

MTA Doktori Értekezés tézisei

**Kullancsok, óvontagok és általuk hordozott kórokozók
rendszertani, öko-járványtani és földrajzi vizsgálata**

Dr. Hornok Sándor

Budapest, 2018

1. Előszó

A kullancsok és óvontagok (Acari: Ixodida) kiemelkedő humán- és állategészségügyi jelentőségű, vérszívó ektoparaziták, amelyek nemcsak vérszívásukkal és az általuk kibocsátott bioaktív anyagokkal károsíthatják gazdaszervezeteiket, hanem *vector-borne* kórokozókat is terjeszthetnek. A kullancsok és óvontagok modern, molekuláris módszerekkel végzett parazitológiai kutatása többértékű lehet. Ezek közé tartozik szekvencia alapú összehasonlításuk és filogenetikai vizsgálatuk, amely kiegészítő ismereteket nyújthat hagyományos, morfológiai azonosításukhoz és rendszertani besorolásukhoz. A nagy érzékenységű molekuláris módszerek ugyanakkor megkönnyíthetik a bennük lévő kórokozók kimutatását is. Óvatosan kell azonban értékelni az így kapott információ újdonságerejét. Egyrészt a kórokozók DNS-ének azonosítása kullancsokban vagy óvontagokban nem feltétlenül jelenti ezek átvivő képességét (vektorkompetenciáját). Másrészt célszerű mérlegelni, hogy a manapság növekvő fontosságúnak ("emerging") tartott fajok új előfordulási adatai valóban terjedést tükröznek-e és nem abból adódtak, hogy a kimutatásukra használt módszerek sokkal érzékenyebbek a korábbiaknál.

Világviszonylatban mintegy 900 kullancs- és óvontagfaj ismert, amelyek közül közel 70 fordul elő Európában, és legalább 24 (azaz 21 kullancsfaj és 3 óvontagfaj) Magyarországon. Ezek száma azonban bővülni látszik, nemcsak egyes fajok növekvő elterjedési területének, de az újonnan felfedezett fajoknak köszönhetően is.

Egyes kullancsfajok, kullancs közvetítette kórokozók (illetve általuk okozott kórképek) előfordulása évtizedek óta ismert hazánkban, de újabbak felbukkanására is számíthatunk. Ennek valószínűségét növeli a melegedőben lévő éghajlat, amely már Magyarországon is érzékelhető; továbbá hazánk kivételes földrajzi fekvése, minthogy olyan közép-európai ország, ahol nem akadályozzák hegyvonulatok (Alpok, Kárpátok) a vektorok és kórokozók mediterrán térségből észak felé való terjedését. A folyamatot felgyorsíthatja, hogy a kórokozókat hordozó kullancsok gazdáik – főleg a repülni képes madarak, denevérek – révén akár egyszerre nagyobb távolságot is megtehetnek. Ráadásul, számos közép- vagy hosszú távon vonuló madár- és denevérfaj synanthrop életmódjáról ismert, így ezek a városokban, vidéki területeken a kullancsokat és az általuk közvetített kórokozókat közvetlenül az emberek és háziállataik közelébe juttathatják. Másfelől, vannak olyan kullancsgazdák (nagyvadak, ragadozók), amelyek csak kisebb távolságban hordoznak, terjesztenek kullancsokat, sőt ebben is korlátozhatják őket természetes és ember alkotta akadályok. A kullancs közvetítette kórokozók gyorsabb vagy lassabb terjedésének mintázatai tehát meglehetősen összetettek, és az ebben szerepet játszó okok teljességükben nem ismertek. Ehhez az is hozzájárul, hogy az utazási, kereskedelmi, állattartási szokások átalakulásával (a globalizáció és egyéb trendek nemkívánatos következményeként) e vírusok, baktériumok és paraziták manapság nagyobb eséllyel bukkannhatnak fel "evolúciós szempontból hirtelen" újabb földrajzi térségekben, vagy akár újabb gazdafajokban is.

2. Célkitűzések

Az értekezésben szereplő vizsgálatok célja az volt, hogy hozzájáruljanak a kullancs- és óvontagfajok, valamint az általuk közvetített bakteriális és egysejtű kórokozók rendszertana, fent említett komplex (tér- és időbeli) előfordulási és terjedési mintázata, illetve a kapcsolódó ökológiai tényezők (élőhely típus, gazda- és rezervoár spektrum, terjedési módok) ismertetéséhez. Nem hangsúlyozható eléggé, hogy az elért tudományos eredmények – két fajleírás, egy cikk és egy könyvfejezet kivételével – csapatmunkából születtek, amelynek során a siker záloga a résztvevők szakmai tapasztalatokon nyugvó nélkülözhetetlen hozzájárulása volt.

3. Anyag és módszer

3.1. Mintagyűjtési módszerek

A kullancsokat **növényzetről** az ún. *dragging-flagging* módszerrel gyűjtöttük. Ehhez legtöbbször 70 cm × 90 cm méretű fehér törülközőt használtunk, amelyet egységnyi hosszúságú, kb. 100 m-es ún. *transect*-ekben ("élőhelysávokban") húztunk végig, és 20-30 másodpercenként eltávolítottuk róla a kullancsokat. Az ismételt kullancsgyűjtést helyszínenként azonos napszakban és lehetőleg azonos időpontban végeztük, ugyanazon az adott számú *transect*-en.

A kullancsokat és óvantagekat gazdáikról vékony hegyű csipesszel távolítottuk el. Ehhez a **denevéreket** barlangok bejáratánál Ecotone hálóval fogtuk el (2 m hosszú, 2,5 m magas, 14 × 14 mm lyukátmérővel). A denevéreket ürülékgyűjtéshez steril papírzacskóban tartottuk; mintagyűjtés és adatrögzítés után szabadon engedték.

A kullancsokat **madarokról** főként az Ócsai Madárvártán, a fentihez hasonló hálóval (amely 12 m hosszú volt, 16 × 16 mm lyukátmérővel) gyűrűzéshez befogott madarakból gyűjtöttük. Az ektoparazitákat 70%-os vagy 96%-os etanolban szobahőmérsékleten tároltuk.

A kullancs fertőzött madarakból esetenként < 20 µl vért vettünk a szárnyvénából (*vena brachialis*) vékony tű és 1 ml-es fecskendő segítségével. A vérmintákat további állatfajoktól (kutya, szarvasmarha stb.) a szakma szabályai szerint vettük, és EDTA tartalmú csőben, -20°C-on lefagyasztottuk.

3.2. Morfológiai fajhatározás

A kullancs és óvantagefajokat már publikált standard határozókulcsok és leírások, képek alapján azonosítottuk. A képeket VHX-5000 digitális mikroszkóppal készítettük.

3.3. DNS kivonás

A kullancsok, óvantagek felületét – darabolás előtt – detergens vagy 10% nátrium-hipoklorit alkalmazásával tisztítottuk. A kullancsokból és a vérmintákból a DNS-t a "QIAamp DNA Mini Kit"-tel vontuk ki, a gyártó előírásait követve. A kullancsokból való DNS kivonáshoz szövetoldó pufferben minimum 8 órás emésztést alkalmaztunk (56 °C-os inkubáció proteináz-K-val). Az ürülék DNS-t "QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit" segítségével vontuk ki. Minden együtt kivont 23 mintához egy extrakciós kontrollt használtunk, hogy PCR negativitása esetén a keresztszennyeződést kizárjuk.

3.4. PCR módszerek

A rendszertani vizsgálatokhoz többnyire két, a citokró-m-c oxidáz 1-es alegységét kódoló génszakaszra (*cox1*) és a 16S rRNS génszakaszra épülő PCR-t használtunk. A kórokozó-kimutatásra mintegy húsz, részben kimutatásra, részben szekvencia alapú azonosításra való konvencionális és valós idejű PCR szolgált.

3.5. Filogenetikai vizsgálatok

A szekvenciákat a GénBank adataihoz az NCBI BLAST programmal (National Institutes of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hasonlítottuk. A törzsfa készítéshez génbanki – lehetőleg publikált – szekvenciákat úgy választottunk, hogy saját szekvenciáinkkal közel 100%-ban illeszkedjenek (= "coverage"). A filogenetikai vizsgálatokat MEGA 6.0 programmal végeztük (Neighbor-Joining, Maximum Likelihood törzsfa), annak modell szelekciója alapján.

3.6. Leggyakrabban alkalmazott statisztikai módszerek

Egy kullancsfaj abundanciáját úgy számoltuk ki, hogy fejlődési alakjaik illetve adultjaik standardizált területen (például három darab, 1×100 m-es élőhely sávon, ún. *transect*-en) gyűjtött egyedeinek számát százalékos arányban fejeztük ki az összes kullancsfaj hasonló adatához képest. A százalékos értékek megbízhatósági intervallumát (CI) 95%-os szinten számítottuk ki. A prevalencia adatokat Fisher-féle egzakt próbával hasonlítottuk össze, két adatsor összefüggését a Spearman rangkorreláció segítségével, a normál eloszlású értékek átlagát pedig *t*-teszttel (szignifikancia szintje: $P < 0,05$).

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1. Tudományra új kullancsfajok

4.1.1. Az *Ixodes ariadnae* Hornok, 2014 jellemzése

Európában eddig két, denevérekre mint gazdákra specializálódott kullancsfaj volt ismert: az *Ixodes vespertilionis* Koch, 1844 és az *I. simplex* Neumann, 1906. A 2011-től végzett hazai, barlangi kullancsgyűjtések során, amelyek elsődleges célja kórokozó-kimutatás volt, felfigyeltem rá, hogy egyes példányok mindkét, már leírt európai denevérkullancs-fajtól különböznek. Ezért jelen vizsgálatunk elsődleges célja az volt, hogy ezekből a morfológiailag eltérő példányokból újabb egyedeket gyűjtsünk, és azokat részletesebb vizsgálatnak vessük alá, beleértve mitochondriális markereik szekvencia- és filogenetikai elemzését. Másodsorban a gyűjtött barlangi kullancsok tér- és időbeli előfordulásáról, azaz a haplotípusok távoli barlangokhoz köthető (így egymástól földrajzilag elválasztott, allopatrikus) eloszlásáról illetve szezonális aktivitásáról is igyekeztünk adatokat gyűjteni.

A részletesebb vizsgálatok igazolták, hogy egy morfológiailag és genetikailag elkülönülő, más denevér gazdákhoz adaptálódott új denevérkullancs-fajt találtam, amit ezt követően leírtam. Az új faj az *I. ariadnae* Hornok, 2014 nevet kapta. Az *I. ariadnae* sp. nov. *cox1* szekvenciája csak 88%-ban illetve 86%-ban egyezett az *I. vespertilionis* és az *I. simplex* szekvenciáival (amelyek 85%-os egyezést mutattak egymással). Általánosságban véve, az azonos nembe tartozó kullancsfajok közötti *cox1* szekvencia azonosság a 70-94% tartományban szokott lenni. Ennek megfelelően, az Európában eddig leírt két denevérkullancs fajjal összehasonlítva, az *I. ariadnae* sp. nov. mindössze 86-88%-os azonossága amellel szól, hogy önálló fajról van szó. Filogenetikailag ez az új faj közelebb áll az *I. vespertilionis* fajhoz, de külön csoportba tartozik, amit mérsékelt magas *bootstrap* érték (83%) is támogatott. Ezt megerősíti, hogy az *I. ariadnae* sp. nov. nemcsak genetikailag tér el a másik két denevérkullancs-fajtól, hanem morfológiailag is (a lárvá, nympha és adult stádiumban egyaránt), illetve gazdakörében (*I. ariadnae* sp. nov.: főként *Myotis* spp.; *I. vespertilionis*: jellemzően *Rhinolophus* spp.; *I. simplex*: szinte kizárólag *Miniopterus schreibersii*).

4.1.2. Az *Ixodes collaris* Hornok, 2016 jellemzése

Euráziában 2015-re három denevérkullancs-faj széleskörű előfordulása vált ismertté. Ezek az *Ixodes vespertilionis* Koch, 1844, az *I. simplex* Neumann, 1906 és az *I. ariadnae* Hornok, 2014. Az *I. vespertilionis* faj morfológiai jegyeit mutató példányok között igen magas, a "fajelválasztó határként" ismert 6,1%-os *cox1* szekvencia eltérést többszörösen meghaladó (16%-os) különbséget találtunk a magyarországi és a vietnámi példányok (nőstények, nymphák) között. Újabb vizsgálatunk célja az volt, hogy hiányzó stádiumokat gyűjtsünk (hímeket, lárvákat) és részletesebb morfológiai elemzéssel igazoljuk: a hazai és a vietnámi haplotípusok esetében külön fajról van szó, majd az új fajt leírom.

Az újabb vizsgálatokban talált morfológiai bélyegek egyértelműen alátámasztották a vietnámi denevérkullancsok önálló faji státuszát. Az új fajt *I. collaris* Hornok, 2016 néven leírtam. Érdekes, hogy míg az *I. collaris* példányait korábban Délkelet-Ázsia számos részén valószínűleg *I. vespertilionis* fajjal tévesztették össze, a *cox1* és 16S rRNS gének vizsgálata alapján az új faj közelebbi filogenetikai rokonságban áll az *I. ariadnae*, mint az *I. vespertilionis* fajjal.

A denevérpopulációk földrajzi elkülönültsége fontos előmozdítója lehet kullancsaik fajképződésének (speciációjának). Ennek megfelelően, a kis patkósdenevérek (*Rhinolophus hipposideros*) földrajzi izolációja a Pireneusoktól északra illetve délre kullancsaik (*I. vespertilionis*) nagyfokú genetikai diverzitását vonta maga után, mint ezt leírtuk. Az *I. vespertilionis* ismert fő gazdája (*R. hipposideros*), és az *I. collaris* fajt (*R. affinis*, *Hipposideros pomona*) Euráziában allopatrikus földrajzi elterjedésűek, tehát míg az előbbi a Himalájától nyugatra fordul elő, addig az utóbbi két denevérfaj a Himalájában és attól keletre. Ez (és minden bizonnyal a *niche* elkülönülés egyéb tényezői is) szelekciós nyomásként hathattak e denevérfajok evolúciós elkülönülésekor (amit filogenetikai csoportosulásuk is jelez) éppúgy, mint kullancsaik esetében, tehát az *I. vespertilionis* és az *I. collaris* fajok eltérő irányú fejlődésekor.

Az *I. vespertilionis* fajt mindig is ritkának tartották Délkelet-Ázsiában, ami részben megmagyarázza, hogy miért nem vizsgálták e kullancsfajt összehasonlító morfológiai szempontból részletesen ebben a térségben. Az *I. vespertilionis* leírása Japánból azt tükrözi, hogy számos vonásában osztozik az *I. collaris* új fajjal, így például a pajzs alakjában, a gnathosoma ventrális gallérszerű peremében és a Haller-féle szerv elülső gödrének érzéksertéi csoportosulása szempontjából. Ezért, főként ha még figyelembe vesszük a vietnámi és a Japánból származó denevérkullancsok filogenetikai viszonyait, lehetséges, hogy az *I. collaris* Japánban is előfordul. Ráadásul, mivel a *R. affinis* az új kullancsfaj fontos gazdájának tűnik (amint erre itt rámutattunk), és e denevérfajt az *I. vespertilionis* fő gazdjaként írták le Dél-Kínában, feltételezzük, hogy az *I. collaris* széles körben elterjedt Délkelet-Ázsiában.

Következésképpen, első alkalommal írtam le egy vietnámi denevérkullancs-faj összes stádiumát. Mivel az *I. vespertilionis* és e kullancsok között lényeges genetikai és morfológiai különbségeket találtunk, ezek alapján az utóbbiak külön, új fajba tartoznak, amelynek az *I. collaris* Hornok, 2016 nevet adtuk.

4.2. Kullancsok és egy óvantag közvetítette kórokozó új rendszertani viszonyai

4.2.1. Madarak kullancsainak (*Ixodes*, *Hyalomma* és *Haemaphysalis* spp.) filogenetikai vizsgálata

A madarak fontos szerepet játszanak a kullancsok és kullancs közvetítette kórokozók rövid- és hosszú távú terjesztésében. Közép-Európában, így Magyarországon is a vonuló madarak egzotikus kullancsfajokat hozhatnak magukkal a mediterrán térségből vagy akár távolabbról. Szintén ismert, hogy a madarak fontos gazdái a régió helyi (honos) kullancsfajainak. Ezeknek a korábbi tanulmányoknak az eredményeit kívántuk nagyobb mintaszámmal kiegészíteni és a gyűjtött kullancsokat szélesebb körben (genetikailag is) összehasonlítani. Jelen vizsgálatunk célja tehát az volt, hogy átfogó képet nyújtsunk a közép-európai énekesmadarakat – részben vonulási időszakukban – fertőző kullancsfajok faji és genetikai diverzitásáról, majd az így kapott adatokat földrajzi és ökológiai összefüggésben értelmezzük.

A 2012-2014 közötti időszakban összesen 3339 kullancsot gyűjtöttünk 1167 énekesmadárról, amelyek 47 fajba tartoztak. A két leggyakoribb kullancsfajnak az *Ixodes ricinus* és a *Haemaphysalis concinna* bizonyult, 2296 (68,8%) illetve 989 (29,6%) példánnyal, amelyek kizárólag lárvák és nimfák voltak. A vizsgálati periódusban 48 *I. frontalis* mintát is sikerült gyűjtenünk, többségében (79,2%) vörösbegyőről (*Erithacus rubecula*). Az egzotikus (termofil és hazánkban nem honos) kullancsfajok közül három *Hyalomma* nympa került elő mezei posztátáról (*Sylvia communis*), amelyek morfológiailag a *Hy. rufipes* fajra emlékeztettek. Ezenfelül, két *I. festai* fajúként azonosított nőtényt találtunk zöldikén (*Carduelis chloris*) és erdei szürkebegyen (*Prunella modularis*).

A felmérés legfontosabb kullancsfertőzött madárfajait összehasonlítva megállapítható, hogy az *I. ricinus* és az *I. frontalis* lárvák és nimfák többsége (69,1% és 91,7%) jellemzően földről táplálkozó madárfajokon fordult elő, míg a *Ha. concinna* fejlődési alakjainak 73,9%-a magasabban (a föld felett) táplálkozó madarakon, ami erősen szignifikáns összefüggés volt. Ugyanakkor a kullancsfertőzöttség intenzitása nem mutatott szignifikáns különbséget a madarak testsúly és vonulási távolság (rezidens, illetve rövid vagy hosszú távú vonulók) szerint megkülönböztetett kategóriái között.

A 46 molekulárisan elemzett *I. frontalis* példány között, amelyek *cox1* gén szakaszát szekvenáltuk, egyértelműen két genetikai vonal különült el, mindkettő kilenc haplotípussal. E két genetikai vonal elkülönülése a törzsfán magas (100%) támogatottságú volt. A 16S rRNS gén filogenetikai elemzése megerősítette a két *I. frontalis* genetikai vonal elkülönülését.

A *Hyalomma* nympa *cox1* és 16S rRNS szekvenciája a legnagyobb hasonlóságot a *Hy. rufipes* fajjal mutatta. A molekulárisan vizsgált 12 *Ha. concinna* minta között hat különféle *cox1* haplotípust találtunk. A törzsfán e hat *cox1* haplotípus két genetikai vonal mentén csoportosult, magas (100%) támogatottság mellett. Ezek egy részét nagymértékű (99,7%) azonosság jellemezte a *Ha. concinna* távol-keleti izolátumaival (Japánból és Kelet-Szibériából).

Vizsgálatunk szolgáltatta az első, molekulárisan is megerősített bizonyítékát annak, hogy Közép-Európában a madarak szállíthatják a *Hy. rufipes* éretlen fejlődési alakjait. Ezen kívül, első

alkalommal találtuk meg az *I. festai* fajt Magyarországon. Két genetikai marker molekuláris és filogenetikai vizsgálata alapján eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy Közép-Európában a madarak az *I. frontalis* kullancsfaj két külön genetikai vonalát hordozzák. E genetikai vonalak elkülönültsége mind a *cox1*, mint a 16S rRNS gén szempontjából magas támogatottságú. Figyelemreméltó, hogy a két vonal közötti *cox1* szekvencia eltérés (9%) meghaladja a kullancsok faji határaként megjelölt (tehát az azonos fajú kullancsok közötti maximális eltérés) mértékét (6.1%). A *Ha. concinna* fejlődési stádiumai szignifikánsan gyakrabban fordultak elő jellemzően magasabban (a föld felett) táplálkozó madárfajokon, ami azzal magyarázható, hogy e kullancsfaj gazdakeresés közben relatíve magasabb helyet foglal el a növényzeten, a lárvák és nymphák hazánkban legkedveltebb gazdafaja, az őz méretével összefüggésben.

Ezek az eredmények rámutatnak a madarak nyugati és keleti vonulási kapcsolatai fontosságára (ami kiegészíti a déli irány ebből a szempontból már ismert jelentőségét). Ez a lehetőség a kullancs közvetítette kórokozók terjedése kapcsán is figyelmet érdemel.

