

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Madarak szerepe a kullancs közvetítette
kórokozók járványtanában**

PhD értekezés tézisei

dr. Flaisz Barbara

2018

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Hornok Sándor, Ph.D., Habil.
Állatorvostudományi Egyetem
Parazitológiai és Állattani Tanszék
témavezető

Dr. Csörgő Tibor, Ph.D.
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék
témabizottság tagja

Dr. Gyuranecz Miklós, Ph.D.
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témabizottság tagja

Prof. Farkas Róbert, DSc
Állatorvostudományi Egyetem
Parazitológiai és Állattani Tanszék
témabizottság tagja

Bevezetés

A madarak járványtani szerepe egyre inkább előtérbe kerül. A verébalakúak rendjébe tartozó madárfajok, különösen azok, amelyek a földfelszín közelében táplálkoznak, életmódjukból kifolyólag gyakran fertőződnek kullancsokkal, ezáltal hozzájárulhatnak a kullancsok valamint a kullancs közvetítette kórokozók terjesztéséhez.

Közép-Európában az énekesmadarakon az *Ixodes ricinus* (Taragel'ová et al. 2008; Dubska et al. 2009; Lommano et al. 2014) és a *Haemaphysalis concinna* (Špitalská et al. 2011) kullancsfajok fordulnak elő a leggyakrabban. Madárspecifikus kullancsfajok közül pedig az *I. frontalis* (Lommano et al. 2014), az *I. arboricola* (Dubska et al. 2011; Špitalská et al. 2011) és az *I. lividus* (Jaenson et al. 1994). Az ornithophil kullancsok előfordulása Közép-Európában viszonylag ritka. Ezt példázza az *I. arboricola* is, melynek előfordulását több mint 50 évvel ezelőtt jelentették Magyarországról (Babos 1965). Egy másik figyelemre méltó jelenség a vonuló madarak szerepe az egzotikus kullancsok (pl. *Hyalomma* fajok) természetes úton történő szállításában, melynek során nem endémiás kórokozók érkehetnek Európa országaiba (Hornok et al. 2013a). A madarak kullancsfertőzöttségének mértékét több tényező befolyásolja. Európa-szerte ismert jelenség a földön táplálkozó madarak, mint például a feketerigók (*Turdus merula*) ill. vörösbecyék (*Erithacus rubecula*) fokozott kullancshordozása (Taragel'ová et al. 2008; Norte et al. 2015). A klimatikus ill. helyi földrajzi jellegzetességek is hatással lehetnek a kullancsok aktivitására és túlélésére (Hasle et al. 2009), ezáltal a madarak kullancsosságára. Egy hazai kutatás során a thermophil *Ha. concinna* lárvák és nimfák többségét nyári időszakban gyűjtötték madarokról (Hornok et al. 2013a).

A vektorok által közvetített kórokozók és a gazda vérében megjelenő táplálékeredetű hormonok egyidejűleg befolyásolhatják a kullancsfertőzöttség valamint a kórokozók átoltás képességének mértékét. Egy cseh kutatás során kimutatták, hogy az ekdiszteroidok (sejtproliferációt és növekedést befolyásoló hormonok rovarokban) nagy mennyiségben jelenhetnek meg olyan madarak vérében melyekkel előzetesen ekdiszteroid-tartalmú növényeket etettek (Koudela et al. 1995). A vedlési folyamat kezdő lépését, az apolízist ekdiszteroidok befolyásolják. Ahhoz, hogy a kutikula elválása az epidermisztől megkezdődhessen, a kullancs haemolymphájában magas ekdiszteroid koncentráció szükséges (Diehl et al. 1982). A háromgazdás kullancsok a vérszívás befejezése után vedlenek, majd egy újabb gazdára kapaszkodnak fel. Ilyenkor megfertőzhetik az új gazdát azokkal a kórokozókkal melyeket az előző vérszívás alkalmával, vagy még korábban az anyától szereztek.

