

Állatorvostudományi Egyetem

Biológiai Intézet

**Három kullancsfaj és a *Borrelia miyamotoi*
ökológiai vizsgálata egy erdei élőhelyen**

Készítette: Gabelics Tamás Péter

Biológus MSc II.

Témavezető:

Dr. Földvári Gábor

ÁTE, Parazitológiai és Állattani Tanszék, egyetemi docens

Budapest, 2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Kullancsok	3
2.2. Általunk vizsgált kullancsfajok és szezonális előfordulásuk.....	3
2.3. A kullancs, mint vektor.....	7
2.4. <i>Borrelia</i> -fajok és a <i>Borrelia miyamotoi</i>	8
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	11
3.1. Kullancsok gyűjtése	11
3.2. Kullancsok határozása	12
3.3. Szezonális vizsgálata	12
3.4. Kórokozók molekuláris vizsgálata.....	13
3.4.1. DNS-kivonás	13
3.4.2. Real-time PCR.....	13
3.4.3. Konvencionális PCR	14
3.4.4. Szekvenálás	16
4. EREDMÉNYEK	17
4.1. Kullancsok szezonális előfordulása	17
4.2. <i>Borrelia miyamotoi</i>	19
5. MEGBESZÉLÉS	22
5.1. Kullancsok szezonális előfordulása	22
5.2. <i>Borrelia miyamotoi</i>	23
ÖSSZEFOGLALÓ	25
SUMMARY	26
IRODALOMJEGYZÉK	27
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	31

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A kullancsokra és az általuk terjesztett kórokozókra egyre növekvő figyelem irányul mind a médiában, mind a tudományban. A leggyakoribb és legismertebb kórokozók közül az ember és a háziállatok Lyme borreliosisát okozó különböző fajú *Borrelia* spirochéta baktériumok a legjelentősebbek. Sok szempont alapján egy jól kutatott kórokozóról van szó, azonban a hazai kullancspopulációk *Borrelia*-fertőzöttségének mértéke kevéssé feltérképezett. Ez a hiányosság még hangsúlyosabban vonatkozik a *Borrelia miyamotoi*-ra. Ez a közelmúltban leírt humán patogén spirochéta a Lyme-kórtól eltérő, visszatérő lázat okoz, terjedése azonban szintén kullancs vektorhoz köthető. A TDK munkám a *Borrelia miyamotoi* járványtanának és ökológiájának megértésére vonatkozik. Vizsgálataink elsősorban a kórokozó fő vektorára, az *Ixodes ricinus* kullancsfajra összpontosulnak, arra, hogy egy adott év különböző évszakaiban gyűjtött egyedek száma, illetve *Borrelia miyamotoi* fertőzöttsége mutat-e szignifikáns különbségeket. Az esetleges eltéréseket az évek között is vizsgáljuk majd. Emellett hasonló szempontok szerint vizsgálunk két azonos élőhelyen előforduló, *Haemaphysalis* nembe tartozó kullancsfajt is. Ezeknek a kullancsoknak a szezonálisáról és vektor szerepéről összességében kevés az irodalomban fellelhető információ.

Kérdéseim:

- Milyen szezonalitást mutat az *I. ricinus* három fejlődési alakja?
- Ehhez képest a *B. miyamotoi* fertőzöttsége mutat-e szezonális változatosságot?
- Hogyan alakul a gyűjtési helyen előforduló másik két kullancsfaj szezonálisága?
- Jelen van a *B. miyamotoi* az ismert vektoron kívüli kullancsfajokban?
- Vannak-e jelentős évek közötti különbségek a kullancsfajok és a kórokozók szezonáliságában?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Kullancsok

A kullancsfélék családja (Ixodidae) taxonómiaiilag az ízeltlábúak törzsén (Arthropoda) belül a pókszabásúak osztályán (Arachnidae) át az atkák alosztályában (Acari) található. A kullancsfélék családját az angol nyelvben “hard ticks”-nek, azaz „kemény kullancsoknak” nevezik, a család testvércsoportja az óvantagok (Argasidae), melyeket az utótestet fedő kemény pajzs (scutum) hiánya miatt “soft ticks”-nek, azaz „puha kullancsoknak” neveznek. A kullancsfélék szárazföldi gerincesek külső parazitái, vérrel táplálkoznak, a világon több mint 700 fajuk ismert, ebből hazánkban kb. 20 faj van jelen. Életük során három fejlődési stádiumon esnek át. A petékből lárvák kelnek ki, melyek nimfákká, majd adult kullancsokká vedlenek (1. ábra). Minden vedléshez, a szaporodáshoz és peterakáshoz is táplálkozásra van szükség (Hillyard, 1996). A kullancsok életmódja alapján két csoportba oszthatók. Az exofil fajok azok, melyek maguk keresik fel a gazdát. Ez úgy értendő, hogy az egyedek az aljnövényzeten várják a gazda közeledtét, melyet speciális érzékszerveikkel (pl. Haller szerv) érzékelnek és kellő pillanatban felkapaszkodnak rá. Az endofil kullancsok ezzel ellentétben a gazda közvetlen közelében, a fészékben élnek, így az új kullancsgeneráció az új gazdagenerációval együtt nevelkedik fel. Ez a két stratégia sokszor egy faj stádiumai között is változhat. Például bizonyos *Hyalomma*, *Rhipicephalus* és *Dermacentor* fajok csak adult stádiumban élnek exofil módon, juvenilis stádiumokban endofilok. A gazdák száma alapján is elkülöníthetők a kullancsok, háromgazdás, kétgazdás és egygazdás fajokra. A háromgazdás kullancsok táplálkozás után mindig leesnek a gazdáról és átvedlenek a következő stádiumba, az egygazdások egész életükben képesek ugyanarról az állatról táplálkozni. A kétgazdások a három stádiumból kettőt töltenek ugyanazon a gazdán. Adult állapotban a kullancsok ivari dimorfizmust mutatnak, amely legszembetűnőbb a pajzson (scutum) mutatkozik meg (1. ábra; 3-4. ábra). A nőstények pajzsa körülbelül a test egyharmadát fedi, míg a hímeké majdhogynem az egészet (Bowmann és Nuttall, 2008).

2.2. Általunk vizsgált kullancsfajok és szezonális előfordulásuk

A közönséges kullancs (*Ixodes ricinus*) Európa legerősebben kullancsfaja. Minden stádiumában exofil kullancsfaj, több mint 300 szárazföldi gerinces gazdafaja ismert. A fajt már a 18. században leírták, azonban mélyebb kutatások csak a 20. században irányultak rá. A hatvanas évek vizsgálatai során derült fény vektorszerepére a

kullancs encephalitis vírus kapcsán, majd a nyolcvanas években írták le belőlük a Lyme borreliosiszt okozó spirochétákat (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) (Földvári, 2016). Ezeken kívül rengeteg kórokozó fajt mutattak ki *I. ricinus*-ból, ezek közül a legjelentősebb baktériumok az *Anaplasma phagocytophilum* és változatos *Rickettsia* fajok, protozoonok közül a legjelentősebbek a *Babesia* fajok (Rizzoli és mtsai., 2014).



1. ábra: Az *I. ricinus* különböző stádiumai méretének szemléltetése. Nőstény (bal felül), hím (bal alul), nimfa (jobb felül) és lárva (jobb alul).
(Van Duijvendijk és mtsai., 2016)

Az *Ixodes ricinus* (2. ábra) szezonális populációdinamikája a széles elterjedése és gyakori előfordulása miatt mára már jól feltérképezett. Az adult és nimfa stádiumban lévő kullancsok nagyobb denzitásban fordulnak elő koratavasszal és ősszel (Hillyard, 1996). A különböző évszakokban aktív kullancsok abundanciájának és a bennük lévő zsírszövet mennyiségének összevetéséből kiderült, hogy a koratavasszal aktív kullancsok kevesebb zsírtartalékkal rendelkeznek, mint az ősszel aktívak. Ennek magyarázata lehet, hogy a tavasszal sikeresen táplálkozó egyedek közül az adult nőstények petét raknak, a nimfák egy rövidebb pihenési időszak (diapauza) mellett átvedlenek és még ugyanazon év őszében újra gazdát keresnek, immár a táplálkozásból származó tartalék zsírszövettel. Azok a kullancsok, amelyek tavasztól aktívak, de nem találnak gazdát, tartalékaik kimerülésével elpusztulnak. Az ősszel aktív kullancsok sikeres táplálkozása esetén egy hosszú, egy éves diapauzát tartanak és következő ősszel lesznek ismét aktívak, sok zsírszövettel, amely

egyedek viszont nem tudnak táplálkozni, csak egy telet átvészelő diapauzát tartanak, és koratavasszal próbálnak ismét gazdát találni, zsírtartalékaik teljes kimerülése előtt (Randolph és mtsai., 2002).



2. ábra: Az *I. ricinus* adult stádiuma, nőstény (bal) és hím (jobb).
(<http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/key-to-genera/ixodes/ixodes-ricinus/>
oldal alapján módosítva, 2016. 10. 24.)

A *Haemaphysalis concinna* (3. ábra) Eurázsia mérsékeltövi lombhullató erdeiben szélesesen elterjedt, minden stádiumban exofil kullancsfaj. A juvenilis stádiumok gazdaköre főleg a kis- és közepes emlősökre és énekesmadarakra terjed ki, az adult stádium elsősorban a párosujjú patásokon táplálkoznak, de ragadozókon, sünökön és nyulakon is előfordulnak. Teljes kifejlődésük a természetben gyakran három éven belül végbemegy, labor körülmények között (20-24°C, 90-95%-os páratartalom) ez a fejlődés menet 200-250 nap alatt bekövetkezik. Közép-Európában az adultok április és augusztus között, a nimfák április és október között, a lárvák május és október között aktívak (Nosek, 1971). Egy magyarországi megfigyelés alapján a legnagyobb egyedszámban a *H. concinna* adultjai áprilisi és májusi hónapban fordultak elő (Hornok, 2009). A kullancs encephalitis vírusnak és a *Rickettsia sibirica*-nak bizonyított vektora a *H. concinna* (Balashov, 1967). Néhány éve sikerült először kimutatni a fajtól Lyme borreliosis spirochétát (Rigó és mtsai., 2011), a kórokozó terjesztésében betöltött szerepe azonban még nem feltérképezett.



