenóttal etettük *ad libitum*.

2. ábra; *Rana dalmatina* ebihal Gosner 25-ös állapotban (© Bombay Bálint)

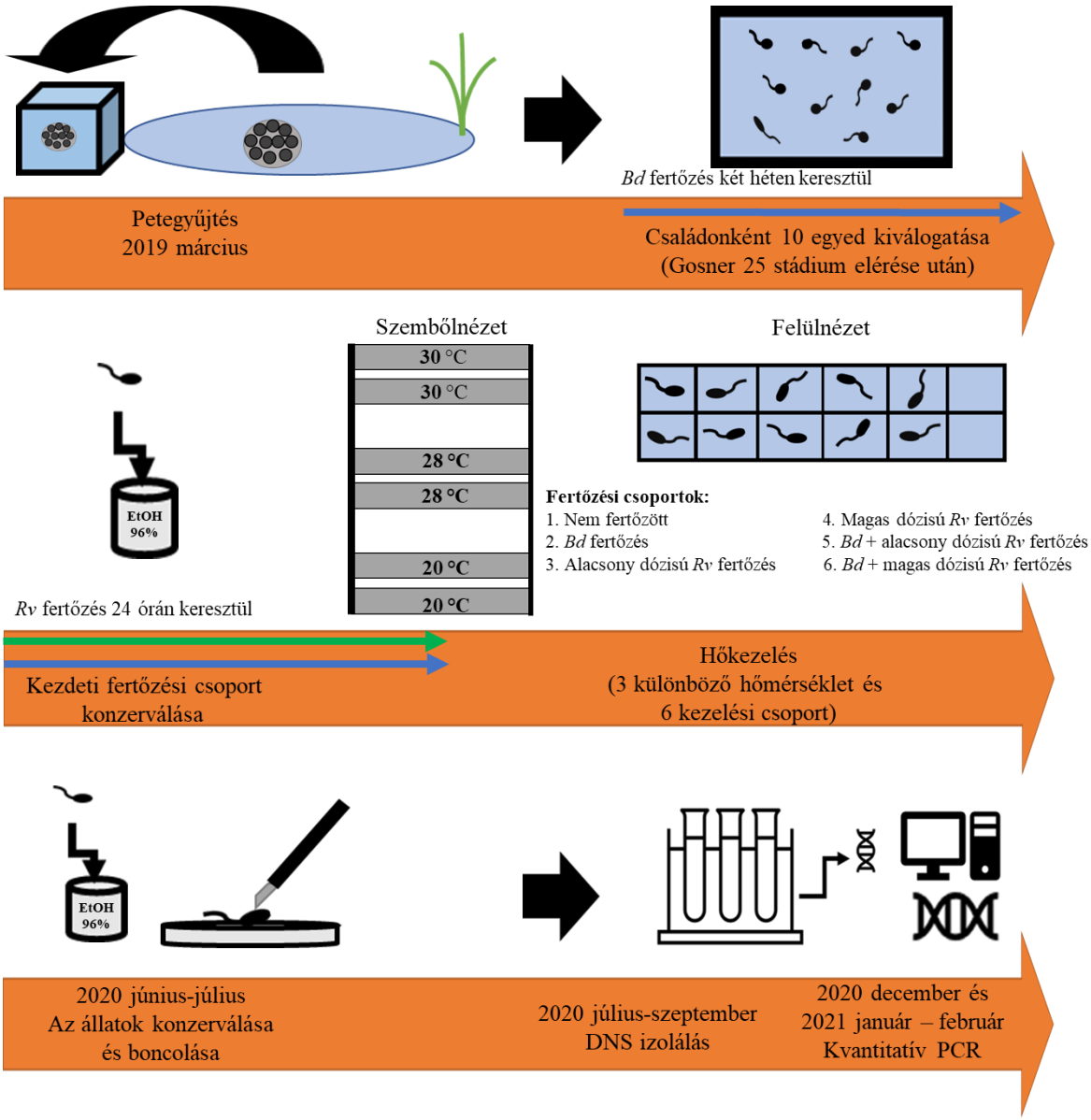


3. ábra; Gyűjtési helyszínek: (I)-Ilona-tó; (K)-Katlan; (AP)-Apátkút; (PH)-Pesthidegkút, a térkép QGIS programmal készült (Version 3.18.1)

3.2. Kísérleti elrendezés

Teljes faktoriális kísérleti elrendezést használtunk, amely a következőképpen épült fel: 3 hőmérsékleti kezelés (20, 28 és 30 °C) és 6 fertőzési csoport [nem fertőzött (1), *Bd* fertőzés (2) alacsony dózisú *Rv* fertőzés (3), magas dózisú *Rv* fertőzés (4), *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés (5), *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés (6)]. Minden fertőzési csoportban 20 egyed lett kezelve, és három hőmérsékleti kezelést kaptak, tehát ez a hat fertőzési csoporttal és a három hőmérséklettel összesen 360 egyedet jelent. Az egyes családokból az egyedeket véletlenszerűen választottuk ki és osztottuk be a fertőzési csoportokba, hogy ezzel elkerüljük a családhatást. Ezeket az egyedeket 2 literes dobozokban, 1800 ml RSW-ben tartottuk. Majd megtörténtek a fertőzések, és ezt követően az állatokat randomizálva osztottuk be a hőmérsékleti kezelésre, 2 literes edényekbe helyeztük őket, és ezeket tettük melegítő tálcákra, amelyek 20, 28 vagy 30 °C-ra voltak állítva, 6 napon keresztül. A hőmérsékleti kezelés előtt,

a kezdeti fertőzési csoportot túlaltattuk és konzerváltuk 96%-os etanolban, így ezek az állatok csak fertőzve lettek, de a hőmérsékleti kezelésben nem vettek részt. Ezáltal pedig összehasonlíthattuk a hőmérsékleti kezelésben részt vett állatok kórokozóinak fertőzési intenzitását és prevalenciáját azokéval, amelyek nem lettek melegítve. Ez alatt az időszak alatt a vízcsere kétszer történt egy héten, RSW-vel, amely az adott fertőzési csoporthoz tartozó hőmérsékletre volt előmelegítve. A kísérlet végén az ebihalak túlaltatása történt, illetve a konzerválásuk 70%-os etanolban. A kísérlet alatt szigorú karantén protokollt alkalmaztunk, amelyek megegyeznek a Schmidt és mtsai (2009) által leírtakkal. A kísérlet időbeni menete az alábbi 4. ábrán látható.



4. ábra; A kísérlet időbeni menete

3.3. Fertőzés Batrachochytrium dendrobatidis-szel

Batrachochytrium dendrobatidis zoospórákat adtunk a nevelődobozok felében található ebihalaknak (10 egyed/doboz) kétszer egy héten (összesen ötször). Az IA042 törzset (*Batrachochytrium dendrobatidis*–Global Pandemic Lineage; *Bd*-GPL. Forrás: Trenton W. Garner, Zoological Society of London, London, Egyesült Királyság) használtuk, amely a globális járványt okozó törzshöz tartozik, és a koncentrációt úgy állítottuk be, hogy a végleges koncentráció elérje a 2000 zoospóra/ml-t. Az ebihalnevelő-dobozok másik felét pedig beoltottuk ugyanilyen mennyiségű, steril mTGhL táplevessel. A *Bd*-vel való fertőzés két héten keresztül zajlott.