Közép-Európában az *Anaplasma phagocytophilum* (Špitalská et al. 2011), *Rickettsia*-fajok (Hildebrandt et al. 2010; Lommano et al. 2014), *Borrelia*-fajok (Taragel'ová et al. 2008;

Dubska et al. 2009; Špitalská et al. 2011), a *Francisella tularensis* (Franke et al. 2010a), a kullancsencephalitis vírusa (Lommano et al. 2014) és *Babesia*-fajok (Franke et al. 2010a; Hildebrandt et al. 2010) a leggyakoribb zoonotikus kórokozók madarak kullancsaiban. A rigófélék családjába tartozó madarak fontos rezervoár szerepet tölthetnek be a *B. garinii* és a *B. valaisiana* esetében (Dubska et al., 2009). A kullancslárvákban jelenlevő *Borrelia*-fertőzöttségből arra következtetnek, hogy a madarakon való vérszívás közben történhet a kórokozó felvétele (Franke et al. 2010a). Az *I. ricinus* az énekesmadarak egyik leggyakoribb ektoparazitája Európában, ugyanakkor ez a fő vektora a *B. burgdorferi sensu lato*-nak is (Heylen et al. 2014b). A madarak szerepe tehát kullancsgazdaként és baktérium-hordozóként is jelentős ezeknek a kórokozóknak a fenntartásában. Ezen felül egy magyarországi kutatás során énekesmadarak véréből sikerült a *R. helvetica* és az *A. phagocytophilum* kimutatás is (Hornok et al. 2014b).

Célkitűzések

Az értekezés célkitűzései:

1. a vonuló és rezidens madárfajok által szállított kullancsok faji és genetikai változatosságának vizsgálata Magyarországon, különös tekintettel a madárkullancsok molekuláris taxonómiai jellegzetességeire különböző földrajzi környezetben.
2. a madarak kullancsfertőzöttségét befolyásoló fajspecifikus tényezők meghatározása.
3. a gazda vérében megjelenő, táplálékból származó hormonok jelenlétének, és azok kullancsfertőzöttségre gyakorolt hatásának vizsgálata, valamint az eredmények összevetése a lepkék populációsűrűség adataival, hogy megállapítsuk milyen hatással bírnak a vedlési hormonok az apolízisre
4. piroplasmák jelenlétének és gyakoriságának vizsgálata madarokról gyűjtött *Ha. concinna* kullancsokban

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

2012 januárjától 2014 decemberéig zajlott a kullancsok és vérminták gyűjtése énekesmadarakból. A gyűjtés helyszínei magyarországi gyűrűző állomások voltak (Ócsa, Fenékpusztá, Bódva-völgy). A madarak befogása standard Ecotone függönyhálókka történt (Hornok et al. 2014b). Minden befogott madár átvizsgálásra került kullancsok szempontjából. A kullancsoka gazdánként külön csövekben helyeztük el és 70%-os etanolban tároltuk. A faji meghatározás határozókulcs segítségével történt (Babos 1965), majd szobahőmérsékleten tároltuk őket.

A vérmintákat a kullancsfertőzött madarak szárnyvénájából gyűjtöttük, a táplálékeredetű hormonok (ekdiszteroidok) jelenlétének kimutatása céljából. A mintákat EDTA-s mikrocövekben -20°C-on tároltuk feldolgozásig. Tizennyolc véletlenszerűen kiválasztott mintát vizsgáltunk folyadékkromatográfiai-tömegspektrometriai módszerrel (LC-MS/MS).

LC-MS/MS vizsgálatok

A minták előkészítését követően a tiszta felulúszók kerültek felhasználásra az LC-MS/MS vizsgálatokban. A kalibrációt hét standard ekdiszteroiddal végeztük (95% <tisztaság), úgy mint 20-hidroxi-ekdizon (20E), polipodin B (pB), posztszteron (pS), ekdizon (E), 2-deoxi-20-hidroxi-ekdizon (2d20E), ajugaszteron C (ajC) és dakrihainanszteron (Ds) (Hunyadi et al. 2007; Tóth et al. 2008). A kísérleti berendezés egy Agilent 1200 folyadékkromatográfias rendszer volt. A kromatográfias elemzés kivitelezése egy Kinetex XB-C18 oszloppal történt 40°C-on (100 x 2.1 mm, 2.6 µm), 0.5 ml/perc elúciós sebességgel. A tömegspektrometriás kimutatás ESI ionforrással felszerelt 6410A triple-quadrupol MS berendezéssel történt pozitív ionizációs módban. A vegyületek detektálása MRM (multiple reaction monitoring) módszerrel történt, 700 volt elektronsokszorozó feszültséggel. A fragmentációs feszültség és az ütközési energia (CE) célvegyületenként lett optimalizálva. Az adatok kinyerése és a kvalitatív elemzés MassHunter B.04.01 szoftverrel történt.

