

Állatorvostudományi Egyetem  
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Denevérek vérszívó ektoparazitáinak öko-epidemiológiai  
vizsgálata**

Ph.D.

Szőke Krisztina

2019

Témavezető és témabizottsági tag:

.....

Hornok Sándor, Ph.D., Habil.

ÁTE, Parazitológiai és Állattani Tanszék

témavezető

Estók Péter, Ph.D.

Állattani Tanszék

Biológia Intézet

Eszterházy Károly Egyetem

témabizottsági tag

Prof. Farkas Róbert, DSc.

ÁTE, Parazitológiai és Állattani Tanszék

témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a n. .... sz. példány.

.....

Szőke Krisztina

## Bevezetés

A denevérek (Chiroptera) rendje a második legfajgazdagabb emlőscsoport a rágcsálók után és e mellett a legszélesebb körben elterjedt szárazföldi emlősök. Az emberek megjelenése a denevér élőhelyein és a denevérek adaptációja a városi területekhez növelte az emberek és a denevérek közötti kapcsolat esélyét. Az elmúlt néhány évtizedben számos zoonózisos betegség természetes gazdaszervezetének is elismerték őket. Migrációs szokásaik, a nagy populációs sűrűségük és szállási preferenciáik azonban számos fertőzés átadását elősegítik és lehetővé teszik a kórokozók nagyobb távra történő terjedését. A denevérek fajonként több zoonótikus vírust hordoznak, mint a rágcsálók és többségük magas emberi patogenitást mutat. A kórokozók átvitelét az emberekre vagy más fajokra a denevérek közvetlenül, vagy olyan vektorokon keresztül terjeszthetik, mint a paraziták. A denevérek ektoparazitáinak nagy része gazda-specifikus, de vannak olyan fajok, amelyek embereket és más emlősöket is megfertőzhetnek.

A denevér kullancsok (Acari: Ixodidae) az egész Óvilágban elterjedtek. Eddig három denevérspecifikus kullancsfajt ismertünk (*Ixodes vespertilionis*, *I. simplex* és *I. kopsteinii*) azonban az utóbbi időben, egy új kullancsfajt fedeztek fel, amely szintén a denevéreket parazitálja. Az *I. vespertilionis* és *I. simplex* a legnagyobb földrajzi elterjedésű kullancsfajok közé tartozik, amelyek az Óvilág nagy részét lefedik (Európától délre Afrikában és Ausztráliában, keletre Ázsiában, beleértve Japánt is). Ennek ellenére azonban még nem végeztek filogeográfiai tanulmányokat e két kullancsfaj morfológiai és / vagy genetikai egységességének vizsgálatára. Vektor szerepükről is csak kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre.

Az óvantagok közül, az *Argas vespertilionis* az Óvilágban a leggyakoribb és legelterjedtebb, denevérekre specializálódott faj. Járványtanilag az egyik legfontosabb vérszívó parazitája a denevéreknek, mivel nem csak denevéreket, hanem háziállatokat és embereket is fertőzhet. A korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az óvantagok baktériumokat (*Rickettsia* sp., *Elrichia* / *Anaplasma* sp. és *Bartonella* sp.) és piroplasmákat (*Babesia* fajok) is hordozhatnak.

A denevéreket tartják a vérszívó poloskák (Cimicidae) ősi gazdafajának, amelyek később más gazdákra specializálódtak (emberek és madarak). Történelmileg és ökonómiailag a közönséges ágyipoloskát (*Cimex lectularius*) tartják a legfontosabbnak, mivel világszerte előfordul és az emberi környezetet részesíti előnyben. A *Cimex lectularius* legalább 65 kórokozó potenciális vektora lehet, de vektorkompetenciája még megerősítésre vár.

