

MTA doktori értekezés opponensi bírálatára adott válasz

A jelölt neve: **dr. Hornok Sándor**
Az értekezés azonosítója: **dc_1605_18**
Az értekezés címe: **Kullancsok, óvontagok és általuk hordozott kórokozók
rendszereti, öko-járványtani és földrajzi vizsgálata**
Az opponens neve: **dr. Molnár Kálmán, az MTA doktora**

Tisztelt Bíráló!

Szeretném megköszönni doktori értekezésem szakmai bírálatát, és az abban megfogalmazott támogató véleményt. Az értekezés szerkezetére vonatkozó kritikájával egyetérték: egyrészt örülök, hogy mint írta, a szövegben rendkívül kevés az elütés, másrészt sajnálom, hogy a betűméret megválasztásakor nem voltam tekintettel a könnyebb olvashatóságra. A doktori mű valóban nagyon koncentráltan tartalmazza az eredményeket és több szempontból szerencsésebb lett volna kevesebbet felvonultatni. Mindazonáltal a témaválasztás után az értekezésbe választott eredményeket relevánsnak tartottam, és úgy véltem, egy kutatói pálya összefoglalása kapcsán nem állja meg a helyét a "kevesebb néha több" elv.

A Tisztelt Bíráló által megfogalmazott kérdésekre az alábbi válaszokat adom. A második oldalon vastagon kiemelt felvetésekkel a Bíráló a valóban várható trendet fogalmazta meg, nevezetesen minden bizonnyal nőni fog a kullancsfajok száma, részben a jelenleg alfajként vagy markánsan eltérő genetikai változatként számon tartott kategóriák faji szintre emelésével. Ezt azonban megnehezíti, hogy a taxonómia sem mentes a szubjektív megítéléstől, és nehéz objektív választóvonalat találni a fajok között. Jó példa erre, hogy a kullancsfajokat elválasztó átlagos 16S rRNS gén különbséget 5,3%-nak tartják (Lv és mtsai, 2014), mégis nemrég leírtak Európában olyan új fajt, amely csak 1,8%-ban – és morfológiailag is alig – különbözik legközelebbi rokonától (Estrada-Peña és mtsai, 2014). Szakmai véleményem az, hogy az ilyen és hasonló ellentmondásokat keresztezési kísérletekkel sem lehet teljes bizonyossággal megoldani, mivel ismert az eltérő fajt képviselő kullancspopulációk természetes hibridizációja (például: Araya-Anchetta és mtsai, 2013). Ugyanakkor az értekezésben önálló faji státuszt érdemlőként említett példák (ahogy a Tisztelt Bíráló fogalmaz, valószínűsíthető fajok) közül az új kullancsfajok leírására nem minden esetben vállalkozhatok. A denevérkullancsok és más gazdaspecifikus fajok esetében viszonylag könnyen áttekinthetőek a korábbi fajleírások, és jó esetben a különbségek annyira egyértelműek, hogy mellőzhető a típuspéldányokkal való összehasonlítás. A generalistább kullancsfajok esetében azonban szükség van erre, és az összes olyan már szinonimizált fajjal való összehasonlításra is, amelyek nevét invalidként "kivonták a használatból". Ezen túlmenően az olyan jelentős fajkomplexek, mint a *Rhipicephalus sanguineus* esetében kizárólag ismeretgyarapítás lehetett a célunk, mert a témával évek óta foglalkozó és nemzetközileg elismert szakemberek az illetékesek új fajokat leírni (a tudományos közvélemény "nem hagyná", hogy ezt más megtegye). Ahol viszont – az előzmények tükrében – egyetlen egy újabb adult példány megtalálásán múlik az új faj leírása, azt szeretném

megtenni, ha előkerül ilyen és a morfológiai-genetikai különbségek továbbra is igazolhatóak (például a doktori műben nem szereplő, Északkelet-Magyarországon megtalált újnak tűnő ágyi poloska faj esetében).