3. ábra: A *H. concinna* adult stádiuma, nőstény (bal) és hím (jobb).
 (<http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/key-to-genera/haemaphysalis/haemaphysalis-concinna/Photograph> oldal alapján módosítva, szerzői jog a Londoni Természettudományi Múzeumot illeti)

A *Haemaphysalis inermis* (4. ábra) Európa erdős és mediterrán területein, valamint Dél-Ázsiában jellemző faj. Gazdaköre meglehetősen hasonló a *H. concinna*-éhoz. Az adult kullancsok, legtöbb fajtól eltérően a téli hónapokban, október és május között aktívak, leszámítva a kemény fagyokat. Innen származik a „winter tick” angol elnevezése a fajnak (Hillyard, 1996). A lárvák májustól augusztusig, a nimfák április és június között, majd augusztus és október között aktívak. A juvenilis stádiumok aljnövényzeten való tartózkodása nagyon ritka, valamint a gazdán is csak pár órán át tartózkodnak (Balashov, 1967; Santos-Silva és mtsai., 2011). Azonban ezzel a kijelentéssel ellentmondásos irodalmat is közöltek, ahol a lárvák és nimfák is jelentős mennyiségben kerültek begyűjtésre a növényzetről (Dantas-Torres és mtsai., 2013). Teljes életsiklusuk a természetben legtöbbször két év alatt lezajlik, ez azonban kitolódhat 3 évre is, attól függően, hogy az adult stádium mikor talál gazdára. Laboratóriumi körülmények között (20-24°C) a teljes fejlődési ciklus 165 nap alatt végbemegy (Nosek és mtsai., 1967). Magyarországon novemberben és decemberben figyeltek meg magasabb egyedsűrűséget (Hornok, 2009). A 18S és 28S riboszómális RNS géneken alapuló filogenetikai vizsgálat szerint a *H. inermis* a *Haemaphysalis parva*-val külön csoportot alkot a *Haemaphysalis* nemben belül (Burger és mtsai., 2013). Vektor szerepe eddig kevésbé felderített, azonban szerepe lehet a kullancs-encephalitis vírus (Nosek és mtsai., 1986), *Rickettsia helvetica* (Hornok és mtsai., 2010), *Rickettsia aeschlimannii* (Portillo és mtsai., 2008), *Rickettsia*

raoultii és *Anaplasma phagocytophilum* (Boldiš és mtsai., 2008) terjesztésében. Ezekhez a kórokozókhoz komoly emberi betegségek rendelhetők.



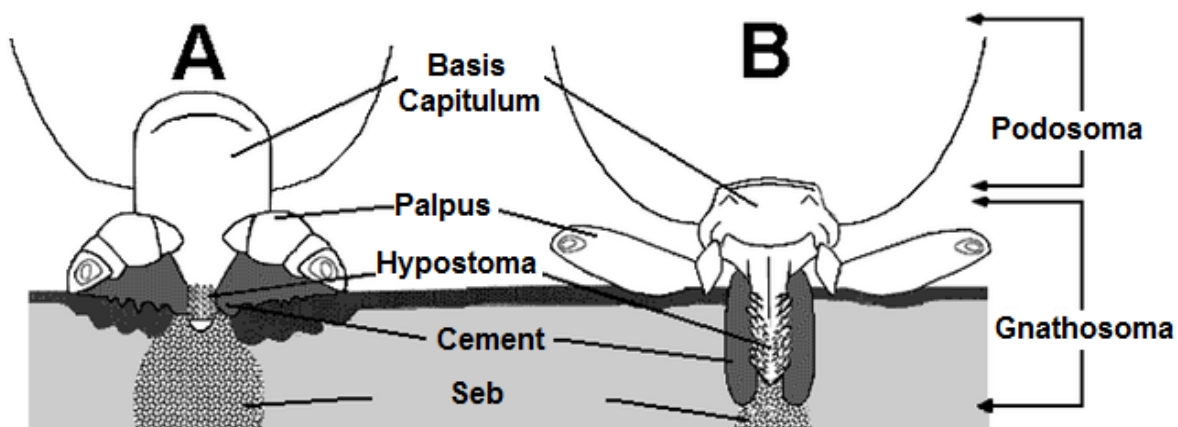
4. ábra: A *H. inermis* adult stádiuma, nőstény (bal) és hím (jobb).

(<http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/key-to-genera/haemaphysalis/haemaphysalis-inermis/> oldal alapján módosítva, 2016. 10. 24.)

2.3. A kullancs, mint vektor

Meglehetősen sok, taxonómiaiilag távol álló kórokozó számára a kullancsok jelentik a terjedés kulcsát, közöttük számos vírus, baktérium és egysejtű protozoon, valamint fonálféreg is előfordul. Ezt a sokféleséget a kullancsok egyedülálló vérszívási mechanizmusa hozta létre. A bőrfelületen csáprágójuk segítségével ejtenek egy apró sebet, melybe belemélyesztik szájszervüket. Szájszervük köré egy cement-szerű anyagot választanak ki, stabilizálva helyüket a bőrben (5. ábra). Ellentétben a szúnyogokkal, melyek egyetlen kapillárist megszúrva szívnek vért (solenofágia), a kullancsok telmofágok, más néven pool-feeder-ek, azaz több ér felsértésével egy apró vérrel telt árkot hoznak létre a bőr alatt. Ha több kullancs közel helyezkedik el egymáshoz a bőrben (co-feeding), a több árok egymással kapcsolatba lép, így a kórokozók könnyen átjuthatnak egyik egyedből a másikba, akár fertőzési gócot létrehozva. A kullancsok bélrendszere egy vakbélrendszer, ami azt jelenti, hogy klasszikus értelemben nem képesek üríteni, a nagy mennyiségű felszívott vér tárolását és feldolgozását kutikulájuk folyamatos szintézisével, a vér besűrítésével és a fölösleges víz gazdaállatba való visszajuttatásával

hajtják végre. Ilyen módon a kullancs szervezetében felhalmozódott kórokozók nagy mennyiségben kerülhetnek a gazda vérébe. Emésztésük intracelluláris, amely szintén egyedülálló az ízeltlábúak között, az emésztés során keletkezett melléktermékeket a rektális zsákban tárolják el és bizonyos ciklusonként képesek ezt üríteni. Ezen kívül a kullancs szaporodása is segít sok kórokozót olyan módon, hogy transzovariálisan a petékbe juthatnak, így az újonnan kikelő lárvák a kezdetektől hordozhatják a kórokozót. Lényeges lehet a hímek viselkedésében való különbözőség, az *I. ricinus* hímje fakultatív vérszívó, azaz a hímivarsejtek termeléséhez nincsen feltétlenül szüksége táplálkozásra, ezzel szemben a *Haemaphysalis* genus hímjeinek elengedhetetlen a vérszívás (Balashov, 1967; Bowmann és Nuttall, 2008).



5. ábra: Táplálkozó kullancsok a bőrbe fúródás két módja szerint.

A: felszíni táplálkozás (pl. *Dermacentor spp.*);

B: mélyen kötődő táplálkozás (pl. *Amblyomma spp.*).

(https://identify.us.com/_Media/tickattack_med-3.png oldal alapján módosítva;

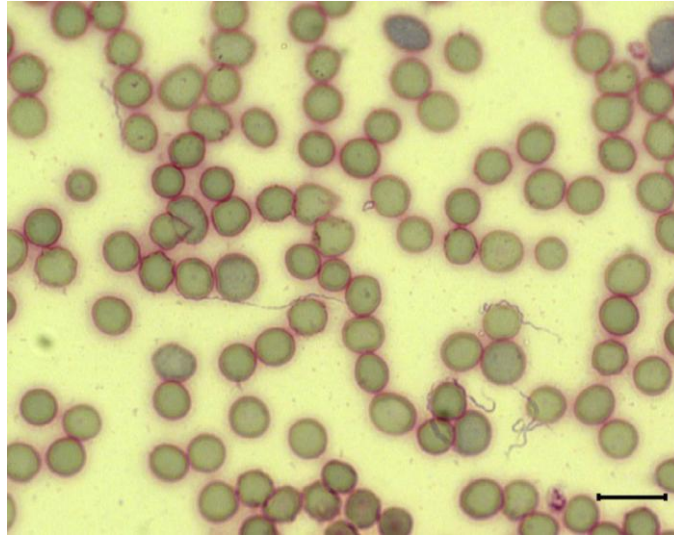
Letöltve 2016. október 21.)

2.4. *Borrelia*-fajok és a *Borrelia miyamotoi*

A *Borrelia* nem tagjai gram-negatív, anaerob spirochéta baktériumok, 7-14 periplazmatikus flagellummal rendelkeznek, hosszúságuk 5-25 μm , szélességük 0,2-0,5 μm . Nevükhöz két közegészségügyi szempontból jelentős betegség köthető, a Lyme borreliosis és a visszatérő láz. Terjedésük vérszívó ízeltlábú vektorokkal, a Lyme borreliosis a kullancsfélékkel (Ixodidae), a visszatérő láz első sorban tetvekkel (Raoult és mtsai., 1999) és óvantagokkal (Argasidae) történik, de köztük is van néhány kullancs által terjedő faj. Gerinces gazdába jutva a Lyme borreliosis kórokozója, név szerint a *Borrelia burgdorferi* sensu lato fajcsoport bizonyos tagjai, a szövetekben elrejtőzködve gyulladásokat hoznak létre a szervezetben (bőr, ízületek, szív, központi idegrendszer),

ezzel szemben a visszatérő lázat okozó spirochéták az érendszerben keringve sokszorozódnak és membránfehérjéik nagy mutációs rátájának köszönhetően képesek kijátszani a gazda immunrendszerét (6. ábra). A két csoport filogenetikailag is két, élesen elkülönülő csoportot képez (Marconi és Garon, 1992).