A madárkullancsok molekuláris taxonómiai és filogenetikai analízise

Kullancsspecifikus COI gén alapú konvencionális PCR-t (Former et al. 1994) használtunk első körben a molekuláris elemzéshez. Egy másik konvencionális PCR-t (Black és Piesman 1994) választottunk a 16S rDNS gén 460 bp hosszúságú részének felsokszorozására. A kullancsokból történő egyedi DNS kivonás QIAamp DNA Mini Kit segítségével történt, ahogy korábban már leírásra került (Hornok et al. 2014b). PCR termékek detektálása etídium-bromidos festést és 1.5 %-os agaróz gélelektroforézist követően ultrabolya fény segítségével történt. A tisztítást és szekvenálást a Biomi Kft végezte (Gödöllő,

Magyarország), majd a kapott szekvenciákat a GenBank-ba töltöttük fel. A filogenetikai analízist Tamura-Nei modell és Maximum Composite Likelihood módszerrel végeztük, a MEGA version 5.2 program segítségével (Tamura et al. 2011).

Piroplasmák kimutatása *Ha. concinna* kullancsokból és a piroplasmák filogenetikai analízise

A piroplasmák jelenlétét Casati et al. (2006) által módosított konvencionális PCR-rel vizsgáltuk. Ennek során a *Babesia/Theileria* fajok 18S rRNA génjének kb. 500 bp hosszúságú részét sokszoroztuk fel. PCR termékeket 1%-os standard agaróz gélben futtattuk és ECO Safe nukleinsav festéssel tettük láthatóvá. Tisztítást és szekvenálást követően a szekvenciákat manuálisan szerkesztettük majd illesztettük a GenBankban fellelhető szekvenciákhoz a BLASTN program segítségével. A filogenetikai analízist Maximum Likelihood módszerrel végeztük (Jukes Cantor model), a MEGA version 6.0 program segítségével (Tamura et al. 2013).

Kutatásetikai engedélyek

Vizsgálataink az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény rendelkezéseinek figyelembevételével zajlottak. A madaraktól való mintagyűjtést a Közép-Duna-völgyi Környezetvédelmi és Természetvédelmi Felügyelőség engedélyezte (határozat száma: 27251-1/2014).

Statisztikai módszerek

A konfidencia intervallumok meghatározása 95%-os megbízhatósági szinten a Sterne módszer szerint történt (Reiczigel, J. 2003). A prevalencia adatokat Fisher egzakt teszttel elemeztük. Az átlagos kullancsfertőzöttségi intenzitás mértékét a különböző madár kategóriák között Mann-Whitney U-próba segítségével hasonlítottuk össze. A különbség $P < 0.05$ esetén volt szignifikáns.

A hernyók aktivitására a lepkék (Rovarok:Lepkék) populációsűrűségi adataiból következtettünk, melyet a hazai Erdészeti Fénycsapda Hálózat 1974 és 2006 között gyűjtött adataiból számoltunk (Gimesi et al. 2012). Spearman-féle rangkorrelációval elemeztük az apolízist mutató kullancsok havi aránya és a lepkék populációsűrűsége közötti összefüggést. A vérben található ekdiszteroidok, a szezonális és az apolízis közti kapcsolatot Fisher egzakt teszttel hasonlítottuk össze. A piroplasma pozitív *Ha. concinna* kullancsok arányát ugyancsak Fisher egzakt teszttel vizsgáltuk. A konfidencia intervallumok meghatározása 95%-os megbízhatósági szinten a Sterne módszer szerint történt (Reiczigel, J. 2003).

Eredmények

A vonuló és rezidens madárfajok által szállított kullancsok faji változatossága

A kutatás során összesen 3339 kullancsot gyűjtöttünk 1167 fertőzött énekesmadárról. A madárkullancsok hat fajba tartoztak. Az *I. ricinus* és a *Ha. concinna* volt a leggyakoribb 2296 illetve 989 példánnyal (lárvák és nimfák). Ezen felül 48 darab *I. frontalis* (köztük három adultot) és három *Hy. rufipes* nimfát találtunk. Továbbá három adult nőstény kullancsot, két *I. festai* és egy *I. lividus* sikerült gyűjteni.

Harmincnegy *I. frontalis* példányt vörösbegyőről (*E. rubecula*) gyűjtöttünk. A *Hyalomma* kullancsok egy mezei posztáról (*Sylvia communis*), a két *I. festai* nőstény egy zöldikéről (*Carduelis chloris*) és egy szürkebegyőről (*Prunella modularis*) származott. Az *I. lividus* nőstényt egy partifecskéről (*Riparia riparia*) gyűjtöttük.