3.4. Fertőzés Frog Virus 3-mal

A ranavírusokkal szemben mutatott fogékonyságról, illetve a vírus kísérleti fajokra kifejtett hatásáról nem rendelkezünk irodalmi adatokkal, ezért ennek tesztelésére egy alacsony (6.12 x 10^3 pfu / ml $^{-1}$) és egy magas (6.25 x 10^5 pfu / ml^{-1}) víruskoncentrációjú csoportot hoztunk létre. Az ebihalak felét megfertőztük *Rv*-vel (Frog Virus 3; FV-3), a következőképpen: az egyedeket egyesével helyeztük el 500 milliliteres műanyag poharakba, amelyek 200 milliliter RSW-vel voltak töltve, majd megfertőztük őket az alacsony, illetve a magas dózissal. Az ebihalak 24 órán keresztül voltak kitéve a fertőzésnek. Az ebihalak másik felének ugyanilyen mennyiségű tenyésztőmédiumot (a vírus hozzáadása nélkül) adtunk. Annak érdekében, hogy megfigyelhető legyen a hőmérsékleti kezelés hatása az *Rv* prevalenciájára, illetve fertőzési intenzitására, mintát vettünk a hőmérsékleti kezelés előtt és után is. Ez azt jelenti, hogy minden fertőzési csoportból 20 egyedet (összesen 120) a melegítés megkezdése előtt túlaltattunk és konzerváltunk 70%-os etanolban a további molekuláris vizsgálatokhoz.

3.5. DNS izolálás és kvantitatív PCR (qPCR)

Az ebihalakat sztereómikroszkóp alatt boncoltuk, a gomba DNS-t az ebihalak szájképletéből izoláltuk a PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachussetts, USA) segítségével, a Boyle és mtsai (2004) által leírtakat követve, míg a vírus DNS-t a májból, a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI,

USA) segítségével izoláltam, a gyártó által leírt protokoll szerint. A kórokozók örökítőanyagának specifikus régióit qPCR-rel erősítettem fel. A *Bd* esetében ez a köztes átíródó elválasztó régió (Internal Transcribed Spacer; ITS) 1-5.8S rRNS-e volt (Boyle és mtsai 2004; Hyatt és mtsai 2007), míg az *Rv* esetében a kapszid fehérjét (Major Capsid Protein; MCP) kódoló szakasz (Stillwell és mtsai, 2018). A primerek és próbák az alábbi 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat; Az Rv és Bd esetén használt primerek és próbák

Amplifikált régió	Primer szekvencia (5' – 3')	Próba	Forrás
ITS1-3 Chytr	**(CCT TGA TAT AAT ACA GTG TGC CAT ATG TC)**	Chytr MGB2 **(6FAM CGA GTC GAA CAA AAT MGBNFQ)**	Boyle és mtsai, 2004, Hyatt és mtsai, 2007
ITS-1 5.8S Chytr	**(AGC CAA GAG ATC CGT TGT CAA A)**	Chytr MGB2 **(6FAM CGA GTC GAA CAA AAT MGBNFQ)**	Boyle és mtsai, 2004, Hyatt és mtsai, 2007
MCP (Major Capsid Protein)	(**CCA GCC TGG TGT ACG AAA ACA)**	RANA_P1 (**6FAM-TGG GAG TCG AGT ACT AC-MGB)**	Stillwell és mtsai, 2018
MCP (Major Capsid Protein)	(**ACT GGG ATG GAG GTG GCA TA)**	RANA_P1 (**6FAM-TGG GAG TCG AGT ACT AC-MGB)**	Stillwell és mtsai, 2018

3.6. Statisztikai elemzés

Az adatok statisztikai elemzéshez a szabadon hozzáférhető R platform legfrissebb, 4.0.4. verzióját használtuk (R Core Team, 2020).

3.6.1 Prevalencia

A fertőzési csoportokban tapasztalt prevalenciák összehasonlítását a Fisher-egzakt teszttel végeztem. A 3-as és 5-ös fertőzési csoportban mind a három hőmérsékleti kezelés utáni prevalenciát külön-külön hasonlítottuk a kezdeti fertőzési csoport prevalenciájával. A fertőzési csoportokat egymással nem hasonlítottuk össze. Az eloszlások vizsgálata után az Rv prevalencia kiszámításához csak a 3-as és 5-ös fertőzési csoportokat vettük be az elemzésbe, a

4-es és 6-os csoportokban tapasztalt alacsony variancia miatt. Az így kapott *p*-értékeket fdr (false discovery rate) módszerrel korrigáltuk. A prevalencia értékeket és a 95%-os konfidencia intervallumokat a QP3 programmal számoltam ki (Reiczigel és mtsai, 2019). Végezetül a *Bd* prevalenciára vonatkozó adatok nem voltak statisztikailag értékelhetők, ezért azokat csak leíró jelleggel mutatom be.

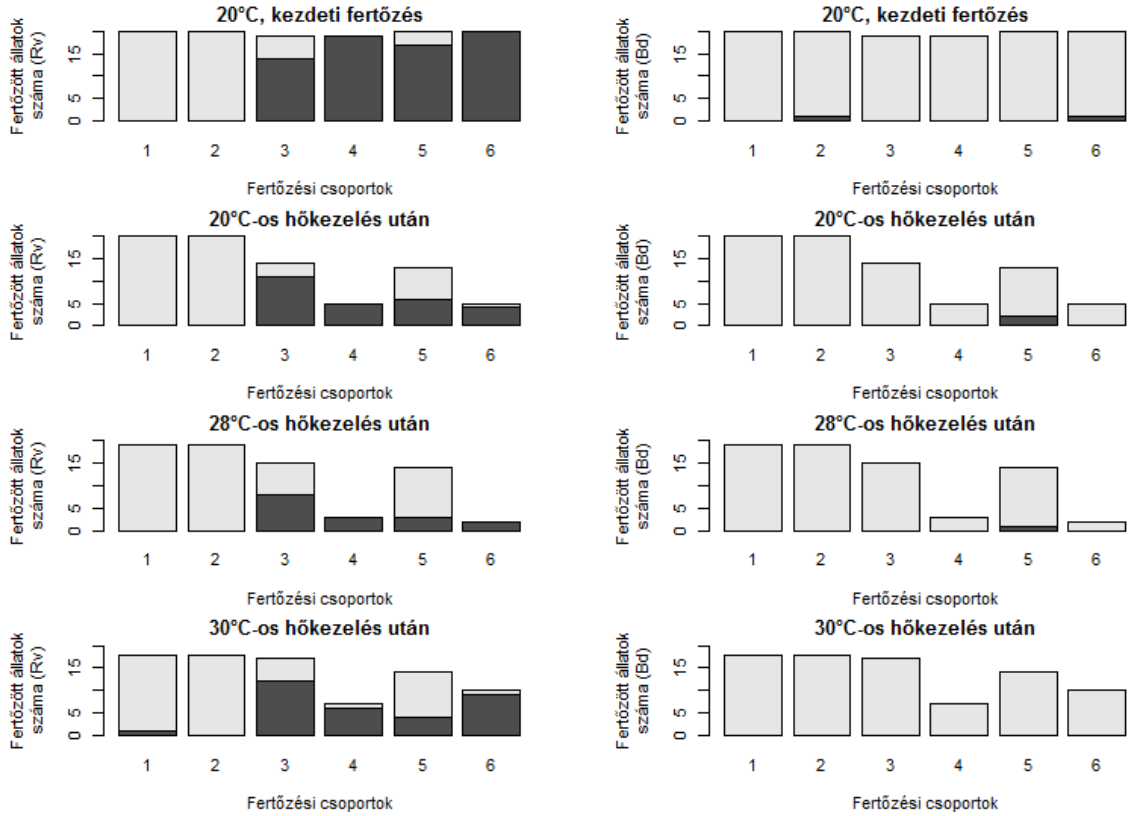
3.6.2 Fertőzési intenzitás

A fertőzési intenzitást Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával hasonlítottuk össze a kezelési csoportok között. Az így kapott *p*-értékeket ebben az esetben is fdr módszerrel korrigáltuk.

4. Eredmények

4.1 Rv és Bd prevalencia

A prevalencia értékek csoportonként összevonva, illetve részletesen hőmérsékleti kezelésenként a 2. táblázatban láthatóak. A 3-as és 5-ös fertőzési csoportban mind a három hőmérsékleti kezelés utáni prevalenciát külön-külön hasonlítottuk a kezdeti fertőzési csoport prevalenciájával. Az 1-es csoportban tapasztalt alacsony prevalencia érték valamilyen kontamináció eredménye lehet az adatfeldolgozás során.