A *B. miyamotoi* egy viszonylag újnak tekinthető, 1995-ben leírt faj, melyet Japánban mutattak ki először *Ixodes persulcatus* kullancsfajból. Az *I. persulcatus* Japánban és Ázsia legnagyobb területén a *B. burgdorferi* sensu lato Lyme borreliosis-t okozó spirochéták fő terjesztője. A fertőzött kullancsok kisebb hányadában fedezték fel az eltérő flagellumproteint tartalmazó baktériumot, melynek további, genetikai vizsgálatából kiderült, hogy egy mindaddig ismeretlen *Borrelia*-fajról volt szó (Fukunaga és mtsai., 1995). Nevét Kenji Miyamoto, japán kutatóról kapta, akinek a személyéhez a spirochéta baktériumok kullancsokból való izolációja köthető. A *flagellin* génre irányuló filogenetikai vizsgálat alapján a *B. miyamotoi* a visszatérő lázat okozó *Borrelia*-fajok közé illeszkedik be (Fukunaga és Koreki, 1995). Érdekes megjegyezni, hogy míg a *B. miyamotoi* kullancsvektor által terjed, a vele rokonított fajok mind óvantagokkal (Schwan és Piesman, 2002). Felfedezése óta a *B. miyamotoi*-t Európa-szerte is kimutatták *I. ricinus*-ból (Cochez és mtsai., 2015; Geller és mtsai., 2012; Kiewra és mtsai., 2014; Michelet és mtsai., 2014; Richter és mtsai., 2003; Szekeres és mtsai., 2015), valamint Észak-Amerikában *Ixodes scapularis*-ból (Scoles és mtsai., 2001) és *Ixodes pacificus*-ból (Mun és mtsai., 2006). Kórokozó mivoltára csak az utóbbi években derült fény, az első 46 humán eset 2011-ben került közlésre Oroszországból (Platonov és mtsai., 2011). Az esetek nagy részében a páciensek influenza-szerű tüneteken estek át magas láz mellett, kisebb részében pedig kiváltódott a visszatérő láz. Észak-amerikai esetek tüneteit a granulocytás anaplasmosiséhoz hasonlítják (Chowdri és mtsai., 2015), valamint idős, csökkent immunitású betegeknél agyvelőgyulladást (meningoencephalitis) véltek felfedezni (Gugliotta és mtsai., 2013; Hovius és mtsai., 2013).



6. ábra: Giemsa-festett perifériás vérkenet a *B. miyamotoi* LB-2001-el fertőzött SCID egérből. Méretarány: 10 μ m.
(Wagemakers és mtsai., 2015)

Az *Ixodes* nembe tartozó kullancsfajok bizonyított hordozói a Lyme-borreliáknak, valamint a *B. miyamotoi*-nak, azonban a *Haemaphysalis* genusba tartozó kullancsok és a *Borrelia* spirochéták kapcsolatáról hiányosak (Kahl és mtsai., 1992), sőt sokszor egymásnak ellentmondóak az ismereteink. *Haemaphysalis concinna* laboratóriumban történő fertőzése és felnevelése afelé mutatott, hogy a kullancs képes táplálkozás közben felvenni a *Borrelia garinii* spirochétákat, azonban azokat transzstadiálisan, azaz a következő stádiumba történő vedlés során elveszíti (Sun és Xu, 2003). Ez a megállapítás nem feltétlenül általánosítható, ugyanis *H. punctata* (Tälleklint, 1996) és *H. concinna* (Rigó és mtsai., 2011) fajok vegetációról gyűjtött, azaz adott stádiumban még nem táplálkozott egyedeiből kimutattak Lyme-borreliákat, azonban a fertőzés prevalenciája alacsonyabb volt, mint az *I. ricinus* esetében. Utóbbi időben a visszatérő lázat okozó *Borrelia*-kat is sikerrel mutatták ki *H. punctata* fajból Japánban (Lee és mtsai., 2014) és Portugáliában (Nunes és mtsai., 2016) egyaránt.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kullancsok gyűjtése

Gyűjtési helyünk a Pest-megyei Pilisszentkereszten található, a falu Forrás utcája végén kezdődő erdőszakasz, amely egy gyertyános-tölgyes társulás, sásos aljnövényzettel (7. ábra). A területre minden hónapban egy alkalommal mentünk ki, ez alól kivételt képeztek a hideg téli hónapok. Gyűjtő felszerelésünk gyűjtőnként egy kb. egy négyzetméteres, világos színű kordbársony anyag, egy csipesz és hetven térfogatszázalékos etilalkoholt tartalmazó, csavaros tetejű, műanyag csövek. A zászlózásos kullancsgyűjtés a fémrúdra, vagy vastagabb faágra húzott anyaggal történt. A zászlóval a magunk előtt lévő aljnövényzetet simítva haladtunk, néhány lépésenként pedig ellenőriztük a vásznat. A kullancsok különböző stádiumai mind a lágyszárúakon, vagy kisebb cserjéken várják prédájukat, számukra a zászló által keltett mozgás a gazda mozgását imitáló mechanikai inger, amely hatására az anyagra kapaszkodnak. A zászló világos anyagán könnyen észrevehető az állatok, megfelelően hegyes végű csipesz segítségével még a lárvastádiumban lévő egyedek is könnyedén leszedegethetők. Ekkor kerültek a kullancsok az alkoholos fiolákba, melyben stádiumuktól és méretüktől függően rövidebb-hosszabb idő alatt elpusztultak. A gyűjtés alatt számításba vettük a gyűjtők számát, mértük a gyűjtéssel telt időt, valamint a hőmérsékletet és páratartalmat. Minden gyűjtő saját idejét mérte stopper segítségével, ebből a végén átlagot számoltunk. A stoppert az egyéb személyes teendők mellett akkor is megállítottuk, ha a zászlóra egyszerre túl sok kullancs került. A lárvák petecsomóból történő kikelésekor az esetek legnagyobb részében egymás közelében lévő (vagy akár ugyanazokra a) fűszálakra másznak fel, így néhány suhintással száznál több kullancsot is foghatunk. Ezeknek az egyedeknek a leszedegése pedig annyi időt vett igénybe, amely már torzította volna a mintavételi időt.



7. ábra: A pilisszentkereszti gyűjtőhelyünk.
Fotó: Dr. Földvári Gábor

3.2. Kullancsok határozása

Az alkoholos fiolákban tárolt kullancsokat petricsészében szétosztatva, sztereomikroszkóp alatt határoztam meg. A határozó bélyegeket határozókulcsból (Hillyard, 1996) sajátítottam el. Az egyedeket fajuk és stádiumuk (lárva, nimfa, nőstény, hím) szerint számláltam és válogattam szét külön csövekbe, majd laborfüzetben és elektronikus táblázatban egyaránt rögzítettem az adatokat. A határozási munkát a 2015. áprilisi gyűjtésétől kezdve végeztem, közel 2500 kullancs egyedet határoztam meg.

3.3. Szezonális vizsgálata

A terület vizsgálata 2011-ben kezdődött, egy Európai Uniós pályázat (EDENext FP7) keretein belül. Ez a pályázat már több éve véget ért, azonban a területről mai napig folytatták a kullancsok havi szintű begyűjtését. Így a rendelkezésre álló adatsor már a hatodik év adatait tartalmazza. A kullancsfajok különböző stádiumaiban gyűjtött egyedeinek száma, a gyűjtési idő és a gyűjtő személyek száma alapján számoltunk egy általános egyedsűrűségi értéket (egyed/óra/gyűjtő). Ez az érték tulajdonképpen azt jelenti, hogy egy ember egy óra alatt hány kullancssal találkozhat az erdőben sétálva. Ezek az értékek megmondják, hogy az adott alkalomkor (adott hónapban) mekkora volt a kullancsok egyedsűrűsége, a több éves adatsor adatai alapján pedig megmondhatjuk, mely évek voltak kedvezőbbek, vagy kevésbé kedvezők általában a kullancsok számára, illetve voltak-e különbségek a fajon belül, vagy fajok között.

A statisztikai elemzéseket és az ábrák készítését az R statisztikai program használatával végeztem (R Development Core Team, 2016).

3.4. Kórokozók molekuláris vizsgálata

3.4.1. DNS-kivonás

Az kullancsokból alkalikus hidrolízissel (Barbour és mtsai., 2009; Guy és Stanek, 1991) vontuk ki a DNS-t. Az adott alkalom gyűjtési sikerességétől függően döntöttünk a kullancsok számáról, melyek DNS-ét kinyertük. Ez a szám (ha rendelkezésre állt annyi) az *Ixodes ricinus*-nál 25 adult (13 nőstény, 12 hím), 25 nimfa és 100 lárva volt minden gyűjtésből (hónapból). A két *Haemaphysalis* fajnál kevesebb, 15 adult (8 nőstény, 7 hím), 15 nimfa és 100 lárva volt. A kullancsokat az alkoholos fiolákból kivéve hagytam kiszáradni, mivel az etilalkohol gátolja a PCR-t. Az alkoholtól mentes adult és nimfa egyedeket egyesével, a lárvákat tízesével helyeztem a csövekbe. Ezután csövenként 500 µl 1,25%-os ammónium-hidroxid oldattal 90°C-on, 30 percen át főztük az egyedeket. A következő 30 percen szintén 90°C-on maradtak a minták, azonban a csövek nyitott állapotban álltak a melegítőben. Ez a lépés az oldatban lévő ammónia elpárolgásához vezetett, a visszamaradt folyadékban a DNS már oldott formában volt jelen. A DNS-izolálás ellenőrzéseként a DNS koncentrációt minden ötvenedik mintában megmértük Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével. TDK munkámban összesen 1922 kullancs egyed kivont DNS-ét dolgoztuk fel molekuláris módszerekkel, de összesen 4495 (2012 márciusától 2016 decemberéig gyűjtött) kullancsból vontunk ki DNS-t.