Ritkább kullancsfajok genetikai változatosságának vizsgálata földrajzi szempontból

Négy kullancsfaj esetén születtek jelentős eredmények. A 46 darab *I. frontalis* esetében, melyek COI génszakaszait szekvenáltuk két egymástól elkülönült genetikai vonalat fedeztünk fel ("A": KU170492-500, és "B": KU170501-9). Az elkülönülés támogatottsága a filogenetikai törzsfán magas volt. Az ezt követő 16S rDNS gén vizsgálatával két elkülönült genotípust találtunk (KU170518: genotípus A-Hu16S, KU170519: genotípus B-Hu16S). Ezek a 16S rDNS genotípusok 100%-os szekvencia hasonlóságot mutattak délnyugat-európai (Azori-szigetek) izolátumokkal (KP769863 és KP769862).

Az *I. lividus* COI szekvenciái (KU170510) 100%-ban egyeztek egy Egyesült Királyságból származó kullanccsal (GU124743), illetve a parciális 16S rDNS szekvenciák 99,7%-os egyezést mutattak egy Belgiumban izolált példánnyal. A megvizsgált *Hyalomma* nimfa részleges COI szekvenciája (KU170491) a legnagyobb fokú azonosságot egy Etiópiából származó *Hy. rufipes* x *Hy. dromedarii* hibriddel (AJ437079) mutatta. A részleges 16S rDNS gén (KU170517) pedig egy *Hy. rufipes* kullanccsal.

A 12 megvizsgált *Ha. concinna* kullancs hat különböző COI genotípusba tartozott (KU170511-6), melyek a filogenetikai törzsfán két vonalat alkottak. A COI genotípusok három 16S rDNA genotípust képviseltek (KU170523-5), melyek távol-keleti izolátumokkal mutattak rokonságot.

A kullancsfertőzöttséget befolyásoló madárjellegzetességek vizsgálata

Az *I. ricinus* és az *I. frontalis* lárvák és nimfák többsége (78.4%, CI: 76.7-80.1% és 91.7%, CI: 80-97.7%) azokon a madarakon fordult elő, amelyek főleg a talajszint közelében táplálkoznak. Ezzel szemben a *Ha. concinna* lárvákat és nimfákat a legnagyobb számban (73.1%, CI: 70.2-75.9%) azokon a madarakon találtuk, amelyek a talajszint felett

magasabban táplálkoznak. A két kullancsnem közötti különbség a gazdakeresés tekintetében szignifikáns volt (Fisher egzakt teszt: $P < 0.0001$). A kullancsfertőzöttség átlagos intenzitása nem mutatott szignifikáns összefüggést a gazdák kisebb (6-38 g) ill. nagyobb (39-140 g) testtömegével, sem pedig a hosszú ill. rövid távú vonulással (Mann-Whitney U -próba: $P > 0.05$).

A táplálék eredetű hormonok madárvérben való jelenlétének hatása a kullancsfertőzöttségre

A hároméves időszak alatt 3330 korai fejlődési stádiumú kullancsot gyűjtöttünk (főleg *Ixodes* fajokat és *Ha. concinna*) 1164 főleg vagy részben rovarevő énekesmadárról. A gyűjtött kullancsok számottevő arányban 20.5% (683/3330, CI: 19.2-21.9%) mutatták az apolízis jelenségét. A kezdődő vedlés jelei a nem megszívott (azaz a vérszívás kezdeti fázisában lévő) kullancsokon is megfigyelhetők voltak. A megszívott apolitikus nimfák esetében a genitális pórus helye sötétebb és jobban kivehető volt. A madarokról származó apolitikus kullancsok legnagyobb hányadát júliusban gyűjtöttük (35.5%, CI: 31.9-39.1%). Szignifikáns összefüggést találtunk az apolízist mutató lárvák és nimfák, valamint a lepkék regionális populációsűrűsége között (Spearman-féle rangkorreláció: $r=0.93$, $P=0.00001$).

Hét ekdiszteroid ill. azok származéka kimutatható mennyiségben volt jelen 18-ból nyolc kullancsos madár vérmintájában. Szignifikánsan több volt a pozitív minták aránya nyáron (61.5%=8/13) mint tavasszal (0.0%=0/5) (Fisher egzakt teszt: $P=0.036$). Az apolitikus kullancsokat hordozó madarak között szignifikánsan több volt az ekdiszteroid-pozitív minták aránya (87.5%=7/8), azokhoz a madarakhoz képest, amelyek nem hordoztak ilyen kullancsokat (10.0%=1/10) (Fisher egzakt teszt: $P=0.003$).