Az akár földrajzilag nagyon távoli kullancspopulációk közötti génáramlást leginkább gazdáik köre és azok mobilitása határozza meg. Így az értekezésben említettem arra vonatkozó példát, amikor viszonylag kis földrajzi távolságban is nagyfokú genetikai eltérés figyelhető meg (ez jellemzőbb a ragadozók, rovarevők kullancsaira, amilyen a *Haemaphysalis erinacei*), míg a denevérek és különösen a madarak kullancsai esetében e gazdaválasztás nagyobb távolságot áthidaló genetikai hasonlóságot von maga után. Így tehát:

Ad 1.: Az adott kullancsfaj jellemző gazdakörétől függ, hogy populációi között **járványtani szempontból** melyik irányba (tehát az elkülönülés vagy a kapcsolódás felé) mutató mechanizmus a meghatározó. Ennek megítélésekor figyelembe kell venni az adott kórokozót terjesztő kullancsfajok gazdáinak természetes mozgását, vándorlását (repülő fajoknál a vonulás irányát, távolságát és magasságát) éppúgy, mint a háziállatok ember általi szállítását.

Ad 2.: Az **accidentális fertőzések elkerülésének** esélye az alternatív vektorok mobilitásától és azok terjesztőképességétől függően jelentősen különbözhet. Például a kullancsok (hím *Derma-centor reticulatus*) biológiai vektorként két nagyságrenddel hatékonyabban és életük végéig közvetíthetik az *Anaplasma marginale* baktériumfajt, míg a böglyök és vérszívó legyek mechanikai vektorként csak 1-2 óra hosszúra és kevésbé hatékonyan (Scoles és mtsai, 2005). Ezek a vektorok közötti különbségek tehát nemcsak az átvitel hatékonyságában nyilvánulnak meg, hanem meghatározzák a fertőződés tér- és időbeli kockázatát. Ugyanakkor a kórokozók vektorbeli fennmaradásának módja is jelentősen befolyásolja a fertőződés esélyeit, tehát egy transovarialis öröklődő, kullancs közvetítette kórokozó esetében a gazda és újabb megbetegedések hiányában is fennmaradhat az adott terület kockázati státusza, míg a transstadialis és intrastadialis átvitel a fertőzött gazdák folyamatos jelenlétét feltételezi.

Ad 3.: Az **endemikusan, állandóan jelenlévő kórokozók visszaszorítását** megkísérelni kontra-produktív lehet, mert átvészeléses immunitást kiváltó kórokozók esetében megszüntetheti az endémiás stabilitás hosszú távon kialakult egyensúlyi állapotát (Coleman és mtsai, 2001). A helyben tartott haszonállatok általában védettek az endémiásan előforduló, kullancs közvetítette kórokozókkal szemben, viszont klinikai-kórtani értelemben fogékonyak lehetnek az arra a területre bevitt újabb genetikai változatokra. Ezt a hazánkban általunk leírt, elhullással járó szarvasmarha anaplasmosis kapcsán meg is említettük (Hornok és mtsai, 2012a). Így tehát inkább célszerű ez utóbbiak bekerülésének megelőzése szűrővizsgálattal.

Azokon a helyeken, ahol a kullancsokat a növényzetről és kérődzőkről is gyűjtöttem (főként Északkelet-Magyarországon), a helyi állattartók jellemzően évről évre ugyanazokat a legelőket használják, ezért említettem a haszonállatok rendszeres megjelenésének szerepét az egyes kullancs élőhelyeken tapasztalt kora tavaszi aktivitásuk lehetséges tényezőjeként. A *Haemaphysalis punctata* megfigyelt visszaszorulása összefügghet az ebben a térségben kedvezőtlenül változott juh- és szarvasmarha állománylétszámmal. Hazánkban jellemzően ún. három gazdás kullancsok élnek, tehát mire az adott helyen lerakott petékből adultok lesznek, háromszor is van alkalmuk a fejlődési stádiumoknak a "helyváltotatásra", jó eséllyel akár

nagyobb távolságban is. Ezzel szemben melegebb éghajlaton, az ún. egy gazdás kullancsok populációi valóban nagy eséllyel származhatnak akár egyetlen nőténytől, és részben ez magyarázza a nagyobb fokú genetikai egyöntetőséget, mint legutóbb Pakisztánból származó kullancsok esetében kimutattuk (Zeb és mtsai, 2019). Így tehát teljesen igaza van a Bírálónak abban, hogy hazánkban a három gazdás kullancsok esetében – a környezeti, abiotikus tényezők mellett – leginkább a gazdák előfordulása vagy hiánya befolyásolja a helyi abundanciát. Ezt tükrözte az autópálya két oldalán tapasztalt kullancs-előfordulási különbség is, mivel ez a barrier a *Dermacentor*-fajok adultjait hordozó, ún. reprodukciós gazdákat mozgásukban akadályozza (4.3.4. fejezet).