## Célkitűzéseink

1. A denevéreken élősködő kullancsok mitokondriális gén- és morfológiai heterogenitásának, földrajzi elterjedésének és gazdaspektrumának feltérképezése az Óvilágban
2. Az *Argas (Carios) vespertilionis* Óvilágból származó mintáinak vizsgálata a kullancsokéhoz hasonló összefüggésben (morfológia, génheterogenitás és gazdaspektrum)
3. A denevéropoloskák (Cimicidae) filogenetikájára vonatkozó ismeretek bővítése, Magyarországról, Romániából (utóbbi a Balkánt képviseli) és további két országból (Dél-Afrika és Vietnám) származó minták vizsgálatával
4. A denevérkullancsok és óvontagok által hordozott piroplasmák (Apicomplexa: Piroplasmida) és *vector-borne* baktériumok vizsgálata
5. Kullancsok, óvontagok és poloskák vizsgálata kinetoplastida (Euglenozoa: Kinetoplastida) DNS-re
6. A denevérek ürülékének szűrése piroplasmákra (Apicomplexa: Piroplasmida) és baktériumokra

# Anyag és módszer

## Paraziták és ürülékek gyűjtése és azonosítása

1890 és 2016 között ektoparazitákat (Kullancsok: *Ixodes vespertilionis*, *I. ariadnae*, *I. simplex*; óvantag: *Argas vespertilionis* és denevéropoloskák: *Cimex* sp. and *Cacodmus* sp.) gyűjtöttünk Európából, Ázsiából és Afrikából, összesen 17 országból (Magyarország, Románia, Németország, Szerbia, Montenegró, Bosznia- Hercegovina, Cseh Köztársaság, Olaszország, Franciaország, Spanyolország, Oroszország, Vietnám, India, Japán, Kína, Kenya és Dél - Afrika).

Morfológiai összehasonlításokat végeztünk a kullancsokon a tapogatók hossza/alakja, a scutum alakja és indexe (hosszúság/szélesség), az alloscutum sertéinek sűrűsége és a coxális serték elhelyezkedéseinek alapján. Az óvantag lárvák (*Argas vespertilionis*) morfológiai azonosítása Hoogstraal (1957 és 1958) leírása, a poloskáké pedig a protonum, paragenitális sinus (*Cimex* sp.) vagy a párzótövis (*Cacodmus* sp.) alapján történt. Az egyes országok reprezentatív mintáinak azonosítását Jenaval fénymikroszkóppal végeztük a tejsavval végzett tisztítás után.

2014-ben, május és szeptember között, denevér ürülékmintákat gyűjtöttünk Magyarországon és Hollandiában. A standard mintaméret minden denevér esetében három-öt székletminta volt. Az egyes mintákat számozott, csavaros kupakkal ellátott műanyag csövekbe helyeztük és fagyasztva  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk az értékelésig.

## Az ektoparaziták és ürülékek DNS kivonása

A kullancsok (*Ixodes ariadnae*, *I. vespertilionis*, *I. simplex*) és poloskák (*Cimex* spp. és *Cacodmus* spp.) esetében a DNS kivonást egyedenként vagy a hátsó lábból, az *Argas vespertilionis* lárvákét pedig egyedenként vagy kis *pool*-okban végeztük QIAamp DNS Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. A kullancsokat szárítottuk, majd háromszor mostuk (detergenst tartalmazó vízben, csapvízben és desztillált vízben), majd ollóval daraboltuk.

A DNS-t a denevérürülékből a gyártó utasításainak megfelelően a QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország) extraháltuk. Az összes mintát a DNS-tartalom mennyiségére és minőségére a 18S rRNS génre specifikus TaqMan valós idejű PCR-rel vizsgáltuk (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnország).

## A denevér ektoparaziták filogenetikai vizsgálata

PCR vizsgálatot végeztünk a kullancsok 16S rRNS génjének egy kb. 460 bázispárnyi és a 12S RNS génjének kb. 420 bázispárnyi fragmentumának amplifikálására. A Japán minták esetében COI PCR-t alkalmaztunk, amely a gén legfeljebb 710 bp hosszúságú fragmentumát