5. ábra; Az egyes fertőzési csoportokban tapasztalt prevalencia változása a kezdeti fertőzés és a kezelési hőmérséklet függvényében. A fekete szín jelöli a fertőzött egyedeket. 1. csoport = nem fertőzött, 2. csoport = *Bd* fertőzés, 3. csoport = alacsony dózisú *Rv* fertőzés, 4. csoport magas dózisú *Rv* fertőzés, 5. csoport *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés, 6. csoport *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés

2. táblázat; Az egyes hőmérsékletek *Rv* prevalenciája csoportonként. 1. csoport = nem fertőzött, 2. csoport = *Bd* fertőzés, 3. csoport = alacsony dózisú *Rv* fertőzés, 4. csoport magas dózisú *Rv* fertőzés, 5. csoport *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés, 6. csoport *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés

Prevalencia (kezd.fert.csop.)	Fertőzési csoport	Hőmérséklet	Prevalencia	Fertőzési csoportonkénti összevont prev.	Túlélt/fertőzött
0%	1	20	0%	2%	20/0
	1	28	0%		20/0
	1	30	6%		18/1
0%	2	20	0%	0%	20/0
	2	28	0%		19/0
	2	30	0%		18/0
74%	3	20	79%	67%	14/11
	3	28	53%		15/8
	3	30	71%		17/12
100%	4	20	100%	93%	5/5
	4	28	100%		3/3
	4	30	86%		7/6
85%	5	20	46%	32%	13/6
	5	28	21%		14/3
	5	30	29%		14/4
100%	6	20	80%	88%	5/4
	6	28	100%		2/2
	6	30	90%		10/9

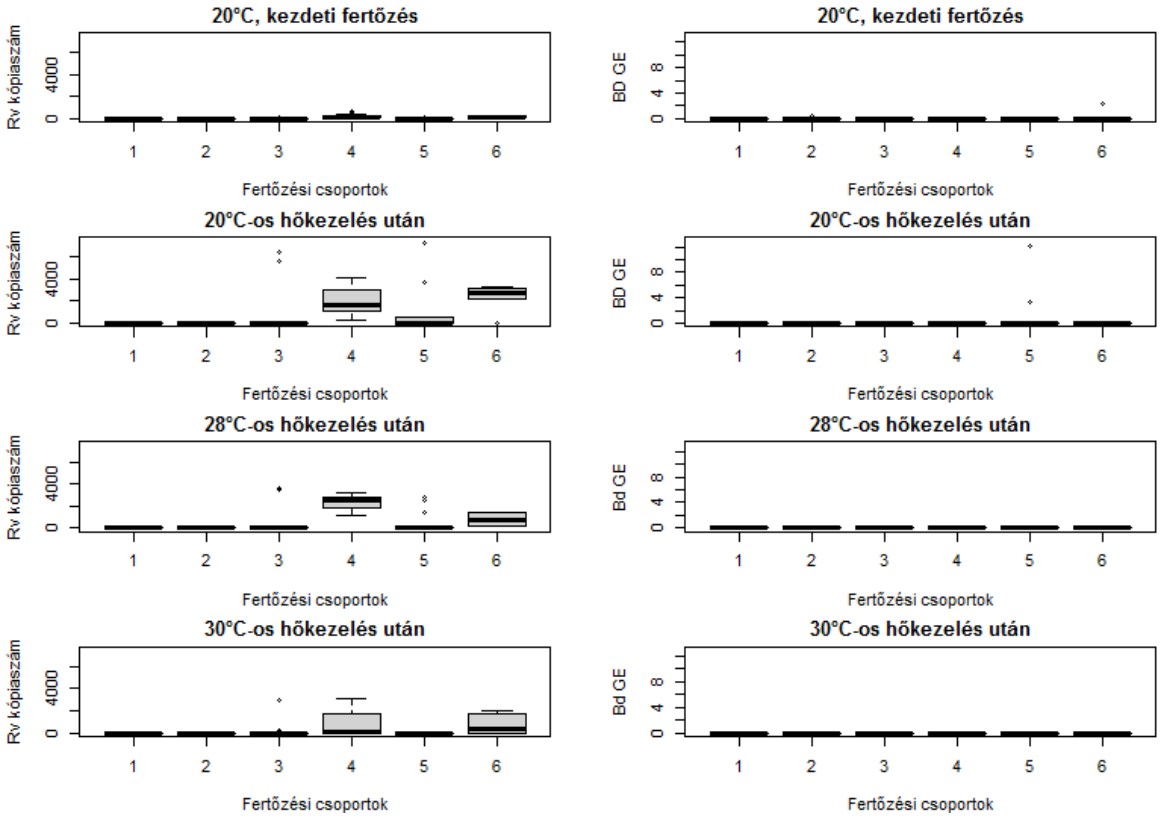
A *Bd* esetén az 1-es fertőzési csoportban egy egyed volt fertőzött, az 5-ös csoportban három egyed, míg a 6-os csoportban pedig szintén egy egyed fertőződött meg (5. ábra).

3. táblázat; Az *Rv* prevalenciájának változása a fertőzési csoportok között a kezdeti fertőzéshez viszonyítva (Fisher-egzakt teszt). 1. csoport = nem fertőzött, 2. csoport = *Bd* fertőzés, 3. csoport = alacsony dózisú *Rv* fertőzés, 4. csoport magas dózisú *Rv* fertőzés, 5. csoport *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés, 6. csoport *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés

Fertőzési csoport	Kezelési hőmérséklet	p érték	p érték (fdr korrigált)	95 % CI	Odds ratio		Változás iránya	Túlélt/fertőzött
3	20	1	1	0,097	5,029	0,769	nincs változás	14/11
3	28	0,288	0,432	0,467	13,24	2,383	nincs változás	15/8
3	30	1	1	0,209	6,453	1,161	nincs változás	17/12
5	20	0,025	0,051	1,013	49,771	6,182	nincs változás	13/6
5	28	< 0,0001	**0,002**	2,809	175,768	18,257	**csökkenés**	14/3
5	30	0,001	**0,004**	2,094	109,79	12,761	**csökkenés**	14/4

A Fisher egzakt teszt alapján az 5-ös fertőzési csoportban 28 fokon az *Rv* prevalenciája szignifikánsan csökkent (p=0,002) a kezdeti fertőzéshez képest. Hasonlóan az 5-ös fertőzési csoportban 30 fokon is szignifikáns csökkenést mutatott (p=0,004) az *Rv* prevalencia a kezdeti fertőzéshez képest. A többi csoportban, illetve hőmérsékleten nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kezdeti fertőzési csoporttól (3. táblázat).

4.2 Rv és Bd fertőzési intenzitás



6. ábra; Az egyes fertőzési csoportokban tapasztalt fertőzési intenzitás a kezelési hőmérséklet függvényében. Az *Rv* kópiaszám értékeket gyök transzformálva ábrázoltam. *Bd* GE = *Bd* genom ekvivalens zoospóraszám. 1. csoport = nem fertőzött, 2. csoport = *Bd* fertőzés, 3. csoport = alacsony dózisú *Rv* fertőzés, 4. csoport magas dózisú *Rv* fertőzés, 5. csoport *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés, 6. csoport *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés

A fertőzési intenzitás értékeket a qPCR által detektált valós kópiaszámként adtam meg, ezek a 6. ábrán láthatóak.