4.2.2. Ragadozók és denevérek kullancsainak (*Ixodes* spp.) filogenetikai vizsgálata

A *Pholeoixodes* alnemet tagjainak eltérő ökológiai és morfológiai jellemzői alapján emelték. E csoport tagjai rendszerint búvóhelyként üreget használó ragadozókon (Canidae, Mustelidae), rovarrevőkön (Erinaceidae) és odú- vagy üreglakó madarakon fordulnak elő. A Nyugat-Palearktikum ide tartozó fontos fajai az *Ixodes canisuga* Johnston, 1849, *I. kaiseri* Arthur, 1957, *I. crenulatus* Koch, 1844, *I. hexagonus* Leach, 1815 and *I. rugicollis* Schulze & Schlottke, 1929. A *Pholeoixodes* alnem tagjaira vonatkozó szakirodalmi adatok gyakran ellentmondásosak (például összetéveszthetőségüket tükrözik a különböző fajnév alatt megjelent azonos szekvenciák). Ilyen esetben a típuspéldányok morfológiai összehasonlítása újonnan gyűjtött példányokkal, majd ez utóbbiak morfológiai és genetikai elemzése tisztázhatja a problémát. Ennek megfelelően, jelen vizsgálatunkhoz kullancsokat gyűjtöttünk kutyákról, rókákról és borzokról Európa kilenc országában, majd ezeket a példányokat morfológiai és filogenetikai szempontból elemeztük.

Összesen 144, a *Pholeoixodes* alnembe tartozó kullancsból vontuk ki a DNS-t. Ezek a következők voltak: 113 (típuspéldányhoz hasonlított) nőstény, 30 nympa, egy hím. Így 84 *I. canisuga*, 34 *I. kaiseri* és 26 *I. hexagonus* DNS mintát vizsgáltunk. Az *I. canisuga* fajúként azonosított kullancsoknak 11 *cox1* haplotípusa volt, amelyek közül egyesek földrajzi eloszlása egyértelmű mintázatot követett. Az *I. kaiseri* fajúként azonosított kullancsoknak kilenc *cox1* haplotípusa volt, amelyeket nagyobb fokú polimorfizmus jellemzett az *I. canisuga* fajhoz képest. E haplotípusok előfordulása Közép- és Délkelet-Európára korlátozódott. Az *I. hexagonus* fajúként azonosított kullancsoknak öt *cox1* haplotípusa volt, amelyek közül egyet csak Németországban és Ausztriában találtuk meg, míg a többi délkelet-európai elterjedésű volt.

A *cox1* és 16S rRNS haplotípusok filogenetikai viszonyai alátámasztották a három *Pholeoixodes*-faj morfológiai eltéréseit, mivel az utóbbi (főleg a hypostoma tövéénél a fejalap felépítése) szerint hasonló példányok a törzsfán egymás közelébe kerültek. Mindkét törzsfá topológiája azt tükrözte, hogy a *Pholeoixodes* subgenus nem monofiletikus. Az *I. kaiseri* és az *I. hexagonus* mintái testvércsoportot alkottak, míg az *I. canisuga* egyedei közelebbi rokonságban álltak a denevérkullancsokkal (*I. vespertilionis*, *I. ariadnae* és *I. simplex*: subgenus *Eschatocephalus*). Így tehát összességében a *Pholeoixodes*-fajok filogenetikai csoportja magában foglalja a denevérkullancsok kládját.

4.2.3. A *Haemaphysalis erinacei* filogenetikai vizsgálata

A *Haemaphysalis erinacei* Pavesi, 1884 Európától (mediterrán térség) egészen Közép-Ázsiáig elterjedt és adult stádiumban főként ragadozókat, sünféléket fertőz. Azon kevés kullancsfaj közé tartozik, amelyeknek valid alfajai vannak. Az alfaj általános definíciója magában foglalja a földrajzi elkülönülést, de a morfológiai megkülönböztethetőséget is. Ez utóbbi nem olyan egyértelmű a mediterrán *H. e. erinacei* és a délkelet-európai, közel-keleti elterjedésű *H. e. taurica* között, mint ez utóbbi és a közép-

ázsiai *H. e. turanica* között. Hasonló okból, egyes szerzők három, míg mások négy alfajt ismernek el e fajon belül. Az ilyen és hasonló ellentmondások dacára eddig nem végezték el a *H. erinacei* alfajainak molekuláris és filogeográfiai összehasonlítását, amit ezzel a vizsgálattal igyekeztünk pótolni. Munkánk fő apropója a faj első megtalálása volt Romániában.

E tanulmányban 26 *H. erinacei* példányt vizsgáltunk, amelyek mindhárom alfajt képviselték. A romániai, törökországi *H. e. taurica* és az olaszországi *H. e. erinacei* *cox1* és 16S rRNS szekvenciái között alacsony (2% alatti) eltérés volt. Azonban a romániai *H. e. taurica* és a közép-ázsiai *H. e. turanica* közötti szekvencia eltérés nagy volt (5,4%-ig a *cox1* génben, és 7,3%-ig a 16S rRNS génben), tehát meghaladta a közeli rendszertani rokonságban álló kullancsfajok közötti várható (átlagos) eltérést (ami 5,3% a 16S rRNS gén esetében). A *cox1* és 16S rRNS törzsfák topológiája jól tükrözte a *H. e. taurica*, *H. e. erinacei* és *H. e. turanica* alfajok közötti szekvencia eltéréseket. Nevezetesen, a *H. e. taurica* és *H. e. erinacei* mintái egymáshoz közel csoportosultak, de távol a *H. e. turanica* alfajtól. Ez az elkülönülés magas támogatottságot kapott.

Számos tényező hozzájárulhatott ehhez az elváláshoz és a különbségek elmélyüléséhez, fennmaradásához. A jégkorszak(ok) idején a Kaszpi-tengerrel összefüggő jégtakaró okozhatta a *H. e. taurica* és a *H. e. turanica* kelet-nyugati irányú szétválását. A későbbiekben pedig az utóbbiak populációi közötti rendszeres genetikai keveredést gátolhatta, hogy madarak csak ritkán hordoznak *H. erinacei* fajba tartozó kullancsokat, míg tipikus gazdái (vagyis a ragadozók és a sünök) nem vándorolnak illetve tesznek meg nagy távolságot, ami megakadályozza a kontinentális régiók közötti génkicserélődést. Következésképpen, a *H. erinacei* alfajok általunk végzett (világviszonylatban első) filogenetikai összehasonlítása az ellen szól, hogy a három alfaj azonos taxonómiai rangú (mint jelenleg). Nevezetesen, a *H. e. turanica* alfaj Kínából származó egyedei és a *H. e. taurica* alfaj Romániából származó egyedei közötti genetikai eltérés mértéke meghaladja a rendszertanilag közeli fajok közötti átlagosan megállapítható különbséget. Ez arra enged következtetni, hogy – különösen a régóta ismert morfológiai különbségek figyelembevételével – ezek külön fajt képviselnek.

4.2.4. A *Babesia vesperuginis* filogenetikai vizsgálata

A *Babesia vesperuginis* az egyetlen olyan piroplasma, amelyről ismert, hogy denevéreket fertőz. Azt feltételezik, hogy – az emlősöket fertőző babesiák túlnyomó többségével szemben – nem kullancs, hanem óvantag (*Argas vespertilionis*) vektorral rendelkezik. Nemrég két tanulmány is született a *B. vesperuginis* filogenetikai viszonyairól, és mindkettő alaphelyzetben mutatta a *Babesia sensu stricto* kládon belül. Mindazonáltal, e korábbi törzsfákon nem szerepelt minden fontos piroplasma csoport, és csak egy génre (18S rRNS) épültek. Újabb vizsgálatunk célja tehát az volt, hogy első ízben nyerjünk *cox1* szekvenciát a *B. vesperuginis* hazai mintájából, és ezt megvizsgáljuk szélesebb filogenetikai összefüggésben.

Ez volt a *B. vesperuginis* első, átfogó filogenetikai összehasonlítása, amely két génre épült. Vizsgálatunk során e piroplasma *cox1* génjét először sikerült felerősíteni denevér óvantagokból (*A. vespertilionis*), illetve első alkalommal magyarországi mintából. *Cox1* génje alapján a *B. vesperuginis* a *Babesia sensu stricto* kategórián kívülre került (96% támogatottság mellett), közel a *Cytauxzoon felis* fajhoz és a theileriákhoz. Az összefűzött (konkatenált) *cox1* és 18S rRNS gén szekvenciák filogenetikai vizsgálata mindkét alkalmazott modellel hasonló topológiájú törzsfát eredményezett. Nevezetesen, a *B. vesperuginis* a klasszikus babesiáktól külön ágra került, magas támogatottsággal (88-99%). Ezen felül a *B. vesperuginis* vagy a "prototheilerida" *B. conradae* és a theileriák, *C. felis* alkotta filogenetikai csoport mellé került, vagy a *B. conradae* fajjal a Theileriidae család kládjának testvércsoportját alkotta. A szóban forgó fajok morfológiai és fejlődéstani jellegzetességei (például: osztódó alakok, "tetrádok") szintén alátámasztják a *B. vesperuginis* fenti filogenetikai viszonyait, tehát hogy közelebbi rokonságban van a theileriákkal, mint a babesiákkal, és legközelebbi rokonai a *C. felis* és a *B. conradae* lehetnek.

Összességében, a vizsgálatunk során kapott törzsfák azokat a filogenetikai viszonyokat tükrözik (tehát ugyanazon öt fő piroplasma csoport elkülönülését), amelyeket más szerzők nemrég a *cox1* aminosav sorrendre vagy a konkatenált mitochondriális + 18S rRNS gén nukleotid szekvenciákra épülő

törzsfák esetében kaptak. Az elvégzett *cox1* szekvencia összehasonlítások és törzsfa elemzések egyértelműen azt támasztják alá, hogy a *B. vesperuginis* – nevével ellentétben – nem tagja a szorosabb értelemben vett *Babesia*-fajok filogenetikai csoportjának, hanem külön ághoz tartozik, legközelebbi rokonságban a *C. felis* és a *B. conradae* fajokkal. Ennélfogva, a *B. vesperuginis* egyedülálló és taxonómiaiilag fontos fajnak számít, amelynek szerepelnie kell a Piroplasmida rend filogenetikai viszonyainak átfogó vizsgálatát célzó tanulmányokban.

4.3. Kullancsfajok tér- és időbeli előfordulása

4.3.1. Természetes élőhelyek hatása a kullancsfajok előfordulására, szezonálisára hazánkban

Magyarországon az utolsó, országos szintű kullancsfelmérést mintegy 50 éve végezték. Azóta is közöltek eredményeket a kullancsok hazai előfordulásáról, de különféle gazdafajokról (kutyákról, rókákról), és ilyen esetben a kullancsok pontos származási helye, eredeti élőhely típusa nem állapítható meg. Jelen vizsgálatunk célja ezért olyan országos felmérés volt, amelynek során a növényzetről gyűjtöttünk kullancsokat és így ez utóbbi adatokat is figyelembe tudtuk venni.

2007 márciusa és júniusa között összesen 3442 kullancsot gyűjtöttünk, amelyek hat fajba tartoztak. Az *Ixodes ricinus* mind a 37 gyűjtési helyen előfordult, közülük néhányon egyedüli fajként. Helyi példányszáma alapján az *I. ricinus* leginkább dús, zöld növényzetű (nedvesebb) erdei élőhelyen fordult elő, kevésbé a szárazabb vegetációjú legelők vagy rétek mentén.

A két *Dermacentor*-faj a legtöbb helyen szimpatrikus volt, azonban csak a *D. reticulatus* fordult elő Délnyugat-Magyarországon, míg néhány helyen (többnyire legelőkön) az ország északi részén csak a *D. marginatus* került elő. A felmérésben gyűjtött három *Haemaphysalis*-faj közül a *H. inermis* és a *H. concinna* élőhelyei kevésbé voltak regionálisak (tehát e fajok az ország több részében is gyűjthetők voltak), szemben a *H. punctata* fajjal, amelyet mindössze két élőhelyen (északon) találtunk meg.

Összehasonlítva az élőhelyek három vizsgált típusát az egyes kullancsfajok aktivitásának időbeli különbségei szempontjából, megállapítható, hogy a száraz legelők mentén az *I. ricinus* csúcsidőszaka másfél hónappal követte a *Dermacentor*-fajokét, míg ez a különbség elmaradt a részben száraz vegetációjú erdei réteken. Ez utóbbi élőhelyen a *H. inermis* maximális egyedszámát legalább egy hónappal a *H. concinna* aktivitási csúcsa előtt érte el, míg ez a különbség elmosódott a sűrű, zöld aljnövényzetű erdőkben. A hőmérsékletfüggő fejlődési sebesség okozhatta a *Dermacentor*-fajok mint nyílt térséget kedvelő kullancsok későbbi aktivitási csúcsát a hegyi rétek hidegebb körülményei között a melegebb, száraz legelőkhez képest. Egy másik tényező, ami legelői környezetben a *Dermacentor*-fajok korábbi aktivitását előmozdíthatta, az a háziállatok mint gazdák e biotóp típusra jellemző szabályszerű és "biztosított" jelenléte kora tavasztól (a legeltetési időny kezdetétől), szemben a vadak hegyi élőhelyeken való véletlenszerű felbukkanásával.

Az ún. erdei kullancsok csoportjában a *Haemaphysalis*- és különösen az *Ixodes*-fajok jobban fejlődnek olyan helyen, ami magasabb nedvességtartalmat kínál, ahogy ez a sűrű, zöld növényzetű erdei ösvények mentén jellemző, és lassabban a hegyi rétek szélén előforduló, részben száraz növényzet alatt. A 2007-es vizsgálat eredményei először mutattak rá, hogy a *H. inermis* hazánkban nagyon gyakori, és azt is sugallták, hogy a *H. punctata* egyedszáma lecsökkent.

A fenti eredmények értelmében fontos, hogy a kullancsfajok idő- és térbeli eloszlásának változásait figyelemmel kísérjük, és eközben számításba vegyük az élőhelyek közötti különbségeket.

4.3.2. A hazánkban előforduló fontosabb kullancsfajok szezonálisitása

Korábbi hazai felmérésünkben a tavaszi kullancs aktivitás idején végeztük a gyűjtést, így nem volt alkalmunk a legfontosabb kullancsfajok éves szezonális aktivitását összehasonlítani. Ezért 2008-ban úgy gyűjtöttem kullancsokat a növényzetről Észak-, Északkelet-Magyarország három megyéjében (Pest, Nógrád és Borsod), hogy az felölelje a teljes aktivitási periódust, és figyelembe vegye az élőhelyek közötti különbségeket (tehát mindhárom fő élőhely típus három-három hellyel képviseltette magát).

Ennek vizsgálatához 1479 adult kullancsot gyűjtöttem. Közülük az *Ixodes ricinus* bizonyult a leggyakoribb fajnak, 676 példánnyal. A növényzetről gyűjtött egyedek alapján ennél az egy fajnál figyeltem meg gazdakereső magatartást az év minden hónapjában. Magasabb tavaszi és alacsonyabb őszi aktivitást mutatott, májusi illetve szeptemberi csúccsal. A *Dermacentor marginatus* fajból összesen 153 példányt gyűjtöttem. E faj esetében a legmagasabb szintű aktivitást tavasszal mértem, februári-márciusi csúccsal, amit jelentősen kisebb őszi aktivitás követett. Ezzel szemben, bár a *D. reticulatus* jelenlétét tavasszal is kimutattam a vegetáción, ez sokkal nagyobb mértékű volt ősszel, összesen 260 példány alapján. A *Haemaphysalis* nemből leggyakrabban a *H. inermis* fajt gyűjtöttem, összesen 326 példányt. E faj aktivitása alacsonyabb volt tavasszal és magasabb ősszel, amely utóbbi csúcsa novemberre és decemberre esett. A téli hónapokban a *H. inermis* 4 °C felett aktív volt. A *H. concinna* fajból 54, a *H. punctata* fajból pedig 10 példányt gyűjtöttem. Az előbbi monofázisos, késő tavaszi aktivitást mutatott, az adult és nympa stádiumú kullancsoknak a növényzeten megfigyelt, egyidejű jelenlétével; míg a *H. punctata* adultok gazdakereső aktivitását kora tavasszal, februártól tapasztaltam.

A fenti eredmények értelmében mind a *Dermacentor*, mind a *Haemaphysalis* nemben belül az egyes fajok időben eltolódott, egymás melletti (ún. allokrónikus) szezonalitást mutattak. Az ivararány szempontjából elmondható, hogy a gazdakereső populáció az év egészében a nőtények túlsúlyával jellemezhető, kivéve a *H. concinna* (29 hím és 25 nőstény) és a *H. punctata* (5 hím és 5 nőstény) fajokat.

Figyelembe véve, hogy hazánkban a *Haemaphysalis* nem képviselői közül korábban a *H. inermis* fajt tartották a legritkébbnek, jelen vizsgálatomban viszont a leggyakoribbnak bizonyult, a *H. inermis* növekvő jelentőségű ("emerging") fajnak tekinthető. A korábbi évekből közölt adataihoz képest 2008-ban a *Dermacentor*-fajok aktivitási csúcsa körülbelül 1-2 hónappal korábbra tolódott. Hasonlóképpen, a *H. inermis* kullancsfaj 2008 első felében február-márciusi fő aktivitást mutatott, a 2007-ben leírt április-májusi helyett, és a *H. punctata* szintén egy hónappal hamarabb érte el aktivitási csúcsát 2008-ban, mint korábban. E négy kullancsfajjal szemben az a kettő, amelyek későbbi csúcsidezakkal jellemezhető, nem vagy alig mutatott eltérést szezonálisában. Ezek az adatok megerősítik, hogy a téli időjárás leginkább bizonyos kullancsfajok nyugalmi állapotának végét befolyásolja, mégpedig elsősorban azon kullancsfajokét, amelyek adultként a kora tavaszi populációban vannak jelen. Az eredmények azt is sugallják, hogy a *Dermacentor* és *Haemaphysalis* nemek két-két fajának szezonális markánsabban változott 2008-ban 2007-hez képest. Ennek értelmezéséhez figyelembe kell venni, hogy 2006/2007 tele a meteorológiai adatrögzítés történetében a legenyhébb volt, ezzel szemben, 2008 január és február hónapja összességében nem volt enyhe, viszont mindkét hónapban bekövetkezett egy-egy hirtelen hőmérsékletnövekedés (az utóbbi esetében 8 nap alatt 16 °C-kal nőtt a napi középhőmérséklet, és a február 17.-én mért -17.3 °C minimumról február 25.-re 21 °C maximum lett). Így arra a következtetésre juthatunk, hogy egy folyamatosan enyhe télhez képest az egymást követő téli napokon hirtelen megnövekvő hőmérsékletnek fontosabb szerepe lehet a kullancsok téli nyugalmának korábbi befejeződésében és így a gazdakereső aktivitás folytatásának kiváltásában.

Ha összehasonlítjuk az egy nembe tartozó kullancsfajokat aktivitási csúcsuk szerint, a jelen felmérésben allokrónikusságot (időbeli elválasztottságot) figyelhetünk meg a két *Dermacentor*-faj szezonális között (tavaszi vs. őszi dominancia) éppúgy, mint a három *Haemaphysalis*-faj esetében (kora tavaszi, késő tavaszi illetve késő őszi csúcs). Minthogy a szóban forgó fajok gyakran szimpatrikusak, és gazdaspektrumuk átfedő, feltételezhetjük, hogy e szezonálisbeli különbség – mint a reprodukciós izoláció ökológiai mechanizmusa – szerepet játszhatott e nemeken belül a több irányú evolúcióban (fajképződésben: "allokrónikus speciációban").

4.3.3. Városi élőhelyek hatása a kullancsfajok előfordulására, szezonálisára

A városi élőhelyek egyfelől előnyökkel is járhatnak a kullancsok számára, mivel – a szélesebb gazdaspektrumú fajok – akár emberre, akár (házi és vadon élő) állatokra felkapaszkodhatnak. Ugyanakkor az alkalmas élőhelyek eloszlása nem folytonos, mint a természetes környezetben, hanem töredezett (mozaikszerű), ami hátrányt jelent a városokban élő kullancsfajok számára gazdán kívüli periódusuk

szempontjából. Hazánkban eddig nem volt széleskörű kullancsfelmérés a legnagyobb városban, Budapesten, amely átfogó információt nyújthatott volna az ott előforduló fajokról. Célunk e hiányzó adatok pótlása volt, különféle városi kullancs élőhelyek összehasonlításával.

A 2013-as vizsgálat során városi élőhelyeken (erdőkben, parkokban és temetőekben) összesen 2455 kullancsot gyűjtöttünk, amelyek négy fajba tartoztak. A 30 gyűjtési hely közül mindössze egy parkban nem találtunk kullancsokat (itt a növényzetet ápolták, a fűvet rendszerint nyírták). A városi élőhelyeken leggyakoribb kullancsfajnak az *Ixodes ricinus* bizonyult, 78,6%-os abundanciával. A 29 kullancs élőhely közül 27 esetében sikerült ezt a fajt megtalálni. A négy, városi környezetben gyűjtött kullancsfajt figyelembe véve az *I. ricinus* élőhelyei voltak a legközelebb a városközponthoz (1 km-en belül is). Tizenhat gyűjtési helyen csak *I. ricinus* fordult elő, és az 5 temető közül négyben csak ezt a kullancsfajt sikerült megtalálni.