amplifikálja. A Németországban gyűjtött kullancsokat összehasonlítottuk más, a GenBank-ban rendelkezésre álló kullancs izolátumok szekvenciáival. *Argas vespertilionis* esetében két mitokondriális markert amplifikáltunk: a *cox1* gén 710 bp hosszúságú fragmentumát és a 16S rRNS gén kb. 460 bp részét. A citokróm c oxidáz 1 (*cox1*) gént választottuk elsődleges géneként a denevérpoloskák molekuláris elemzéséhez. A PCR a különböző rovarrendű *cox1* gén 658 bp hosszúságú, ezen kívül a vietnami mintából származó *cox1* gén hasonló hosszúságú fragmentumát amplifikáltuk. Az eredmények kiegészítéseként 16 mintát, amelyek különböző *cox1* haplotípust mutattak országon belül, internal transcribed spacer 2 (ITS2) nukleáris markerre is leteszteltük. Ez a PCR a Hemiptera ITS2 ~ 1027 bp méretű fragmentumát amplifikálja. A PCR termékeket 1,5% agaróz gélben tettük láthatóvá. A tisztítást és a szekvenálást (mintánként kétszer) a Biomi Inc. (Gödöllő, Magyarország) végezte. A kapott szekvenciákat manuálisan, a BLASTN programmal szerkesztettük, majd igazítottuk és összehasonlítottuk a GenBank-ban elérhető referencia szekvenciákkal. A reprezentatív szekvenciákat benyújtottuk a GenBank-hoz.

A filogenetikai elemzéseket a Tamura-Nei modell és a Maximum Composit Likelihood módszer szerint végeztük, a MEGA program segítségével. A filogenetikai fákat az R programmal hasonlítottuk össze.

### **Kórokozók kimutatása ektoparazitákban és denevérürülékekben**

A DNS minták molekuláris vizsgálatát konvencionális PCR-rel végeztük, amely a piroplasmák (*Babesia/Theileria* spp.) 18S rRNS gén kb. 500 bp hosszú részét amplifikálja. Ez a módszer más apicomplexa nemzetség, beleértve *vector-borne* haemogregarinákat és citogén coccidiumokat is detektál. *Trypanosoma* és rokon kinetoplastida esetében a 18S rRNS gén kb. 900 bp hosszú fragmentumát amplifikáltuk. *Argas vespertilionis* további négy mintáját tovább teszteltük Piroplasmida *cox1* génjére.

Kullancsok jelenlétét az ürülék mintákban Ixodidae család 16S rRNS génje alapján vizsgáltuk. A székletmintákban az *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* és Chlamydiales DNS-ének jelenlétét is kerestük. Ezen felül a DNS-kivonatokat haemoplasmák szempontjából is elemeztük.

Az összes PCR-t pozitív és negatív kontrollokkal végeztük. Az tesztek során a pozitív kontrollok pozitivitást mutattak, míg a negatív és az extrakciós kontrollok negatívak maradtak (az utóbbi a minta szennyezettségének hiányát jelzi). A PCR-termékek elektroforézisét 1,5% -os agaróz gélben végeztük el, etídium-bromiddal megfestettük és ultraibolya fényben tettük láthatóvá. A tisztítást és a szekvenálást (kétszer) az összes PCR-pozitív mintából a Biomi Inc. (Gödöllő, Magyarország) és a Macrogen Europe (Amszterdam, Hollandia) végezte. A reprezentatív szekvenciákat benyújtottuk a GenBank-hoz. Az evolúciós szintű elemzéseket a MEGA programmal végeztük.

## Statisztikai elemzés

A kullancsfajok asszociációját a denevércsaládokkal, a Fisher-egzakt teszttel végeztük. A kullancsfertőzés intenzitását (azaz a denevér egyedeken lévő kullancsok számát) a denevérfajok között Mann-Whitney U-teszttel és Kruskal Wallis H-teszttel hasonlítottuk össze. Az elemzésből kimaradtak a kis (<5) mintaszámú denevérfajok. A COIN csomagot használtuk a kapcsolt rangok P- értékeinek korrekciójára.

Az *Argas vespertilionis* méréseinek átlagait kétmintás T-próbával végeztük.

A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha  $P < 0,05$ . Bonferroni-Holm-korrekcióval korigáltuk a P-értékeket.