4. táblázat; Az egyes hőmérsékletek *Rv* fertőzési intenzitása csoportonként. 1. csoport = nem fertőzött, 2. csoport = *Bd* fertőzés, 3. csoport = alacsony dózisú *Rv* fertőzés, 4. csoport magas dózisú *Rv* fertőzés, 5. csoport *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés, 6. csoport *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés

Kezd. fert. csop. átlag (± SD)	Fertőzési csoport	Hőmérséklet	Átlag (± SD)	Fertőzési csoportonkénti összevont átlag (±SD)
0 (± 0)	1	20	0 (± 0)	0 (± 4)
	1	28	0 (± 0)	
	1	30	2 (± 7)	
0 (± 0)	2	20	0 (± 0)	0 (± 0)
	2	28	0 (± 0)	
	2	30	0 (± 0)	
575 (± 1209)	3	20	5128538 (± 13175519)	5066526 (± 20090653)
	3	28	10173250 (± 32834499)	
	3	30	509524 (± 2078161)	
63018 (± 96032)	4	20	6196174 (± 7212191)	4332218 (± 5246505)
	4	28	5802858 (±4346938)	
	4	30	2370547 (± 3845123)	
596 (± 1019)	5	20	5063631 (± 14578811)	1986103 (± 8396487)
	5	28	1114486 (± 2489267)	
	5	30	14 (± 30)	
32534 (± 26674)	6	20	6743478 (± 4522080)	2845970 (± 3664467)
	6	28	928882 (± 1263791)	
	6	30	1280633 (± 1621145)	

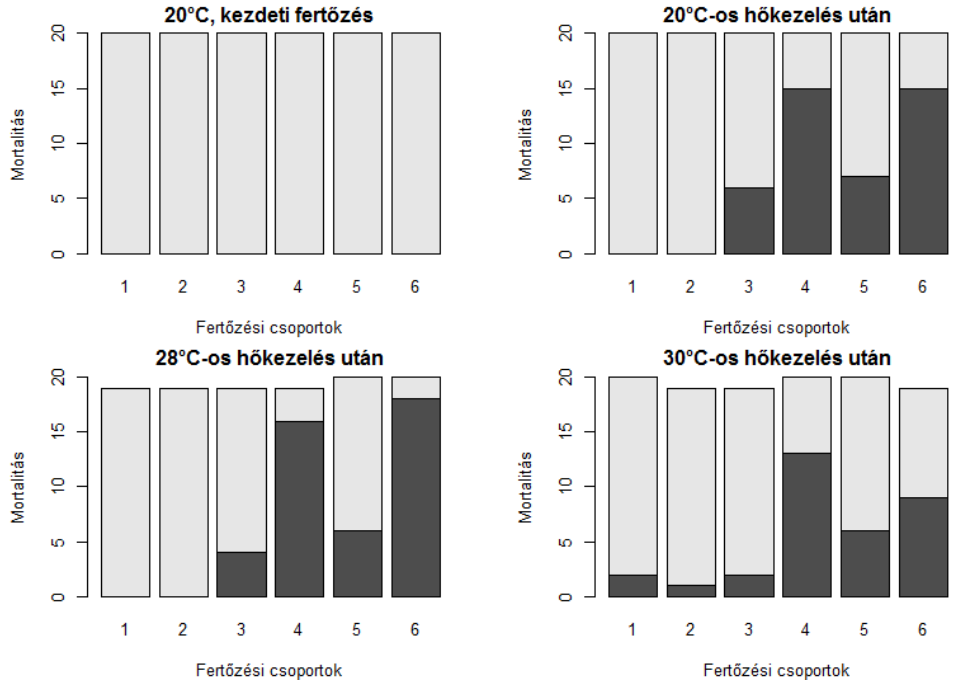
A 2-es fertőzési csoportban egy egyednél volt értelmezhető *Bd* GE (6. ábra) érték (0,36), az 5-ös csoportban három egyed esetében kaptunk értelmezhető értéket (12,12; 3,46; 0,11) míg a 6-os csoport esetében szintén egy egyednél kaptunk értelmezhető GE értéket (2,43). Ezeket az eredményeket a 6. ábra szemlélteti.

5. táblázat; Az *Rv* fertőzési intenzitásának változása a fertőzési csoportok között a kezdeti fertőzéshez viszonyítva (Wilcoxon-féle előjeles rangpróba). 1. csoport = nem fertőzött, 2. csoport = *Bd* fertőzés, 3. csoport = alacsony dózisú *Rv* fertőzés, 4. csoport magas dózisú *Rv* fertőzés, 5. csoport *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés, 6. csoport *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés

Fertőzési csoport	Kezelési hőmérséklet	p érték	p érték (fdr korrigált)	Változás iránya
3	20	0,686	0,734	nincs változás
3	28	0,347	0,595	nincs változás
3	30	0,653	0,734	nincs változás
4	20	< 0,001	**0,001**	**növekedés**
4	28	0,001	**0,005**	**növekedés**
4	30	0,734	0,734	nincs változás
5	20	0,513	0,734	nincs változás
5	28	0,022	0,066	nincs változás
5	30	< 0,001	**0,001**	**csökkenés**
6	20	0,042	0,101	nincs változás
6	28	0,173	0,346	nincs változás
6	30	0,649	0,734	nincs változás

A Wilcoxon-féle előjeles rangpróba alapján a 4-es fertőzési csoportban (magas dózisú *Rv*) 20, és 28 fokon szignifikánsan nőtt (p=0,001, illetve p=0,005) az *Rv* kópiaszáma a kezdeti fertőzéshez képest. Ezzel szemben az 5-ös fertőzési csoportban (*Bd* + alacsony dózisú *Rv*) 30 fokon szignifikánsan csökkent (p=0,001) az *Rv* kópiaszáma a kezdeti fertőzéshez képest. A többi csoport és hőmérséklet esetén nem tapasztaltunk eltérést (5. táblázat).

4.3 Mortalitás



7. ábra; Az egyes fertőzési csoportok közötti mortalitások. Fekete szín jelzi az elpusztult állatok számát. 1. csoport = nem fertőzött, 2. csoport = *Bd* fertőzés, 3. csoport = alacsony dózisú *Rv* fertőzés, 4. csoport magas dózisú *Rv* fertőzés, 5. csoport *Bd* + alacsony dózisú *Rv* kettős fertőzés, 6. csoport *Bd* + magas dózisú *Rv* kettős fertőzés

A kezdeti fertőzési csoportban egyáltalán nem tapasztaltunk pusztulást, míg a hőkezelés után, a 4-es és 6-os csoportokban magas volt a mortalitás, a 3-as és 5-ös csoportokban pedig közepes, illetve alacsony. Az 1-es és 2-es csoportokban pedig csak 30 fokon volt alacsony számú elhullás (7. ábra).

5. Diszkusszió

Az eredményeink alapján elmondható, hogy az *Rv* prevalenciája csökkenést mutatott az 5. fertőzési csoportban (*Bd* + alacsony dózisú *Rv*) 28 és 30 fokos hőkezelés hatására a kezdeti fertőzéshez képest. A fertőzési intenzitás szintén csökkenést mutatott az 5. fertőzési csoportban 30 fokos hőkezelés esetén, amely arra a feltételezésre ad okot, hogy az ebihalak immunrendszere a magasabb hőmérsékleten aktívabb a kórokozók ellen. Feltételezhetjük tehát, hogy valahol 28 és 30 °C körül lehet az a kritikus hőmérséklet, ahol a gazdaszervezetek sikeresebben védekeznek a kórokozók általi fertőzés ellen. Ezek az eredmények a Sauer és munkatársai (2019) által kapott eredményekhez hasonlóak. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy nem biztosan a magas hőmérséklet negatív hatása miatt csökken a prevalencia és fertőzési intenzitás, hanem inkább a kétéltű gazdaszervezetek immunrendszerét serkenti a megemelt hőmérséklet, amelyet a viselkedési láz segítségével érnek el (Sauer és mtsai, 2019). Ezt a feltételezést erősíti az is, hogy a 4. fertőzési csoportban (magas dózisú *Rv*) 20 fokon, a vírus fertőzési intenzitása növekedett a várttal ellentétben, ugyanis az *Rv* egy hőkedvelő kórokozónak bizonyult az *in vitro* kísérletek alapján (Cunningham, 2001). Ezzel szemben, 28 fokon a fertőzési intenzitás szignifikáns növekedést mutatott a 4-es csoportban (magas dózisú *Rv*) a kezdeti fertőzéssel szemben, ami azzal magyarázható, hogy a körülmények az *Rv* szaporodásának kedveztek, de a gazda immunrendszere még nem lépte át azt a határértéket, mint 30 fokos környezeti hőmérséklet esetén.