A *Haemaphysalis concinna* abundanciája 17,8% volt. E fajt a 29 kullancs élőhely közül 6 esetében találtuk meg. Az *I. ricinus* fajhoz hasonlóan, a *H. concinna* is előfordult mindhárom élőhely típusban. A harmadik leggyakoribb kullancsfaj, a *Dermacentor reticulatus* abundanciája 3,6% volt. Annak ellenére, hogy jelenléte két élőhely típusra korlátozódott (parkok és erdők), kilenc élőhelyével elterjedtebbnek tűnt, mint a *H. concinna*. A negyedik azonosított faj, a *D. marginatus* képviselője egyetlen nőstény volt onnan, ahol a közelben szarvasmarhát és lovat tartottak. Leggyakrabban az *I. ricinus* és a *D. reticulatus* fordult elő együtt (hét helyen), amit sorrendben az *I. ricinus* és a *H. concinna* együttes jelenléte követett hat helyen. E három faj azonos élőhelyen is megtalálható volt (két parkban).

Áprilistól júniusig az *I. ricinus* élőhelyenként összesített átlagos egyedsűrűsége a parkok és erdők között kiegyenlített volt, míg temetőben április hónapban szignifikánsan magasabb volt a parkokhoz képest, és júniusban is a parkokhoz és az erdőkhez képest.

A 2013-as vizsgálat során a vegetációról négy kullancsfajt (*I. ricinus*, *H. concinna*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*) sikerült gyűjteni Budapesten. Az *I. ricinus* és a *H. concinna* széleskörű elterjedtsége (tehát, hogy minden élőhely típusban előfordultak) jellemző gazdáik (kis emlősök, madarak) ubikviter jelenlétével állhat összefüggésben. A gazdakereső *I. ricinus* példányok legnagyobb egyedsűrűségüket a temetők elhanyagolt vagy használaton kívüli részeiben érték el. Mivel ezeken az élőhelyeken gazdakereső lárvák is voltak a növényzeten, ez a magas egyedszám leginkább helyi *I. ricinus* populációknak tulajdonítható. Az *I. ricinus* temetőben való fokozott előfordulásához (nagyobb helyi egyedsűrűséghez) vezető okok közül kiemelhető a kullancsok potenciális "beszállítóinak" szerepe (madarak, amelyek előszeretettel fészkelnek temetőben, ahol kisebb a ragadozók száma) illetve a kullancsok "elszállítóinak" kisebb temetői szerepe (a nagyvadak a növényzetről jelentős mennyiségű adult kullancsot vihetnek el, és ennek megfelelően – a szarvasok helyi hiánya következtében – ismert, hogy kisebb, zárt élőhelyeken ez a kullancsok aktivitásának növekedéséhez vezet). Ezen kívül, a sűrű, folytonos és vágatlan temetői aljnövényzet (ami segít megőrizni a magas nedvességtartalmat a talajszinten), és gyakran a parkokénál zártabb felső vegetáció (ami megakadályozza a közvetlen napfény bejutását) szintén hozzájárulhatott a temetői magas kullancs egyedsűrűséghez.

A *D. reticulatus* városi élőhelyeken való előfordulása (urbanizációja) ismert, mivel ez a kedvencként tartott kutyákról gyűjthető leggyakoribb kullancsfaj. Másfelől, a kutyáknak és nagyvadaknak mint e kullancsfaj adult hordozó (reprodukciós) gazdáinak hiánya temetői környezetben megmagyarázhatja e kullancsfaj hiányát ezen élőhely típusból.

Következésképpen, a kullancsokkal való fertőződés esélyei magasak lehetnek városon belül is, de ez nagy mértékben függ az élőhely típustól, ami főként a növényzet eltéréseiből és a kullancshordozó gazdák jelenlétének különbségeiből adódik.

4.3.4. Az autópálya mint mesterséges barrier hatása a kullancsok előfordulására

Az emberi létesítmények (városok, utak) ökológiai hatása ismert: többek között a természetes élőhelyek feltöredezettségét okozhatják. Az ilyen hatásnak kitett madarakat, emlősöket leginkább önma-
gukban véve tanulmányozták, nem pedig kullancsgazdaként; annak ellenére, hogy a kullancsok előfordulása nagy mértékben függ gazdafajaik jelenlététől, amely utóbbiakat a mesterséges akadályok

mozgásukban, populációik érintkezésében akadályozhatják. Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy egy olyan objektum (autópálya) mentén vizsgáljuk meg a kullancsok előfordulását, amely a nagyvadak szempontjából szinte átjárhatatlan akadályt jelent.

A 2016-os vizsgálatban egy autópálya két oldalának háromféle élőhelyén 887 kullancsot gyűjtöttünk. Ezek faji megoszlása a következőképpen alakult: 704 *Ixodes ricinus* (79,4%), 51 *Dermacentor reticulatus* (5,7%), 78 *D. marginatus* (8,8%), 35 *Haemaphysalis inermis* (3,9%) és 19 *H. concinna* (2,1%). Kullancsfajonként összehasonlítva, nem volt szignifikáns különbség az abundanciában azonos élőhely típuson belül, csak a rétek és a ligetek esetében, mivel ezeken a *Dermacentor*-fajok csak az autópálya egyik oldalán fordultak elő. A *Dermacentor*-fajok mint ún. nyílt térséget kedvelő kullancsok fő élőhely típusai a legelők, rétek. A hőmérséklet és a páratartalom valószínűleg nem okozhatta ezt az egyértelmű különbséget az autópálya két oldala között, mert azok nem tértek el jelentősen, és a *Dermacentor*-fajok az abiotikus tényezők szélsőséges értékeivel szemben is nagyfokú toleranciát mutatnak. Másfelől ismert, hogy a főbb gazdafajok jelenléte vagy hiánya kulcsfontosságú a kullancsok horizontális eloszlása szempontjából. Így, a *Dermacentor*-fajok jelenléte az egyik élőhelyen összefügghet a vadászterület közelségével, és a nagyvadak (szarvasfélék, vaddisznók) egyedsűrűségével, továbbá a közepes méretű ragadozók (vörös róókák) és kutyák, lovak jelenlétével, amelyek mind az adult *dermacentorok* (reprodukció) gazdái. Ezt a vadászterületet azonban az autópálya elválasztotta egy szomszédos hasonló élőhelytől, és az autópályát határoló vadvédő kerítések megakadályozták, hogy a nagyvadak átjussanak az autópályán. Ennek megfelelően, más vizsgálatokban is arra a megállapításra jutottak, hogy a gímszarvas (és a házi patások) hiánya a *Dermacentor*-fajú kullancsok helyi előfordulása, eloszlása szempontjából korlátozó tényezőnek számít.

Összességében elmondható, hogy az elkerített autópálya két oldalán jelentős különbség mutatkozhat azon kullancsok előfordulásában, amelyek adultjainak fő gazdái (leginkább a kerítések miatt) mozgásukban akadályozottak (ilyenek a *Dermacentor*-fajok), de úgy tűnik, nincs eltérés olyan kullancsfajok esetében, amelyeknek mozgásukban autópálya által nem akadályozott fontos terjesztői vannak (például az *I. ricinus* és a *H. concinna* esetében sünök, madarak). Az autópályák tehát hozzájárulhatnak a kullancsfajok diverzitásának helyi különbségeihez, de kullancsfajtól függő módon.

4.3.5. A természetes barrierekkel elválasztott (barlangi) denevérkullancs populációk genetikai heterogenitása

A legtöbb generalista kullancsfaj gazdaspektrumát jelentő emlős- és madárfajok között rendszerint vannak olyanok, amelyek populációi érintkeznek, átfednek, ami az általuk terjesztett kullancsok számára is folyamatos reprodukciós kapcsolatot, géncserét biztosít. Azonban kivételt képezhetnek ez alól az egyes barlangokban élő ("specialista") denevérkullancsok, amelyek – hacsak nincs kapcsolat a szóban forgó denevérpulációk között – egymástól többé-kevésbé kifejezett reprodukciós izolációban élhetnek. E feltételezés előzetes vizsgálatára kezdtünk hazai, egymáshoz közelebbi illetve távolabbi barlangokból származó hosszúlábú denevérkullancsok genetikai összehasonlításába.

Ebben a vizsgálatban 535 kullancsot gyűjtöttünk: 527 példányt (220 hím, 119 nőstény, 171 nympa, 17 lárv) az *Ixodes vespertilionis* és 8 nőstényt az *I. ariadnae* fajból. Az *I. vespertilionis* populációiban – az alacsony kullancs aktivitással jellemezhető nyári hónapok kivételével – a nem parazitikus hímek túlsúlyban voltak a nőstényekhez képest. A gazdakereső nőstények jelenléte a barlangfalon kiegyenlítettnek tűnt az évszakok között. Azonban a nymphák aránya magasabb volt a tavasz és az őszi folyamán. Lárva március és június között fordultak elő. A vizsgálatban pre-adult fejlődési stádiumokat minden évszakban találtunk, ami folyamatos, egész évben tartó kullancs aktivitásra utalhat a föld alatti (időjárási változásoknak kevésbé kitett) barlangok védett környezetében. Eközben a kullancsok száma a denevérek mint gazdák jelenlétének függvényében emelkedik vagy csökken.

Tizenöt *I. vespertilionis* példányt választottunk ki genetikai összehasonlításra (nyolcat a pilisi Ariadne barlangrendszerből; további hetet pedig más hazai barlangokból). A fő gyűjtési hely három összefüggő barlangjában csak az "A" haplotípust mutattuk ki. Ezt a haplotípust két másik barlangban is megtaláltuk, 20 km-re nyugatra, de egyik másik, távolabbi barlangban sem. Két további barlangban 40

km-re délnyugatra a "C" haplotípus fordult elő, valamint három barlangban kb. 200 km-re keletre illetve dél felé három újabb haplotípus ("B", "D", "E").

A barlangi kullancspopulációk egymástól szeparáltak, ami kedvezhet az eltérő genetikai vonalak létesülésének, populáció szintű állandósulásának (leszámítva az olyan, rendszerint egymáshoz közeli barlangokat, amelyek között denevérmozgás, így "kullancsok cseréje" is megvalósul). Vizsgálatunk adataiból kitűnik, hogy az *I. vespertilionis* fajnak országon belül is igen eltérő haplotípusai léteznek. Csak az "A" és "C" haplotípusok fordultak elő ismételt, és kizárólag egymás közeli barlangokban. Mivel a fő gyűjtőhelyen előforduló "A" haplotípusú kullancsokat nem találtuk meg távoli barlangokban (amelyekhez további, eltérő haplotípusok tartoztak), ezek az előzetes eredmények arra utalnak, hogy egyes *I. vespertilionis* haplotípusok bizonyos barlangokhoz köthetők. Mint az denevérgyűrzési adatokból következtethető, a fő gyűjtési hely három barlangja és a két nyugatabbra fekvő közeli barlang között – ahol az "A" haplotípus még előfordult – van denevérmozgás, ami lehetővé teszi az *I. vespertilionis* átvitelét. Másfelől a nagy távolság, a hegyvonulatok vagy a denevérmozgás (vándorlás) más korlátozó tényezői megakadályozhatják a távolabbi barlangok közötti kapcsolatot (és így a kullancsok denevérek közreműködésével megvalósuló géncseréjét).

Következtetésképpen, az *I. vespertilionis* egész évben aktív hazánk barlangjaiban, de jelentősebb számban az ősz, a tél és a tavasz folyamán, míg kisebb számban "átnyaraláskor". Úgy tűnik, a barlangok mikrokörnyezete (amely a távolabbi barlangoktól jól elválasztott) kedvez allopatrikus haplotípusok kialakulásának és fennmaradásának, ami összefügg a barlangok közötti távolsággal és a bizonyos barlangokat összekötő denevérmozgással.

4.4. Kullancs közvetítette kórokozók tér- és időbeli előfordulása

4.4.1. Kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulása épületen belül

Annak ellenére, hogy az emberrel együtt élő (synanthrop) rágcsálók milyen gyakran fordulnak elő épületekben, járványtani szerepüket a kullancs közvetítette (illetve tágabb értelemben *vector-borne*) kórokozók szempontjából ritkán vizsgálják. Ennek részben az az oka, hogy más rágcsálókhoz képest a házi egerek (*Mus musculus*), vándorpatkányok (*Rattus norvegicus*) kevésbé jellemzően kullancs fertőzöttek. Hasonlóképpen, egyes "hemisynanthrop" rágcsálókra, így a törpeegérre (*Micromys minutus*) is ritkán kapaszkodnak kullancsok, noha élőhelyén osztozhat nála gyakrabban kullancs fertőzött rágcsáló fajokkal. Ugyanakkor ezeken a rágcsálókon is sokszor előfordulnak más vérszívó ízeltlábúak (bolhák, atkák), amelyek szintén hordozhatnak *vector-borne* (akár kullancs közvetítette) kórokozókat; ráadásul nem gazdaspecifikusak és adultként többször is vért szívhatnak, ami potenciális kockázati tényezőt jelent az ember fertőződése szempontjából. Ennek felmérése céljából fogtunk az alábbi vizsgálatba.

Az ország északkeleti és déli határa mentén, farm- és lakóépületekben összesen 51 synanthrop rágcsálót fogtunk (37 házi egeret, 14 vándorpatkányt), valamint egy fél-synanthrop fajú egyed (törpeegér). Ektoparazitáik között találtunk bolhákat (tíz egéren), atkákat (három egéren) és vérszívó tetveket (két patkányon), de (élőhelyükből adódóan) nem voltak rajtuk kullancsok. Molekuláris vizsgálatuk eredményeként a *Rickettsia helvetica* DNS-ét mutattuk ki egy házi egérben, illetve három további házi egér bolháiban/atkáiban. Az *Anaplasma phagocytophilum* jelenlétét is igazoltuk egératkákban. A *Borrelia burgdorferi* s.l. fajkomplex DNS-ét egy-egy házi egér és vándorpatkány hordozta, de egyik ektoparazitában sem találtunk PCR-pozitivitást. Végül, de nem utolsó sorban egy egérbolha bartonella-pozitív volt.

A *R. helvetica* kimutatása házi egérből és külső élősködőiből újdonságnak számít. Jóllehet ezt a zoonótikus, kórokozóképes baktériumot vadon élő rágcsálók laelapid atkáiból már kimutatták, úgy tűnik, a mi eredményünk igazolja elsőként házi egérben és ektoparazitáiban (bolháiban és atkáiban) való előfordulását. Az *A. phagocytophilum* egerek atkáiban való előfordulása csoport szinten eddig is ismert volt, azonban a mi vizsgálatunk igazolta elsőként házi egérről gyűjtött *Laelaps algericus* fajban. E két, kullancs (*Ixodes ricinus*) közvetítette kórokozó, a *R. helvetica* és az *A. phagocytophilum* új

előfordulási adatainak potenciális járványtani jelentőségét az támasztja alá, hogy a rágcsálók bolhái és atkái egyaránt szívhatnak vért emberen. A rágcsálók bolhái (a *R. helvetica* fajon kívül) más rickettsiák kompetens vektorai lehetnek, és a kullancsok legközelebbi rokonai, az atkák hordozhatják és potenciálisan át is olthatják az *A. phagocytophilum* fajt. Hasonlóképpen, bár a *Borrelia burgdorferi* s.l. elsődlegesen kullancsok (az *I. ricinus* komplex) által közvetített kórokozó csoport, feltételezések szerint a rágcsálók atkái is terjeszthetik.

E molekuláris vizsgálataink eredményei kompenzálják az emberi környezetben élő rágcsálók és vérszívó ektoparaziták potenciális járványtani jelentőségére vonatkozó ismereteink hiányosságait.

4.2. Kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulása a városközpontban, télen

Az Újvilágban molekuláris módszerekkel már igazolták, hogy egyes denevér ektoparaziták (bolhák, óvantagok, poloskák, atkák) hordozhatnak *vector-borne* bakteriális kórokozókat, így bartonellákat, azonban hasonló adatok hiányoznak a világ számos térségéből. Nemrég bartonellák jelenlétét írták le egy ázsiai és négy európai denevérfajban. Mi a denevérekhez társult bartonellák vektorok általi terjedésének lehetősége szempontjából vizsgáltuk annak első feltételét, nevezetesen, hogy a denevérek vérszívó ektoparazitáiban kimutatható-e bartonella DNS (amit kiegészítettünk további *vector-borne* kórokozók elemzésével is). A vizsgált kórokozók között főként kullancs vektorral rendelkezők voltak, bár a bartonellák esetében erről megosztottak a szakvélemények.

A 2011-ben télen, barlangfalról eltávolított denevérek kullancsok, illetve Budapest belvárosában elgyengülten talált denevérekről gyűjtött külső élősködők molekuláris vizsgálatának eredményei a következők voltak. A hosszúlábú denevérek kullancs (*Ixodes vespertilionis*) egy nőstény példánya *Bartonella*-pozitivitást mutatott. További külső élősködők, amelyek bartonella DNS-t hordoztak, a nyolcfésűs denevérbolha (*Ischnopsyllus octactenus*), két atkafaj (*Steatonyssus occidentalis*, *Spinturnix myoti*) és egy denevérlégy-faj (*Nycteribia* sp.). Valamennyi denevér ektoparazita negatívnak bizonyult a következő kórokozókra: *Borrelia burgdorferi* s.l., *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, haemoplasmák és *Anaplasma phagocytophilum*. Az ötfésűs denevérbolha (*Nycteridopsylla eusarca*) mintája *Rickettsia helvetica* DNS-t tartalmazott.

A vizsgálatban használt ízeltlábúakat általánosságban, csoportszinten tekintve, a *Spinturnix* nembe tartozó atkák és a nycteribid denevérlégyek gazdaspecifikus, permanens ektoparaziták, amelyek rendszerint nem szívnak vért más gazdafajokon, mint tipikus gazdáikon, a denevéreken. A kullancsokat, az óvantagokat és a bolhákat azonban kevésbé szoros gazdafajlagosság jellemzi, és temporer élősködők, amelyek fejlődésmenete részben a környezetben zajlik, így speciális gazdakeresési mechanizmussal és szélesebb gazdakörrel rendelkeznek. Ily módon a kullancsok, az óvantagok és a bolhák jelentősebb szerepet tölthetnek be zoonotikus kórokozók átvitelében, ahogy ezt a denevéroóvantagok emberen való vérszívása is példázza.

Bartonella-pozitivitás mutatkozott az egyik *I. vespertilionis* nőstény esetében, valamint e kullancson kívül bolhában, atkában és denevérlégyekben. Figyelembe véve, hogy a macskabolha (*Ctenocephalides felis*) a *Bartonella henselae* vektoraként ismert, továbbá bartonellákat kimutattak már újvilági denevérbolhából, saját eredményünk (tehát e baktériumok kimutatása egy további bolha nemből és fajból) amellet szól, hogy a denevérbolháknak szerepe lehet a bartonellák átvitelében.

Egy ötfésűs bolha (*Nycteridopsylla eusarca*) *R. helvetica*-pozitív volt. Érdekes, hogy az ugyanarról a denevérről gyűjtött 45, vért szívott (és tartalmazó) atka ugyanebben a tesztben PCR-negatívnak bizonyult. Ez arra utalhat, hogy a szóban forgó bolha már vérszívása előtt hordozta a *R. helvetica*-t. Az a denevér, amelyen a *R. helvetica*-pozitív bolha volt, elgyengült állapotban, a földön feküdt télen Budapest belvárosában, amikor és ahol e baktériumfaj ismert vektora, az *I. ricinus* kullancsfaj nem fordul elő. E szituáció járványtani szempontból azért érdekes, mert a kisebb emlősök bolhái (amelyek emberen csak elvétve fordulnak elő) akár masszív fertőzöttséget is okozhatnak emberen, ha eredeti gazdáik lakóházakban, farm- illetve kerti épületekben vagy azok közelében tartózkodnak, hibernálódnak vagy elgyengülnek, elpusztulnak. Továbbá, a bolhafaj, amelyet itt *R. helvetica*-fertőzöttnek találtunk, télen aktív, szemben a *R. helvetica* kullancs vektorával, az *I. ricinus* fajjal.

Összefoglalásképpen, ezek az eredmények szélesítik bizonyos kullancs közvetítette kórokozók (a *R. helvetica*, esetleg a bartonellák) potenciális vektorainak körét: elsősorban olyan denevér ekto-parazitákkal, amelyek – Európa kontinentális éghajlati viszonyai között – télen is aktívak, szemben e kórokozók kullancs vektoraival. Azon vérszívó ízeltlábúak, amelyek szorosabb gazda-fajlagossággal jellemezhetőek, vélhetően a bartonellák denevérek közötti terjesztéséért felelősek, míg a tágabb gazdaspektrummal rendelkező bolhák (kullancsok) kockázati tényezőt jelenthetnek más emlősök, így az ember felé történő átvitel szempontjából. Első alkalommal állapítottuk meg e zoonotikus ágensek synanthrop denevérfajokkal összefüggő előfordulását városi környezetben, ami egyúttal annak indikátora is, hogy a szóban forgó baktériumokat a repülő denevérek (mint rezervoárok) gyorsan behurcolhatják és akár fenn is tarthatják urbanizált élőhelyen.

4.4.3. Városi élőhelyek hatása kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulására

A városi környezetben végzett kullancs felmérések és e kullancsok molekuláris vizsgálatai *vector-borne* kórokozókra gyakran egyféle kullancs élőhelyet céloznak. Ugyanakkor a városi kullancs élőhelyek meglehetősen heterogének. Alábbi tanulmányunkkal arra szeretnénk volna rávilágítani, hogy egyes városi élőhely típusok befolyásolhatják a kullancs közvetítette kórokozók előfordulási gyakoriságát, így a velük kapcsolatos járványtani kockázatot. Vizsgálatunkat a leggyakoribb európai kullancsfaj, az *Ixodes ricinus* nőtényeire alapoztuk, mivel a két kimutatni tervezett kórokozó (csoport), az *Anaplasma phagocytophilum* és a *Borrelia burgdorferi* s.l. jellemzően transztadiálisan adódnak tovább, így legnagyobb esély a jelenlétükre adult stádiumban van (illetve az *Ixodes*-fajú hímek nem szükség-szerűen szívnak vért).