3.4.2. Real-time PCR

A *Borrelia miyamotoi* baktérium DNS-ét a *flagellin-B (flaB)* génjére célozva multiplex kvantitatív real-time polimeráz láncreakció (qPCR) segítségével mutattuk ki (Hovius és mtsai., 2013). A forward primer a FlabBm.motoiF (5' AGAAGGTGCTCAAGCAG 3'), a reverz primer a FlabB.m.motoiR (5' TCGATCTTTGAAAGTGACATAT 3') volt. Emellett a qPCR-hez szükséges egy olyan próbaszekvencia, melynek oligonukleotidjaihoz fluoreszcens riporter van kapcsolva. Ha ez a szakasz hibridizál, akkor a létrejövő fény mennyiségét érzékeln tudja a gép és kaphatunk egy számadatot a kórokozó DNS-ének mennyiségéről. Ez a fluoreszcens próba a FlabBm.motoiPro (5' HEX AGCACAACAGGAGGGAGTTCAAGC BHQ-1 3') volt. A reakcióelegybe ezen kívül szükséges volt egy normalizáló riportert is adagolni, amely a

Rox volt (8. ábra). Ez egy olyan passzív fluoreszcens molekula, amely viszonyítási alapként szolgál a qPCR gép fényreakció detektálásánál. Minden reakciósorhoz pozitív kontrollt és templátmentes kontrollt (non-template control = NTC) is helyeztünk a reakció helyes kimenetele, illetve a lehetséges kontamináció ellenőrzésére. Eredményképp minden felerősödött mintához tartozott egy CP-érték, amely azt a ciklust jelenti, ahol a minták fluoreszcenciája átlépte a háttérfluoreszcenciát, azaz a célszekvencia érzékelhetően felszorzódott. A 40-et meghaladó CP-értéket már nem szokás elfogadni, mivel a keresett DNS ebben az esetben annyira alacsony koncentrációban volt jelen a mintában (Szekeres és mtsai., 2015). A qPCR elegyek pontos összetételét az 1. táblázat, a hőmérséklet-idő paramétereket pedig a 2. táblázat mutatja. Pozitív kontrollként a *Borrelia miyamotoi* HT31 törzséből (Fukunaga és mtsai., 1995) kivont DNS-t használtuk (hollandiai tenyészetből).

1. táblázat: A vizsgálatok során használt qPCR elegyek összetétele.

Nukleáz-mentes víz	1,0113 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	0,2629 µl
Reverz primer (10 pmol/µl)	0,2629 µl
Próba (10 pmol/µl)	0,2629 µl
Rox (50x)	0,2 µl
2x Perfecta Multiplex SuperMix	5 µl
DNS templát	3 µl
VÉGTÉRFOGAT	10 µl

2. táblázat: A qPCR hőmérséklet-idő paraméterei.

	°C	Idő (sec)	
Kezdeti denaturáció	95	120	45 ciklus
Denaturáció	95	10	
Primer bekötődés, láncösszabbanítás	60	35	

3.4.3. Konvencionális PCR

Azokból a mintákból, amelyek a qPCR során pozitívnak bizonyultak, megerősítésképp konvencionális, touchdown PCR segítségével is megpróbáltuk kimutatni (Hovius és mtsai., 2013) a kórokozót. Ezt a *B. miyamotoi glicerofoszfodiészterfoszfodiészteráz* génjére (*glpQ*) specifikus primerek (forward: 5'ATGGGTTCAAACAAAAGTCACC3'; reverz: 5'CCAGGGTCCAATTCCATCAGAATATTGTGCAAC3') használatával hajtottuk végre.

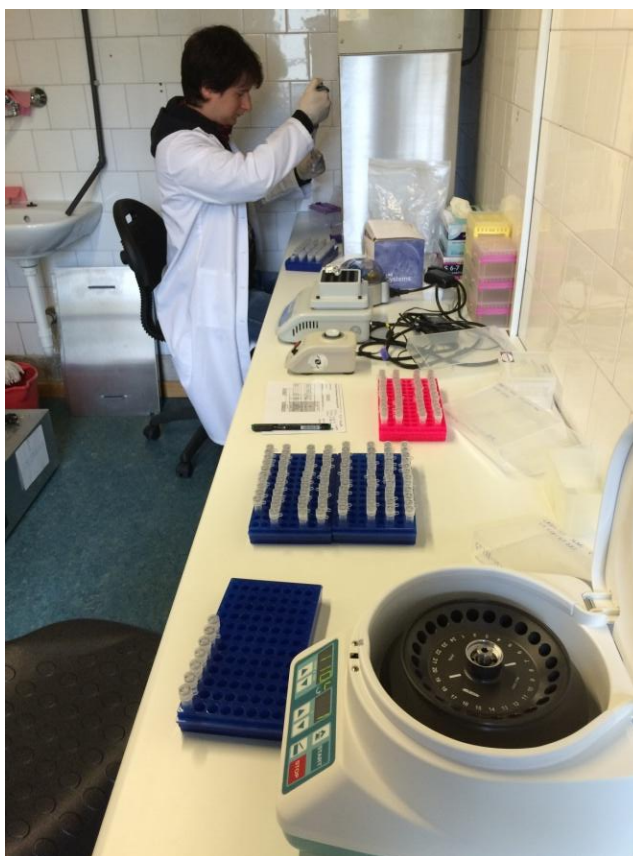
A touchdown PCR sajátossága, hogy a nem-specifikus szekvenciák felerősítésének kikerülése érdekében egy kezdeti ciklussorozatot iktat be. Ez esetben ez tíz cikusból áll, melyeknél minden ciklus végén 1 C°-kal csökkenti a primer bekötődésének hőmérsékleti értékét. A konvencionális PCR elegyek pontos összetételét az 3. táblázat, a hőmérséklet-
idő paramétereket pedig a 4. táblázat mutatja. A PCR értékei némileg eltérnek a referenciától (Hovius és mtsai., 2013), mivel azokat az általunk használt gépekhez és könnyebben beszerezhető, azonban funkcióban azonos reagensekhez kellett igazítani. A pozitív kontroll megegyezik a real-time PCR-nél leírttal. A reakciók termékeit horizontális gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. Ehhez 1,5 %-os agaróz gélen, 1X TBE pufferben 110 V feszültség mellett futtattuk a PCR termékek 5-5 µl-jét.

3. táblázat: A konvencionális PCR elegyek összetétele.

Nukleáz-mentes víz	6 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Reverz primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
HotStarTaq Plus Master Mix (2X)	12,5 µl
Coral Load Dye (festék)	2,5 µl
DNS	3 µl
VÉGTERFOGAT	25 µl

4. táblázat: A konvencionális PCR hőmérséklet és idő paraméterei.

	°C	Idő (sec)	
Kezdeti denaturáció	94 ⁰ C	300	
Denaturáció	94 ⁰ C	30	10 ciklus. bekötődés: -1 ⁰ C/ciklus
Primer bekötődés	62 ⁰ C	30	
Lánchosszabbítás	72 ⁰ C	60	
Denaturáció	94 ⁰ C	30	40 ciklus
Primer bekötődés	53 ⁰ C	30	
Lánchosszabbítás	72 ⁰ C	60	
Végső lánchosszabbítás	72 ⁰ C	600	



8. ábra: A qPCR elegyek összemérése és ehhez használt műszerek.
Fotó: Dr. Földvári Gábor

3.4.4. Szekvenálás

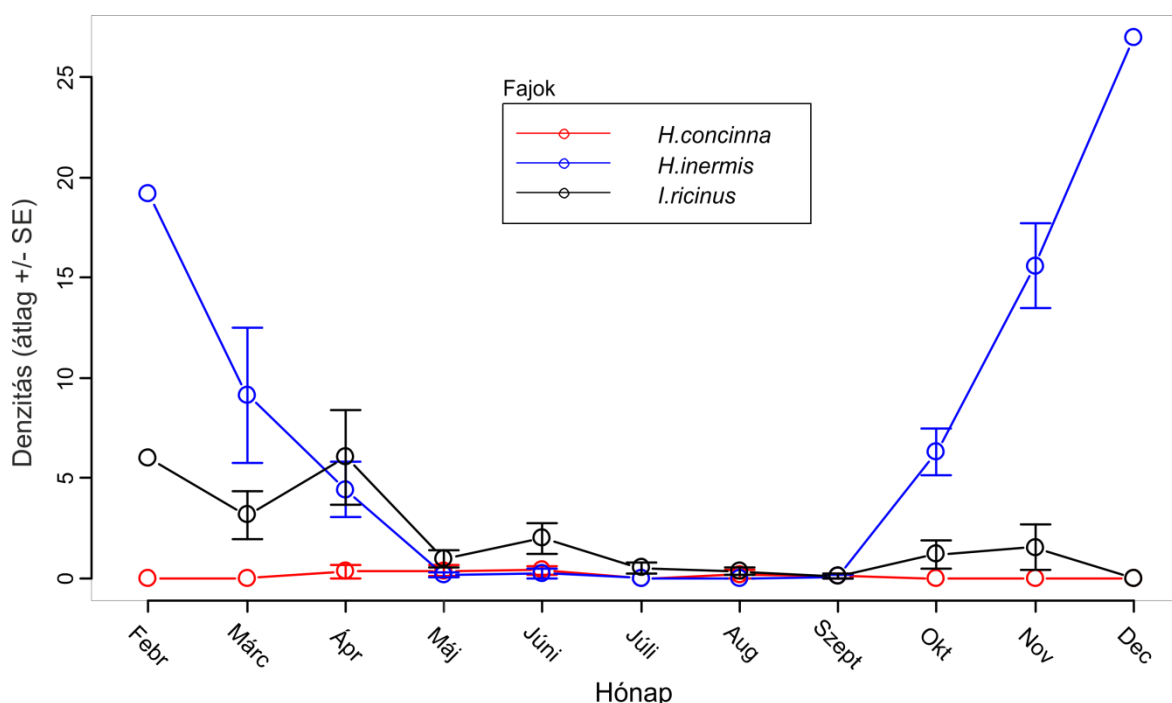
A konvencionális PCR által felerősített génszakasz szekvenciáinak meghatározásához az első lépés a PCR termék tisztítása volt, azaz az oldatban lévő DNS elválasztása a használt reagensektől. Mivel a PCR elektroforetikus gélképén (14. ábra) minden esetben egyetlen specifikus szakasz felerősödése volt látható, ezért a célzott szekvenciát nem volt szükséges más felerősített szekvenciától elválasztani. A tisztított terméket a forward primer hozzáadásával (egyirányú szekvenálás) küldtük el szekvenáltatni az LGC Genomics GmbH, (Berlin, Németország) céghez.