Egyetértek a Tisztelt Bíráló azon felvetésével, hogy az új tudományos eredmények felsorolásakor az áttekinthetőség szempontjából előnyösebb lett volna külön pontban közölni valamennyit. Én azért választottam ismét a koncentráltabb, kevesebb pont szerinti bemutatást, mert az egy pont alatt szereplő eredmények a célcsoport különbözősége dacára egymással összefüggőek. Ez valóban egyértelműbb lett volna, ha közös bevezető mondattal kezdem, illetve az egyes pontok közös nevezőjét előre kiemelem. Például a Bíráló által említett 2. pont alatt mind a négy eredmény rendszertani vonatkozású, legyen szó akár kullancs vagy óvontagfajról, illetve általuk közvetített kórokozóról. Abban tehát csak részben értek egyet a Tisztelt Bírálóval, hogy az egyes pontok alatt nem egymáshoz illő eredmények találhatóak.

A bírálat végén megfogalmazott opponensi kérdésekre válaszaim a következők:

Ad 1.: Igen, más kullancs közvetítette kórokozók szempontjából is van kapcsolat Európa és a Távols-Kelet között. Például 2010-2011 között Moldáviában gyűjtött kullancsmintákból leírták, hogy megjelent abban a térségben a kullancs encephalitis vírusának legpatogénebb, távols-keleti változata (Ponomareva és mtsai, 2015). Érdekes, hogy a vírus legmagasabb prevalenciáját abban a kullancsfajban mérték (*Haemaphysalis punctata*), amely a szomszédos Ukrajnából közölt adatok szerint gyakori madarakon (Akimov és Nebogatkin, 2012). Így ez a korábbi adat is a mi *Babesia* eredményeinkből fakadó következtetések mellett szól, nevezetesen, hogy a vírus terjedése nyugat felé összefügg a madárvonulással. A kullancs encephalitis vírusának nyugati irányú eurázsiai terjedését (tehát, hogy a Távols-Keleten jelent meg, és az európai esetek onnan származnak) más adatok is alátámasztják (Zanotto és mtsai, 1995).

Ad 2.: A piroplasmák körében a szájon át való fertőződés lehetőségét (amely nem azonos a *Babesia gibsoni* harapás útján való terjedésével) a *B. microti* csoportban írták le (Malagon és Tapia, 1994). Ugyanakkor tudomásom van róla, hogy az egyik kutatási partnerünk sikeresen végzett szájon át való *Babesia canis* fertőzési kísérletet rágcsálókra úgy, hogy a vektoraként ismert *Dermacentor reticulatus* kullancsokat megették velük. E munkának a kezdeményezéséhez hozzájárult az is, hogy három, a jelen disszertáció részét képező közleményben (4.5.2-4. fejezetek) felvettem a szájon át való fertőződés *Babesia* sensu stricto csoportban eddig figyelmen kívül hagyott lehetőségét-jelentőségét, amiről az ottani vezető kutatóval telefonos beszélgetést folytattam. Ez azonban a fejlődési ciklus ismeretében csak két módon képzelhető el: ún. preaktivált biológiai vektor kullancsokkal (amelyek sporozoitákat hordoznak, mert már megkezdték vérszívásukat) vagy mechanikai vektorokkal (amelyek merozoitákat hordoznak).

Ad 3.: Korábbi tanulmányok szerint a szájon át felvett DNS kisebb fragmensei (< 500 bp), kis hatékonysággal (a felvett DNS 0,1-0,01%-a) megjelenhetnek a rágcsálók (más emlősök?) vérében (Schubbert és mtsai, 1994). Egy másik tanulmány szerint egy 500 bp körüli génszakasz sohasem került át egyben (pusztán darabokban) a malacok bélfalán (Mazza és mtsai, 2005). A mi vizsgálatainkban kimutatott génszakasz is éppen 500 bp hosszúságú, tehát önmagában ennek a bélfalon való rendszeres és kimutatható átkerülése nem valószínű, hogy az összes általunk közölt szokatlan piroplasma-gazda társulás molekuláris eredményeit megmagyarázhatná. A modernebb, széles spektrumú vizsgálatok szerint azonban hosszabb (akár teljes) génszakaszok is átjuthatnak a bélfalon, és kimutathatóak lehetnek a keringésben (Spisák és mtsai, 2013). Ugyanakkor ismert, hogy nemcsak a gyomortartalomnak (Liu és mtsai, 2015) és a bélnek, de a vérnek is van nukleáz aktivitása (Tamkovich és mtsai, 2006). Mindezt figyelembe véve nehezen tartom elképzelhetőnek, hogy a denevérek csak a piroplasmák DNS-ét veszik fel úgy, hogy az átjut a bélfalukon, megjelenik a szöveteikben, és a vérből felveszik a kullancsok, amelyek emésztetlenül tárolják. Ugyanis csak így lehettek volna a denevérek szövetei, ürületei és kullancsai is PCR-pozitívak abban az esetben, ha a denevérek a legkevésbé sem fogékonyak a szóban forgó piroplasmákra.