A 2013-as budapesti kullancsfelmérésben élőhely típusonként megvizsgáltuk az *Anaplasma phagocytophilum* és a *Borrelia burgdorferi* s. l. prevalenciáját *Ixodes ricinus* nőtényekben. Az *A. phagocytophilum* összesített prevalenciája 8,8% volt. A PCR-pozitív minták aránya szignifikánsan alacsonyabb volt temetőken, mint parkokban, illetve mint parkokban és erdőkben együttvéve. Összesen az *I. ricinus* nőtények 40,8%-a volt *B. burgdorferi* s.l. fertőzött. Szignifikánsan kevesebb *I. ricinus* nőtény hordozta e kórokozót temetőken, mint erdőkben.

Ehhez hasonlóan, negatív korrelációt állapítottak meg a kullancsok előfordulási gyakorisága (abundanciája) és azok fertőzöttség extenzitása (prevalenciája) között, éppen az *I. ricinus* és a *B. burgdorferi* s.l. esetében. Ezen eredmények hátterében olyan tényezők állhatnak, mint például a helyi kullancs gazdák jelenlétének, egyedsűrűségének élőhelyfüggő változatossága. Ezek a kullancsgazdák ugyanis különböznek az *A. phagocytophilum* és a *B. burgdorferi* s.l. járványtani ciklusában betöltött rezervoár szerepük szempontjából.

Városi környezetben végzett vizsgálatunk során az *A. phagocytophilum* és a *B. burgdorferi* s.l. prevalenciája *I. ricinus* nőtényekben szignifikánsan magasabb volt, mint amit korábban hazai természetes (vagy vidéki) élőhelyeket mértek. Ezt az eredményt is részben az magyarázza, hogy más-más rezervoárok vannak jelen vagy hiányoznak urbanizált biotópokban és városon kívüli, erdei környezetben. Általában jellemző, hogy az urbanizált élőhelyeken lecsökken a biodiverzitás, de a potenciális kullancsgazdák egyedsűrűsége magasabb lehet (kivéve: nagy emlősök), ami megnövelheti egyes kórokozók átvitelének esélyeit és ezen keresztül prevalenciáját.

Következésképpen, a kullancs közvetítette kórokozókkal történő fertőződés esélyei magasak lehetnek városon belül is, de ez nagy mértékben függ az élőhely típustól, ami elsősorban a kullancs gazdák mint kórokozó rezervoárok jelenlétének helyi különbségeiből adódik.

4.4.4. A *Babesia canis* szezonalitása *Derma-centor reticulatus* kullancsfajban városi élőhelyen

Kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a kullancsokban előforduló kórokozók szezonális prevalencia eltérésére vonatkozóan, és azok is főként Európa legfontosabbnak tartott kullancsfaja, az *Ixodes ricinus*

vizsgálatából származnak. E kullancsfajban az *Anaplasma phagocytophilum* és a *Borrelia burgdorferi* s.l. leggyakrabban a tavaszi periódusban volt kimutatható. Hazai vizsgálatunk során ebben az összefüggésben a kontinens másik kiemelt, növekvő jelentőségű kullancsfaja, a *Dermacentor reticulatus* által átvihető, állategészségügyi szempontból legfontosabbnak tartott kórokozó, a *Babesia canis* szezonális prevalenciáját elemeztük. Munkánk fontos kiindulópontja volt, hogy a kutya babesiosis klinikai eseteinek túlnyomó többségét Közép-Európa egyes városaiban tavasszal jelentették, míg a vektor szerepet játszó *D. reticulatus* magasabb őszi aktivitásáról ismert.

Ebben a 2014-2015-ös vizsgálatban összesen 852 *D. reticulatus* adultot gyűjtöttünk e faj két, korábban azonosított budapesti élőhelyén (I-es élőhely: 621 egyed, II-es élőhely: 231 egyed). A molekulárisan vizsgált kullancsok 8,2%-a volt PCR-pozitív piroplasmákra. A szekvenálás ezek mindegyikében *B. canis* fajt azonosított, amelynek két 18S rRNS genotípusát mutattuk ki ("A" és "B").

Az I-es élőhelyen *B. canis*-fertőzött kullancsokat csak tavasszal találtunk. A kullancsok átlagmérete áprilistól csökkent (ami a populációban a frissen adulttá vedlett nymphákat jelzi), a *B. canis* egyidejű megjelenésével. Hasonlóképpen, a II-es élőhelyen a *B. canis* hordozó kullancsok szignifikánsan gyakoribbak voltak télen és tavasszal, mint ősszel. Ezen az élőhelyen a kullancsok átlagmérete decemberben kezdett csökkenni, ami megfelelt azon periódus kezdetének, amikor a *B. canis*-fertőzött kullancsok egyre növekvő számban jelentek meg. A fertőzött kullancsok aránya február végén volt a legmagasabb (43,5%) és áprilisra lecsökkent. A II. számú élőhelyen a havi átlagos kullancsméret és a *B. canis*-fertőzött kullancsok aránya szeptembertől ápriliséig szignifikáns negatív korrelációt mutatott.

Ezen túlmenően, egy legalább egy hónapos időbeli eltolódást figyeltünk meg a két *B. canis* genotípus megjelenésében: mindkét élőhelyen az "A" korábban jelent meg a "B"-hez képest, és a II-es élőhelyen az "A" dominanciája összességében is megelőzte a "B"-t. A szezonaritást összességében tekintve a *B. canis*-fertőzött kullancsok hamarabb jelentek meg a II-es számú élőhelyen.

Az egyedek kisebb mérete tehát összefügg azzal, hogy nemrég vedlettek át nympa stádiumból adulttá. Az I-es élőhelyen tavasszal a kisebb méretű példányok megjelenése (amit áprilistól az átlagméret csökkenése jelzett) egybeesett a babesia-hordozó kullancsok megjelenésével, míg a II. számú élőhelyen a havi átlagos kullancsméret és a *B. canis*-fertőzött kullancsok aránya szeptembertől ápriliséig szignifikáns negatív korrelációt mutatott (vagyis a kisebb kullancsokkal jellemezhető populációban több volt a babesia-pozitív). A fenti eredmények azt jelzik, hogy a *B. canis*-fertőzött kullancsok előfordulása (illetve gazdakereső aktivitásuk) valószínűbb akkor, amikor "fiatal" adultok vannak a populációban, tehát az aktivitási (gazdakeresési) szezon elején. Hasonló jelenségeket figyeltek meg más kullancs-kórokozó társulásoknál is. E jelenség egyik lehetséges oka, hogy a babesia-fertőzöttség fokozza a kullancsokban a metabolikus enzimek aktivitását, és ez a megnövekedett anyagcsereszint (és így az energiatartalék hamarabb bekövetkező kimerülése) fontos tényező lehet a *B. canis* fertőzött "éhesebb" *D. reticulatus* kullancsok nagyobb (korábbi) aktivitásában. Egy ilyen mechanizmus előnyös lehet a transovarialis öröklődő kórokozónak (amelyeket itt a *B. canis* példáz), hogy biztosítsa a fertőzött *D. reticulatus* nőtények peterakását még a nyár, tehát a lárvák aktivitási periódusa előtt.

A *B. canis* itt kimutatott két változata kutyaiban eltérő patogenitású lehet, így a budapesti vizsgálat eredményei szerint a szóban forgó élőhelyeken a kutyák előbb fertőződhetnek volna a kisebb kórokozó-képességű ("A") *B. canis* genotípussal, mint a patogénebbnek tekintett "B" változattal.

A *D. reticulatus* szezonális aktivitásának egészét tekintve az is megfigyelhető volt, hogy a II-es számú élőhelyen a *B. canis*-fertőzött kullancsok hamarabb jelentek meg (váltak aktívvá). Az I-es élőhelyhez képest (amely inkább ipari parkhoz hasonló) a II-es biotóp védettebb, mivel utcák és házak veszik körül egy sűrűbben lakott területen. Így feltételezhető, hogy ez utóbbi élőhely, ahol a kullancsokat korábbi aktivitás jellemezte, az ún. városi hősziget hatásnak van kitéve. A sűrűbben lakott területen keletkező hőtöbblet ugyanis hozzájárulhatott a *D. reticulatus* hamarabb aktiválódásához és vedléséhez (ez a kisebb méretű adultok megjelenése alapján már a tél folyamán megkezdődött).

Ebben az összefüggésben, a *B. canis*-fertőzött *D. reticulatus* kullancsok vizsgálatunk során megfigyelt szezonaritása leginkább a városi élőhelyekre lehet érvényes, mint ahogy erre a kutya babesiosis esetszám más, közép-európai nagy városokban és környékükön megfigyelt hasonló, tavaszi dominanciája utal. Így tehát hasonló ökológiai körülmények között a kutya babesiosisának szezonális

előfordulását nem önmagában véve a kompetens vektorok jelenléte határozza meg, hanem befolyásolja a babesia-fertőzött kullancsok korai aktivitása.

4.4.5. Az autópálya mint mesterséges barrier hatása kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulására

Legjobb tudomásunk szerint nem végeztek még olyan felmérést, amely azt vizsgálta volna, hogy az autópálya hatással van-e a kullancs közvetítette kórokozók öko-járványtanára. Hipotézisünk szerint ugyanis egy ilyen barrier befolyásolja e kórokozók prevalenciáját az által, hogy az azokat hordozó (és kullancs fertőződési forrásként szolgáló) rezervoárokat mozgásukban eltérőképpen akadályozza. Vizsgálatunkhoz azt a három, *Ixodes ricinus* által közvetített kórokozót választottuk, amelyek fő rezervoárjai vagy nagyméretűek és nem tudnak átjutni az autópálya vadvédő kerítésén (*Anaplasma phagocytophilum*: szarvasfélék), vagy épp ellenkezőleg (*Borrelia burgdorferi* s.l. rágcsálók és *Rickettsia helvetica*: kullancsok, madarak).

Az autópálya menti élőhelyeken gyűjtött *I. ricinus* nőstényeket vizsgáltuk kullancs közvetítette baktériumok DNS-ére. Az *A. phagocytophilum* összesített prevalenciája az *I. ricinus* nőstényekben 1,9% volt. E kórokozó egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó legmagasabb fertőzöttségi szintjét erdei élőhelyen, a magas szarvas egyedsűrűséggel jellemezhető (vadászati) területen érte el (8,6%). Ugyanakkor *A. phagocytophilum* PCR-pozitív kullancsok nem fordultak elő két élőhelyen, ahol kisebb volt a szarvasok egyedsűrűsége. Összességében, az *A. phagocytophilum* prevalenciája nem mutatott szignifikáns különbséget az autópálya két oldala között.

A *R. helvetica* összesített prevalenciája 17,4% volt. E kórokozó az *I. ricinus* nőstényekben egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó legmagasabb fertőzöttségi szintjét a ligetes 2-es élőhelyen érte el, és ez 31,4% volt. A teljes vizsgálati periódust figyelembe véve, a *R. helvetica* gyakoriságában szignifikáns különbség mutatkozott két, egymáshoz viszonyítva távoli ligetes élőhelyen az autópálya azonos oldalán, de az autópálya ellenkező oldalán lévő élőhelyek között nem volt ilyen. Azonban, ha a mintavételi alkalmakat egyenként tekintjük, többször is szignifikáns különbséget mértünk a *R. helvetica* előfordulási gyakoriságában.

A *B. burgdorferi* s.l. összesített prevalenciája 26,9% volt. E kórokozó egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó legmagasabb fertőzöttségi szintjét az egyik oldalon az autópályával, a másikon vadvédelmi kerítéssel határolt, így a szarvasok kizárásával jellemezhető erdős autópálya-pihenőben érte el (35,9%). Másfelől, szintén a teljes vizsgálati periódust figyelembe véve, a *B. burgdorferi* s.l. legalacsonyabb fertőzöttségi szintjét a 4-es élőhelyen, tehát az erdős vadászati területen mértük (8,6%). Ezen túlmenően, valamennyi élőhely adatai alapján, a Lyme-kór okozójának egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó prevalenciája fordított arányban állt az *A. phagocytophilum* fajével, ami erősen szignifikáns összefüggés volt. Az egész vizsgálati periódusban, a *B. burgdorferi* s.l. összesített prevalencia értékei szignifikáns eltérést mutattak különféle élőhelyek között akár az autópálya azonos, akár áttelienes oldalán. Ez utóbbiak esetében a szignifikancia szintje magasabb volt.

Az *I. ricinus* nőstényekben mért legmagasabb *A. phagocytophilum* prevalencia ahhoz az erdei élőhelyhez tartozott, ahol legnagyobb egyedsűrűségben voltak jelen nagyvadak. Ez a megfigyelés valószínűleg azzal magyarázható, hogy a szarvasfélék és a vaddisznók fontos rezervoárjai az *A. phagocytophilum* fajnak. Ezzel szemben, a *R. helvetica* prevalenciája nem függött a szarvasok (vadak) magasabb vagy alacsonyabb egyedsűrűségétől. Ez egyrészt az *I. ricinus* rezervoár szerepével hozható összefüggésbe, amely kullancsfaj a legtöbb, ligetes-erdei biotópban megtalálható, így ubikviternek számít; másrészt a *R. helvetica* transovarialis átvitelének tulajdonítható, aminek köszönhetően e baktériumfaj a természetben gerinces gazda hiányában is fennmaradhat.

A Lyme-kórt okozó *B. burgdorferi* s.l. *I. ricinus* nőstényekben kimutatott legmagasabb prevalenciáját a szarvasok kizárásával létesült autópálya-pihenőben érte el, a legalacsonyabb prevalenciát a nagy szarvas egyedsűrűséggel jellemezhető vadászterületen (mindkettő erdős élőhely), míg az összes vizsgált biotópot figyelembe véve is erősen szignifikáns fordított arányosság volt e kórokozó kullancsokban mért gyakorisága és az *A. phagocytophilum* fajé között. Ezek a megfigyelések minden

bizonyial összefüggének az adott élőhelyen jellemző szarvas egyedsűrűséggel. A szarvasok hiánya kisebb, körülfalrt területen megnöveli annak esélyét, hogy a kullancsok rágcsálókön vagy más kisemlősökön szívjanak vért, amelyek a *B. burgdorferi* s.l. legfontosabb rezervoárjai. Ez azután a kullancs közvetítette kórokozó (ez esetben borreliák) megnövekedett prevalenciájához vezet az ilyen kis, zárt területen (amely így ún. "kullancs közvetítette kórokozó hotspot" lesz).

Következésképpen megállapítható, hogy az egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó össze-sített prevalencia szempontjából nem volt szignifikáns különbség a hasonló vegetációjú (erdő, liget vagy rét), közeli, de autópálya által elválasztott kullancs élőhelyek között az *I. ricinus* közvetítette három fontos, zoonótikus baktériumfaj gyakoriságában. Ennek tükrében úgy tűnik, az autópályáknak mint mesterséges barriereknak e vonatkozásban nincs "drámai" hatása. Ez valószínűleg a kis emlősök és madarak "puffer hatásának" köszönhető, mert ezek akadálytalanul átjuthatnak egy autópályán, és az *I. ricinus* közvetítette baktériumok fontos rezervoárjai lehetnek. A helyzet azonban más volt egyes mintagyűjtési alkalmakkor, amelyek közelebb állnak a kullancsokkal való időszakos kontaktus kockázatainak való becsléséhez: ilyen esetekben szignifikáns különbség mutatkozott az *I. ricinus* közvetítette baktériumok prevalenciája szempontjából egymástól távoli biotópok között éppúgy, mint egymáshoz közeli között, ha azokat autópálya választotta el. Ezen túlmenően, a *B. burgdorferi* s.l. egész vizsgálati periódus alatti prevalenciájában élőhelyek között megfigyelt különbségek szignifikan-cia szintje magasabbnak bizonyult, ha a szóban forgó élőhelyeket autópálya is elválasztotta. Ezek az eredmények azt példázzák, hogy az elkerített autópályák hozzájárulhatnak a kullancs közvetítette kórokozók prevalenciájának helyi különbségeihez. Ez a hatás legvalószínűbben az autópályák barrier szerepének tulajdonítható, mivel megakadályozzák a nagyvadak (leginkább gímszarvas) mozgását. Ezen kívül, mivel az úttest két oldalán található vadvédelmi kerítések teljesen körülvesszik az erdős autópálya-pihenőket, ezek kizárják onnan a szarvasokat. Ennek következtében pedig a *B. burgdorferi* s.l. magasabb prevalenciát ér el *I. ricinus* kullancsokban (amint erre rámutattunk), és így megnő a Lyme-kór kockázata az ide látogató emberek és kutyáik számára.

4.5. Molekuláris bizonyíték kullancs közvetítette kórokozók jelenlétére új gazdafajokban vagy kullancsaikban

4.5.1. Madarak mint a *Rickettsia helvetica* rezervoárjai

A madarak szerepe régóta ismert kullancsok (és azokban foglalt kórokozók) terjesztésében. Kevesebb adat áll azonban rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a madarak fertőződnek is egyes kullancs köz-vetítette kórokozókkal, így rezervoárként a rajtuk vért szívó kullancsokat akár fertőzhetik is. Ezért vizsgálatunk fő célja az volt, hogy madarak vérmintáiból és a róluk gyűjtött kullancsokból megkísérel-jünk kimutatni három olyan zoonótikus kórokozót (*Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neorickettsia mikurensis*), amelyek – szakirodalmi adatok alapján – növekvő jelentőségűek. Együttal összefüggést kerestünk a madarak kullancs fertőzöttsége, illetve a fajukra jellemző táplálko-zási magasság és vonulási szokás között.

A vizsgálat során 1219 madarat fogtunk be. Közülük 16 madárfaj összesen 68 egyede bizonyult kullancs fertőzöttnek. Az eltávolított 140 kullancs között az *Ixodes ricinus* faj volt túlnyomó többségben mind a fertőzött madarak, mind a kullancsok tekintetében. Nevezetesen, a 68 kullancs fertőzött madár közül 63 egyeden ez a faj volt, ami 92,6%-os prevalenciának felel meg, és a 140 kullancs közül 121 e fajba tartozott, ami 86,4%-os abundanciát jelent. Nyolc madárról ugyanakkor egy másik kullancsfaj, a *Haemaphysalis concinna* egyedeit gyűjtöttük: e fertőzöttség prevalenciája tehát 11,8%-nak bizonyult. A *Ha. concinna* abundanciája 12,6% volt Egy sisegő füzike (*Phylloscopus sibilatrix*) pedig hazánkban nem honos *Hyalomma* lárvával volt fertőzött.

Szignifikánsan több madár hordozott kullancsot azon madárfajok közül, amelyek jellemzően a földről táplálkoznak, szemben azokkal, amelyek magasabbról. A *Ha. concinna* lárvái és nymphái ugyanakkor nem fordultak elő olyan madarakon, amelyek a földről táplálkoznak, ami szignifikáns különbséget jelent az *I. ricinus* fajjal összehasonlítva akár a kullancs fertőzöttség prevalenciáját, akár annak intenzitását nézzük.

A madárfajokat vonulási szokásuk (távolságuk) szerint összehasonlítva, a kullancs fertőzöttség prevalenciája 41,7% volt a rezidens madárfajoknál és 25,3% a rövid távú vonulóknál. Ezen értékek szignifikánsan magasabbak a közép- és hosszú távú vonulók esetében számolt értékeknél (2,8% illetve 8,9%). A *Hyalomma* lárvá egy hosszú távú vonuló fajon fordult elő.

Vérmentákat gyűjtöttünk mind a 68 kullancs fertőzött, és további 60 (kullancsmentes) azonos fajú madárból. Ebből a 128 madárból hat (4,7% prevalencia) PCR pozitív volt *Rickettsia helvetica* fajra, közöttük öt vörösbegy (*Erithacus rubecula*) és egy erdei szürkebegy (*Prunella modularis*). Egy szőlőrigó (*Turdus iliacus*) vérmentája PCR pozitívnak bizonyult *Anaplasma phagocytophilum* fajra. A madarokról eltávolított 140 kullancs közül 72 (51,4%) volt rickettsia-pozitív: 61 (43,6%) tartalmazott *R. helvetica* DNS-t, és 11 (7,9%) tartalmazott *R. monacensis* DNS-t. *Rickettsia helvetica* fajt az *I. ricinus* és a *Ha. concinna* lárvák és nymphák is hordoztak.

Vizsgálatunk eredményei szerint a madarak táplálkozási magassága és vonulási távolsága jelentősen befolyásolhatja kullancs fertőzöttségüket, mind a prevalencia, mind pedig a faji összetétel szempontjából. A *Ha. concinna* lárvák és nymphák valószínűleg azért fertőztek olyan madarakat, amelyek (faji szinten) előszeretettel táplálkoznak a talajszint felett, mivel e kullancsfaj preadult stádiumainak legkedveltebb gazdái hazánkban az őzek. Másfelől, adatainkból az is kitűnik, hogy az *I. ricinus* lárvák és nymphák gazdakereső pozíciójukat a növényzet alacsonyabb szintjén foglalják el (mivel leginkább a földről táplálkozó madárfajokon fordultak elő), aminek hátterében eltérő gazdapreferenciájuk állhat, hiszen gazdaként a rágcsálókat részesítik előnyben. A kullancs fertőzöttség prevalenciája szignifikánsan magasabb volt rezidens és rövid távon vonuló madárfajok körében, minden bizonnyal annak következtében, hogy ezek a fő kullancs szezon idején (kora tavasszal) jelen vannak, illetve akkor érkeznek meg. Ezzel szemben azok a madárfajok, amelyek közép- vagy hosszú távú vonulók, május-június folyamán érkeznek hazánkba, tehát a fő kullancsszezon végén vagy után (így kullancs fertőzöttségük kisebb lesz). A hosszú távú vonulók jelentősége inkább abban rejlik, hogy "egzotikus", Magyarországon nem honos kullancsfajokat hozhatnak magukkal a trópusi, szubtrópusi régiókból, mint ezt itt is igazoltuk.