# Eredmények

## A denevér ektoparaziták molekuláris taxonómiai vizsgálata földrajzi kontextusban

Összesen 21 denevércullancsot (16 *Ixodes vespertilionis*: 6 nőstény, két hím, 7 nimfa, egy lárva; két *Ixodes ariadnae*-szerű egyed: egy nőstény és egy lárva; három *I. simplex* egyed: egy nőstény, egy nimfa és egy lárva) gyűjtöttünk 10 országból Eurázsia területéről. Nem találtunk morfológiai különbséget az *I. vespertilionis* esetében Európán belül gyűjtött egyedek között. Genetikai vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a nyugat- és délnyugat európai egyedek, amelyeket Franciaországban (15 nukleotid különbség, 97,6 % egyezés) és Spanyolországban (34 nukleotid különbség, 94,6 % egyezés) gyűjtöttünk, elkülönülnek a Közép-Kelet Európában gyűjtött egyedektől (ezek között maximum 8 nukleotid különbség, 97,6%-os egyezés). Ennek megfelelően a 16S rRNS-gén amplifikált részének alapján a francia izolátumok (regisztrációs száma: KR902772) a középkelet-európai izolátumokkal csoportosultak, de külön-külön a spanyol izolátumoktól (KR902773). A Vietnámban gyűjtött *I. vespertilionis* morfológiailag eltér az európai egyedektől (konvex vs. konkáv scutum). A vietnámi kullancs (KR902756) COI szekvenciája szintén a legmagasabb intraspecifikus genetikai divergenciát mutatta ebben a tanulmányban: különbözött a középkelet-európai *I. vespertilionis* genotípusoktól (101 nukleotid különbség, 84,1% azonosság) és távolabbi csoportba esett a filogenetikai fán. Ennek a legközelebbi hasonló szekvenciájú egyede (88%) egy korábban publikált Japán genotípus lett. Egy másik, Vietnámban gyűjtött lárva, morfológiai hasonlóságot mutatott az *I. ariadnae* fajhoz. Az egyed COI szekvenciája a legnagyobb hasonlóságot (89,5%) a középkelet-európai *I. ariadnae* genotípussal mutatta. Ezt a megállapítást csak részben erősítette meg a 16S gén elemzése, mivel a vietnámi egyed külön klaszteralizálódott az európai *I. ariadnae* egyedtől (12–14 nukleotid különbség, 96–96,6 % egyezés). Egy Japánban gyűjtött nőstény kullancs szintén morfológiai hasonlóságot mutatott az *I. ariadnae* egyeddel. A COI filogenetikai elemzése során azt találtuk, hogy ez a Japán genotípus együtt klaszteralizálódott a vietnámi egyeddel, közel a magyarországi mintához.

Egy Indiában és Japánban gyűjtött nimfa és egy nőstény kullancs hasonló morfológiát mutatott az *I. simplex* kullancssal. A filogenetikai elemzés során ez a két ázsiai *I. simplex* minta együtt csoportosult (25 nukleotid különbség, 96% -os azonosság a), de külön-külön a két európai (francia és magyar) genotípustól.

2015 március 6-án egy kullancsot találtunk egy *Myotis myotis* denevérfajon. Morfológiai vizsgálatunkban ez az egyed hasonlóságot mutatott az *I. ariadnae* fajhoz. A kullancs részleges COI-szekvenciája (KR093169) is 100%-os homológiát mutatott az *I. ariadnae*-val (KJ490306).

Összesen 329 óvantag lárva gyűjtöttünk 17 denevérfajról, nyolc országban. Négy lárva kivételével mindegyiket *Argas vespertilionis* fajként azonosítottunk. A lárvák többségét (59,1%:



318-ból 188, CI: 53,5–64,6%) *Pipistrellus* fajokról gyűjtöttük. A kiválasztott, diagnosztikai szempontból fontos struktúrák mérése nem mutatott szignifikáns különbséget az Európából és Vietnámból származó minták között, kivéve a hátsó lemez hosszát és szélességét (Olaszország / Románia és Vietnám: egyedek lemezének hossza  $t = 3,49$ ,  $df = 13$ ,  $P = 0,008$ ; Olaszországból / Romániából és Vietnámból származó óvantagok lemezének szélessége:  $t = 3,21$ ,  $df = 13$ ,  $P = 0,012$ ). E mellett a serték pillázottságában is különbséget találtunk. Az *A. vespertilionis* *cox1* szekvenciái 0–2 nukleotid (0–0,3%) különbséget mutattak (99,7–100%: 650–652 / 652 bp) a magyar, román és olasz izolátumok között. Az Európából származó haplotípusok 37–38 nukleotid (5,7–5,8%) különbséget mutattak a Kenyában gyűjtött *A. vespertilionis* lárvák között (94,2–94,3%: 614–615 / 652 bp hasonlóság). Nyilvánvalóbb volt a szekvenciaeltérés (46–49 nukleotid (7,1–7,5%) eltérés, 92,5–92,9%: 603–606 / 652 bp hasonlóság) az *A. vespertilionis* Európából és Vietnámból származó egyedek között. Az *A. vespertilionis* izolátumok klaszteralizálása az Ornithodorinae két tagjával mérsékelt (72%) támogatást kapott. A 16S rRNS gén alapján is az európai egyedek elkülönülnek a vietnámi/kenyai egyedektől (99%). E mellett az *A. vespertilionis* az *Argasidae* családon kívülre esett, viszont ez a gén a faj kapcsolatát az Ornithodoridae családdal csak gyengén támogatta.

Összesen 216 denevéropoloskát (Cimicidae) gyűjtöttünk denevérekről vagy azok szálláshelyeiről. A *Cimex lectularius*-hoz hasonló egyedeket mind a denevéreken (*Pipistrellus pipistrellus*, *Myotis bechsteinii* és *Hypsugo pulveratus*), mind pedig azok szálláshelyein is megtaláltuk. A *Ci. pipistrelli* csak a denevérek szálláshelyen fordultak elő. A *Ci. lectularius* egyedek hasonló általános morfológiai tulajdonságokat mutattak, azonban a magyar és vietnámi egyedek esetében a vietnámi nőstény *paragitalis sinusa* kerekített volt. A Magyarországon talált *Ci. lectularius*-hoz hasonló egyedek csupán 5 nukleotid különbséget mutattak (99,2–100% hasonlóság). Egy Magyarországon gyűjtött *Cimex* sp. viszont 46 nukleotid különbséget (92,7% hasonlóságot) mutatott a *Ci. lectularius* referencia szekvenciáitól. Egy másik vietnámi *Cimex* sp. esetében pedig ennél jóval nagyobb különbséget találtunk (82,7% hasonlóság). *Cimex pipistrelli*-ként azonosított poloskák között csupán 6 nukleotid különbség volt (99–100% hasonlóság). A dél-afrikai *Cacodmus ignotus* két *cox1* haplotípussal rendelkezik, egy nukleotid különbséggel (99,8–100% hasonlóság). Váratlan eredmény a *Ca. ignotus* és *Ca. sparsilis* esetében az ITS2 hasonlóság, amelyek csak 93,2% *cox1* szekvencia hasonlóságot mutattak.

### **Piroplasmák és szabadon élő Bodonidák kimutatása ektoparazitákban**

Összesen 308 denevér kullancsot (*I. vespertilionis*: 124, *I. ariadnae* 45 és *I. simplex* 139 egyed) gyűjtöttünk Románia és Magyarország területéről 2008 és 2015 között, 17 denevérfajról. Kórokozó szempontjából az *I. simplex* (*Babesia* és *Theileria* sp.) mutatta a legnagyobb diverzitást (138 egyedből 13) az *I. vespertilionis* fajhoz képest ( $P=0,02$ ). Az *I.*