4. EREDMÉNYEK

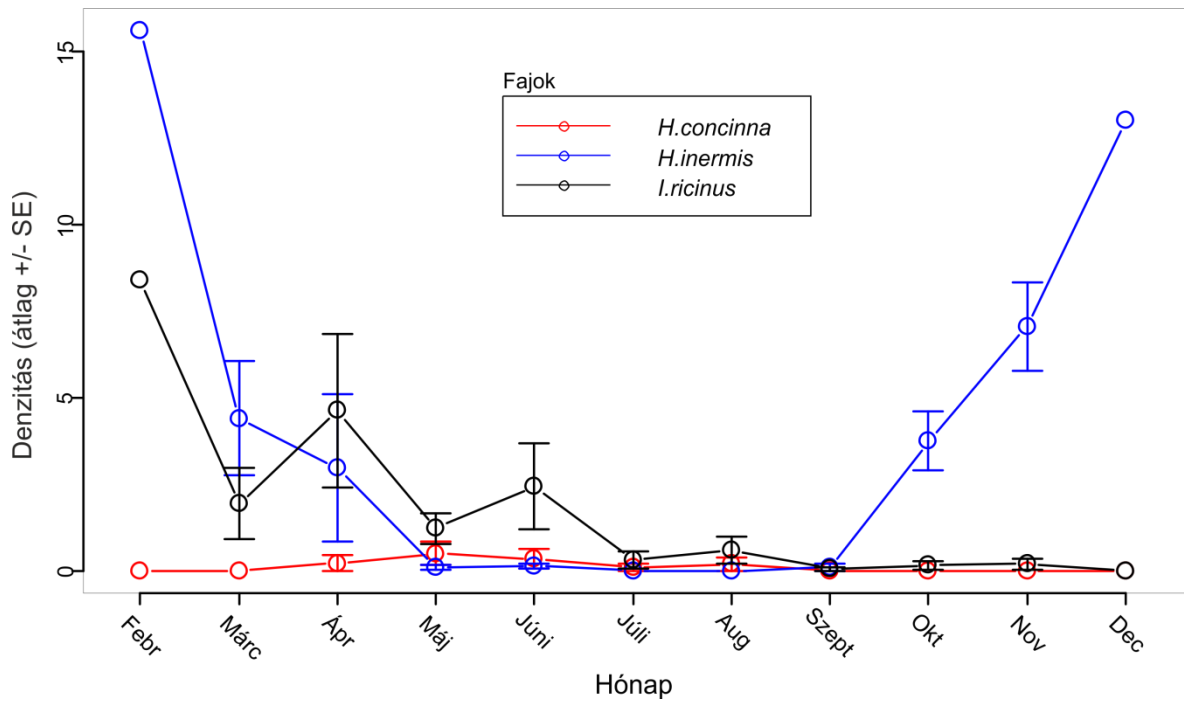
4.1. Kullancsok szezonális előfordulása

A területen lévő fajok közül az év nagyobb hányadában (9-12. ábra) a közönséges kullancs (*Ixodes ricinus*) volt a legelterjedtebb. Összességében kisebb, azonban bizonyos hónapokban az *I. ricinus*-ét meghaladó egyedsűrűségben jelen lévő fajok a *Haemaphysalis concinna* és *Haemaphysalis inermis*. A *H. inermis* faj egyedei kizárólag adult stádiumban voltak megtalálhatók (9-10. ábra). Ezeken kívül az előző évek adatai alapján fel-felbukkan a *Dermacentor marginatus* néhány egyede is a gyűjtésben, ez a faj azonban nem jellemző az élőhelyre, így a további vizsgálatokba nem került bele.

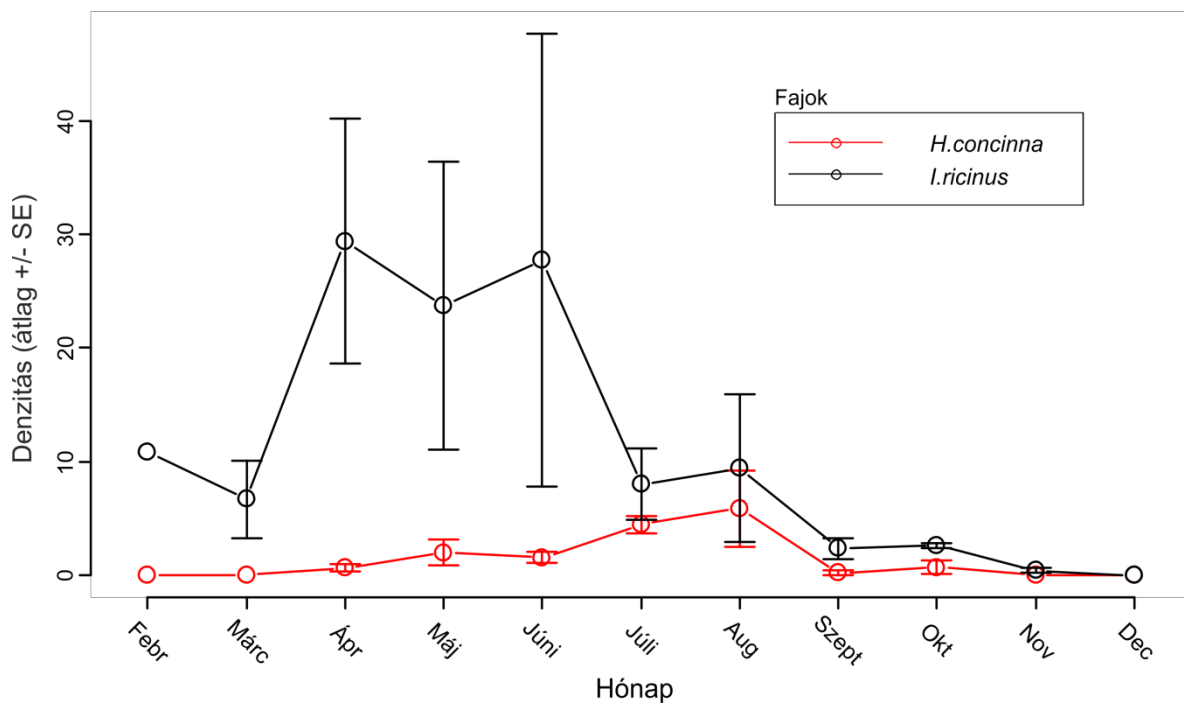
A hónapok és az egyes évek közti összehasonlításokat statisztikai tesztek segítségével nem sikerült megvizsgálni. Ennek oka, hogy egy hónaphoz az adott faj stádiumához összesen 4-5 érték tartozik, ami nagyon alacsony mintaelemszámnak bizonyul egy megbízható eredményeket biztosító statisztikai próbához. Az ábrákon látható átlagértékekhez tartozó szórás értékek is a kevés minta miatt nem reprezentatívak. Az összehasonlításba egy februári és egy decemberi gyűjtés is ábrázolásra került, egyedüli értéként ezeket is fenntartással kell kezelni.



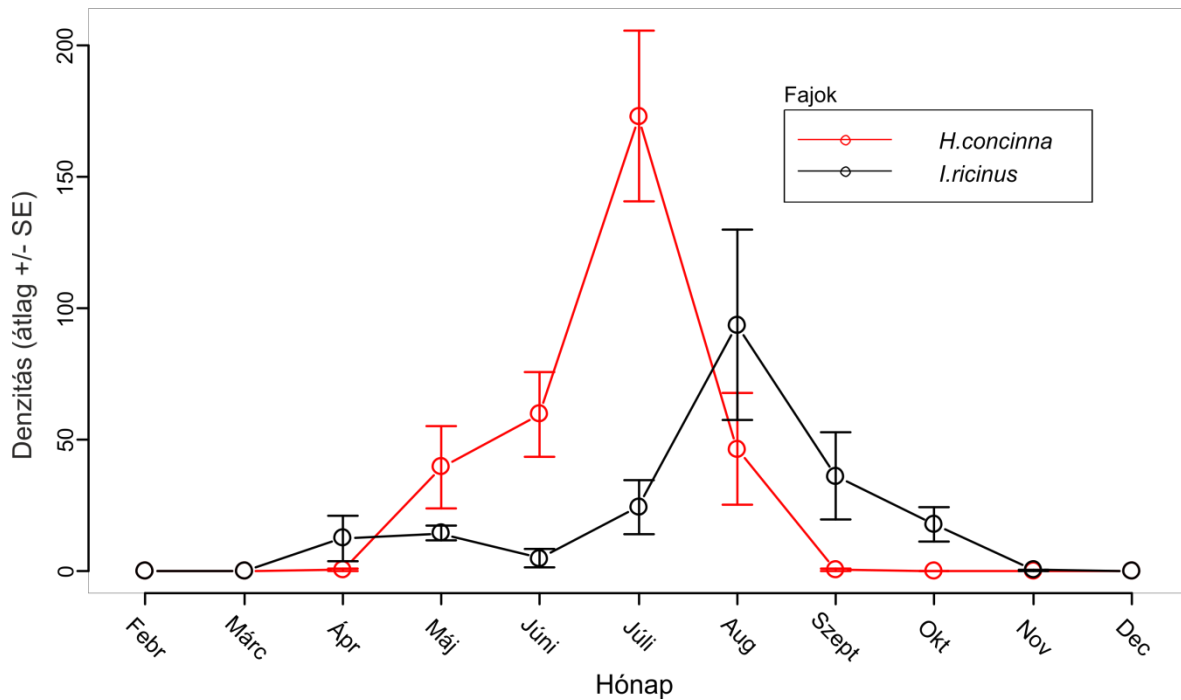
9. ábra: A 2012-től 2016 novemberéig gyűjtött adult nőstény kullancsok szezonális eloszlása az évekre átlagolt denzitási értékekkel (kullancs/óra/gyűjtő).



10. ábra: A 2012-től 2016 novemberéig gyűjtött adult hím kullancsok szezonális eloszlása az évekre átlagolt denzitási értékekkel (kullancs/óra/gyűjtő).



11. ábra: A 2012-től 2016 novemberéig gyűjtött nimfa stádiumú kullancsok szezonális eloszlása az évekre átlagolt denzitási értékekkel (kullancs/óra/gyűjtő).