Vizsgálatunk legfontosabb eredménye a madarak *R. helvetica* bacteraemiájának első molekuláris bizonyítéka. Fontos, hogy mindkét madárfaj, amelynek vérének PCR pozitívnak találtuk (vörösbegy, erdei szürkebegy), emberközeli (synanthrop) életmódjáról ismert (azaz városi és külvárosi élőhelyeik vannak). Mivel vizsgálatunkban nem voltak kullancsok a *R. helvetica* bacteraemiás madarak többségén, és egy további PCR pozitív madáron csak egy PCR negatív kullancs volt, ezen adatok azt sugallják, hogy a rickettsaemia tovább perzisztál az adott madárban a kullancs vektor leválását követően.

A vizsgálatunkban madarokról gyűjtött kullancsok több, mint fele (51,4%) PCR pozitív volt rickettsiákra, leginkább *R. helvetica* fajra. Ez a prevalencia szignifikánsan magasabb annál a fertőzöttségi szintnél, amit a növényzetről gyűjtött, gazdakereső kullancsok esetében jelentettek. Ebben okként az is szerepet játszhatott, hogy egyes kullancsok madár gazdájukból is felvehették a *R. helvetica* fajt.

Egy szőlőrigó vérében *A. phagocytophilum* volt jelen. Szakirodalmi adatokat figyelembe véve ez lehet a második közvetlen bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a madarakban e zoonotikus kórokozó bacteraemiája természetes úton kialakulhat, tehát a madarak szerepet játszhatnak a granulocytás anaplasmosis járványtanában. Ugyanakkor, noha a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* fajt kimutattuk ugyanannak a térségnek a kullancsaiban, ahol a madarak mintavétele is történt, e zoonotikus kórokozóra nézve egy madár sem volt PCR pozitív.

Következtetésekként, ez a madarak *R. helvetica* fertőzöttségének első molekuláris bizonyítéka. Vizsgálatunk eredményei alapján a madarak mindkét, *I. ricinus* által közvetített zoonotikus kórokozó, a *R. helvetica* és az *A. phagocytophilum* potenciális rezervoárjai lehetnek, de az utóbbi szempontjából járványtani szerepük úgy tűnik, alacsonyabb (legalábbis Közép-Európában, illetve a vizsgált térségben). Adataink arra is utalnak, hogy a rickettsaemiás madaraktól akár az *I. ricinus*, akár a *Ha. concinna* kullancsfaj fertőződhet, de alacsony határfokkal.

4.5.2. Denevérek mint humán- és állategészségügyi szempontból jelentős piroplasmák feltételezett rezervoárjai: kullancsvizsgálat

Három, denevéreken élősködő kullancsfaj (Acari: Ixodidae) ismert Európában: az *Ixodes vespertilionis*, az *I. ariadnae* és az *I. simplex*. Ezek specifikus gazdái denevérek, tehát mindhárom fejlődési stádiumnak, amelynek vért kell szívnia (a lárvának és a nymphának a vedléshez, a nőténynek a peterakáshoz) szinte kizárólag denevéren élősködik. Noha e három kullancsfaj a Palearktikumban széles körben elterjedt, hiányosak az adatok az általuk közvetíthető kórokozókról. A denevérkullancsok kórokozó-kimutatás céljából végzett molekuláris vizsgálatai eddig mindössze bartonellákat mutattak ki *I. vespertilionis* fajból, de – legjobb tudomásunk szerint – hasonló közlemények nincsenek sem az *I. simplex*, sem az *I. ariadnae* fajokról. Ezért kezdtünk jelen vizsgálatunkba, hogy kiegészítsük a denevérkullancsok által hordozott kórokozó DNS-re vonatkozó hiányos irodalmi adatokat. Előzőleg *Babesia canis* DNS-t mutattunk ki denevérek ürülékében, így kórokozó célcsoportnak a piroplasmákat választottuk. Munkánkban arra is lehetőség nyílt, hogy megvizsgáljuk e kullancsok földrajzi elterjedtségét és gazdaspektrumát Magyarországon és Romániában, mivel három családon belül hat nembe tartozó 17 denevérfajról sikerült kullancsokat gyűjteni.

A két országban összesen 308 kullancsot gyűjtöttünk 17 denevérfaj 200 egyedéről. Az *I. ariadnae* fajt 45, az *I. vespertilionis* fajt 124, és az *I. simplex* fajt 139 példány képviselte (lárvák, nymphák és nőtények). Hazánkban az *I. ariadnae* faj szignifikánsan gyakrabban fordult elő a Vespertilionidae család denevérfajain, míg az *I. vespertilionis* a Rhinolophidae családdal társult. Az *I. ariadnae* faj nem került elő Romániából, ahol az *I. vespertilionis* rendszerint a Vespertilionidae és Rhinolophidae család képviselőin egyaránt előfordult. Egy lárvát kivételével (ami *Barbastella barbastellus* denevérfajon táplálkozott) az *I. simplex* csak *Miniopterus schreibersii* fajról volt gyűjthető. Az *I. ariadnae* és az *I. vespertilionis* estében nem volt szignifikáns fertőzöttség intenzitásbeli különbség az egyes denevérfajok között. Hasonlóképpen, ezen öt denevérfaj esetében nem volt szignifikáns különbség az egyes kullancs fejlődési stádiumokkal való fertőzöttségük intenzitásában (kivéve a *Myotis daubentonii* és a *Rhinolophus ferrumequinum* fajokat).

Piroplasma DNS szekvenciákat 20 denevérkullancsból sikerült nyernünk. Az *I. simplex* kullancsfaj szignifikánsan gyakrabban hordozott piroplasma DNS-t (138 mintából 13), mint az *I. vespertilionis* (124 mintából 3). A *Babesia* és *Theileria* DNS szekvenciák legnagyobb diverzitása (a legtöbb kimutatott faj) is az *I. simplex* kullancsfajban fordult elő. Az *I. ariadnae* kullancsfajban ugyanakkor csak a *Babesia vesperuginis* DNS-e volt jelen. Az *I. vespertilionis* lárváiban a *B. vesperuginis* mellett a *B. crassa* egy genetikai változatát mutattuk ki.

Az *I. simplex* nymphákban ez utóbbi előfordulásán kívül egy további, új *B. crassa* genotípust is igazoltunk, amelyet korábban Magyarországon még nem mutattunk ki. Ugyancsak *I. simplex* fajból a következő piroplasmák szekvenciáit mutattuk ki: a zoonótikus *B. venatorum*, *B. canis*, *T. capreoli*, *T. orientalis* és *Theileria* sp. OT3. A filogenetikai vizsgálatban a denevérkullancsokból felerősített valamennyi *Babesia*- és *Theileria*-faj a konspecifikus genotípusokkal csoportosult.

E vizsgálatban mindhárom kullancsfaj szerepelt, amely denevér gazdákra specializálódott Európában. Eredményeink megerősítették, hogy az *I. ariadnae* kullancsfaj legkedveltebb gazdái a Vespertilionidae családba tartoznak, az *I. vespertilionis* gazdái a Rhinolophidae családba, míg az *I. simplex* faj a *M. schreibersii* (Miniopteridae) specifikus parazitája. A kullancs fertőzöttség intenzitása nem különbözött szignifikánsan a kisebb és nagyobb testű denevérfajok között (*My. daubentonii* vs. *R. ferrumequinum*), ami arra utalhat, hogy a testmérettől függő paraméterek (mint a testfelület mérete, ami összefügg az anyagcsereszinttel, hőkibocsátással) nem számítottak kritikusan fontos tényezőnek a szóban forgó kullancsok gazdára találásában.

A fenti piroplasmákat – a *B. vesperuginis* kivételével – eddig denevérekből nem mutatták ki, csak más gazdákban. Ismert, kompetens vektoraik a *D. reticulatus*, *I. ricinus* és *Haemaphysalis*-fajok. Ezek a kullancsfajok csak ritkán fordulnak elő denevéreken, és valószínűleg akkor kapaszkodnak fel denevérekre, amikor azok kis emlősök búvóhelyén (például faodvakban) pihennek, vagy a földről is táplálkozó denevérfajok a rétek, erdők aljnövényzetéről esznek rovarokat. Azonban a *M. schreibersii*,

amely faj kullancsaiból e vizsgálatban a legtöbb piroplasmát kimutattuk, nem táplálkozik a föld szintjéről. Éppen ezért alternatív magyarázatként szolgálhat, hogy vérszívó legyek is hordozhatnak, sőt át is vihetnek egyik gazdáról a másikra *Babesia*- és *Theileria*-fajokat, és a legyek (Insecta: Diptera: Muscidae stb.) számos denevérfaj, köztük a *Mi. schreibersii* táplálékának gyakori elemei. Ebből fakadóan a denevérek kapcsolatba kerülhetnek különféle piroplasmákkal vagy DNS-ükkel, illetve hozzájuthatnak ezekhez táplálékukból.

Ily módon, kétféle magyarázata is lehetséges a fenti, váratlan eredményeknek. Az első, hogy a denevérek gyakran felveszik azon vektor közvetítette kórokozók DNS-ét, amelyek rovar/ízeltlábú táplálékukban jelen vannak. Az emésztés során ez a DNS átjuthat a bélfal barrierjén (részben) emésztetlenül, és így megjelenhet a keringésben vagy talán a véren kívül más szövetekben is, ahonnan azután a denevéren vért szívó kullancsok felvehetik. A második, jóllehet kevésbé valószínű magyarázat, hogy a denevérek a piroplasmák szélesebb körére fogékonyak, mint azt előzőleg feltételezték. Mint nemrég (filogenetikai vizsgálatok alapján) kimutatták, a piroplasmák törzsfejlődése a gazdafajok jelentős diverzitását és – a korábbi állásponttal szemben – limitált gazdaspecifitást tükröz, ami arra utal, hogy e kullancs közvetítette egysejtűek evolúciójuk során gyakran váltottak gazdát. Ebben az összefüggésben itt vázolt eredményeink szerint a denevérek az emlősök széles körével (tehát más rendjeivel is) osztozhatnak piroplasmákon. Hasonlóképpen, ismert, hogy több *Babesia*- és *Theileria*-faj különféle emlős rendekből származó gazdát is fertőz. Végül, de nem utolsó sorban azt is érdemes figyelembe venni, hogy a denevérek evolúciójuk során "nagy árat fizettek" az aktív repülő életmódhoz való adaptációjukért, így különösen az (akár más gazdákból származó) intracelluláris kórokozókra fogékonyak és azok rezervoárjai lehetnek.

4.5.3. Denevérek mint humán- és állategészségügyi szempontból jelentős piroplasmák feltételezett rezervoárjai: ürülékvizsgálat

A denevéreket az utóbbi években egyre gyakrabban ismerik fel a kórokozók különféle csoportjainak rezervoárjaiként. Mindazonáltal, míg számos tanulmány foglalkozott denevérekhez társult, növekvő jelentőségű vírusokkal és baktériumokkal, az utóbbi években csak néhány molekuláris vizsgálatot közöltek vektorok közvetítette egysejtűek hordozóiként betöltött szerepükről; annak ellenére, hogy a denevérek ízeltlábúakkal – akár táplálékként, akár ektoparazitáikként – való szoros kapcsolata ismert. Ezért fogtunk a denevérmintákban előforduló, ízeltlábúak közvetítette egysejtűek (Apicomplexa: Piroplasmida és más csoportok) alábbi felmérésébe.

Ehhez a molekuláris vizsgálathoz denevérürüléket választottunk mintaként, részben nem invazív gyűjthetősége miatt (ami elsődleges szempont kis testű, szigorúan védett állatfajok rövid ideig tartó befogása során). A mikroorganizmusok DNS-ének denevérürülékből való kimutatása nemcsak a táplálékul szolgált rovarokban vagy a denevérek belében található kórokozókról szolgáltatott információt. A haematropikus protozoonok invazív stádiumai vagy intracelluláris alakjai ugyanis átjuthatnak a bélfal barrierjén, és így DNS-ük kimutatható mennyiségben távozhat a bélsárral.

A *Babesia canis* DNS-e öt egyedi mintában volt jelen (prevalencia: 2,7 %). Két szekvenciát azonosítottunk ("A" és "B" típus). Mind az öt *B. canis*-pozitív ürülékmintát szolgáltató denevért Magyarország azon két régiójának 50 km-es körzetén belül gyűjtöttük, ahol egy korábbi országos felmérésben a legtöbb szeropozitív kutyát találtuk.

Három lehetséges magyarázata van ennek a szokatlan eredménynek. Az első, hogy a szóban forgó denevérek megehették a *B. canis* ismert kullancs vektorának, a *Dermacentor reticulatus* fajnak a példányait. Ha a szóban forgó denevérek (amelyek ürüléke *B. canis*-pozitív volt) fertőzött kullancs vektort fogyasztottak volna, a *D. reticulatus* kullancsfaj DNS-ének jelen kellett volna lennie ürülékükben, de ezt nem tudtuk kimutatni. A második lehetséges magyarázat háttere, hogy vérszívó legyekről (például *Stomoxys*-fajok) ismert, hogy mechanikai vektorként részt vehetnek a *Babesia*-fajok átvitelében. A *Stomoxys calcitrans* (szuronyos istállólegy, másként kutyalég) gyakran szív vért kutyákon, ugyanakkor egyes denevérfajok táplálékának fontos összetevője. Ennek tükrében a denevér-ürülékben kimutatott *B. canis* DNS származhatott olyan vérszívó legyekről, amelyek parasitaemiás

kutyából szívtak vért (amire a két *B. canis* endémiás régióban megvolt a lehetőség) és utána a szóban forgó denevérek megették.

A harmadik magyarázat szerint a *B. canis* DNS jelenléte egyes ürülékmintákban azt is jelentheti, hogy a mintát szolgáltató denevérek fertőzöttek (parasitaemiások) voltak, amely esetben a babesia DNS a keringésből juthatott a béltartalomba (más, az erythrocytákat fertőző protozoonokhoz hasonlóan, amilyenek például a plasmodiumok). E lehetőséget az is alátámasztja, hogy a *D. reticulatus* lárvák, nymphák kedvelt rágcsló gazdái között számos *Apodemus*-faj arborealis, azaz előszeretettel másznak fákra. A *Dermacentor* lárvákról és nymphákról ismert, hogy előfordulnak ilyen fakorona közeli fészkekben (fa odúban). Mind a négy denevérfajról, amelyek ürüléke *B. canis* pozitív volt, ismert, hogy a nyári időszakban pihenőhelyként előszeretettel választanak fa odúkat, ahol tehát elvileg fertőződhetnek *Dermacentor* preadult stádiumokkal. Ennélfogva nem lehet teljesen kizárni, hogy azok a denevérek, amelyek ürüléke *B. canis* PCR pozitív volt, valóban fertőzöttek voltak e piroplasmával. Mindennek taxonómiai magyarázata is van (figyelembe véve, hogy a paraziták gazdái gyakran rendszertanilag rokon csoportokból kerülnek ki): a *B. canis* fajra való – legalább részleges – fogékonyságot eddig két emlős rendből írták le, amelyek a ragadozók (Carnivora) és a páratlanujjú patások (Perissodactyla), amelyek egy nagy kládot (Pegasoferae) alkotnak a denevérekkel (Chiroptera).

Következésképpen, vizsgálatunk eredménye azt sugallja, hogy a kutya babesiosis járványtánának vannak olyan aspektusai, amelyek ismeretlenek illetve jelentőségüket alábecsülik. Ide tartozik a rovarok általi mechanikai átvitel szerepe és a denevérek esetleges fogékonysága a *B. canis* fajra.

4.5.4. Borz eredetű *Babesia*-faj DNS-e kutyákban

Az elmúlt évtizedben a *Babesia*-fajok vadon élő ragadozóknál való előfordulásáról egyre gyakrabban számoltak be. Annak ellenére, hogy ismert a házi és vadon élő állatok kapcsolata (például vadászat során), illetve ezek számos kullancsfajon is osztozhatnak, a kutyák vadon élő ragadozók *Babesia*-fajaival történő megfertőződésére vonatkozó adatok hiányosak.

Kutatásunk során 90 kutyától és öt elütött borztól származó vérmintát és kullancsokat vizsgáltunk. Az összes vérminta és 33 borz kullancs esetében, DNS kivonást követően, piroplasma specifikus PCR-t és szekvenálást végeztünk, valamint filogenetikai vizsgálattal összehasonlítottuk a kapott genotípusokat a ragadozókat fertőző piroplasmák genotípusaival.

A 90 kutya vérből tizenegy, továbbá mind az öt borztól származó minta pozitív lett piroplasmákra. A szekvenálás hat kutyában és mind az öt borzban borz-specifikus piroplasma ("*Babesia* sp. Meles-Hu1") DNS-ét mutatta ki. Öt kutyában *B. canis* DNS-ének jelenlétét is sikerült igazolni. Szignifikánsan több volt a "*Babesia* sp. Meles-Hu1" DNS pozitív minta azoknál a kutyáknál, amelyeket gyakrabban vittek erdőbe (ami a borzok kedvelt élőhelye Magyarországon), mint amelyek nem rendelkeztek ezzel a tulajdonsággal. Ezen felül, szignifikánsan nagyobb volt a *Babesia* DNS pozitív minták száma vadászkutyák esetében, mint azoknál, amelyeket nem vittek vadászatra. Két kutya, amelyek közül az egyikben borz-specifikus *Babesia*-faj, míg a másikban *B. canis* DNS-e volt jelen, a babesiosis klinikai tüneteit mutatta. A vért szívott *Ixodes canisuga* és *I. hexagonus* példányok közül, amelyeket a babesia-fertőzött borzokról gyűjtöttünk, csak az *I. canisuga* hordozta a "*Babesia* sp. Meles-Hu1" DNS-ét, ami e genotípus szignifikáns asszociációját jelenti az *I. canisuga* kullancsfajjal. Filogenetikailag, a "*Babesia* sp. Meles-Hu1" a "*B. microti*" csoportba tartozik.

Elsőként igazoltuk a borz-specifikus *Babesia*-faj DNS-ének jelenlétét kutyákban, amelyek közül az egyik jellemző klinikai tüneteket is mutatott. A "*Babesia* sp. Meles-Hu1" DNS-t tartalmazó vérminták száma alapján (ami meghaladta a *B. canis* pozitív minták számát) ezeket nem tekinthetjük egyedi esetnek. Feltételezhetjük, hogy azok a kutyák, amelyeket gyakrabban visznek erdőbe, veszélyeztetettebbek e piroplasma szempontjából, mivel nagyobb valószínűséggel fertőződnek meg *I. canisuga* kullancsfajjal borzoktól vagy borzok kotorékaiból. A fenti eredmények értelmében a borz genotípus gazdagítja azon piroplasmák körét, amelyek természetesen képesek fertőzni a Caniformia alrend különböző családjainak (ez esetben Canidae, Mustelidae) képviselőit.

4.5.5. Vadon élő ragadozók és a szarvasmarha Anaplasmataceae családba tartozó baktériumainak DNS-e kutyákban

Európában a kutyák az Anaplasmataceae család legalább négy neméből fogékonyak kórokozókra. Közülük az *Anaplasma platys* a vérlemezkéket, az *A. phagocytophilum* a neutrophil granulocytákat, az *Ehrlichia canis* pedig a monocytákat fertőzi és károsítja. Ebből fakadóan ezeket a kutyák fontos kórokozóinak tartják. Ugyanakkor a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* és a *Neorickettsia risticii* fertőzöttséget is leírták kutyában. Ezen túlmenően a dirofilariosis során *Wolbachia* DNS lehet jelen a kutyák vérében. Másfelől arra is találunk szakirodalmi adatokat, hogy egy adott felmérésben szereplő kutyák teljesen PCR-negatívak az Anaplasmataceae család képviselőire.

Nemrég vidéki kutyákból molekuláris bizonyítékot szolgáltatunk egy borz eredetű babesia genotípus jelenlétére, ami rávilágított arra, hogy a vidéki környezetben (tehát a természet illetve haszonállatok közelében) tartott kutyák – különösen ha vadászatra is használják vagy gyakran viszik erdőbe őket – kapcsolatba kerülhetnek a vadon élő ragadozók kullancs közvetítette kórokozóival. Ezért újabb vizsgálatunk célja az volt, hogy e vidéki kutyák vérmintáit molekuláris eszközökkel teszteljük az Anaplasmataceae család képviselőinek jelenlétére.

A kutyákból származó 90 vér DNS minta közül 18 lett PCR pozitív az Anaplasmataceae család valamely képviselőjére, míg a borzoknál ugyanez az arány öt mintából kettő. Ezeken felül hat kullancs DNS minta is PCR pozitívnak bizonyult (öt *Ixodes canisuga*, egy pedig *Haemaphysalis concinna* fajból, míg valamennyi *I. hexagonus* negatív volt). A pozitív mintákban az Anaplasmataceae család hat tagját azonosítottuk további PCR-ek és szekvenálás segítségével, ahogy ezt alább részletezem. Kullancsokat nem találtunk azon kutyákon, amelyek a PCR pozitív vérmintákat adták.