A *Bd* esetében már a kezdeti fertőzésben részt vett állatoknál sem volt megfelelő a fertőződés, így a *Bd*-re várt hipotéziseinket nem tudtuk statisztikailag alátámasztani. Nem tudtuk tehát kimutatni, hogy milyen hatással volt a *Bd* prevalenciájára és fertőzési intenzitására az *Rv* jelenléte kettős fertőzöttség esetén. Habár a *Bd*-nek való kitettség a kéthetes fertőzés során eredményezhette azt, hogy az ebihalak jobban fogékonnyá váltak az ezt követő *Rv* fertőzésre. Ezt magyarázhatja a kettős fertőzöttség esetén tapasztalt magas mortalitás (Watters és mtsai, 2018). Az, hogy a *Bd*-t nem tudtuk detektálni annak lehet a következménye, hogy a kutatás során használt *Bd*-GPL törzset már 2015 óta használják a kutatócsoportban, és feltételezhető, hogy a sokszori átoltás eredményeképpen csökken a törzs virulenciája. A jövőbeni kísérletekhez új törzs alkalmazása egy lehetséges megoldás lehet erre a problémára.

A 4. és 6. fertőzési csoportokban megfigyelhető magas pusztulás egyik lehetséges magyarázata a magas dózisú *Rv*-nek való kitettségben keresendő. A 4. fertőzési csoportban, amely a magas dózisú *Rv* kezelést kapta, valószínűleg azért volt a legmagasabb az elhullás, mivel a természetben nem gyakran, vagy egyáltalán nem fordul elő, hogy ilyen magas *Rv* dózissal találkoznak a kétéltűek. A kezdeti fertőzési csoportokban nem tapasztaltunk mortalitást, így az egyes hőmérsékleti kezelések utáni elhullást nem tudtuk összehasonlítani a kezdeti fertőzéssel. A 6. csoportban megfigyelt, szintén magas mortalitási érték pedig a kettős fertőzöttség miatt alakulhatott ki. Ez a fertőzési csoport *Bd* és magas dózisú *Rv* fertőzést kapott, és ugyan a *Bd* sikertelen fertőzése miatt statisztikailag nem tudjuk bizonyítani a kettős fertőzöttség gazdaszervezetre gyakorolt negatív hatását, a már fentebb leírt *Bd*-fertőzés utáni kitettség kialakulása miatt a gazdaállatok már fogékonyabbak lehettek az *Rv*-vel való fertőzésnek, illetve kevésbé voltak képesek védekezni a fertőzéssel szemben (Watters és mtsai, 2018). Ugyanígy az 5. fertőzési csoportban (*Bd* + alacsony dózisú *Rv*) is megfigyelhető volt egy alacsony pusztulás, ami valószínűleg szintén magyarázható ezzel. Sajnos ezek főleg feltevések, mivel túl sok állat pusztult el, és az így megmaradt adatmennyiség az értékelhető mintaelemszám lecsökkenését okozta. Eredményeink alapján elmondható, hogy az erdei béka ebihalak rendkívül fogékonyak erre a ranavírusok által okozott betegségre, ahogyan azt vártuk a más rokonfajokon (pl. *Rana latastei*) végzett kutatások alapján (Pearman és mtsai, 2004).

Továbbá a kísérlet egy *in situ* természetvédelmi stratégia modellje volt, ezért számos dologra oda kell figyelni a jövőben a módszer tökéletesítéséhez (Hettyey és mtsai 2019). Az egyik ilyen az, hogy egyes békafajok, köztük különösen a *R. dalmatina* ivarváltáson mennek át különböző külső behatások mellett. Ilyenek például a különböző stresszfaktorok jelenléte, az emberi földhasználat, illetve a hőmérsékleti kezelés is (Nemesházi és mtsai, 2020b). A szerzők kimutatták például, hogy a *R. dalmatina* esetében emberi földhasználat hatására a genetikailag nőstény békák maszkulinizálódtak. Ezen kívül azt is kimutatták, hogy laborkörülmények között 125 egyedből hatnál volt megfigyelhető ivarváltás, aminek a stresszhatások lehetnek a magyarázó okai. És mivel a megemelt hőmérséklet (30 °C) hatására is végbemegy az ivarváltás, ezért ezt mindenképpen figyelembe kell vennünk, mielőtt alkalmazzuk ezt a módszert természetes populációkon (Nemesházi és mtsai, 2020a). Ezen kívül a Hettyey és munkatársai (2019) által leírtak is a további kutatások iránti szükségletet fejtik ki. A szerzők leírják, hogy sok előnnyel járhat egy *in situ* melegítő berendezés a *Bd* elleni védekezésben, ám rengeteg limitáló tényező is fennáll. Például az, hogy a hidegadaptált kétéltűfajok (mint például az általunk vizsgált *R. dalmatina*), amelyek alacsony CT_{max}-szal

rendelkeznek, el fogják kerülni a megemelt környezeti hőmérsékletet nyújtó berendezéseket. Veszélyforrást jelent továbbá az is, hogy a melegebb hőmérséklet limitálhatja a hidegkedvelő kórokozók szaporodását, ám például a különböző ranavírusok terjedését elősegítheti (Cunningham, 2001). Ezért is fontosak az olyan irányú kutatások, amelyek ezeknek a kórokozóknak a túlélését, fertőzési intenzitását, illetve prevalenciáját vizsgálják különböző hőmérsékleti kezelések hatására. Ezenkívül a kórokozók lokális elterjedéséről szóló munkák is igen fontosak lehetnek az *in situ* kezelések tervezésekor. Végezetül pedig ezen módszerek finanszírozása is egy egyelőre megoldatlan probléma. Nemcsak az előállítás költsége, de a különböző élőhelyeken való üzemeltetés is költséges lehet (Hettyey és mtsai, 2019).

Irodalomjegyzék

Allender MC, Mitchell MA, Torres T, Sekowska J, Driskell EA. 2013: Pathogenicity of frog virus 3-like virus in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*) at two environmental temperatures. J. Comp. Pathol., 149. 2-3. p. 356–367.

Andersson M. O, Víchová B, Tolf C, Krzyzanowska S, Waldenström J, Karlsson M. E. 2017: Co-infection with *Babesia divergens* and *Anaplasma phagocytophilum* in cattle (*Bos taurus*), Sweden. Ticks Tick-borne Dis., 8. 6. p. 933–935.

Anthony D Barnosky, Nicholas Matzke, Susumu Tomiya, Guinevere O U Wogan, et al. 2011: Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? Nature, 3. 471. p. 51-7.

APHA 1985: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington DC, American Public Health Association

Ariel E, Nicolajsen N, Christophersen MB, Holopainen R, Tapiovaara H, Jensen BB. 2009: Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. Aquaculture, 294. 3-4. p. 159–164.

Becker CG, Rodriguez D, Longo AV, Talaba AL, Zamudio KR. 2012: Disease risk in temperate amphibian populations as higher at closed-canopy sites. PLoS ONE, 7. 10. e48205.

Belasen AM, Bletz MC, Leite DdS, Toledo LF, James TY. 2019: Long-term habitat fragmentation is associated with reduced MHC IIB diversity and increased infections in amphibian hosts. Front. Ecol. Evol., 6. 236.

Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, Donald KRMC, et al. 2004: Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. Aust Vet J., 82. 7. p. 31-6.