*ariadnae* kullancsban csak a *Ba. vesperuginis* DNS szekvenciája (azonosság: 448/448 bp = 100%) volt jelen. Az *I. vespertilionis* lárvákban a *Ba. vesperuginis* (azonosság: 448/448 bp = 100%) és a *Ba. crassa* (azonosság: 404/410 bp = 98,5%) szekvenciáit azonosítottuk. *I. simplex*-ben a *Ba. crassa* egy másik genotípusának szekvenciáit (azonosság: 403/410 = 98,3%), egy zoonótikus *Ba. venatorum* rövidebb szekvenciáit és *Ba. canis* két szekvenciáját (mindkét identitás: 420/420 bp = 100) % izoláltuk. A szekvenálás eredményei *Theileria* sp. fajok DNS-ének jelenlétét kizárólag *I. simplex*-ben mutatta (*T. capreoli* (egyezés: 423/425 bp = 99,5%); *T. orientalis* (egyezés: 432/432 bp = 100%); *Theileria* sp. OT3 (egyezés: 432/432 bp = 100%)).

Összesen 321 óvantag lárvét gyűjtöttünk 17 denevérfajról, nyolc országból (Magyarország, Románia, Olaszország, Kenya, Vietnam, Kína). A 18S rRNS gén alapján 12 minta tartalmazta piroplasma DNS-ét. Mind a 12 minta esetében csak *Ba. vesperuginis* DNS-t találtunk, amelyek 100%-ban azonosak voltak a kínai és magyar mintákban. Az összekapcsolt *cox1* és 18S rRNS génszekvenciákkal végzett filogenetikai elemzésekkel kapcsolatban mindkét alkalmazott modell hasonló általános topológiájú fákat eredményezett. A *Ba. vesperuginis* (KY657243) *cox1* szekvenciája a legnagyobb hasonlóságot a *Cytauxzoon felis* (KC207821) szekvenciájával (79,1%, 709/896 bp) mutatta, és kevésbé hasonlított a *Babesia* spp. (azaz 74,9–77,6%) és *Theileria* spp. fajok szekvenciáihoz. A 18S rRNS szekvencia 90% -nál kevesebb egyezést mutatott a *Babesia* és *Theileria* spp. sensu stricto csoporttal.

A 307 denevérkullancs (*I. vespertilionis*, *I. ariadnae* és *I. simplex*), 299 *Argas vespertilionis* lárva és 207 denevérpóloska (*Ci. lectularius* és *Ci. pipistrelli*) mintából három volt PCR-pozitív kinetoplastida DNS-re. Egy *I. simplex* lárvában *Bodo saltans* DNS-ét (99,7% (754/756 bp) azonosság a referencia szekvenciával: AY490224) találtuk meg. Egy *A. vespertilionis* lárvában és egy *Ci. pipistrelli* nimfában pedig *Bodonidae* fajok DNS-ét izoláltuk (100%: 776/776 bp egyezés a *Bodonidae* sp. Pan-2 (AY753625) szekvenciáival). Mindegyik mintánk negatív lett *Trypanosoma* DNS-re.

## **Piroplasmák és vector-borne baktériumok kimutatása denevérürülékben**

Összesen 196 egyedi és 25 pool-ozott denevér ürülék mintát gyűjtöttünk Magyarország és Hollandia területén. *Babesia canis* DNS-ét találtuk meg öt magyar egyedi mintában (prevalencia 2,7 %, CI: 0,9-6,2 %). Ezek a denevérekből származó *Babesia* izolátumok 100%-ban megegyeznek Horvátországban, kutyákból kimutatott *Ba. canis* DNS-ével. Mind az öt pozitív minta olyan területről származik, amelymel 50 km-es körzetében, ahol korábban a legtöbb szeropozitív kutyákat találtak, egy előzetes országos felmérés során. Holland, *Myotis dasycneme* kolóniáiból származó összesített mintákban egy másik kórokozó szekvenciáit is megtaláltuk, amely 99%-os homológiát mutatott a *Besnoitia besnoiti* fajjal.