A kérődzők valamely *Anaplasma*-fajának rövid 16S rRNS szekvenciáját két kutyából mutattuk ki. A hosszabb 16S rRNS szekvencia e mintákból azonos volt több, az Ó- és Újvilágból közölt *A. marginale* szekvenciával, a 4-es fő felületi fehérje (msp4) gén viszont csak azzal az egy genotípussal egyezett, amelyet korábban hazai szarvasmarhából és kullancsokból (*Dermacentor reticulatus* és *Ixodes ricinus*) is kimutattunk. Ez az *A. marginale* genotípus filogenetikailag egyik fő csoportba sem került, amelyet génbanki, azonos fajú szekvenciák alkottak. A törzsfán pozíciója rövid evolúciós (horizontális) távolságot mutatott. Egy kutya vérmintája *A. phagocytophilum* DNS-t is tartalmazott.

A 16S rRNS gén rövidebb szakasza alapján öt DNS mintából kaptunk olyan szekvenciát, amely legközelebb egy spanyolországi borzból kimutatott *Ehrlichia*-fajhoz állt. Az öt DNS minta forrása között volt egy kutya (a rendszeresen erdőbe vitt csoportból) és négy *I. canisuga* kullancs. E hazai genotípus hosszabb 16S rRNS gén szakasza 99,8%-ban volt azonos a spanyol mintáéval. A filogenetikai elemzés megerősítette, hogy ez a hazánkban a világon először kimutatott, kutya eredetű *Ehrlichia* izolátum különbözik mind a *Ca. E. khabarensis* fajtól, mind a spanyol borz eredetű *Ehrlichia*-fajtól, bár ez utóbbi támogatottsága csak mérsékelt (91%) volt.

Egy *Neoehrlichia* nembe tartozó faj rövid 16S rRNS génszakaszát (ami itt *Ca. Neoehrlichia lotoris* Hu-2 néven szerepel) hat kutyából, két borzból és egy *I. canisuga* kullancsból mutattuk ki. A 16S rRNS gén hosszabb szakaszában ez 100%-ban egyezett a *Ca. Neoehrlichia lotoris* Hu-1 és FU98 genotípusokkal, amelyeket nemrég közöltünk európai borzból (Kelet-Magyarország) illetve közöltek vörös rókából (Ausztria). Vizsgálatunkban a 16S rRNS gén felerősített szakaszának teljes hossza meghaladta az eddig Európában leírtakét, és 99,3% azonosságot mutatott a *Ca. N. lotoris* fajjal mosó-medvéből (USA). A három európai *Ca. N. lotoris*-szerű izolátum együttes filogenetikai csoportosulása megerősítette 16S rRNS gén azonosságukat. Azonban a *Ca. N. lotoris* Hu-2 chaperon (hő sokk) fehérje gén (groEL) szekvenciája különbözött az eddig ismertektől, mivel csak 99,6%-ban volt azonos a *Ca. N. lotoris* Hu-1 és az FU98 genotípusokéval. A groEL törzsfán a kutya izolátum és a vadon élő ragadozók izolátumainak elkülönülése erős (100%) támogatottságot kapott. A *Ca. N. lotoris* Hu-2 DNS-e szignifikánsan gyakrabban fordult elő vadászkutyákban.

Rövid 16S rRNS *Wolbachia* szekvenciát nyolc kutya vérében és egy, borzról gyűjtött *H. concinna* kullancsban mutattunk ki. Közülük négy ízeltlábú eredetű wolbachiák, míg öt fonálféreg wolbachiák génbanki szekvenciáival állt közelebbi rokonságban.

A fenti eredmények molekuláris bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az Anaplasmataceae család több nemének képviselőiből származó DNS is jelen lehet kutyák vérében. Egy (az *Anaplasma phagocytophilum*) kivételével ezek előfordulását eddig még nem írták le kutyákban. Génbanki adatok szerint azt az *A. marginale* genotípust, amelyet itt kutyából azonosítottunk (és korábban hazánkban szarvasmarhában és kullancsokban találtunk meg) semmilyen más országból nem írták le. Az *A. marginale* vektora, a *Dermacentor reticulatus* kullancsfaj gyakran fordul elő kutyákon is, ami a legvalószínűbb forrása e leletnek.

A hazai kutyában e helyütt kimutatott borz eredetű *Ehrlichia*-faj 16S rRNS genotípusa két bázispárral is különbözött szekvenciájában az eredetileg közölt spanyolországi változattól. E génszakszt az Anaplasmataceae család fajain belül nagyon konzervatívnak tartják, tehát eredményünk azt sejteti, hogy ez az *Ehrlichia*-faj Európán belül, az egyes földrajzi régiók között genetikai heterogenitással jellemezhető. Jelen eredményeink alapján érdemes tovább vizsgálni, hogy az *I. canisuga* vektora-e ennek a genotípusnak.

Vizsgálatunk szolgáltatta az első molekuláris bizonyítékot arra vonatkozóan is, hogy egy, a *Ca. N. lotoris* fajhoz közel álló genotípus kutyákban is előfordul. E délnyugat-magyarországi változat groEL szekvencia eltérése a kelet-magyarországi, ausztriai és csehországi szekvenciától újdonság, különösen annak tükrében, hogy a *Ca. N. lotoris* szekvenciák között nem találtak eltérést az USA-ban. A *Ca. N. lotoris* valószínű vektorai a *Phlebotomus* alnembe tartozó kullancsok. Vizsgálatunk során azonban 19 *I. (Ph.) canisuga* példányból csak egy volt PCR pozitív, noha mindet bacteriaemiás borzról gyűjtöttük. Ez arra utalhat, hogy az *I. (Ph.) canisuga* nem vektora a *Ca. N. lotoris* Hu-2 genotípusnak, vagy alacsony határfokkal veszi fel e baktériumokat. Mindazonáltal, a *Phlebotomus* alnem kullancsfajai gyakran fordulnak elő "üreglakó" emlősökön, és az ilyen védett bújóhelyekkel való gyakori kontaktus magyarázhatja a *Ca. N. lotoris* Hu-2 szignifikánsan magasabb prevalenciáját vadász- és erdőlátogató kutyákban, ahogy ezt itt kimutattuk.

Noha ízeltlábú-eredetű *Wolbachia* DNS-t nemrég énekesmadarak vérében is azonosítottunk, a kutyák vérének hasonló lelete csak nehezen magyarázható (annak ellenére, hogy egyes szimbiontákat a vérszívó ízeltlábúak gazdáikba juttathatnak).

Következtetésképpen, kutyák vérében az Anaplasmataceae család tagjainak széles köréből származó DNS lehet jelen, amiről eddig nem volt tudomásunk. Az itt ismertetett eredményeket úgy is értelmezhetjük, mint annak első molekuláris bizonyítékát, hogy a kutyák e három potenciálisan vagy bizonyítottan kórokozóképes baktériumfajjal (*A. marginale*, borz *Ehrlichia*-faj és *Ca. N. lotoris*-szerű genotípus) legalábbis kapcsolatba kerülhetnek. A DNS keringésszel jelenléte a szóban fogó kutyák fogékonyságát is jelentheti, tehát hogy az e gazdában újak számító kórokozók (átmeneti) fertőzőség alakulhatott ki, de ennek végső bizonyítása további vizsgálatot igényel.

4.6. Kullancsfajok első azonosítása hazánkban és más európai országokban

Ezeket az eredményeket (röviden) az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- az *Ixodes ariadnae* első azonosítása Németországban
- az *Ixodes ariadnae* első azonosítása Belgiumban
- az *Ixodes festai* első azonosítása Magyarországon
- az *Ixodes kaiseri* első azonosítása Magyarországon, Németországban és Szerbiában
- a *Haemaphysalis erinacei* első azonosítása Romániában
- a *Rhipicephalus sanguineus* első autochthon előfordulása Magyarországon
- a *Hyalomma rufipes* autochthon előfordulása Magyarországon

4.7. Kullancs közvetítette kórokozók első molekuláris azonosítása hazánk illetve Európa vonatkozásában

Ezeket az eredményeket (röviden) az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- az *Anaplasma marginale* első molekuláris azonosítása Magyarországon
- az *Anaplasma ovis* első molekuláris azonosítása Magyarországon
- az *Ehrlichia canis* első molekuláris azonosítása Magyarországon
- egy borz *Ehrlichia*-faj első azonosítása Közép-Európában
- a *Candidatus Neoehrlichia lotoris* első azonosítása Magyarországon és borzban
- a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* első azonosítása Magyarországon
- a tudományra új *Candidatus Rickettsia hungarica* molekuláris azonosítása
- a *Rickettsia massiliae* első azonosítása Magyarországon
- a *Rickettsia aeschlimannii* első azonosítása Magyarországon
- a *Rickettsia africae* első autochthon előfordulása Európában
- a kutya haemoplasmáinak első molekuláris azonosítása Magyarországon
- egy borzélősködő *Babesia*-faj első azonosítása Magyarországon
- egy *Babesia crassa* genotípus első azonosítása Európában
- a *Babesia motasi* első molekuláris azonosítása Közép-Európában
- a *Babesia major* első molekuláris azonosítása hazánkban
- a *Theileria orientalis* első azonosítása Közép-Európában
- a *Theileria buffeli* első azonosítása Közép-Európában
- a *Hepatozoon canis* első azonosítása Magyarországon

4.8. Kullancs- és óvontagfajok, valamint általuk közvetített kórokozók összehasonlítása tágabb földrajzi értelemben

4.8.1. Denevérkullancs-fajok genetikai heterogenitása Euráziában

A denevérekre mint gazdákra specializálódott kullancsok (Acari: Ixodidae) csak az Óvilágban fordulnak elő. Euráziában, 2014 előtt három ilyen "denevérkullancs-faj" létezése volt ismert: ezek az *Ixodes vespertilionis* Koch, 1844, az *I. simplex* Neumann, 1906 és az *I. kopsteini* Oudemans, 1925. Nemrég azonban egy új fajt azonosítottunk *I. ariadnae* Hornok, 2014 néven. Úgy tűnik, e négy faj gazdapreferenciája különbözik: az *I. vespertilionis* főként *Rhinolophus*-fajokon, az *I. ariadnae* *Myotis*-fajokon, míg az *I. simplex* a *Miniopterus schreibersii* denevérfajon, az *I. kopsteini* pedig a Molossidae család képviselőin fordul elő. Így a szóban forgó denevérfajok földrajzi elterjedtségének határai, vándorlási szokásai, élőhely különbségei és hibernációs magatartása jelentősen befolyásolja kullancsaik földrajzi előfordulását. Az *I. vespertilionis* és az *I. simplex* is szerepel a világ legszélesebb körben elterjedt kullancsfajai között, mivel előfordulnak az Óvilág legnagyobb részében (Európától Dél-Afrikáig és Ausztráliáig éppúgy, mint keleti irányban Ázsia legtávolabbi részéig: Japánig). Azonban, mindezek ellenére, nem végeztek (nem közöltek) filogeográfiai vizsgálatot arra vonatkozóan, hogy e két kullancsfaj széles elterjedtségi körén belül morfológiailag illetve genetikailag mennyire egységes.

Korábban megállapítottuk, hogy az *I. vespertilionis* kullancsfajnak allopatrikus (térben elkülönült) genotípusai léteznek még egy országon belül is, egymástól távoli barlangok között. Azzal a céllal végeztük újabb vizsgálatunkat, hogy kiderítsük: ez a tendencia érvényesül-e nagyobb távolságban is. Ehhez denevérkullancsok mitochondriális genetikai markereinek heterogenitását mértük fel Eurázsia távoli térségeiből származó példányokból, amelyek az *I. vespertilionis*, az *I. simplex* és az *I. ariadnae* morfológiai jegyeit mutatták. Ugyanakkor Dél- és Délkelet-Ázsiából korlátozott számban álltak rendelkezésre kullancsok, mivel ott azok meglehetősen ritkák.

Vizsgálatunk során a Közép- és Kelet-Európa (KKE) négy országában gyűjtött *I. vespertilionis* példányok között nem találtunk nyilvánvaló morfológiai különbséget. A COI gén felerősített szakasza legfeljebb nyolc nukleotid (98,7%) különbséget mutatott az izolátumok között. A törzsfán ezek a

haplotípusok együtt csoportosultak, de külön a nyugat-európai, Franciaországban gyűjtött mintáktól. A Spanyolországból származó *I. vespertilionis* példányok morfológiailag szintén azonosnak tűntek a KKE országaiban gyűjtöttel. E délnyugat-európai minták COI haplotípusai azonban csak 94,6%-os azonosságot mutattak a fenti (más európai) haplotípusokkal. A filogenetikai vizsgálatban a délnyugat-európai izolátumok külön kládot alkottak, az összes többi európai minta testvércsoportjaként. Ezeket a különbségeket a 16S és 12S rRNS génekre épülő vizsgálatok is megerősítették.

A Vietnámban gyűjtött *I. vespertilionis* (azóta új fajként leírva *I. collaris*) nympa COI szekvenciája a vizsgálatunk során kapott legnagyobb fokú, fajon belüli genetikai eltérést mutatta: a KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusoktól akár 101 bázispárnyit, tehát szekvencia azonossága ez utóbbiakkal csupán 84,1%-os volt, és ennek megfelelően a törzsfán külön is csoportosult. E vietnámi minta felerősített 16S rRNS szekvenciája alapján is minden európai *I. vespertilionis* mintától külön helyeződött, azon két ázsiai kullancs testvércsoportjaként, amelyek leginkább az *I. ariadnae* fajra hasonlítottak.

Egy másik kullancsot Vietnámban *Myotis* nembe tartozó denevérfajról gyűjtöttünk. Ez a lárva morfológiailag az *I. ariadnae* fajra hasonlított és COI szekvenciája legnagyobb mértékben (89,5%) a KKE-i *I. ariadnae* haplotípussal egyezett. A COI filogenetikai elemzés ezt az *I. ariadnae*-szerű vietnámi kullancsot az európai *I. ariadnae* közelébe helyezte, de külön a KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusoktól. Ezt az eredményt a 16S és 12S rRNS génekre épülő vizsgálatok (legalább részben) megerősítették. Ezen felül egy Japánban, *Murina leucogaster* denevérfajról gyűjtött nőstény kullancsot szintén az *I. ariadnae* morfológiai bélyegei jellemezték. E minta COI szekvenciája 89,7%-ban volt azonos a KKE-i *I. ariadnae* haplotípusával, de csak 86,4%-ban a KKE-i *I. vespertilionis* példányokéval. Ezt az eredményt a 16S és 12S rRNS génekre épülő vizsgálatok is megerősítették.

Egy nympa, amelyet *Miniopterus magnater* denevérfajról gyűjtöttek Indiában, az *I. simplex* kullancsfajhoz hasonló felépítésű volt. E minta COI szekvenciája 90,8-91%-ban volt azonos két európai haplotípusával, amelyektől filogenetikailag is jól elkülönült. Ennek megfelelően az indiai *I. simplex* haplotípus és a magyar a 16S rRNS génre épülő törzsfán is elvált, magas támogatottság mellett.

Egy Japánban, *Mi. fuliginosus* denevérfajról gyűjtött *I. simplex* nőstény COI szekvenciája 96%-ban volt azonos a fenti, indiai haplotípusával. Filogenetikai összehasonlításban ez a két ázsiai *I. simplex* példány együtt csoportosult, a két európai mintától külön. Ugyanez az elrendeződés jellemezte a japán *I. simplex* minta környezetében a 16S rRNS törzsfát. Másfelől, a japán *I. simplex* 12S rRNS gén szekvenciája 93,6%-ban egyezett a magyar fajazonos mintáéval.

Ha az összes európai *I. vespertilionis* mintát vesszük figyelembe, a Spanyolországban gyűjtöttek jelentősen különböztek (és filogenetikailag is külön helyezkedtek el) más vizsgált haplotípusoktól. E jelenség legvalószínűbb háttértényezője az lehet, hogy e kullancsfaj denevér gazdái az Ibériai-félszigeten izolált populációkat képviselnek, amelyeknek a tőlük északabbra lévőekkel való genetikai keveredését a Pireneusok megakadályozzák. Ugyanezt tükrözi a spanyol és a KKE-i *R. hipposideros* törzsfán elfoglalt helyzete. Európa és Ázsia viszonylatában, a KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusokhoz képest a vietnámi példány és a Japánban azonos fajúnak ítélt haplotípus nagyfokú, 14-16%-os genetikai eltérést mutatott, és elkülönült filogenetikai helyeződése is arra utal, hogy valószínűleg külön fajokról van szó (az egyes kullancsfajok közötti COI szekvencia eltérést kb. 6,1%-ban adják meg).

Vizsgálatunk eredményei első alkalommal igazolták, hogy Ázsiában is élnek olyan denevérek, amelyek genetikailag és morfológiailag is az *I. ariadnae* fajhoz állnak legközelebb (ezt eddig csak Európából ismertük). Az *I. ariadnae* legfontosabb gazdái a *Myotis*-fajok, és jelen tanulmányunk egyik *I. ariadnae*-szerű példányát is *Myotis*-fajról gyűjtötték Vietnámban. A Murininae alcsalád képviselői, amelybe a *Murina leucogaster* (a Japánban gyűjtött, *I. ariadnae* fajhoz közel álló kullancs gazdája) is tartozik, szintén a *Myotis*-fajok rokonai. Ez a genetikai vonal (amelybe az *I. ariadnae* és a hasonló haplotípusok gazdái tartoznak) egyértelműen külön helyeződik a denevérfajok törzsfáján.

A törzsfákon nemcsak a négy *I. simplex* haplotípus alkotott a többi denevérek kullancstól külön csoportot, de a három fajba tartozó denevérgazdáik is elkülönültek a vizsgálatunkban szereplő más denevérfajoktól. Ismételten, az eljegesedés és az eredményezett földrajzi izoláció tekinthető a legfőbb mechanizmusoknak e közeli rokonságban álló, ázsiai *Miniopterus*-fajok genetikai differenciálódásában, és ugyanez szolgálhatott a vizsgálatunkban denevérek kullancsok között megfigyelt relatív genetikai heterogenitás (mindössze 96% COI szekvencia azonosság) alapjául is.

4.8.2. A denevéróvantag (*Argas vespertilionis*) genetikai heterogenitása az Óvilágban

Az Argasidae család rendszertana ellentmondásos, mivel az óvantagok többsége több genusba is besorolható. Ennek megfelelően az óvilági denevéróvantag (*Argas vespertilionis*) taxonómiai státusza is bizonytalan, mert eredetileg a *Carios* nem típusfaja volt, de a valid óvantag- és kullancsnevek legutóbbi listájában az *Argas* nem tagjaként szerepel. Az újabb filogenetikai vizsgálatok sem amellett szólnak, hogy az óvilági denevéróvantag az *Argas* genus képviselője lenne, mivel e fajt tévesen helyezték az Argasinae alcsaládba, és 12S rRNS génje alapján az Ornithodorinae alcsaládba kellene tartoznia. Ezen túlmenően az *A. vespertilionis* fajszintű egységét régóta megkérdőjelezték. Nemrég eurázsiai denevérkullancsok fajon belüli, nagyfokú mitochondriális marker heterogenitását mutattuk ki. Újabb vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk az *A. vespertilionis* fajt is hasonló összefüggésben, tehát morfológiáját, mitochondriális genetikai markereit és gazdaspektrumát az Óvilágban.

Összesen 318 óvantaglárvét gyűjtöttünk 17 denevérfajról (amelyek hat nembe tartoztak) hét országban. Négy kivételével mindet *A. vespertilionis* fajuként azonosítottuk. Az *A. vespertilionis* lárvák többségét (59,1%) *Pipistrellus*-fajokon találtuk. Egy lárvát Dél-Afrikából *A. transgariensis* fajba tartozóként határoztunk meg, három lárva Mexikóból pedig az *Ornithodoros* nemet képviselte.

Néhány diagnosztikai fontosságú képlet mérési eredményei nem különböztek jelentősen az európai és vietnámi *A. vespertilionis* lárvák között, kivéve a hátlemez hosszát és szélességét. A sternalis és analis szőrök következetesen hegyesek, tűszerűek voltak, míg a dorsalis szőrök fűrészesek. A fűrészes szőrök felépítése kis eltérést mutatott a földrajzilag távoli minták között: az európai denevéróvantag lárvák szőreinek felső felében elkülönült felületi nyúlványok vannak, de a vietnámiak szőreinek vége pamacs-szerűen (csoportos nyúlványokra) töredezett.

A *cox1* génszakasz szekvenálása 17 mintánál volt eredményes. Az *A. vespertilionis* *cox1* szekvenciák 99,7-100% azonosságot mutattak Magyarországon, Romániában és Olaszországban. Ugyanakkor az európai haplotípusok jobban különböztek egy Kenyában gyűjtött *A. vespertilionis* lárvától (94,2-94,3% azonosság) és a vietnámi denevéróvantagoktól (92,5-92,9% azonosság). A *cox1* törzsfa topológiája is ugyanezeket a különbségeket tükrözte (az *A. vespertilionis* haplotípusok elkülönülése Magyarország-Vietnám között magas támogatottságot kapott). Az *A. vespertilionis* izolátumoknak az Ornithodorinae alcsalád két képviselőjével való csoportosulása mérsékelt (72%) támogatottságú volt. A 16S rRNS gént 16 mintából szekvenáltuk. A 16S rRNS gén törzsfa alapján is, az európai *A. vespertilionis* elkülönülése a kenyaitól és vietnámitól magas támogatottságot (99%) kapott, és e faj az Argasinae alcsaládon kívül helyeződött; ugyanakkor az Ornithodorinae alcsaládon belüli viszonyai gyenge támogatottságúak voltak.