Piroplasmák jelenlétének kimutatása és molekuláris vizsgálata madarokról gyűjtött *Ha. concinna* kullancsokban

Háromszázhuszonegy *Ha. concinna* vizsgálata során 51 kullancsból sikerült piroplasmákat kimutatni (15.9%, CI: 12.1-20.4%). A molekuláris azonosítás során ezek 100%-os egyezést mutattak három *Babesia* genotípussal, melyeket korábban Dél-Szibériában és Oroszország keleti részén írtak le (Rar et al. 2014). A kullancsok többségében két genotípus volt jelen: "Irk-Hc133" (korábban megtalálták Irkutskban, Szibéria déli részén) és "Kh-Hc222" (Khabarovsk, Távol-Kelet). Egy további genotípust: "Irk-Hc130" (Rar et al., 2014) három *Ha. concinna* példányból sikerült kimutatni. A filogenetikai elemzés során kiderült, hogy mindhárom genotípus a kérdéses babesziák közé tartozik. A *Ha. concinna* lárvák és nimfák között nem volt eltérés piroplasma-pozitivitás szempontjából, viszont nyáron és ősszel szignifikánsan több volt a PCR pozitív kullancsok aránya a tavaszi időszakhoz viszonyítva. A PCR pozitív *Ha. concinna* fiatal fejlődési alakok jellemzően öt madárfajról származtak. Ez az öt madárfaj, amely rendelkezik keleti vonulási kapcsolatokkal a citromsármány (*Emberiza*

citrinella), a berki tücsökmadár (*Locustella fluviatilis*), az énekes rigó (*Turdus philomelos*), a nádirigó (*Locustella luscinioides*) és a fülemüle (*Luscinia megarhynchos*) volt.

Megbeszélés

A vonuló és rezidens madárfajok által szállított kullancsok faji változatossága

Közép-Európában az *I. ricinus* és a *Ha. concinna* gyakrabban fordul elő madarakon az ornithophil fajokhoz képest (Dubska et al. 2009; Špitalská et al. 2011). Eredményeink ehhez hasonló képet mutattak, mivel a legnagyobb számban *I. ricinus* és *Ha. concinna* fiatal fejlődési alakokat sikerült gyűjtenünk. A madárspecifikus kullancsok ritkábban fordultak elő az általunk megvizsgált madarakon, ugyanakkor esetükben adult kullancsokat is sikerült gyűjteni. Az *I. frontalis* legutóbb fél évszázada találták meg Magyarországon (Janisch 1959). Jelen eredményeink igazolják, hogy ez egy gyakori kullancsfaj lehet országunkban. Nagy arányban gyűjtöttük ezeket a kullancsokat vörösbegyről (*E. rubecula*), amely madárfaj tavasszal főleg délnyugatról északkeleti irányba vonul, azaz a mediterrán térségből Magyarország felé (Hornok et al. 2012b). Közép-Európa másik gyakori ornithophil kullancsfaja, az *I. arboricola* (Mihalca et al. 2012; Novakova et al. 2015), nem került elő vizsgálatunk során. Egzotikus kullancsok közül a *Hy. rufipes* Közép-Európába történő madarak általi szállítását sikerült molekuláris módszerekkel igazolnunk. Ezen felül sikerült azonosítanunk az *I. festai*, amelyet hazánkban eddig még nem írtak le.

Ritkább kullancsfajok genetikai változatosságának vizsgálata földrajzi szempontból

Molekuláris taxonómiai szempontból fontos lehet a madárkullancsok vizsgálata, hogy feltárhassuk a fajon belüli összeköttetéseket a különálló földrajzi régiók között. A kutatás során az *I. frontalis* kullancsok többsége vörösbegyről (*E. rubecula*) származott. A molekuláris vizsgálatok alátámasztották ennek a madárfajnak a vonulási kapcsolatait Délnyugat-Európa és Közép-Európa között, mivel a két 16S rDNS genotípus (KU170518: A-Hu16S genotípus, KU170519: B-Hu16S genotípus) 100%-os szekvencia egyezést mutatott Azori-szigetetről származó mintákkal. A két 16S rDNS genotípus két elkülönült genetikai vonalat képviselt, hasonlóan a COI gén szekvenálási eredményéhez, mely egyértelművé tette a genetikai vonalak szétválását. A COI szekvenciák elkülönülésének mértéke (9%) a genetikai vonalak között meghaladta kullancsfajok közötti elkülönülés javasolt határát. (COI gén esetén 6,1 %) (Lv et al., 2014). Ennek ellenére morfológiai különbséget nem sikerült felfedeznünk a két vonal között.