Beugnet F, Bourdeau P, Chalvet-Monfray K, Cozma V, Farkas R, Guillot J, Halos L, Joachim A, Losson B, Miró G, Otranto D, Renaud M, Rinaldi L. 2014: Parasites of domestic owned cats in Europe: co-infestations and risk factors. Parasites & Vectors, 25. 7. p. 291.

Bielby J, Cooper N, Cunningham AA, Garner TWJ, Purvis A. 2008: Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. Conserv. Lett., 1. p. 82-90.

Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT, Hyatt AD. 2004: Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Dis. Aquat. Org., 60. p. 141–148.

Brenes R, Gray MJ, Waltzek TB, Wilkes RP, Miller DL. 2014: Transmission of *Ranavirus* between ectothermic vertebrate hosts. PLoS ONE, 9. 3. e92476.

Brunner JL, Schock DM, Davidson EW, Collins JP. 2004: Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. Ecology, 85. 2. p. 560-6.

Brunner JL, Richards K, Collins JP. 2005: Dose and host characteristics influence virulence of ranavirus infections. Oecologia, 144. p. 399-406.

Brunner JL, Schock DM, Collins JP. 2007: Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. Dis. Aquat. Organ., 77. p. 87–95.

Brunner JL, Storfer A, Gray MJ, Hoverman JT., 2015: *Ranavirus* ecology and evolution: from epidemiology to extinction. In: Gray MJ, Chinchar VG. (eds): Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates. New York, Springer. 71-104.

Byrne AQ, Vredenburg VT, Martel A, Pasmans F, Bell RC, Blackburn DC, et al. 2019: Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 116. 41. p. 20382-20387.

Campbell J, Kessler B, Mayack C, Naug D. 2010: Behavioural fever in infected honeybees: parasitic manipulation or coincidental benefit? Parasitology, 137. 10. p. 1487-1491.

Carey C. 1993: Hypothesis concerning the causes of the disappearance of Boreal toads from the Mountains of Colorado. Conserv. Biol., 7. 2. p. 355-62.

Carey C, Cohen N, Rollins-Smith L. 1999: Amphibian declines: an immunological perspective. Dev. Comp. Immunol., 23. 6. p. 459-72.

Chege S, Howlett J, Al Qassimi M, Toosy A, Kinne J, Obanda V. 2013: Opportunistic infection of *Aspergillus* and bacteria in captive Cape vultures (*Gyps coprotheres*). Asian Pac. J. Trop. Biomed., 3. 5. p. 401–406.

Chinchar VG, Wang J, Murti G, Carey C, Rollins-Smith L. 2001: Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuerin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. Virology, 288. 2. p. 351–357

Chinchar VG. 2002: Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. Arch. Virol., 147. 3. p. 447–470.

Cohen JM, McMahon TA, Ramsay C, Roznik EA, Sauer EL, Bessler S, et al. 2019: Impacts of thermal mismatches on chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence are moderated by life stage, body size, elevation and latitude. Ecol. Lett., 22. 5. p. 817–825.

Cohen JM, Venesky MD, Sauer EL, Civitello DJ, McMahon TA, Roznik EA, Rohr JR. 2017: The thermal mismatch hypothesis explains host susceptibility to an emerging infectious disease. Ecol. Lett., 20. 2. p. 184–193.

Cunningham AA. 2001: Investigations into mass mortalities of the common frog (*Rana temporaria*) in Britain: Epidemiology and aetiology. PhD thesis, Royal Veterinary College (University of London). URL: https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.269010 Megtekintve: 2021.02.18.

Daly JW. 1995: The chemistry of poisons in amphibian skin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92. 1. p. 9-13.

Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. 1999: Emerging infectious diseases and amphibian population declines. Emerg. Infect. Dis., 5. 6. p. 735–748.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000: Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. Science, 287. 5452. p. 443–449.

Densmore CL, Green DE. 2007: Diseases of amphibians. ILAR J., 48. 3. p. 235-54.

Duffus ALJ, Cunningham AA. 2010: Major disease threats to European amphibians. Herpetol J., 20. p. 117-27.

Echaubard P, Leduc J, Pauli B, Chinchar VG, Robert J, Lesbarrères D. 2014: Environmental dependency of amphibian–ranavirus genotypic interactions: Evolutionary perspectives on infectious diseases. Evol. Appl., 7. 7. p. 723–733.

Erin L. Sauer, Nadia Trejo, Jason T. Hoverman, Jason R. Rohr 2019: Behavioral fever reduces ranaviral infection in toads. Funct, Ecol., 33. 11. p. 2172-2179.

Fisher MC, Garner TWJ, Walker J. 2009: Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time and host. Ann. Rev. Microbiol., 63. p. 291–310.

Gray MJ, Chinchar VG., 2015: Ranaviruses. Lethal pathogens of ectothermic vertebrates. Berlin, Germany, Springer.

Gutiérrez-Pesquera LM, Tejedo M, Olalla-Tárraga MÁ, Duarte H, Nicieza A, Solé M. 2016: Testing the climate variability hypothesis in thermal tolerance limits of tropical and temperate tadpoles. J. Biogeogr., 43. 6. p. 1166–1178.

Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, et al. 2009: Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. The ISME Journal, 3. p. 818-24.

Herczeg D, Ujszegi J, Kásler A, Holly D, Hettyey A 2021: Host-multiparasite interactions in amphibians: a review. Parasites & Vectors (közlésre elfogadott kézirat)

Hettyey A, Ujszegi J, Herczeg D, Holly D, Vörös J, Benedikt R. Schmidt, Jamie Bosch 2019: Mitigating Disease Impacts in Amphibian Populations: Capitalizing on the Thermal Optimum Mismatch Between a Pathogen and Its Host. Front. Ecol. Evol., 7. 254.

Hoon-Hanks L. L, Stöhr A. C, Anderson A. J, Evans D. E, Nevarez J. G, Díaz R. E, Rodgers C. P, Cross S. T, Steiner H. R, Parker R. R, Stenglein M. D. 2020: *Serpentovirus* (*Nidovirus*) and *Orthoreovirus* Coinfection in Captive Veiled Chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) with Respiratory Disease. Viruses, 12. 11. p. 1329.

Hoverman JT, Gray MJ, Miller DL. 2010: Anuran susceptibilities to ranaviruses: role of species identity, exposure route, and a novel virus isolate. Dis. Aquat. Org., 89. 2. p. 97-107.

Hoverman JT, Mihaljevic JR, Richgels KLD, Kerby JL, Johnson PTJ. 2012: Widespread cooccurrence of virulent pathogens within California amphibian communities. EcoHealth, 9. p. 288–292.

Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, Dalton A, Kriger K, Hero M, Hines H, Phillot R, Campbell R, Marantelli G, Gleason F, Coiling A. 2007: Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Dis. Aquat. Org., 73. 3. p. 175–192.

Jancovich JK, Bremont M, Touchman JW, Jacobs BL. 2010: Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family Iridoviridae). J Virol., 797. 84. p. 636-47.

Joachim Roth, Clark M. Blatteis 2014: Mechanisms of Fever of Production and Lysis: Lessons from Experimental LPS Fever. Compr. Physiol., 4. 4. p. 1563-1604.

Kik M, Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Pasmans F, Wohlseind P, Grönea A, Rijksa JM. 2011: Ranavirus-associated mass mortality in wild amphibians, The Netherlands, 2010: A first report. Vet. J., 190. 2. p. 284–286.

Kik M, Stege M, Boonyarittichaikij R, van Asten A. 2012: Concurrent ranavirus and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs (*Phyllobates* and *Dendrobates* species), The Netherlands, 2012: A first report. Vet. J., 194. 2. p. 247-9.

Koprivnikar J. 2010: Interactions of environmental stressors impact survival and development of parasitized larval amphibians. Ecol Appl., 20. 8. p. 2263-72.

Krzysztof Rakus, Maygane Ronsmans, Alain Vanderplasschen 2017: Behavioral fever in ectothermic vertebrates. Dev. Comp. Immun., 66. p. 84-91.