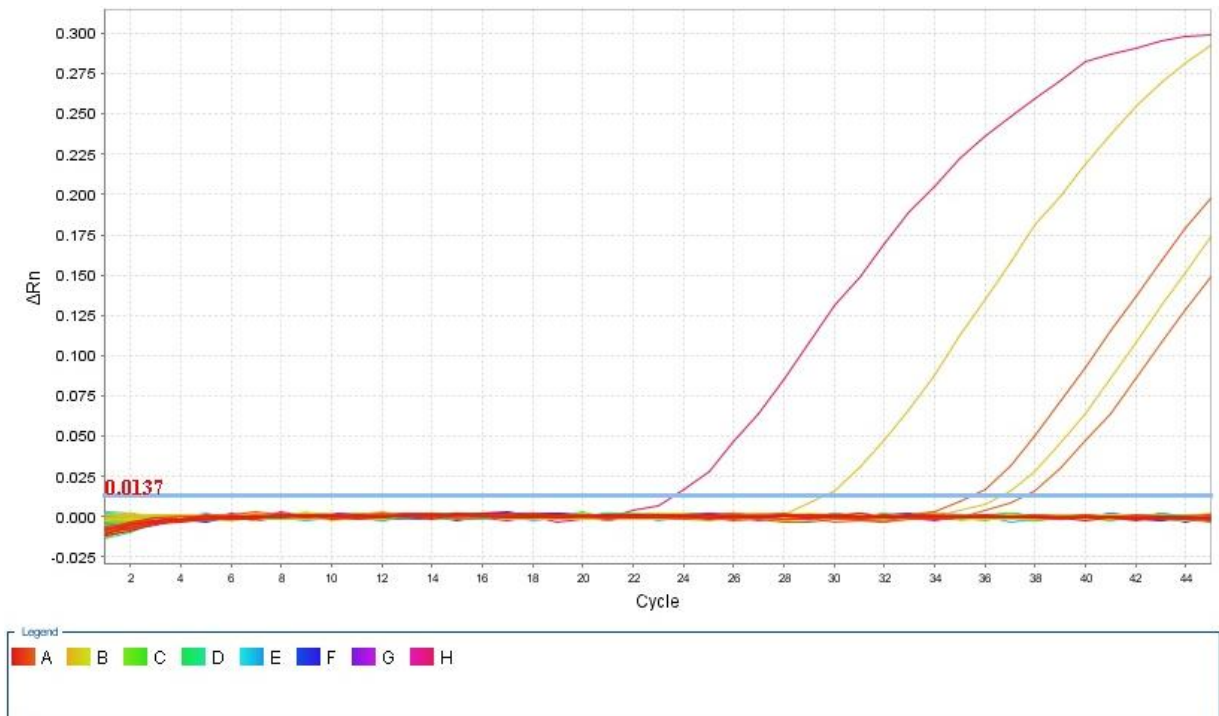
12. ábra: A 2012-től 2016 novemberéig gyűjtött lárva stádiumú kullancsok szezonális eloszlása az évekre átlagolt denzitási értékekkel (kullancs/óra/gyűjtő).

4.2. *Borrelia miyamotoi*

Összesen 1051 *I. ricinus*, 770 *H. concinna* és 101 *H. inermis* kullancsból származó DNS-t vizsgáltunk, ezek a 2012 márciusától 2013 novemberéig gyűjtött egyedek voltak. A qPCR alapján az összesen 741 DNS mintából 10 darab bizonyult pozitívnak *Borrelia miyamotoi*-ra (13. ábra, 5. táblázat). Ezen minták mindegyike *I. ricinus*-ból származott, hat lárva pool-ból, kettő nimfából, egy híméből és egy nőstényből. A pozitív minták adatait az 5. táblázat tartalmazza.

Így az összesen 456 *I. ricinus* mintának 2,19%-ában volt kimutatható a *B. miyamotoi*. Egyedre leszámolva, feltételezve, hogy a lárva poolok csak 1-1 darab fertőzött kullancsot tartalmaztak, 1051 *I. ricinus* egyed 0,95%-a volt fertőzött.

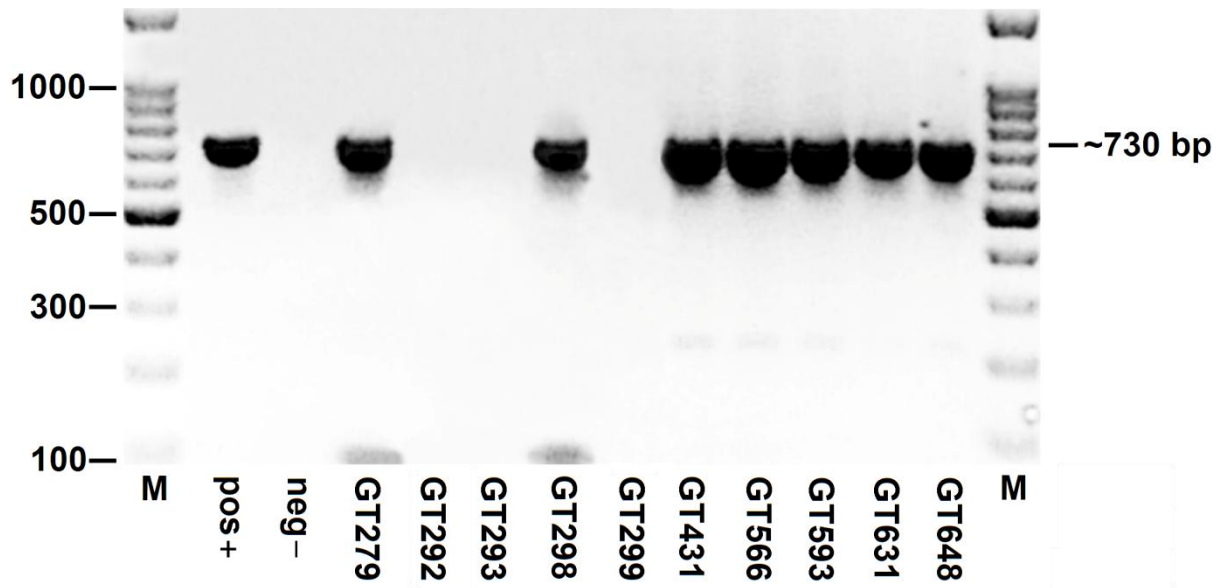
A konvencionális PCR ebből a tíz mintából hetet sikeresen felerősített (14. ábra), a három negatív mind a lárva-poolok közül került ki. Ezen minták kerültek szekvenálásra, majd szekvenciáik az NCBI génbankjába is feltöltésre kerültek. Génbanki kódjaik a 13. táblázatban láthatók.



13. ábra: A *Borrelia miyamotoi* specifikus real-time PCR egyik amplifikációs plotja. Balról az első görbe a pozitív kontrolltól származott, majd sorban a GT298, GT292, GT299 és GT293 azonosítójú minták.

5. táblázat: A qPCR pozitív minták adatai és a génbankba felkerült szekvenciák azonosító kódjai.

Minta-azonosító	Gyűjtési dátum	Faj	Stádium	Egyed darabszám	CP-érték	Génbanki azonosító
GT279	2012.09.21	<i>Ixodes ricinus</i>	Nimfa	1	30,06	KY986522
GT292	2012.09.21	<i>Ixodes ricinus</i>	Lárva	10	35,59	-
GT293	2012.09.21	<i>Ixodes ricinus</i>	Lárva	10	37,68	-
GT298	2012.09.21	<i>Ixodes ricinus</i>	Lárva	10	29,69	KY986523
GT299	2012.09.21	<i>Ixodes ricinus</i>	Lárva	10	36,74	-
GT431	2013.05.23	<i>Ixodes ricinus</i>	Hím	1	26,90	KY986524
GT566	2013.07.02	<i>Ixodes ricinus</i>	Nőstény	1	24,13	KY986525
GT593	2013.07.02	<i>Ixodes ricinus</i>	Lárva	10	28,29	KY986526
GT631	2013.08.29	<i>Ixodes ricinus</i>	Nimfa	1	31,71	KY986527
GT648	2013.08.29	<i>Ixodes ricinus</i>	Lárva	10	30,85	KY986528



14. ábra: A real-time PCR pozitív minták konvencionális PCR-ének gélfotója.
M: molekulatömeg marker; pos+: pozitív kontroll; neg-: negatív kontroll.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Kullancsok szezonális előfordulása

Az *Ixodes ricinus* esetében a szezonális előfordulását megjelenítő ábráról leolvasható, hogy az adult nőstények aktivitása egy tavaszi és egy kisebb őszi csúcsot mutat (9. ábra). Ez a mintázat összecseng az irodalmi adatokkal (Randolph és mtsai., 2002). Hímeknél az őszi csúcs ezen években nem mutatkozott meg (10. ábra), ennek magyarázata lehet, hogy az ősszel aktív hím kullancsok nagy mennyiségű zsírtartalékuk miatt (Randolph és mtsai., 2002) elsősorban nem a táplálkozásra, hanem a nőstények megtalálására fordítják energiáikat. Ugyanis az *Ixodes* nemben bizonyított, hogy a jó kondícióban lévő hímeknek már az utolsó vedlésük alatt lezajlik a spermatogenezise (Balashov, 1956), így vérszívás nélkül, gazdán kívül is megtermékenyíthetik a nőstényeket. A nimfák a melegebb hónapokban (április-augusztus) (11. ábra), a lárvák augusztustól októberig mutattak nagyobb denzitást (12. ábra), az átlagértékekhez tartozó nagy standard hiba miatt azonban nem mondhatók ki konkrét trendek.

A *H. concinna* faj adultjai nagyon ritkának bizonyulnak a területen (9-10. ábra). Nimfáik már jóval gyakoribbak, július és augusztus hónapokban mutatják a legnagyobb denzitást (11. ábra). Ezek az értékek azonban soha nem lépik át az *I. ricinus* nimfák denzitását. A lárvák nagyfokú rajzása megelőzi az *I. ricinus*-ét, májusban, júniusban és júliusban magasan meghaladja az *I. ricinus* lárvák denzitását (12. ábra). A legtöbb lárva júliusban fordult elő, ekkor az egyedszám olyan magasnak bizonyult, hogy egy személy egy óra séta alatt akár 150-200 *H. concinna* lárvét is felszedhet magára. Augusztusban még mindig jelentős számban vannak jelen a lárvák, azonban ekkor már a dominanciát az *I. ricinus* veszi át. Ezek az eredmények megegyeznek az országszerte vizsgált, rókákon megtalálható kullancsok szezonális adataival (Széll és mtsai., 2006).