Figyelemreméltó adat, hogy az *I. festai* Magyarországon elsőként sikerült leírni. Ezt a kullancsfajt olyan madárfajokról gyűjtöttük, amelyek ősszel a Földközi-tenger medencéje felé vonulnak. Tanulmányunk során mindhárom *Hyalomma* nimfa morfológiailag *Hy. rufipes*-nek bizonyult. Az a példány, amelyet PCR segítségével vizsgáltunk COI gén alapján egy etiópai *Hy. rufipes* hibriddel mutatott nagyfokú egyezést (Rees et al. 2003). A mezei posztátáról (*S. communis*) melyről a *Hyalomma* kullancsokat gyűjtöttük, ismert, hogy Fekete-Afrikában telel

(Csörgő et al. 2009) és Közép-Európában költ. A vonuló madarak szerepet vállalnak az egzotikus kullancsok fiatal alakjainak szállításában. A *Ha. concinna* Eurázsia-szerte elterjedt kullancsfaj, amely gyakran kapaszkodik fel madarakra. A *Ha. concinna* COI genotípusai három 16S rDNS genotípust képviseltek. Ezek közül kettő 16S rDNS gén nagyfokú egyezést mutatott kelet-szibériai (Khasnatinov et al. 2016) és japán (Takano et al. 2014) fajtársakkal. A szoros kapcsolat magyarázata lehet ezen ektoparaziták vonuló madarak segítségével történő szállítása Európa és Kelet-Ázsia között.

A kullancsfertőzöttséget befolyásoló madárjellegzetességek vizsgálata

Számos tényező befolyásolja a madarak kullancsfertőzöttségének intenzitását. Korábbi tanulmányokkal összhangban (Dubska et al. 2009; Hornok et al. 2014b), szignifikánsan több kullancsfertőzött madarat találtunk a talajszint közelében táplálkozó madárfajok között. Az *I. ricinus* és az *I. frontalis* fiatal alakjai is főleg ezeken a madarakon fordultak elő. Az *I. frontalis* esetén, a talajon táplálkozó madarakkal való összefüggés először került bizonyításra. Ezzel szemben a *Ha. concinna* lárvák és nimfák szignifikánsan gyakrabban fordultak elő olyan madárfajokon, amelyek a talajszint felett magasabban táplálkoznak. A két kullancsnem közötti különbség az eltérő gazdakeresési magassággal magyarázható. Jelen tanulmányunkban a testtömeg és a vonulási útvonal hossza nem mutatott szignifikáns összefüggést a madarak kullancsfertőzöttségének intenzitásával.

A táplálék eredetű hormonok madárvérben való jelenlétének hatása a kullancsfertőzöttségre

Kutatásunk során fény derült egy további érdekes tényezőre, amely befolyásolhatja a gazdaparazita viszonyt. Rees (2004) foglalta össze azoknak a korábbi laboratóriumi kutatásoknak az eredményét, amelyek igazolták, hogy a külső forrásból származó vedlési hormonok felgyorsítják a kullancsok vedlését azáltal, hogy apolízist indukálnak. Jelen tanulmányunkban az apolitikus kullancsok nyári tömeges megjelenését megelőzte a hernyók regionális csúcsaktivitása. Ezen felül szignifikáns szezonális összefüggés volt kimutatható a lepkék populációsűrűsége és az apolitikus kullancsok aránya között a hónapok függvényében. A hernyók nagy mennyiségben tartalmazhatnak ekdiszteroidokat (Sehna et al. 1981), és még akkor is megjelenhetnek a madarak étrendjében, ha az egyes énekesmadár fajok fő táplálékát más ízeltlábú osztályok teszik ki (Haraszthy, L. 1998). Az apolitikus kullancsok madarakon észlelt magas aránya és a lepkék egyidejűleg tapasztalt szezonális aktivitása a hernyók (és feltehetőleg más ízeltlábúak) ekdiszteroid koncentrációjával van összefüggésben.

Ahogy rövidül a vérszívással eltöltött idő, úgy csökken a kórokozó átvitel kockázata (Wilhelmsson et al. 2013). Kutatásunk során a 20-hidroxiekdizon és az ekdizon volt jelen a legnagyobb mennyiségben a rovarvő madarak vérmintáiban. A tapasztalt ekdiszteroid

értékek korábbi cseh kutatáshoz viszonyítva (Koudela et al. 1995.), jóval nagyobb akkumulációt mutattak bizonyos madarak esetében, ezáltal igazolták, hogy lehetséges a madárvérben ezen anyagok felhalmozódása.