Langdon JS, Humphrey JD, Williams LM. 1988: Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. J. Fish Dis., 11. 1. p. 93–96

Linda K. Vaughn, Harry A. Bernheim, Matthew J. Kluger 1974: Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. Nature, 252. p. 473-474.

Lips KR 2016: Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. Philos. Trans. R. Soc. B, 371. 1709.

Love CN, Winzeler ME, Beasley R, Scott DE, Nunziata SO, Lance SL. 2016: Patterns of amphibian infection prevalence across wetlands on the Savannah River Site, South Carolina, USA. Dis. Aquat. Org., 121. 1. p. 1-14.

Macfoy C, Danosus D, Sandit R, Jones TH, Garraffo HM, Spande TF, et al. 2005: Alkaloids of anuran skin: antimicrobial function? Z. Naturforsch C., 60. 11-12. p. 932-7.

Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (2021) Magyarország kételtűi és hüllői: Erdei béka https://www.mme.hu/keteltuek-es-hullok/erdei-beka. [cikk] Letöltés dátuma: 2021.02.15.

Malagon DA, Melara LA, Prosper OF, Lenhart S, Carter ED, Fordyce JA, et al. 2020: Host density and habitat structure influence host contact rates and *Batrachochytrium salamandrivorans* transmission. Sci. Rep., 10. 5584.

Maniero GD, Carey C. 1997: Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. J. Comp. Physiol. B., 167. 4. p. 256-63.

Miller DL, Rajeev S, Brookins M, Cook J, Whittington L, Baldwin CA. 2008: Concurrent infection with *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, and *Aeromonas* in a captive anuran colony. J. Zoo Wildl. Med., 39. 3. p. 445-9.

Matutte B, Storey KB, Knoop FC, Conlon JM. 2000: Induction of synthesis of an antimicrobial peptide in the skin of the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*, in response to environmental stimuli. FEBS. Lett., 483. 2-3. p. 135–138

Murphy P. J, St-Hilaire S, Corn P. S. 2011: Temperature, hydric environment, and prior pathogen exposure alter the experimental severity of chytridiomycosis in boreal toads. Dis. Aquat. Organ., 95. 1. p. 31-42.

Natalie K. Stilwell, Richard J. Whittington, Paul M. Hick, Joy A. Becker, Ellen Ariel, Steven van Beurden, Niccolò Vendramin, Niels J. Olesen, Thomas B. Waltzek 2018: Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR for the detection of ranaviruses. Dis. Aquat. Org., 128. p. 105-116.

Nemesházi E, Mikó Zs, Ujhegyi N, Verebélyi V, Ujszegi J, Kásler A et al. 2020a: Sex reversal and ontogeny under climate change and chemical pollution: are there interactions between the effects of elevated temperature and a xenoestrogen on early development in agile frogs? Publikálatlan kézirat. URL: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.29.424761v1

Nemesházi E, Gál Z, Ujhegyi N, Verebélyi V, Mikó Z, Üveges B, … Bókony V. 2020b: Novel genetic sex markers reveal high frequency of sex reversal in wild populations of the agile frog (*Rana dalmatina*) associated with anthropogenic land use. Mol. Ecol., 29. p. 3607-3621.

Nicole Liew, Maria J. Mazon Moya, Claudia J. Wierzbicki, Michael Hollinshead, Michael J. Dillon, et al. 2017: Chytrid fungus infection in zebrafish demonstrates that the pathogen can parasitize non-amphibian vertebrate hosts. Nat. Commun., 8. 15048.

O'Hanlon SJ, Rieux A, Farrer RA, Rosa GM, Waldman B, Bataille A, et al. 2018: Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. Science, 627. 6389. p. 621-7.

Olori JC, Netzband R, McKean N, Lowery J, Parsons K, Windstam ST. 2018: Multi-year dynamics of ranavirus, chytridiomycosis, and co-infections in a temperate host assemblage of amphibians. Dis. Aquat. Org., 130. 3. p. 187-97.

Ortiz-Santaliestra ME, Fishery MC, Fernández-Beaskoetxea S, Fernández-BenÉItez MJ, Bosch J. 2011: Ambient ultraviolet B radiation and prevalence of infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in two amphibian species. Conserv. Biol., 25. 5. p. 975-82.

Paré JA. 2003: Fungal diseases of amphibians: an overview. Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract., 6. 2. p. 315-26.

Pasquier LD, Schwager J, Flajnik MF. 1989: The immune system of *Xenopus*. Annu. Rev. Immunol., 7. p. 251-75.

Peter B Pearman, Trenton W J Garner, Monika Straub, Urs F Greber 2004: Response of the Italian agile frog (Rana latastei) to a Ranavirus, frog virus 3: a model for viral emergence in naïve populations. J. Wildl. Dis. 40. 4. p. 660-669.

Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. 2004: Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. Mycologia, 96. 1. p. 9–15.

Price SJ, Garner TWJ, Nichols RA, Balloux F, Ayres C, Mora-Cabello de Alba A, Bosch J. 2014: Collapse of amphibian communities due to an introduced *Ranavirus*. Curr. Biol., 24. 21. p. 2586–2591.

Price SJ, Leung WTM, Owen C, Sergeant C, Cunningham AA, Balloux F, Garner TWJ, Nichols RA. 2019: Temperature is a key driver of a wildlife epidemic and future warming will increase impacts.Global Change Biol., 25. p. 2648-2660.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Reiczigel J, Marozzi M, Fábián I, Rózsa L. 2019: Biostatistics for parasitologists – a primer to Quantitative Parasitology. Trends Parasitol., 35. 4. p. 277-281.

Rollins-Smith LA. 2017: Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. Dev. Comp. Immunol., 66. p. 111-9.

Rojas S, Richards K, Jancovich JK, Davidson EW. 2005: Influence of temperature on *Ranavirus* infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*. Dis. Aquat. Organ., 63. 2-3. p. 95– 100.

Scheele BC, Pasmans F, Skerratt LF, Berger L, Martel A, Beukema W, et al. 2019: Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. Science, 363. 6434. p. 1459–1463.

Schmidt B, Furrer S, Kwet A, et al 2009: Desinfektion als Massnahme gegen die Verbreitung der Chytridiomykose bei Amphibien. Zeitschr. Feldherpetol., 15. p. 229–241.

Sunday JM, Bates AE, Dulvy NK. 2014: Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. Proc. R. Soc. B, 278. 1713. p. 1823–1830.

Talbott K, Wolf TM, Sebastian P, Abraham M, Bueno I, McLaughlin M, et al. 2018: Factors influencing detection and co-detection of Ranavirus and *Batrachochytrium dendrobatidis* in Midwestern North American anuran populations. Dis. Aquat. Org., 128. p. 93–103.

Van Rooij P, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F. 2015: Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. Vet. Res., 46. 137.

Vörös J, Herczeg D, Fülöp A, Gál J. T, Dán Á, Harmos K, Bosch J. 2018: *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hungary: an overview of recent and historical occurrence. Acta Herpetol., 13. 2. p. 125-140.

Vörös J, Herczeg D, Papp T, Monsalve-Carcaño C, Bosch J. 2020: First detection of *Ranavirus* infection in amphibians in Hungary. Herpetol. Notes, 13. p. 213-7.

Warne RW, Crespi EJ, Brunner JL. 2011: Escape from the pond: stress and developmental responses to ranavirus infection in wood frog tadpoles. Funct. Ecol., 25. 1. p. 139-46.

Warne RW, LaBumbard B, LaGrange S, Vredenburg VT, Catenazzi A. 2016: Co-infection by chytrid fungus and ranaviruses in wild and harvested frogs in the tropical Andes. PLoS ONE, 11. 1. e0145864.

Watters JL, Davis DR, Yuri T, Siler CD. 2018: Concurrent infection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus among native amphibians from northeastern Oklahoma, USA. J. Aquat. Anim. Health, 30. 4. p. 291-301.