Annak lehetőségét, hogy az *A. vespertilionis* név alatt több faj is létezhet, már mások is felvetették, de ezt – főként molekuláris alapon – eddig nem vizsgálták. Tanulmányunkban a paraméterek túlnyomó többsége nem különbözött jelentősen az európai és a vietnámi *A. vespertilionis* lárvák között, noha ezek két mitochondriális genetikai marker alapján jól elkülönültek. Továbbá annak ellenére, hogy eltérést találtunk a hátlemez átlagos hosszában és szélességében az európai és a vietnámi minták között, ez önmagában kevés lenne új fajok megkülönböztetéséhez, mert a hátlemez alakja (amit a hasonló hossz/szélesség arány mutatott) ebben az összefüggésben mérvadóbb. Ezért, további megkülönböztető bélyegek hiányában jelen eredményeink arra utalnak, hogy az európai és a vietnámi (genetikailag legjobban különböző) *A. vespertilionis* lárvák ugyanahhoz a fajhoz tartoznak.

Másfelől, az európai és a vietnámi minták *cox1* szekvencia eltérése (7,1-7,5%) meghaladta a kullancsfajok között megállapított átlagos eltérés szintjét (6,1%). Eszerint morfológiailag hasonló, de genetikailag eltérő *A. vespertilionis* populációk léteznek Európában és Délkelet-Ázsiában, ami arra utal, hogy ezt az óvantagfajt legalább két feltételezhető kriptikus faj komplexének (vagy alfajok csoportjának) kellene tekinteni. Ez indokoltnak tűnik pusztán a lárva stádium felépítése alapján is. Ugyanebben az összefüggésben, a kenyai és az európai *A. vespertilionis* közötti szekvencia eltérés elmaradt az európai és vietnámi közöttitől, ami arra utalhat, hogy a folyamatban lévő génkicserélődés (vagy korábbi genetikai kapcsolat) valószínűbb ebben az irányban.

A denevércsoporthoz képest – mint itt rámutattunk – az *A. vespertilionis* földrajzilag távoli példányai között megfigyelt morfológiai és genetikai különbség kevésbé kifejezett, aminek egyik fontos háttér tényezője ennek az óvantagfajnak a széles gazdaspektruma (tehát a Vespertilionidae családba tartozó denevérek legalább hat genusa, ahogy ez jelen felmérésünkéből is kitűnt), ami megakadályozza populációinak teljes allopatrikus izolációját.

4.8.3. A denevéróvantag (*Argas vespertilionis*) és a *Babesia vesperuginis* genetikai hasonlósága Közép-Európa és Közép-Ázsia között

A vérszívó ízeltlábúak által közvetített egysejtű élősködők több csoportjából is fordulhatnak elő fajok denevérek vérében, többek között trypanosomák és piroplasmák. Az utóbbi csoportból egyedül a *Babesia vesperuginis* fajról ismert, hogy denevéreket fertőz, és azokban kórtani hatást fejt ki. Ez utóbbi kapcsán vetődött fel, hogy talán a denevéróvantag (*Argas vespertilionis*) e piroplasma vektora, mert külső élősködőként kizárólag ennek lárváit találták meg a babesia-fertőzött denevéreken.

A *B. vesperuginis* fajt nemrég Közép-Európában is azonosítottuk, és nagy számban gyűjtött *A. vespertilionis* lárvát vizsgáltunk meg filogeográfiai összefüggésben Európa három országát, Délkelet-Ázsiát (Vietnám) és Kelet-Afrikát (Kenya) beleértve. Egy újabb felmérésünk célja az volt, hogy e két korábbi eredményeit kiegészítsük, és megvizsgáljuk, hogy (1) a Kína közép-ázsiai részéből származó *A. vespertilionis* lárvák genetikai markerei (cox1 és 16S rRNS gén) alapján milyen filogenetikai viszonyban állnak az Eurázsia más térségeiből származókkal, illetve hogy (2) a *B. vesperuginis* előfordul-e Ázsiában, és ha igen, van-e különbség Közép-Európa és Közép-Ázsia mintái között e piroplasma legfontosabb genetikai markerében (18S rRNS).

A piroplasmák 18S rRNS génszakaszának kimutatására épülő PCR-ben 12 minta bizonyult pozitívnak: tíz Magyarországról és kettő Kínából. Kínából két *A. vespertilionis* egyed (*Vespertilio murinus* denevérfaj két egyedéről gyűjtve) tartalmazott piroplasma DNS-t. Mind a 12 PCR pozitív minta szekvenálása *B. vesperuginis* fajt azonosított, 100% azonossággal a magyar és a kínai minták között.

Az *A. vespertilionis* cox1 szekvenciák 99,1-99,2%-ban voltak azonosak Magyarországon és Kínán (Xinjiang) között. Másfelől viszont a kínai haplotípusok mindössze 92,6-93,1% azonosságot mutattak a vietnámi mintákkal. A cox1 törzsfá ugyanezeket a viszonyokat tükrözte: a Magyarországról és Kínából származó *A. vespertilionis* együtt csoportosult, de – 99% támogatottság mellett – külön a Vietnámban gyűjtöttektől. A 16S rRNS törzsfá ugyanezt erősítette meg.

Legjobb tudomásunk szerint ez az első molekuláris bizonyíték annak, hogy a *B. vesperuginis* Ázsiában előfordul. Korábbi vizsgálatunkban kullancsokat gyűjtöttünk három családba tartozó denevérekről, amelyek közül a *B. vesperuginis* DNS csak a Vespertilionidae család fajairól származó kullancsokban (*I. vespertilionis*, *I. ariadnae*) volt kimutatható, míg más (kérődzőket és kutyát fertőző) piroplasmák DNS-ét a Rhinolphidae és a Miniopteridae családok denevérfajairól gyűjtött kullancsok (*I. vespertilionis* és *I. simplex*) hordozták. Ez a korábbi megfigyelés jól egyezik ennek a vizsgálatnak az eredményeivel, mivel (1) egészen mostanáig, a Rhinolphidae és Miniopteridae családok denevérfajainak kiterjedt hazai vizsgálata ellenére az *A. vespertilionis* óvantagfajt csak a Vespertilionidae család tagjain találtuk meg, továbbá (2) itt ez utóbbiakról gyűjtött *A. vespertilionis* lárvák nagyszámú mintájában csak a *B. vesperuginis* DNS-ét azonosítottuk. E jelenség legvalószínűbb magyarázata, hogy a vespertilionid denevérek a *B. vesperuginis* fajhoz annak feltételezhető óvantag biológiai vektorából jutnak, míg a Rhinolphidae/Miniopteridae fajok a piroplasmák szélesebb köréhez vagy legalábbis DNS-éhez juthatnak hozzá leginkább mechanikai vektorokat tartalmazó táplálékukból.

Korábbi eredményeink alapján a *B. vesperuginis* 18S rRNS génszakasz szekvenciái Európán belül egyezést mutattak, tehát Magyarországon, Románián és Anglián (AJ871610) között. Az itt elvégzett szekvencia összehasonlítások alapján e piroplasma 18S rRNS génje jóval nagyobb földrajzi távolságban is konzervatívnak tűnik (figyelembe véve, hogy Magyarország, tehát Közép-Európa és Xinjiang, Közép-Ázsia között mintegy 5000 km van). Ezzel szemben más *Babesia*-fajok (pl. *B. canis*) esetében országon belül is lehet 18S rRNS szekvencia eltérés.

A *Vespertilio murinus*, amely denevérfaj vizsgálatunk során Közép-Európában és Északkelet-Kínában genetikailag rokon *A. vespertilionis* lárvákat hordozott, széles körben elterjedt a Palearktikumban (Európától Szibériáig és a Csendes-óceán partvidékéig). E nagy térségben a *V. murinus* populációi relatív genetikai homogenitást tükröznek, és kolóniai Ázsiában gyakoriak emberlakta településeken (épületekben), így keleti expanziójuk történelmileg összefüggthetett az ember által megváltoztatott élőhelyek terjedésével is. Ez a denevérfaj kelet-nyugati és észak-déli irányban is vándorolhat. Ezek a háttértényezők lehetővé teheték a fokozatos génáramlást (keveredést) az *A. vespertilionis* egymástól távoli, európai és közép-ázsiai populációi között – többek között akkor, amikor e denevérfajjal társult – ahogy ezt vizsgálati eredményeink tükrözik. Ezzel szemben, mindkét itt vizsgált mitochondrialis marker (cox1 és 16S rRNS gének) nagyfokú genetikai eltérést (vagyis redukált génáramlást) tükrözött Közép-Ázsia és Délkelet Ázsia (Vietnám) *A. vespertilionis* populációi között (tehát kisebb távolságban, mint Közép-Európa és Közép-Ázsia között). Ez a kisebb arányú génkicserélődés legvalószínűbben földrajzi barrierékkel függhet össze (a Himalája magas vonulatai és a Tibeti-fennsík), amelyek elválasztják ezeket a térségeket és megakadályozzák, hogy denevérgazdáik révén az *A. vespertilionis* populációk keveredjenek.

Összességében, az *A. vespertilionis* molekuláris vizsgálatai egyes denevérpaziták (óvantagok és piroplasmák) "genetikai kapcsolatát" sejtetik Közép-Európa és Közép-Ázsia között az Észak-Palearktikumon keresztül. Tehát, a szóban forgó gazdapopulációk érintkeznek annyira, hogy – akár áttételesen – kórokozók illetve azok genetikai anyagának "cseréje" megvalósuljon. Más repülő gerincesekről (madarokról) már bebizonyosodott, hogy kullancs közvetítette kórokozók terjesztének hasonló földrajzi összefüggésben (kelet-nyugati irányban), tehát a Távol-Kelet, Szibéria és Európa között. Fenti eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy az Eurázsia keleti és nyugati térségei közötti ökológiai kapcsolatnak a denevérek is szerves részei, és ennek járványtani jelentősége lehet más (nemcsak kullancs és óvantag közvetítette) kórokozók szempontjából is.

4.8.4. Madárkullancsokban azonosított babesiák genetikai hasonlósága Közép-Európa és a Távol-Kelet között

Közép-Európában a madarokról gyűjthető két leggyakoribb kullancsfaj az *Ixodes ricinus* és a *Haemaphysalis concinna*. Euráziában az *I. ricinus* földrajzi előfordulása a Nyugat-Palearktikumba esik, míg a *H. concinna* Közép- és Kelet-Ázsia térségeiben is honos. Közép-Európában a *H. concinna* lárvák és nymphák nyáron, az énekesmadarak fészkelési periódusában is aktívak, továbbá ősszel, a melegebb éghajlaton telelő madarak észak-északkeletről dél felé vonulása idején. Ezek a tényezők hozzájárulnak a vonuló és helyi madarak jelentőségéhez e kullancsfaj kisebb vagy akár nagyobb távolságba való eljuttatásában. Nem meglepő tehát, hogy a madarakat a *H. concinna* legfontosabb gazdái között tartják számon, és így feltételezhető, hogy e gazdacsoport a *H. concinna* által hordozott kórokozók terjesztésében is kiemelkedő szerepet játszhat. Az elmúlt két évben ezen újonnan felismert szibériai és távol-keleti *Babesia*-genotípusok közül néhányat megtaláltak közép-európai *H. concinna* kullancsokban is: hazánkban növényzetről, míg Szlovákiában a növényzetről és rágcsálókról gyűjtött kullancsokban. Vizsgálatunk célja az volt, hogy molekuláris módszerekkel megállapítsuk: e piroplasmák jelen vannak-e madarak *H. concinna* fajú kullancsaiban, ami megmagyarázhatná a Nyugat-Palearktikumban való előfordulásukat.

Vizsgálatunkhoz 321 *H. concinna* lárvát és nymphát gyűjtöttünk 121 énekesmadárról, amelyek 19 fajba tartoztak. A piroplasmákra PCR pozitív kullancsok aránya 15,9% volt. PCR pozitivitást 11 madárfaj kullancsaiban találtunk. E piroplasmák (egy sikertelen szekvenálást leszámítva) molekulárisan 100%-ban azonosak voltak három *Babesia* genotípussal, amelyeket nemrég írtak le Szibéria déli részén (Bajkál-vidék) és Oroszország távol-keleti részében. Az "Irk-Hc133" (eredetileg Irkutszkban, Szibériában találták meg) és a "Kh-Hs222" (Khabarovszk, Távol-Kelet) genotípusok voltak jelen a legtöbb itt vizsgált kullancsban. E két *Babesia*-genotípust korábban megtaláltuk gazdakereső *H. concinna* kullancsokban Magyarországon, és leírták gazdakereső, valamint rágcsálókról gyűjtött *H. concinna* kullancsokból Szlovákiában. Újabb vizsgálatunk során azonban egy harmadik genotípust ("Irk-Hc130", szintén

Irkutskból) is azonosítottunk három kullancsban. Legjobb tudomásunk szerint ez utóbbi genotípust eddig nem mutatták ki Európában, és a három *Babesia*-genotípus egyikét sem találták meg még madarak kullancsaiban.

A törzsfán a madárkullancsból azonosított Kh-Hc222 külön helyezkedett el attól a filogenetikai csoporttól, amelyet a madárkullancsból származó *Babesia* sp. Irk-Hc133, a *B. crassa* és a *B. major* alkotott, míg a *Babesia* sp. Irk-130 genotípust tartalmazó klád a *B. motasi* testvércsoportja volt. Összességében, mindhárom fenti genotípus a kérődzőket (Artiodactyla: Ruminantia) fertőző *Babesia*-fajok filogenetikai csoportjához tartozott. E három genotípus kórokozó-képessége nem ismert és (legjobb tudomásunk szerint) még nem is írták le őket e gazdacsoportból. Mindazonáltal valószínűsíthető, hogy a *H. concinna* egyedei hozzájuthatnak vadon élő kérődzőkből (különösen őzből) származó piroplasmákhoz, mivel hazánkban (is) ezek a cervidák a lárva és a nympa stádium kedvelt gazdái.

A *H. concinna* fajú kullancsok PCR pozitivitása szignifikánsan ritkább volt a tavaszi időszakban (2,5%), mint nyáron (17,6%) vagy ősszel (19,2%). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *H. concinna* fajhoz társult piroplasmák terjesztésében a hazánkba tavasszal, délről érkező vonuló madarak a legkevésbé fontosak; szemben azokkal, amelyek északról, északkeletről érkeznek Magyarországra a nyár végén, illetve ősszel. A *H. concinna* Eurázsia-szerte elterjedt kullancsfaj. Lárvai és nympái egyidejűleg csak a nyár és az őszi folyamán (októberig) aktívak, ami megerősíti, hogy e kullancsfaj hosszabb távú, madarak általi terjesztésében az őszi vonulás a legfontosabb.

A piroplasma PCR pozitív *H. concinna* lárvákat, nympákat szignifikánsan gyakrabban gyűjtöttük négy olyan madárfajról, amelynek ismert keleti vonulási kapcsolatai vannak (92 kullancsból 24), mint más fajokról (229 kullancsból 27), ami a fenti összefüggésben betöltött öko-járványtani szerepük mellett szól. E négy madárfajon a PCR pozitív kullancsok aránya 14-60% volt. A vizsgálatunkban babesia-hordozónak talált *H. concinna* példányok terjesztésében kulcsszerepet játszó madárfajok keleti kapcsolatai jól dokumentáltak: mind jelenkori vonulásuk, mind populációik földtörténeti – jégkorszakok utáni – expanziója (illetve filogenetikai rokonságuk) szempontjából. Továbbá, az elmúlt években-évtizedekben folyamatos növekedés volt megfigyelhető a Magyarországon felbukkanó új madárfajok számában, és ezek egy jelentős része keleti eredetű volt. Másfelől, a nem vagy csak részben vonuló madárfajokról a *H. concinna* aktivitási csúcsának idején gyűjtött kullancsok PCR pozitivitása azt támasztja alá, hogy a vizsgálatunkban kimutatott szibériai és távol-keleti *Babesia*-genotípusok fenn tudnak maradni Közép-Európában. Ezt jól tükrözi regionális, a növényzetről gyűjtött, gazdakereső kullancsokban való jelenlétük is.

4.8.5. A *Rhipicephalus sanguineus* s.l. filogenetikai megosztottsága a Kelet- és a Nyugat-Mediterráneum között

A *Rhipicephalus sanguineus* (*sensu lato*) (Acari: Ixodidae) egy legalább 17 kullancsfajból álló komplex-hez tartozik, közöttük számos orvosi, állatorvosi jelentőségű fajjal. A csoport típusfajának korábban a *R. sanguineus* (*sensu stricto*)-fajt (angolul: *brown dog tick*) tekintették, amely melegebb éghajlati körülmények között világszerte elterjedt, nagyfokú alkalmazkodóképességének köszönhetően (vö. egyszerre endofil-exofil, tehát zárt [épület, kennel] és nyílt, városi vagy természetes élőhelyeken egyaránt előfordul; egész évben jelen lehet, évente akár négy generációval; sőt aktív és passzív gazdakeresésre is képes). Bár jellemzően kutya élősködő (mindhárom fejlődési stádiumában), a *R. sanguineus* számos vadon élő és házi állatfajt fertőzhet, még az embert is. Többféle (köztük zoonótikus) kórokozó vektora lehet. Mivel a melegebb éghajlati körülményeket kedveli, szakmai körökben úgy vélik, hogy a globális felmelegedés következtében a *R. sanguineus* elterjedési területének határa északabbra fog tolódni. Jelen tudásunk szerint a *R. sanguineus* fajnév nem használható *sensu stricto* értelemben (mivel típuspéldánya nem ismert, újat pedig még nem jelöltek ki), a *sensu lato* pedig sem morfológiailag, sem molekulárisan nem egységes faj. A *R. sanguineus* két, valószínűleg külön fajt jelentő filogenetikai csoportját "trópusi" vagy északi és "mérsékelt égövi" vagy déli vonalnak nevezték el dél-amerikai tanulmányok alapján, majd ezeken belül további taxonómiai egységek létezését tárták fel.

Úgy tűnik, a *R. sanguineus* eddigi vizsgálataiban egyes kontinentális térségek nem szerepeltek kellő hangsúllyal, tehát vagy egyáltalán nem, vagy csak kis számú mintával. Ezt példázzák Európában a mediterrán térség országai. Így vizsgálatunk elsődleges célja az volt, hogy az eddigi közleményekben kevésbé képviselt országokból szolgáltatassunk adatokat, vagyis, hogy filogeográfiai értelemben összehasonlítsuk a *R. sanguineus* két mitochondrialis genetikai markerét olyan mintákból, amelyeket Magyarországon, a balkáni országokban és a Földközi-tenger más térségeiben, továbbá Kelet-Afrikában gyűjtöttünk. Ily módon a *R. sanguineus* trópusi ("tropical") és mérsékelt égövi ("temperate") vonala is szerepelt munkánkban.

Az 50 molekulárisan vizsgált kullancs közül a *cox1* és a 16S rRNS gének felerősített szakasza alapján 38 példányt azonosítottunk "*R. sanguineus*" fajúként (tehát ezek a "mérsékelt égövi" vonalon belül a *Rhipicephalus* sp. I és II, illetve a "trópusi" vonalnak megfelelő *R. sanguineus* s.l. csoportba tartoztak). A *cox1* szekvenciák a *Rhipicephalus* sp. I és II között 90,5–91,1% azonosságúak voltak. A IIa és IIb alcsoportok között ugyanez az érték 94,9–95,6% volt. A *cox1* szekvenciák filogenetikai elemzése azt mutatta, hogy az általunk vizsgált *Rhipicephalus* sp. I haplotípusok egy kládba tartoznak. Másfelől, a *Rhipicephalus* sp. II szekvenciái két alcsoportot alkottak, amelyek elkülönültsége erős támogatottságú volt. Ezeket a viszonyokat a 16S rRNS törzsfá is megerősítette.

Földrajzilag, a *Rhipicephalus* sp. I mintái csak a Kelet-Mediterráneumból kerültek elő, hasonlóan e csoport hozzáférhető génbanki szekvenciáihoz. Komplementaritásban ezzel, a *Rhipicephalus* sp. IIa alcsoport mintái a Közép- és Nyugat-Mediterráneumhoz tartoztak (illetve Magyarországon is ezt találtuk meg), és a *Rhipicephalus* sp. I csoporttal átfedő zónát képeztek Szerbiában. A *Rhipicephalus* sp. IIb földrajzi előfordulása fokális volt a *Rhipicephalus* sp. IIa elterjedési területén belül.