A *H. inermis* fajnak a területen zászlózásos módszerrel csak az adult stádiumát sikerült gyűjtenünk. A faj május és szeptember között alig fellelhető, azonban októbertől kezdve robbanásszerűen megnő az előfordulásuk, amely meghaladja mindkét másik vizsgált fajét (9-10. ábra). Egyetlen decemberi és februári mintavételünkben látszik, hogy a leghidegebb téli hónapokban a legmagasabb az egyedszámuk. A nemek között megfigyelhető a nőstény dominancia. Néhány *Haemaphysalis*-fajról ismert, hogy a nőstények képesek partenogenetikusán szaporodni, és ez esetben a hímek jelenléte sokkal kisebb a populációban (Balashov, 1967). A *H. inermis* esetében nem írták le a jelenséget, de lehetséges magyarázatként szolgálhat a megfigyelésre. Annak kiderítése, hogy a

szezonális elkülönülésnek a faj abiotikus igényeiből, vagy inkább gazdaköre különbségeiből adódó eltérés az oka, további vizsgálatokat igényel.

5.2. *Borrelia miyamotoi*

Az eddig feldolgozott adatok alapján az *I. ricinus* *B. miyamotoi* fertőzöttsége egyedi szinten alacsonynak bizonyult (min. 0,95%). A 10 pozitív mintából 5 ugyanarról a gyűjtési alkalomról származott (2012. szeptember), közülük 1 nimfa és 4 lárva-pool. Mivel a *B. miyamotoi* bizonyítottan transzovariálisan is fertőzi a petéket (Scoles és mtsai., 2001), nagy valószínűséggel egy fertőzött nőstény által lerakott petékből kikelt lárvagócot sikerült begyűjteni. Mivel azonban a két év (18 gyűjtési alkalom) gyűjtésének molekuláris vizsgálatából összesen 10 minta lett pozitív a kórokozóra, amelyek ráadásul összesen 4 gyűjtési alkalomhoz köthetők, a kórokozó szezonális előfordulására nem lehetett következtetéseket levonni. Azt azonban érdemes megjegyezni, hogy a tíz mintából egy kivételével mind nyári és őszi hónapokból származott.

Az, hogy a *Haemaphysalis* fajokban nem mutattuk ki a kórokozót még nem zárja ki annak esetleges vektor szerepét. Az irodalmi adatok szerint az *Ixodes* fajokhoz képest a *Haemaphysalis*-fajok kisebb százalékban hordozzák a *Borrelia*-kat (Rigó és mtsai., 2011; Tälleklint, 1996). Ahogy a terület kullancsainak, úgy feltételezhetően a gerinces kullancsgazdáknak is alacsony a fertőzöttsége, de az is feltehető, hogy a *B. miyamotoi* rezervoár gerincesei ritkák a területen (Szekeres és mtsai., 2015). Ez utóbbit néhány előzetes rágcshalócsapdázás mérsékelt sikere is megerősíti (Földvári Gábor, személyes közlés). Az utóbbi időben *H. concinnából* és *H. inermisből* egyaránt először mutattak ki *Babesia* és *Theileria* fajokat (Hornok és mtsai., 2015), melyeknek lényeges állategészségügyi szerepe van. Az általunk izolált *Haemaphysalis* DNS-ek további, más kórokozókra történő vizsgálata új információkkal szolgálhat a fajok vektorszerepéről.

A pozitív konvencionális PCR eredmény után szekvenálás szükségessége nélkül kijelenthetjük, hogy a kimutatott kórokozó valóban *B. miyamotoi* volt, hiszen a baktérium két különböző génjének egyes szakaszait erősítettük fel specifikus primerek segítségével. Mivel a qPCR egy sokkal érzékenyebb folyamat, a konvencionális PCR során negatívnak bizonyult minták még nem cáfolják meg az előző kísérlet sikerességét. Több oka is lehet a sikertelen kimutatásnak, ezek közül a legvalószínűbb a túl alacsony kórokozó DNS-mennyiség. A megérkezett szekvenciák analízise alátámasztotta korábbi megállapításunkat, ugyanis 99 %-os egyezést mutattak az NCBI génbank *Borrelia miyamotoi* szekvenciáival.

Mivel a jelen vizsgálat keretein belül csupán a 2012-es és 2013-as gyűjtésű kullancsok molekuláris vizsgálatára került sor, a 2014-es, 2015-ös és 2016-os gyűjtésekben elképzelhető, hogy más mintázatok mutathat a *Borrelia miyamotoi* fertőzöttsége. A további következtetésekhez és szezonális trendek megfigyeléséhez a többi évben gyűjtött kullancsok hasonló vizsgálatára lesz szükség, amely azonban meghaladja e dolgozat kereteit. Emellett a kutatás kibővítéseként *Borrelia burgdorferi* sensu lato fertőzöttséget is tervezünk vizsgálni. Ezen kórokozók *Ixodes ricinus*-ban észlelt magas prevalenciája miatt alkalmasak lehetnek szezonális vizsgálatokra, *Haemaphysalis* nembe tartozó kullancsfajokkal azonban szintén tisztázatlan a kapcsolatuk.

ÖSSZEFOGLALÓ

Európa legismertebb és legerjedtebb kullancsfajának, a közönséges kullancsnak (*Ixodes ricinus*) elterjedése, életmódja és vektorszerepe mára már jól feltérképezett. Azonban hazánkban előfordulnak egyéb, hasonló viselkedésű, de sokkal kevésbé kutatott kullancsfajok is. A pilisi erdőkben a közönséges kullancson kívül még két, jelentős számban előforduló kullancsfajjal találkozhatunk, ezek a *Haemaphysalis concinna* és *Haemaphysalis inermis*. A kutatócsoport egy pilisi gyűjtőhelyről immár hatodik éve havonta gyűjti a kullancsokat; ebbe a folyamatba becsatlakozva vizsgálom a fajok szezonálisitását és *Borrelia miyamotoi* fertőzöttségét. A *Borrelia miyamotoi*-ről csak néhány éve bizonyosodott be, hogy egy humán patogén spirochéta baktérium, amely a Lyme kórt okozó *Borrelia*-któl eltérően visszatérő lázat alakíthat ki az emberi és állati szervezetben.

A kullancsok begyűjtése az aljnövényzetről zászolózásos módszerrel történt. A befogott állatok faj és fejlődési stádium szerint lettek szétválogatva és alkoholban konzerválva. Az egyes fajok és stádiumok mennyiségét a heterogén élőhely miatt nem tér, hanem idő alapú módszerrel kvantifikáltuk. Bár a két *Haemaphysalis*-fajról elmondható, hogy összességében ritkábbak, bizonyos hónapokban egyedsűrűségük meghaladta az *Ixodes ricinus*-ét. A területen előforduló kullancsok közül az *Ixodes ricinus* nimfák és adultok előfordultak minden gyűjtési hónapban.

A molekuláris vizsgálatokhoz első lépésben a 2012-ből és 2013-ból gyűjtött kullancsokból válogattunk úgy, hogy az összes fajt, stádiumot és gyűjtési hónapot lefedjük. A DNS kivonást alkalikus hidrolízissel végeztük. A *Borrelia miyamotoi* jelenlétét valós idejű (real-time) polimeráz láncreakcióval bizonyítottuk. A 752 mintából 10 bizonyult pozitívnak, ezek mindegyike *Ixodes ricinus*-ból (lárva, nimfa, nőstény, hím) származott. Így a vizsgált *Ixodes ricinus* egyedek 0,95%-ából volt kimutatható a kórokozó. Konvencionális PCR segítségével tízből hét esetben igazoltuk a real-time PCR eredményeinket. A két *Haemaphysalis*-faj valamennyi stádiumából vizsgált egyedek negatívnak bizonyultak.

A korábban hazánkban csak Gemencen kimutatott kórokozó Pilisben, viszonylag nagy prevalenciával való előfordulása azt jelzi, hogy az *I. ricinus* kullancsok *Borrelia miyamotoi* fertőzöttsége országszerte jelen lehet, amely potenciális veszélyforrást jelenthet az emberek számára.

SUMMARY

Ecology of three tick species and *Borrelia miyamotoi* in a forest habitat

Europe's most studied and most common tick species, the sheep tick (*Ixodes ricinus*), has a well-known distribution, life cycle and vector role. However, in Hungary there are other, less studied tick species with a life cycle similar to *I. ricinus*. The forests of the Pilis Mountains give home to two of these less known ticks, *Haemaphysalis concinna* and *Haemaphysalis inermis*. The research group has been collecting monthly data at a sampling site in Pilis in the past six years. I joined to examine the seasonal activity of the tick species and the *Borrelia miyamotoi* infection rate of the area. *Borrelia miyamotoi* is a newly recognised human pathogenic spirochete bacterium. Unlike the *Borrelia* species that cause Lyme borreliosis, these spirochetes develop a relapsing fever in humans and vertebrates.

Flagging method was used to collect ticks from the undergrowth. The captured individuals were sorted by species and stage and preserved in alcohol. Quantification of the species and stages was based on time, not space. This is because the sampling site was too heterogeneous. It can be said that the *Haemaphysalis* species are generally uncommon in some months, however, they show higher abundance than that of *I. ricinus*. *Ixodes ricinus* adults and nymphs were present in every sampling month.

The molecular analysis included ticks collected from 2012 and 2013. The individuals were selected so that they cover every species, stage and month. We used alkaline hydrolysis to extract DNA from the ticks, individually from adults and nymphs and in pools with up to 10 specimens for larvae. To demonstrate the presence of *B. miyamotoi* we used real-time polymerase chain reaction. From 752 samples ten proved to be positive, from all stages of the *I. ricinus*. The pathogen was detected in 0.95% (minimum prevalence) of *I. ricinus* individuals. Seven out of the ten samples were confirmed by conventional polymerase chain reaction. Individuals examined from the two *Haemaphysalis* species proved to be negative for *B. miyamotoi*.

The first Hungarian *B. miyamotoi* detection was in Gemenc. The finding that the pathogen also occurs in the Pilis Mountains with a relatively high prevalence could be pointing to an infection throughout the whole country making it a potential threat to humans.