Whitfield SM, Geerdes E, Chacon I, Ballestero Rodriguez E, Jimenez RR, Donnelly MA, et al. 2013: Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. Dis. Aquat. Org., 104. 2. p. 173-8.

William W. Reynolds 1977: Fever and antipyresis in the bluegill sunfish, *Lepomis Macrochirus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 57. 2. p. 165-167.

Wynne FJ. 2020: Detection of ranavirus in endemic and threatened amphibian populations of the Australian Wet Tropics Region. Pac. Conserv. Biol., 26. 1. p. 93-7.

Zapata AG, Varas A, Torroba M. 1992: Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. Immunol. Today, 13. 4. p. 142-7.

Összefoglalás

Napjainkban zajlik a hatodik kihalási hullám, amely rendkívül sok fajt érint világszerte. Ebben az emberi tevékenységek is jelentős szerepe van. Különösen veszélyeztetettek a különböző kétéltűfajok, mivel ezek érzékenyek a környezet hirtelen változásaira. Továbbá rendkívüli veszélyt jelentenek a kétéltűekre a különböző betegségek, mint például a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) kitrid gomba okozta kitridiomikózis, illetve a ranavírusokhoz (*Rv*) köthető fertőző betegségek. Ezek főként az emberi tevékenységek hatására terjedtek el világszerte és végeztek pusztítást a kétéltű populációkban. Ennek a következtében a kettős vagy többes fertőződés egy gyakori jelenség a természetes kétéltű populációkban. Kutatásunk célja az volt, hogy tesztelje a környezeti hőmérséklet változásának a hatását a *Bd*-vel, *Rv*-vel, illetve mindkét patogénnel fertőzött erdei béka (*Rana dalmatina*) ebihalakon. Az *Rv* prevalenciája szignifikáns csökkenést mutatott a *Bd*-vel és alacsony dózisú *Rv*-vel fertőzött ebihalak esetén 28 és 30 °C-on. Ezzel ellentétben a fertőzési intenzitás pedig, szignifikáns növekedést mutatott a 20 és 28 °C-on kezelt, magas dózisú *Rv*-vel fertőzött csoport esetén, illetve szignifikánsan csökkent a 30 °C-on kezelt, alacsony dózisú *Rv*-vel és *Bd*-vel fertőzött csoportban. Továbbá 20 °C-on, és még 28°C-on is növekvő *Rv* fertőzési intenzitást tapasztaltunk a magas, illetve alacsony dózisú *Rv*-vel fertőzött csoportoknál. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten az ebihalak immunrendszere kevésbé működik jól, illetve a 28 és 30 °C között eltérés mutatkozik az immunrendszerük működésében. Ezen felül emelkedett mortalitást figyeltünk meg a magas dózisú *Rv*-vel, és a magas dózisú *Rv*-vel és *Bd*-vel fertőzött csoportok esetében. Ennek a fertőzési események időbeni elkülönülése lehet az oka, mivel a *Bd* fertőzés hatására (amelynek kezdete két héttel előzte meg az *Rv* fertőzést) megnövekedhetett az ebihalak fogékonysága az azt követő *Rv* fertőzésre. Végezetül, az eredményeink alapján elmondható, hogy habár a viselkedési láz jelenségét tapasztaltuk a 30 °C-on kezelt ebihalaknál, nem zárhatjuk ki, hogy a betegség lefolyásában a környezeti hőmérséklet változásának is szerepe volt.

Abstract

Nowadays, we are facing the sixth mass extinction event, in which human activities are playing a decisive role. Amphibians are highly vulnerable because they are sensitive to rapid environmental changes. Emerging pathogens like *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and Ranaviruses (*Rv*) pose a serious threat to amphibians globally. Both are spreading mainly by human activities and causing massive declines among amphibian populations. Therefore, co-infections with these pathogens are frequently encountered in wild amphibian populations. Our study experimentally tested the effects of constant heat treatment on the disease progression of *Bd* and *Rv* with a particular focus on co-infections in *Rana dalmatina* tadpoles. The prevalence of *Rv* decreased significantly in tadpoles at the lower dose *Rv* and *Bd* co-infected group at 28 and 30 °C temperature. In contrast, the infection intensity of *Rv* showed a significant increase at 20 and 28 °C in the single high dose *Rv* infected group and decreased at 30 °C on the low dose Rv and *Bd* co-infected group. Furthermore, at 20 °C and even at 28 °C, we saw a trend of increasing *Rv* infection intensity in both (low and high) single *Rv* infected groups (group 3 and 4). This may suggest a lower immune function of infected tadpoles at lower environmental temperature, and a supposed immune function difference between 28 and 30 °C temperature. Moreover, we experienced an elevated mortality in the single high dose *Rv* infected group, and the co-infected group with high dosage of *Rv* and *Bd*. The time order between the infections challenges of different pathogens may cause this pattern, because *Bd* infection started two weeks before *Rv* challenge and this may influence susceptibility to subsequent *Rv* infection. However, our results showed some evidence of behavioural fever in *R. dalmatina* tadpoles treated at 30 °C, we cannot rule out the effects of elevated environmental temperature on the disease progression of *Bd* and *Rv* caused co-infections.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Hettyey Attilának, hogy lehetőséget biztosított a kutatócsoportjában a szakdolgozat elkészítéséhez, továbbá a Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport minden munkatársának, különösen Ujszegi Jánosnak, aki a kísérlet során a *Bd* fertőzést végezte, továbbá Ujhegyi Nikolettnek, aki a QGIS használatában nyújtott segítséget. Külön köszönettel tartozom Dr. Bókony Veronikának, hogy az adatok statisztikai elemzésében a segítségemre volt. Köszönöm Dr. Papp Tibornak (ELKH ÁOTI) és Rachel E. Marschangnak (Laboklin GmbH), hogy az FV-3 izolátumot a rendelkezésünkre bocsájtották. Köszönöm Dr. Krízsik Virágnak és Tuschek Máriának, hogy használhattam az MTTM Molekuláris Taxonómiai Laboratórium eszközeit, illetve az *Rv* DNS izolálásában nyújtott segítségüket. Köszönöm Dr. Ursu Krisztinának (Nébih) a *Bd* izolálásban nyújtott közreműködést. Szeretném megköszönni a rengeteg segítséget, erőfeszítést, türelmet és odaadó munkát témavezetőmnek, Dr. Herczeg Dávidnak, aki nélkül ez a munka nem készülhetett volna el. Köszönöm a segítséget belső konzulensemnek, Dr. Kövér Szilviának, illetve Tanáraimnak az ötletekért és tanácsokért. Hálás vagyok továbbá Bombay Bálintnak, hogy illusztrációival színesíthettem a szakdolgozatomat. Köszönöm a barátaimnak, szaktársaimnak, akik támogattak és segítettek ezek alatt az évek alatt, illetve köszönöm a családomnak, akik szintén támogatásukkal járultak hozzá a munkámhoz.

Védett természeti területen folyó kutatás végzéséhez szükséges engedély száma: PE/EA/295-7/2018. Állategészségügyi Hatóság engedélye állatkísérletek végzéséhez: PE/EA/58-4/2019. A kutatás anyagi hátterét a K-124375 számú NKFIH OTKA projekt biztosította.

Alulírott Dr. Kövér Szilvia igazolom, hogy

Takács Hunor „A környezeti hőmérséklet hatása a kétéltűek fertőző betegségeire" című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021. 04. 29.

.....

Dr. Kövér Szilvia belső konzulens

Ökológiai Tanszék

Alulírott ..... DR HERCZEG DÁVID ..... Igazolom, hogy

..... TAKÁCS HUNOR ..... (a hallgató neve)

..... A KÖRNYEZETI HŐMÉRSÉKLET HATÁSA A KÉTÉLTŰEK FERTŐZŐ BETEGSÉGEIRE

című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2012. ÁPRILIS 29.

DR HERCZEG DÁVID .....

a témavezető neve és aláírása

ELKH ATK NÖVI .....

.....

tanszék