Piroplasmák jelenlétének kimutatása és molekuláris vizsgálata madarokról gyűjtött *Ha. concinna* kullancsokban

A *Ha. concinna* egy Európa és Ázsia szerte előforduló kullancsfaj (Lebedeva és Korenberg 1981). Tekintve, hogy a madarak kedvelt gazdái ennek a parazitának, a vonuló madarak általi szállítása valószínűsíthetően gyakori jelenség. A *Haemaphysalis* fajok fontos szerephez jutnak a kérődző piroplasmák járványtanában (Alani és Herbert 1988; Yin et al. 1996), a madarak pedig feltételezett terjesztői a *Babesia*-hordozó kullancsoknak. A vizsgálataink során kimutatott *Babesia* genotípusokat ("Irk-Hc133" és "Kh-Hc222") korábban már megtalálták vegetációról gyűjtött *Ha. concinna* kullancsokban (Hornok et al. 2015b, Hamšíková et al. 2016). A harmadik *Babesia* genotípust ("Irk-Hc130") eddig még nem mutatták ki Európában. A három *Babesia* genotípus egyikét sem mutatták még ki madárkullancsokból. A lárvák PCR pozitivitása valószínűsíti, hogy a szibériai és távol-keleti *Babesia* genotípusok a *Ha. concinna*-k közreműködésével transzovariálisan terjedve fennmaradnak ill. szóródnak nagy földrajzi távolságokon keresztül.

Adataink alapján azt feltételezzük, hogy az őszi vonulás (észak ill. északkelet felől Közép-Európába) fontos szerepet tölt be a *Ha. concinna*hoz köthető piroplasmák terjesztésében. A PCR pozitív *Ha. concinna* lárvák és nimfák szignifikánsan gyakrabban fordultak elő öt olyan madárfajon, melyek keleti vonulási kapcsolatokkal (jelenlegi vagy filogenetikai) rendelkeztek, így öko-járványtani szerepüket alátámasztják a fenti összefüggésben. A hosszú távon vonuló madarak jelenlegi populációinak filogenetikai összevetése tükrözi, hogy a jégkorszak utáni rekolonizáció keleti ill. nyugati irányokba történt (Irwin és Irwin 2005).

Új tudományos eredmények

1. A *Hy. rufipes* fiatal fejlődési alakjainak madarak által történő Közép-Európába szállítását elsőként igazoltuk molekuláris módszerekkel, valamint az *I. festa* első alkalommal sikerült leírunk Magyarországon. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy hazánkban az *I. frontalis* egy, a madarakon gyakran előforduló kullancsfaj. Közép-Európában a madarak által szállított *I. frontalis* és a *Ha. concinna* esetén két genetikai vonalat fedeztünk fel. Ezek nagyfokú szekvencia egyezést mutattak ugyanazon kullancsfajok délnyugat-európai illetve kelet-ázsiai példányaival. Eredményeink felhívják a figyelmet a nyugati és keleti madárvonulások fontosságára, melynek szerepe lehet a kullancs közvetítette kórokozók járványtanában is.

2. Magyarországon elsőként írtuk le az *I. frontalis* fiatal alakjainak jelenlétét a talajon táplálkozó madarakkal összefüggésben. A *Ha. concinna* lárvák és nimfák esetében azt találtuk, hogy gyakrabban fordulnak elő a talajszint felett magasabban lévő növényzetben táplálkozó madarakon.

3. Elsőként írtuk le, hogy az énekesmadarak vérében természetes úton megjelenő ekdiszteroidok már a gazdán (amely nem élettani jelenség a háromgazdás kullancsok esetén) elősegíthetik a kullancsok apolízisét. Ennek a természetben előforduló jelenségnek a leírására, a legjobb tudásunk szerint eddig még nem volt példa. A külső forrásból származó ekdiszteroidok magas szinteket érhetnek el a rovarrevő madarak vérében, és ez lerövidítheti a kullancsok élősködését is.

4. Az "Irk-Hc130"-as *Babesia* genotípust elsőként találtuk meg Európában. Elsőként írtuk le az "Irk-Hc130", "Irk-Hc133" és "Kh-Hc222" genotípusokat madarokról származó *Ha. concinna* kullancsokból. Eredményeink rámutattak, hogy a madaraknak jelentős szerepe lehet a *Babesia* genotípusok hosszú távra való szállításában *Ha. concinna* kullancsokban. A helyi madarokról származó *Babesia*-hordozó kullancsok pedig tükrözhetik a szibériai ill. távolkeleti *Babesia* genotípusok közép-európai fennmaradását.