Másfelől fontos megemlíteni, hogy kisebb méretű, a gazda véreből származó (tehát gazda- és nem kórokozó eredetű) DNS szakaszok hosszabb távon is kimutathatóak a kullancsok középbél-sejtjeiben (Kirsten és Gray, 1996). Ezt használják ki az ún. *blood-meal* analízis során, tehát annak a madár/emlős fajnak vagy csoportnak az azonosításához, amelyen a kullancs korábban vért szívott. A szóban forgó PCR-rel és RLB módszerrel jellemzően még kimutatható DNS szakasz hosszúságát 95 bp-nak találták (Kirsten és Gray, 1999).

Ad 4.: Valóban, a kullancsok akár több évig is élhetnek, ami függ a fajuktól (*Dermacentor marginatus*: jellemzően egy év, *D. reticulatus*: egy-két év; *Ixodes ricinus*: két-három év) és környezeti hatásoktól, beleértve a gazdára jutás lehetőségét. Az utóbbit pedig befolyásolja még a kórokozóval való fertőzöttség is. Mindennek ciklikus (pl. évszakos) és random (pl. időjárási) háttértényezői egyaránt lehetnek, így előre meg nem jósolható, de egy tendencia megállapítható. Ezért a szezonális és abundancia vizsgálatokban igyekeztem több élőhelyről végzett mintagyűjtés alapján következtetéseket levonni (például 4.3.2. és 4.3.4. fejezetek).

Ad 5.: A madárspecialista (ornithophil) és üregkedvelő (pholeophil) kullancsfajok találkozása madár gazdáikkal valóban fészkelési szokásukkal függ össze. Erre jó példa az *Ixodes arboricola* jelenléte odúlakó madarakon, vagy a Bíráló által említett *I. lividus* faj partifecskén. Az általam madarokról gyűjtött, legfontosabb három kullancsfaj közül viszont egy további ornithophil kullancsfaj, az *I. frontalis* a föld közelében, a növényzeten keres gazdát (Agoulon és mtsai, 2019), és ezzel függ össze a földről táplálkozó madarakon való gyakori előfordulása. Két további kullancsfaj (az *I. ricinus* és *Haemaphysalis concinna*) pedig generalista. Az *I. ricinus* lárváinak és nimfáinak legkedveltebb gazdái hazánkban a rágcsálók (Rigó és mtsai, 2011), a *H. concinna* esetében pedig a saját adataim szerint is az őzek (Hornok és mtsai, 2012b). Az pedig ismert, hogy a kullancsok passzív gazdakeresés során növényzeten elfoglalt magassága összefügg azon gazdák méretével, amelyekre fel akarnak kapaszkodni (*I. ricinus*: Meylon és Jaenson, 1997; *Haemaphysalis* spp.: Tsunoda és mtsai, 2004).

Ad 6.: Igen, sőt ez a módja (ún. allopreening: kölcsönös tisztítás) egyes megfigyelések szerint hatékonyabb módja a külső élősködők eltávolításának, mint az "öntisztálkodás" (Villa és mtsai, 2016). Ez nem meglepő annak ismeretében, hogy a kullancsok gazdán elfoglalt predilekciós

helye nemcsak azzal függ össze, hogy mely testrészekre jutnak fel legnagyobb valószínűséggel vagy milyen a bőr vastagsága, hanem attól is, hogy tisztálkodáskor hol érik el őket legkevésbé a gazdák (kullancsok többnyire a madarak csőre körül). Ez utóbbit váltja ki a kölcsönös tisztítás.

Végül szeretném hozzátenni: megtisztelő számomra, hogy a Bíráló személyében olyasvalaki értékelt tudományos munkásságomat, akinek parazitológiai kutatásait számos, állatorvosi szempontból fontos új faj leírása fémjelzi. Összegzésképpen még egyszer köszönöm a pozitív bírálatot, a konstruktív kérdéseket, és tisztelettel kérem ez utóbbiakra adott válaszaim elfogadását.