Mindössze egy minta volt Elefántcsontpartról, amelyet *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.), azaz "trópusi" vonalba tartozóként azonosítottunk genetikailag. E kullancs *cox1* szekvenciája 100%-ban csak egy génbanki szekvenciával volt azonos, amely Közép-Amerikából származott (Panama). A *cox1* gén alapján a Kenyából és Elefántcsontpartról származó minden további (összesen nyolc) kullancs filogenetikailag a *R. leporis* fajjal együtt csoportosult. A *R. leporis* vizsgálatunkban morfológiailag azonosított hímjeinek légzőnyílás lemeze nagyon hosszú és keskeny dorsalis nyúlvánnyal rendelkezett, és könny-csepp alakú, hátul lekerekített adanalis lemezük volt. A *R. leporis* és a *R. sanguineus* (s.l.) ("trópusi" vonal) *cox1* szekvenciái ugyanakkor 98,4% azonosságot mutattak országon (Elefántcsontpart) belül, és filogenetikai elkülönülésük magas (100%) támogatottságot kapott. A 16S rRNS gén szekvencia analízisben a *R. leporis* és a *R. sanguineus* (s.l.) ("trópusi" vonal) közötti eltérés nem volt ilyen nyilvánvaló.

Munkánk során tehát bebizonyosodott, hogy – a *Rhipicephalus* sp. I-gyel ellentétben – a *Rhipicephalus* sp. II meglehetősen heterogén, és két, filogenetikailag jól definiálható kládból (a + b) áll. A *R. sanguineus* "trópusi" és "mérsékelt égövi" vonalairól eddig is ismert volt, hogy földrajzi előfordulásuk mintázata függ a szélességi körtől. Ezen túlmenően itt azt is bebizonyítottuk, hogy a "mérsékelt égövi" vonalon belül a *Rhipicephalus* sp. I és II előfordulása hosszúsági kör szerint is elkülönül, legalábbis a Földközi-tenger térségében. Ez utóbbi jelenség magyarázataként, a gerinctelen és gerinces taxonok széles köre (így kullancsfajok és gazdáik) által szolgáltatott molekuláris bizonyítékok arra utalnak, hogy Európa déli félszigetei fő menedékhelyekként (refúgiumokként) funkcionálhattak a jégkorszak(ok) idején, amelyekből genetikailag eltérő csoportok jöttek létre. Noha az Európa északi részei felé történő újranepeülés eseményei e csoportok számára másodlagos szimpátriát eredményezhettek, genetikai különbségeik mindmáig fennmaradtak és kimutathatóak.

Vizsgálatunkban a *R. leporis* és a *R. sanguineus* (s.l.) vagy "trópusi" vonal filogenetikailag egymáshoz közel helyeződött, mindössze 1,6% *cox1* szekvencia különbséggel. Ez a szekvencia eltérés a nukleotid változatosság azon intervallumában (0,2-3%) van, ami a *R. sanguineus* (s.l.) esetében "fajon belül" jellemző. E rendszertani bizonytalanság alapján további és szélesebb körű vizsgálatokra lesz szükség annak eldöntéséhez, hogy a kelet- és nyugat-afrikai *R. leporis* nem a *R. sanguineus* (s.l.) vagy "trópusi" vonalon mint fajon belüli morfológiai változat-e.

5. Új tudományos eredmények

1. A korábban egységesnek tartott hosszúlábú denevérkullancs-faj, az *Ixodes vespertilionis* önálló fajok komplexe. Közülük kettőt tudományra új fajként sikerült leírni: ezek az *I. ariadnae* és az *I. collaris*.
2. A *Pholeoixodes* alnem (ahová főleg búvóhelyként üreget használó emlősök és odúlakó vagy üregben költő madarak kullancsai tartoznak) magában foglalja a barlangi denevérek kullancsainak *Eschatocephalus* alnemét. A madarak *Ixodes frontalis* kullancsfaja és a denevérek *Argas vespertilionis* óvantag-faja filogenetikailag nem egységes. A *Haemaphysalis erinacei turanica* önálló faji státuszt érdemel. A *Babesia vesperuginis* nem a babesiákhoz (*sensu stricto*), hanem a prototheileridákhoz áll közel.
3. Hazánkban a *Dermacentor*- és a *Haemaphysalis*-fajok genuson belüli allokrónikus szezonalitást mutatnak. A jellemzően kora tavasszal gazdát kereső fajok aktivitási csúcsát a hirtelen emelkedő téli hőmérséklet akár 1-2 hónappal előrebb hozhatja, míg úgy tűnik, a folyamatosan enyhe tél kevésbé befolyásolja. A *Haemaphysalis inermis* növekvő jelentőségű faj.
4. Városi élőhelyeken a közepes illetve nagy testű kullancsgazda fajok előfordulásának függvényében változhat a kullancsok egyedsűrűsége, bennük a kórokozók gyakorisága. A városi élőhelyek "hőszigetként" előrehozhatják egyes "tavaszi kullancsfajok" aktivitását.
5. Városi élőhelyeken a *Babesia canis* tavasszal volt a leggyakoribb kullancs vektorában, a *Dermacentor reticulatus* fajban, mert úgy tűnik, befolyásolja e kullancsok aktivitását.
6. Egyes kullancs közvetítette kórokozók (*Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum*) alternatív potenciális vektorokban (bolhákban, atkákban) olyan helyeken és időben is előfordulhatnak, ahol és amikor ismert kullancs vektoraik nem (például épületen belül vagy télen, a városközpontban).
7. Az autópálya mint mesterséges barrier hatással van a kullancsok és az általuk közvetített kórokozók helyi előfordulására. Egy autópálya mentén, ahol különféle élőhelyeken (részben emiatt) a nagyvadak eltérő egyedsűrűséggel vannak jelen, az *Anaplasma phagocytophilum* és a *Borrelia burgdorferi* s.l. prevalenciája *Ixodes ricinus* nőstényekben fordítottan arányos lehet. Erdős, dús aljnövényzetű autópálya pihenőkben a Lyme-kór okozója akár jelentősen magasabb prevalenciával fordulhat elő, mint a környező területeken.
8. A madarak fertőződhetnek *Rickettsia helvetica* fajjal. A jellemzően föld felett táplálkozó madárfajokon a *Haemaphysalis concinna* gyakoribb kullancsfaj, mint az *Ixodes ricinus*. Hazánkban a vonuló madarak "egzotikus" kórokozókat hozhatnak be: nemcsak délről, de akár kelet felől is. A délről érkező madarak által behurcolt afrikai kullancsfaj, a *Hyalomma rufipes* hazánk kontinentális éghajlatán adulttá tud vedleni, így (kisebb populációkkal) képes lehet megtelepedni.
9. A denevérekben a kutya, a kérődzők és az ember egyes piroplasmáinak, továbbá kutyákban a borz és a szarvasmarha néhány, kullancs közvetítette kórokozójának a DNS-e kimutatható.
10. Molekuláris bizonyítékok alapján a piroplasmák, a rickettsiák és az Anaplasmataceae család képviselői hazánkban sokkal nagyobb fajgazdagsággal fordulnak elő, mint korábban gondolták. A *Rickettsia africae* és egy *Babesia crassa* fajhoz közel álló piroplasma autochthon jelleggel előfordul Európában. A *Candidatus Rickettsia hungarica* tudományra új faj.
11. Mitochondriális markerek alapján a kullancsok, óvantagok fajain vagy fajcsoportjain belül genetikai heterogenitás (izoláció) fordulhat elő akár rövidebb földrajzi távolságban, ahol ez jégkorszaki refúgiумokhoz vagy geológiai barrierekhez (hegységekhez) köthető (például az *Ixodes vespertilionis* az Ibériai félsziget és Nyugat-Európa között, az *Argas vespertilionis* Közép-Ázsia és Délkelet-Ázsia között, a "*Rhipicephalus sanguineus*" a mediterrán térségben). Ugyanakkor fajokon belüli genetikai homogenitás figyelhető meg akár nagyobb földrajzi távolságban is, ha ezek között a területek között – akár áttételesen, közös telelőterületekkel megvalósuló – madárvonulási kapcsolat van vagy azonos fajú denevérek átfedő populációi fordulnak elő (például a *Haemaphysalis concinna* Közép-Európa és a Távol-Kelet között, vagy az *Argas vespertilionis* Közép-Európa és Közép-Ázsia között).

6. A doktori mű alapjául szolgáló saját közlemények

Hornok S, Elek V, de la Fuente J, Naranjo V, Farkas R, Majoros G, Földvári G. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol.* 2007;122:316-22.

Hornok S. Allochronic seasonal peak activities of *Dermacentor* and *Haemaphysalis* spp. under continental climate in Hungary. *Vet Parasitol.* 2009;163:366-9.

Hornok S, Farkas R. Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. *Med Vet Entomol.* 2009;23:41-6.

Hornok S, Meli ML, Perreten A, Farkas R, Willi B, Beugnet F, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet Microbiol.* 2010;140:98-104.

Hornok S, Horváth G. First report of adult *Hyalomma marginatum rufipes* (vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus) on cattle under a continental climate in Hungary. *Parasit Vectors.* 2012;5:170.

Hornok S, Kovács R, Meli ML, Gönczi E, Hofmann-Lehmann R, Kontschán J, Gyuranecz M, Dán A, Molnár V. First detection of bartonellae in a broad range of bat ectoparasites. *Vet Microbiol.* 2012;159:541-3.

Hornok S, Csörgő T, de la Fuente J, Gyuranecz M, Privigeyi C, Meli ML, Kreizinger Z, Gönczi E, Fernández de Mera IG, Hofmann-Lehmann R. Synanthropic birds associated with high prevalence of tick-borne rickettsiae and with the first detection of *Rickettsia aeschlimannii* in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:77-83.

Hornok S, Dénes B, Meli ML, Tánczos B, Fekete L, Gyuranecz M, de la Fuente J, de Mera IG, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Non-pet dogs as sentinels and potential synanthropic reservoirs of tick-borne and zoonotic bacteria. *Vet Microbiol.* 2013;167:700-3.

Hornok S, de la Fuente J, Horváth G, Fernández de Mera IG, Wijnveld M, Tánczos B, Farkas R, Jongejan F. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in ixodid ticks of carnivores from South Hungary. *Acta Vet Hung.* 2013;61:42-50.

Hornok S, Meli ML, Gönczi E, Hofmann-Lehmann R. First evidence of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in Hungary. *Parasit Vectors.* 2013;6:267.

Hornok S, Tánczos B, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Hofmann-Lehmann R, Farkas R. High prevalence of *Hepatozoon*-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 2013;196:189-93.

Hornok S, Kontschán J, Kováts D, Kovács R, Angyal D, Görföl T, Polacsek Z, Kalmár Z, Mihalca AD. Bat ticks revisited: *Ixodes ariadnae* sp. nov. and allopatric genotypes of *I. vespertilionis* in caves of Hungary. *Parasit Vectors.* 2014;7:202.

Hornok S, Kováts D, Csörgő T, Meli ML, Gönczi E, Hadnagy Z, Takács N, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. *Parasit Vectors.* 2014;7:128.

Hornok S, Meli ML, Gönczi E, Halász E, Takács N, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Occurrence of ticks and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* s.l. in three types of urban biotopes: forests, parks and cemeteries. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:785-9.

Hornok S, Mester A, Takács N, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Farkas R. Re-emergence of bovine piroplasmosis in Hungary: has the etiological role of *Babesia divergens* been taken over by *B. major* and *Theileria buffeli*? *Parasit Vectors.* 2014;7:434.

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

Hornok S, Estrada-Peña A, Kontschán J, Plantard O, Kunz B, Mihalca AD, Thabah A, Tomanović S, Burazerović J, Takács N, Görföl T, Estók P, Tu VT, Szőke K, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Takahashi M, Yamauchi T, Takano A. High degree of mitochondrial gene heterogeneity in the bat tick species *Ixodes vespertilionis*, *I. ariadnae* and *I. simplex* from Eurasia. *Parasit Vectors.* 2015;8:457.

Hornok S, Földvári G, Rigó K, Meli ML, Gönczi E, Répási A, Farkas R, Papp I, Kontschán J, Hofmann-Lehmann R. Synanthropic rodents and their ectoparasites as carriers of a novel haemoplasma and vector-borne, zoonotic pathogens indoors. *Parasit Vectors.* 2015;8:27.

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.* 2015;8:627.

Hornok S, Takács N, Szőke K, Kunz B. First record of *Ixodes ariadnae* in Germany - Short communication. *Acta Vet Hung.* 2015;63:347-51.

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

Hornok S, Görföl T, Estók P, Tu VT, Kontschán J. Description of a new tick species, *Ixodes collaris* n. sp. (Acari: Ixodidae), from bats (Chiroptera: Hipposideridae, Rhinolophidae) in Vietnam. *Parasit Vectors.* 2016;9:332.

Hornok S, Szőke K, Kováts D, Estók P, Görföl T, Boldogh SA, Takács N, Kontschán J, Földvári G, Barti L, Corduneanu A, Sándor AD. DNA of Piroplasms of Ruminants and Dogs in Ixodid Bat Ticks. *PLoS One.* 2016;11:e0167735.

Hornok S, Kartali K, Takács N, Hofmann-Lehmann R. Uneven seasonal distribution of *Babesia canis* and its two 18S rDNA genotypes in questing *Dermacentor reticulatus* ticks in urban habitats. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:694-697.

Hornok S, Krawczyk A. First record of *Ixodes ariadnae* in Western Europe, Belgium--Short communication. *Acta Vet Hung.* 2016;64:467-471.

Hornok S, Wang Y, Otranto D, Keskin A, Lia RP, Kontschán J, Takács N, Farkas R, Sándor AD. Phylogenetic analysis of *Haemaphysalis erinacei* Pavesi, 1884 (Acari: Ixodidae) from China, Turkey, Italy and Romania. *Parasit Vectors.* 2016;9:643.

Flaisz B, Sulyok KM, 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.* 2017;8:666-670.

Hornok S. *Ixodes ariadnae* Hornok, 2014. In: Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN (Eds): *Ticks of Europe and North Africa: A guide to species identification*. Springer International Publishing 2017, pp. 109-113.

Hornok S, Mulvihill M, Szőke K, Gönczi E, Sulyok KM, Gyuranecz M, Hofmann-Lehmann R. Impact of a freeway on the dispersal of ticks and *Ixodes ricinus*-borne pathogens: forested resting areas may become Lyme disease hotspots. *Acta Vet Hung.* 2017;65:242-252.

Hornok S, Sándor AD, Beck R, Farkas R, Beati L, Kontschán J, Takács N, Földvári G, Silaghi C, Meyer-Kayser E, Hodžić A, Tomanović S, Abdullah S, Wall R, Estrada-Peña A, Duscher GG, Plantard O. Contributions to the phylogeny of *Ixodes (Pholeoixodes) canisuga*, *I. (Ph.) kaiseri*, *I. (Ph.) hexagonus* and a simple pictorial key for the identification of their females. *Parasit Vectors.* 2017;10:545.

Hornok S, Sándor AD, Tomanović S, Beck R, D'Amico G, Kontschán J, Takács N, Görföl T, Bendjeddou ML, Földvári G, Farkas R. East and west separation of *Rhipicephalus sanguineus* mitochondrial lineages in the Mediterranean Basin. *Parasit Vectors.* 2017;10:39.

Hornok S, Szőke K, Görföl T, Földvári G, Tu VT, Takács N, Kontschán J, Sándor AD, Estók P, Epis S, Boldogh S, Kováts D, Wang Y. Molecular investigations of the bat tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae) and *Babesia vesperuginis* (Apicomplexa: Piroplasmida) reflect "bat connection" between Central Europe and Central Asia. *Exp Appl Acarol.* 2017;72:69-77.

Hornok S, Szőke K, Tu VT, Kontschán J, Takács N, Sándor AD, Halajian A, Földvári G, Estók P, Plantard O, Epis S, Görföl T. Mitochondrial gene heterogeneity of the bat soft tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae) in the Palaearctic. *Parasit Vectors.* 2017;10:109.

Hornok S, Trautwein K, Takács N, Hodžić A, Duscher GG, Kontschán J. Molecular analysis of *Ixodes rugicollis*, *Candidatus* Neoehrlichia sp. (FU98) and a novel *Babesia* genotype from a European badger (*Meles meles*). *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8:41-44.

Hornok S, Corduneanu A, Kontschán J, Bekő K, Szőke K, Görföl T, Gyuranecz M, Sándor AD. Analyses of separate and concatenated cox1 and 18S rRNA gene sequences indicate that the bat piroplasm *Babesia vesperuginis* is phylogenetically close to *Cytauxzoon felis* and the 'prototheilerid' *Babesia conradae*. *Acta Vet Hung.* 2018;66:107-115.

Hornok S, Horváth G, Takács N, Farkas R, Szőke K, Kontschán J. Molecular evidence of a badger-associated *Ehrlichia* sp., a *Candidatus* Neoehrlichia lotoris-like genotype and *Anaplasma marginale* in dogs. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9:1302-1309.

Hornok S, Horváth G, Takács N, Kontschán J, Szőke K, Farkas R. Molecular identification of badger-associated *Babesia* sp. DNA in dogs: updated phylogeny of piroplasms infecting Caniformia. *Parasit Vectors.* 2018;11:235.

Hornok S, Murányi D, Kontschán J, Tu VT. Description of the male and the larva of *Ixodes collaris* Hornok, 2016 with drawings of all stages. *Parasit Vectors.* 2019; in press.

Hornok S, Szőke K, Meli ML, Sándor AD, Görföl T, Estók P, Wang Y, Tu VT, Kováts D, Boldogh SA, Corduneanu A, Sulyok KM, Gyuranecz M, Kontschán J, Takács N, Halajian A, Epis S, Hofmann-Lehmann R. Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New Worlds. *Parasit Vectors.* 2019;12:50.

7. Köszönetnyilvánítás

Időrendi sorrendben, hálás vagyok Prof. Kassai Tibornak, akihez – csaknem 30 éve – még egyetemi hallgatóként fordultam, és aki örömmel fogadta érdeklődésemet a parazitológia iránt, "felfedezve" engem e tudományterület számára. Ugyancsak köszönettel tartozom Prof. Varga Istvánnak, aki PhD témavezetőként támogatta kutatói-oktatói pályakezdésemet. Köszönöm továbbá Prof. Farkas Róbertnek, hogy PhD tanulmányaim után segített megvalósítani a kezdetektől dédelgetett szakmai terveimet, hogy vérszívó ízeltlábúak által közvetített (nemcsak egysejtű) kórokozókkal foglalkozhassak. Külföldi partnereim közül e tekintetben kiemelkedik Prof. Regina Hofmann-Lehmann (Zürichi Egyetem, Állatorvosi Kar, Klinikai Laboratórium vezető), aki több, mint tíz éve lehetővé tette svájci tanulmányútjaimat, és – lelkesedésemet, munkakedvemet látva – módszertani, anyagi és erkölcsi támogatását azóta is folyamatosan biztosította.

Újabb keletű, eredményességükben szintén kimagasló szakmai együttműködéseket köszönhetek kutató barátaimnak, Kontschán Jenőnek (Növényvédelmi Intézet), Kovács Dávidnak (Magyar Biodiverzitás-kutató Társaság) és Sándor Attilának (Kolozsvári Agrártudományi és Állatorvosi Egyetem). A madaras illetve denevéres vizsgálatok nem valósulhattak volna meg e szakterületek hazai és nemzetközi híró művelői (társzerzőim) nélkül, akik közül kiemelkedik Csörgő Tibor (Ócsai Madárvárta) illetve Görföl Tamás (Magyar Természettudományi Múzeum), Estók Péter (Eszterházy Károly Egyetem) és Boldogh Sándor (Aggteleki Nemzeti Park). Magas színvonalú módszertani segítséget kaptam még munkatársamtól, Takács Nórától is, akinek hálás vagyok precizitásáért és segítőkészségéért. Ugyancsak nélkülözhetetlen és rendszeres szakmai kapcsolatot jelentett számomra Gyuranecz Miklós és kutatócsoportjának tagjai, akik a bakteriológia általam nem művelt területein működtek közre kutatásaimban.

További külföldi partnereim, akik ismételt támogatást nyújtottak munkáimhoz – a teljesség igénye nélkül –, Prof. José de la Fuente (IREC, Spanyolország), Olivier Plantard (Oniris, Állatorvosi Kar, Franciaország), Prof. Agustín Estrada-Peña (Zaragozai Egyetem, Spanyolország), Prof. Yuanzhi Wang (Shihezi Egyetem, Kína), Vuong Tan Tu (Ökológia és Biológiai Erőforrások Intézete, Vietnám), valamint Marina Meli és Enikő Gönczi (Zürichi Egyetem, Svájc). Köszönöm Horváth Gábor (hatósági állatorvos, Csurgó) és munkatársam, Földvári Gábor, valamint két PhD hallgatóm, Flaisz Barbara és Szőke Krisztina közreműködését, és rajtuk kívül is mindenkinek, aki társzerzőm volt vagy a cikkek köszönetnyilvánításaiban szerepel, továbbá az ÁTE Parazitológiai és Állattani Tanszéke minden egykori és jelenlegi munkatársának, akikkel együtt dolgoztam illetve dolgozom oktatási és kutatási feladataim megvalósításában.

Kutatásaim anyagi feltételét OTKA pályázatom (115854), az EDENext project és az ÁTE Kutatókari (Kiválósági) forrásai nyújtották.

Végül, de első sorban köszönöm (a szabadidőmet sem kímélő) kutatásaimhoz nyújtott állandó családi háttérrel és türelmet feleségemnek, Kovalcsik Mariannak és kislányomnak, Viviennek, akit "szakmai ártalomként" sikerült megfertőznöm – paraziták helyett – az állatok szeretetével.

Mivel abban a megtiszteltetésben volt részem, hogy szakfordítóként és zarándokként tibeti buddhizmussal is foglalkozhattam, nem feledem: kutatásaimért a legnagyobb áldozatot maguk a paraziták hozták, mivel az eredményekért életüket adták.