Publikációs lista

A kutatás témájával kapcsolatosan, lektorált folyóiratokban megjelent közlemények

Flaisz, B., Sulyok, K.M., Kováts, D., Kontschán, J., Csörgő, T., Csipak, Á., Gyuranecz, M., Hornok, S.: ***Babesia* genotypes in *Haemaphysalis concinna* collected from birds in Hungary reflect phylogeographic connections with Siberia and the Far East**, Ticks Tick Borne Dis., 8. 666-670, 2017.

Flaisz, B., Hornok S.: **A madarak szerepe a kullancs közvetítette kórokozók öko-járványtanában**, Magy. Állatorvosok., 139. 489-497, 2017. (in Hungarian with English abstract)

Hornok, S., Flaisz, B., Takács, N., Kontschán, J., Csörgő, T., Csipak, Á., Jaksa, B.R., Kováts, D.: **Bird ticks in Hungary reflect western, southern, eastern flyway connections and two genetic lineages of *Ixodes frontalis* and *Haemaphysalis concinna***, Parasit. Vectors., 9. 101., 2016.

Hornok, S., Kováts, D., Flaisz, B., Csörgő, T., Könczöl, Á., Balogh, G.T., Csorba, A., Hunyadi, A.: **An unexpected advantage of insectivorism: insect moulting hormones ingested by song birds affect their ticks**, Sci. Rep., 6. 23390, 2016.

Egyéb, lektorált folyóiratokban megjelent tudományos közlemények

Hornok, S., Sugár, L., Horváth, G., Kovács, T., Micsutka, A., Gönczi, E., Flaisz, B., Takács, N., Farkas, R., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R.: **Evidence for host specificity of *Theileria capreoli* genotypes in cervids**, Parasit. Vectors., 10. 473., 2017.

Hornok, S., Estók, P., Kováts, D., Flaisz, B., Takács, N., Szőke, K., Krawczyk, A., Kontschán, J., Gyuranecz, M., Fedák, A., Farkas, R., Haarsma, A.J., Sprong, H.: **Screening of bat faeces for arthropod-borne apicomplexan protozoa: *Babesia canis* and *Besnoitia besnoiti*-like sequences from Chiroptera**, Parasit. Vectors., 8. 441. 2015.

Hornok, S., Takács, N., Kontschán, J., György, Z., Micsutka, A., Icton, S., Flaisz, B., Farkas, R., Hofmann-Lehmann, R.: **Diversity of *Haemaphysalis*-associated piroplasms of ruminants in Central-Eastern Europe, Hungary**, Parasit. Vectors., 8. 627., 2015.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek **Dr. Hornok Sándornak**, a sok nekem szentelt időt és energiát amellyel segítette a PhD munkámat.

Ugyancsak köszönettel tartozom a Parazitológiai és Állattani Tanszéken dolgozó kollégáimnak a kutatásban nyújtott segítségért. Külön köszönet **Takács Nórának**, **Szőke Krisztinának**, és **Tóth Veronikának** a molekuláris munkában nyújtott segítségért, **Szekeres Sándornak** és **Dr. Majoros Gábornak** pedig a sok tanulságos beszélgetésért és átadott lelkesedésért.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat **Farkas Róbert professzor úrnak**, hogy lehetőséget biztosított a tanszéken történő munkavégzésre, valamint külön köszönöm kedves támogatását és a hasznos konzultációkat.

Számos kutató segített a munkám során a mintagyűjtésben valamint a laboratóriumi és statisztikai vizsgálatok kivitelezésében. Az alábbi személyeknek tartozom köszönettel:

Csipak Ármin, **Dr. Kováts Dávid**, **Jaksa Bianka Regina** és **Czikkelyné Ágh Nóra** (Ócsai Madárvárta, Ócsa)

Dr. Csörgő Tibor (Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék, Budapest)

Görföl-Sulyok Kinga Mária és **Dr. Gyuranecz Miklós** (Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Állatorvos-tudományi Intézet, Budapest)

Dr. Könczöl Árpád és **Dr. Balogh György Tibor** (Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató Laboratórium, Budapest)

Csorba Attila és **Dr. Hunyadi Attila** (Szegei Tudományegyetem, Farmakognózi Intézet, Szeged)

Dr. Kotschán Jenő (Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet, Budapest)

Dr. Kele Zoltán és **Dr. Jedlenszki Nikoletta** (Szegei Tudományegyetem, Szeged)

Legnagyobb köszönettel tartozom férjemnek **Engyel Ferenc Balázsnak**, aki mindvégig mellettem állt.

Köszönjük a kutatás anyagi támogatását OTKA 115854 (Dr. Hornok Sándor részére) pályázatnak, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma 9877-3/2015/FEKUT támogatásnak.