Budapest, 2019. november 8.

dr. Hornok Sándor

Hivatkozott irodalom

Agoulon A, Hoch T, Heylen D, Chalvet-Monfray K, Plantard O. Unravelling the phenology of *Ixodes frontalis*, a common but understudied tick species in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019;10:505–512.

Akimov I, Nebogatkin I. Distribution of the tick *Haemaphysalis punctata* (Acari, Ixodidae) in Ukraine. *Vestnik zoologii* 2012;46:e46–e51.

Araya-Anchetta A, Scoles GA, Giles J, Busch JD, Wagner DM. Hybridization in natural sympatric populations of *Dermacentor* ticks in northwestern North America. *Ecol Evol.* 2013;3:714–724.

Coleman PG, Perry BD, Woolhouse ME. Endemic stability – a veterinary idea applied to human public health. *Lancet* 2001;357:1284–1286.

Estrada-Peña A, Nava S, Petney T. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:734–43.

Hornok S Micsutka A, Fernández de Mera IG, Meli ML, Gönczi E, Tánczos B, Mangold AJ, Farkas R, Lutz H, Hofmann-Lehmann R, de la Fuente J. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res Vet Sci.* 2012a;92:30–35.

Hornok S, Horváth G, Jongejan F, Farkas R. Ixodid ticks on ruminants, with on-host initiated moulting (apolysis) of *Ixodes*, *Haemaphysalis* and *Dermacentor* larvae. *Vet Parasitol.* 2012b;187:350–3.

Kirstein F, Gray JS. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:4060pii: 201603625.

Kirstein F, Gray JS. Blood meal identification in ticks: a promising tool in ecological research on tick-borne diseases. *Zentralbl Bakteriol* 1999;289:760–764.

Liu Y, Zhang Y, Dong P, An R, Xue C, Ge Y, Wei L, Liang X. Digestion of Nucleic Acids Starts in the Stomach. *Sci Rep.* 2015;5:11936.

Lv J, Wu S, Zhang Y, Chen Y, Feng C, Yuan X, Jia G, Deng J, Wang C, Wang Q, Mei L, Lin X: Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasit Vectors*. 2014;7:93.

Malagon F, Tapia JL. Experimental transmission of *Babesia microti* infection by the oral route. *Parasitol Res*. 1994;80:645–8.

Mazza R, Soave M, Morlacchini M, Piva G, Marocco A. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Res*. 2005;14:775–84.

Mejlon HA, Jaenson TGT. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 1997;21:747–754.

Ponomareva EP, Mikryukova TP, Gori AV, Kartashov MY, Protopopova EV, Chausov EV, Konovalova SN, Tupota NL, Gheorghita SD, Burlacu VI, Ternovoi VA, Loktev VB. Detection of Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis viral RNA in ticks collected in the Republic of Moldova. *J Vector Borne Dis*. 2015;2:334–336.

Rigó K, Gyuranecz M, Tóth AG, Földvári G. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ectoparasites in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11:1499–501.

Schubbert R, Lettmann C, Doerfler W. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol Gen Genet*. 1994;242:495–504.

Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol*. 2005;42:668–675.

Spisák S, Solymosi N, Ittész P, Bodor A, Kondor D, Vattay G, Barták BK, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z, Szállási Z, Rasmussen S, Sicheritz-Ponten T, Brunak S, Molnár B, Csabai I. Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS One*. 2013;8:e69805.

Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075:191–6.

Tsunoda T, Tatsuzawa S. Questing height of nymphs of the bush tick, *Haemaphysalis longicornis*, and its closely related species, *H. mageshimaensis*: correlation with body size of the host. *Parasitology* 2004;128(Pt 5):503–509.

Villa SM, Goodman GB, Ruff JS, Clayton DH. Does allopreening control avian ectoparasites? *Biol Lett*. 2016;12: pii: 20160362.

Zanotto PMA, Gao GF, Gritsun T, Marin MS, Jiang WR, Venugopal K, Reid H W, Gould EA. An arbovirus cline across the northern hemisphere. *Virology*. 1995;10:152–159.

Zeb J, Szekeres S, Takács N, Kontschán J, Shams S, Ayaz S, Hornok S. Genetic diversity, piroplasms and trypanosomes in *Rhipicephalus microplus* and *Hyalomma anatolicum* collected from cattle in northern Pakistan. *Exp Appl Acarol*. 2019, in press.