IRODALOMJEGYZÉK

- Balashov, J.U.S., 1956. Nutrition and course of spermatogenesis in ixodid ticks. Dokl. Akad. Nauk SSSR 110, 1133–1136.
- Balashov, Y.S., 1967. Blood-sucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals., Krovososushchie kleshchi (Ixodoidea)-perenoschiki boleznei cheloveka i zhivotnkh. Nauka Publishers, Leningrad.
- Barbour, A.G., Bunikis, J., Travinsky, B., Hoen, A.G., Diuk-Wasser, M.A., Fish, D., Tsao, J.I., 2009. Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81, 1120–1131.
- Boldiš, V., Kocianová, E., Štrus, J., Tušek-Žnidarič, M., Sparagano, O.A.E., Štefanidesová, K., Špitalská, E., 2008. Rickettsial agents in Slovakian ticks (Acarina, Ixodidae) and their ability to grow in Vero and L929 cell lines. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 281–285.
- Bowmann, A., Nuttall, P., 2008. Ticks Biology, Disease and Control. Cambridge University Press, Cambridge.
- Burger, T.D., Shao, R., Barker, S.C., 2013. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes of ticks reveals a deep phylogenetic structure within the genus *Haemaphysalis* and further elucidates the polyphyly of the genus *Amblyomma* with respect to *Amblyomma sphenodonti* and *A. Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 265–274.
- Chowdri, H.R., Gugliotta, J.L., Berardi, V.P., Goethert, H.K., Molloy, P.J., Sterling, S.L., Telford, S.R., 2015. *Borrelia miyamotoi* infection presenting as human granulocytic anaplasmosis: a case report. Ann. Intern. Med. 159, 21–27.
- Cochez, C., Heyman, P., Heylen, D., Fonville, M., Hengeveld, P., Takken, W., Simons, L., Sprong, H., 2015. The presence of *Borrelia miyamotoi*, a relapsing fever spirochaete, in questing *Ixodes ricinus* in Belgium and in the Netherlands. Zoonoses Public Health 62, 331–333.
- Dantas-Torres, F., Lia, R.P., Capelli, G., Otranto, D., 2013. Efficiency of flagging and dragging for tick collection. Exp. Appl. Acarol. 61, 119–127.
- Földvári, G., 2016. Life cycle and ecology of *Ixodes ricinus*: the roots of public health importance., in: Braks, M., van Wieren, S., Takken, W., Sprong, H. (Szerk.), Ecology and prevention of Lyme borreliosis (Ecology and Control of Vector-borne diseases, Volume 4). Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Fukunaga, M., Koreki, Y., 1995. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. FEMS Microbiol. Lett. 134, 255–258.
- Fukunaga, M., Takahashi, Y., Tsuruta, Y., Matsushita, O., Ralph, D., McClelland, M., Nakao, M., 1995. Genetic and Phenotypic Analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 804–810.
- Geller, J., Nazarova, L., Katargina, O., Järvekülg, L., Fomenko, N., Golovljova, I., 2012. Detection and Genetic Characterization of Relapsing Fever Spirochete *Borrelia miyamotoi* in Estonian Ticks. PLoS One 7, e51914.

- Gugliotta, J.L., Goethert, H.K., Berardi, V.P., Telford 3rd, S.R., 2013. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* 368, 240–245.
- Guy, E.C., Stanek, G., 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 44, 610–611.
- Hillyard, P.D., 1996. Ticks of North-West Europe, Ticks of North-West Europe. Field Studies Council, Shrewsbury.
- Hornok, S., 2009. Allochronic seasonal peak activities of *Dermacentor* and *Haemaphysalis* spp. under continental climate in Hungary. *Vet. Parasitol.* 163, 366–369.
- Hornok, S., Meli, M.L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2010. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet. Microbiol.* 140, 98–104.
- Hornok, S., Takács, N., Kontschán, J., György, Z., Micsutka, A., Icton, S., Flaisz, B., Farkas, R., Hofmann-Lehmann, R., 2015. Diversity of *Haemaphysalis* -associated piroplasms of ruminants in Central-Eastern Europe, Hungary. *Parasit. Vectors* 8, 1–6.
- Hovius, J.W.R., de Wever, B., Sohne, M., Brouwer, M.C., Coumou, J., Jahfari, S., Pals, S.T., Horlings, H.M., Fikrig, E., Sprong, H., Marinus, H.J., 2013. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet* 382, 658–661.
- Kahl, O., Janetzki, C., Gray, J.S., Stein, J., Bauch, R.J., 1992. Tick infection rates with *Borrelia* : *Ixodes ricinus* versus *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus* in two locations in eastern Germany. *Med. Vet. Entomol.* 363–366.
- Kiewra, D., Stańczak, J., Richter, M., 2014. *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Borrelia miyamotoi* in Lower Silesia, Poland - Preliminary study. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 892–897.
- Lee, K., Takano, A., Taylor, K., Sashika, M., Shimozuru, M., Konnai, S., Kawabata, H., Tsubota, T., 2014. A relapsing fever group *Borrelia* sp. similar to *Borrelia lonestari* found among wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) and *Haemaphysalis* spp. ticks in Hokkaido, Japan. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 841–847.
- Marconi, R.T., Garon, C.F., 1992. Phylogenetic analysis of the genus *Borrelia*: a comparison of North American and European isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 174, 241–244.
- Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., Chirico, J., van der Wal, F.J., Sprong, H., Boye Pihl, T.P., Klitgaard, K., BÅ, dker, R., Fach, P., Moutailler, S., 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 103.
- Mun, J., Eisen, R.J., Eisen, L., Lane, R.S., 2006. Detection of a *Borrelia miyamotoi sensu lato* relapsing-fever group spirochete from *Ixodes pacificus* in California. *J. Med. Entomol.* 43, 120–123.
- Nosek, J., Chunikhin, S.P., Gresikova, M., Korolev, M.B., Kozuch, O., Stefutkina, L.F., Ivannikova, T.I., 1986. Peculiarities of tick-borne encephalitis virus reproduction in *Haemaphysalis inermis* ticks and their explants. *Acta Virol.* 30, 396–401.

- Nosek, J., Lichard, M., Sztankay, M., 1967. The ecology of ticks in the Tribeč and Hronský Inovec Mountains. *Bull. World Health Organ.* 36, 49–59.
- Nunes, M., Parreira, R., Maia, C., Lopes, N., Fingerle, V., Vieira, M.L., 2016. Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: Phylogenetic characterization of two novel Relapsing Fever-like *Borrelia* sp. *Infect. Genet. Evol.* 40, 266–274.
- Platonov, A.E., Karan, L.S., Kolyasnikova, N.M., Makhneva, N. a., Toporkova, M.G., Maleev, V. V., Fish, D., Krause, P.J., 2011. Humans infected with relapsing fever spirochete *borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1816–1823.
- Portillo, A., Santibáñez, P., Santibáñez, S., Pérez-Martínez, L., Oteo, J.A., 2008. Detection of *Rickettsia* spp. in *Haemaphysalis* ticks collected in La Rioja, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 653–658.
- R Development Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria.
- Randolph, S.E., Green, R.M., Hoodless, A.N., Peacey, M.F., 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 32, 979–989.
- Raoult, D., Birtles, R.J., Montoya, M., Perez, E., Tissot-Dupont, H., Roux, V., Guerra, H., 1999. Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. *Clin. Infect. Dis.* 29, 434–436.
- Richter, D., Schlee, D.B., Matuschka, F.R., 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 697–701.
- Rigó, K., Gyuranecz, M., Tóth, A.G., Földvári, G., 2011. Detection of *Borrelia burgdorferi* *Sensu Lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ectoparasites in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 1499–1501.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Spitalská, E., Kazimírová, M., 2014. *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front. Public Heal.* 2, 1–26.
- Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Nuncio, M.S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., Bacellar, F., 2011. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): An update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp. Appl. Acarol.* 55, 85–121.
- 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, 115–121.
- Scoles, G.A., Papero, M., Beati, L., Fish, D., 2001. A Relapsing Fever Group Spirochete Transmitted by *Ixodes scapularis* Ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 1, 21–34.
- Sun, Y., Xu, R., 2003. Ability of *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor silvarum* ticks to acquire and transstadially transmit *Borrelia garinii*. *Exp. Appl. Acarol.* 31, 151–160.

- Szekeres, S., Coipan, E.C., Rigó, K., Majoros, G., Jahfari, S., Sprong, H., Földvári, G., 2015. Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. *Parasit. Vectors* 8, 1–8.
- Széll, Z., Sréter-Lancz, Z., Márialigeti, K., Sréter, T., 2006. Temporal distribution of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* in Hungary. *Vet. Parasitol.* 141, 377–379.
- Tälleklint, L., 1996. Lyme borreliosis spirochetes in *Ixodes ricinus* and *Haemaphysalis punctata* ticks (Acari: Ixodidae) on three islands in the Baltic Sea. *Exp. Appl. Acarol.* 20, 467–476.
- Van Duijvendijk, G., Coipan, C., Wagemakers, A., Fonville, M., Ersöz, J., Oei, A., Földvári, G., Hovius, J., Takken, W., Sprong, H., 2016. Larvae of *Ixodes ricinus* transmit *Borrelia afzelii* and *B. miyamotoi* to vertebrate hosts. *Parasit. Vectors* 9, 1–7.
- Wagemakers, A., Staarink, P.J., Sprong, H., Hovius, J.W.R., 2015. *Borrelia miyamotoi*: A widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 31, 260–269.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Földvári Gábornak szeretnék köszönetet mondani a közös munkáért, támogatásáért, tanításáért és a családias hangulatban eltöltött terepi mintavételekért.

Köszönöm Szekeres Sándornak a laboratóriumi munkákban adott segítségét, tanítását a módszerek megértésében és elsajátításában, valamint a dolgozat megírásában nyújtott noszogatását.

Köszönöm Prof. Dr. Farkas Róbertnek, tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított az ÁTE, Parazitológiai és Állattani Tanszékén végzett munkák kivitelezéséhez.

Köszönöm Dr. Kreizinger Zsuzsának és Dr. Gyuranecz Miklósnak (Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézet) a molekuláris vizsgálatban adott segítségüket.

A terepi gyűjtésekben adott segítségét szeretném megköszönni Dr. Majoros Gábornak, Rigó Krisztinának.

Köszönöm Gyarmati Ádámnak és Kis Jánosnak a statisztikai elemzésben adott tanácsait és segítségét.

Köszönöm Szilágyi Melindának kitartását és lelki támogatását.