A denevérürülékek közül 13 minta volt pozitív *Rickettsia* DNS-re, Három mintában *Rickettsia* új genotípusát találtunk, mely 97,7%-ban ((333/ 341 bp) hasonlított egy olyan genotípusra, melyet rágcsálókban (*Apodemus flavicollis*) mutattak ki Lengyelországban (KY488187), de viszonylag szorosan kapcsolódott a *Rickettsia felis*-hez (332/341 bp, azaz 97,4% -os azonossággal) is. Ezenkívül az *R. helvetica* DNS-ét is megtaláltuk Magyarországon gyűjtött mintában. Négy holland mintából, melyeket *Myotis dasycneme* fajokról gyűjtöttek, *Neorickettsia risticii* DNS-ét izoláltuk. A 16S rRNS gén alapján az itt talált *N. risticii* szekvenciái 100%-ban megegyeznek (273/273 bp) lovakból kimutatott *N. risticii* szekvenciáival (e.g., AF380258) és közeli rokonságban levő más *Neorickettsia* genotípusokkal. A minták közül három tartalmazott még *Mycoplasma* DNS-t is, melynek fajszerű azonosítását nem lehetett elvégezni.

# Diszkusszió

## A denevér ektoparaziták molekuláris taxonómiai vizsgálata földrajzi kontextusban

A denevérekullancsok kifejezett genetikai különbségeket mutatnak és filogenetikailag hasonlóan csoportosulnak a denevérgazda fajokkal. Ebben az összefüggésben a denevérfajok földrajzi elterjedése, a földrajzi akadályok és a jégkori periódusok utáni rekolonizáció (amelyek izolálhatják a denevérpopulációkat) különösen fontosak lehetnek a szelekcióban. Kimutattuk, hogy a Spanyolországban gyűjtött minták jelentősen különböznek (és filogenetikailag csoportosulnak) a többi vizsgált genotípustól. Ennek a jelenségnek az lehet az oka, hogy az itt élő denevérfajok izolált populációt képviselnek az Ibériai-félszigeten. A Pireneusok barriert képezhetnek, ami megakadályozza a populációkat a keveredésben. Európából származó *I. vespertilionis* (KR902757-66), a Vietnámból származó nagy (16%) genetikai divergenciájú *I. vespertilionis* (KR902756) és a hasonló genotípusú Japán egyed (AB231667) jól elválasztott és távoli filogenetikai pozíciója arra utalhat, hogy ezek valószínűleg különálló kullancsfajokat képviselnek. A vietnámi egyedek *Rhinolophus affinis*, a japán pedig *R. cornutus* denevérfajról származik. A mitokondriális (citokróm b) szekvenciák filogenetikai elemzése alapján ez a két denevérfaj külön-külön csoportosul a nemzetség többi képviselőjétől (amelyekről a jelen vizsgálatban a kullancsok származnak), hasonlóan csoportosul a kullancsok filogenetikai helyzetéhez. Elsőként igazoltuk *I. ariadnae*-szerű egyedek előfordulását Ázsia területén, amely eddig csak Európából volt ismert. Az *I. ariadnae* elsődleges gazdafajai a *Myotis* spp. A *Murina leucogaster*, amelyről a Japán genotípus származik, szintén közeli rokona a *Myotis* fajoknak. Az *I. ariadnae* németországi gyűjtőhelye legalább 250 km-re fekszik a délkeleti országhatároktól, kb. 650 km-re a kullancsfaj ismert élőhelyétől Magyarországon. Figyelembe véve a denevér migrációs tartományát, amely kb. 100-250 km Magyarországon és Németországban, ez az adat arra utal, hogy az *I. ariadnae* autochton lehet Németország területén. *I. simplex* egyedeket gyűjtöttünk *Miniopterus magnater* (India) és *Mi. fuliginosus* (Japán) denevérekről, amely lehetővé teszi a filogenetikai összehasonlítást az Európából *Mi. schreibersii*-ről gyűjtött egyedekkel. A filogenetikai elemzés során a négy *I. simplex* genotípus nemcsak a többi denevérekullancs izolátumtól különül el, hanem a három denevér gazdafaj is a többitől, amelyek részt vettek a kutatásunkban.

Az óvantagok csak a lárváinak megtalálása a denevéreken összhangban van az *A. vespertilionis* életciklusával, azaz a lárvák (ellentétben a nimfákkal és felnőttekkel) több hétig szívnak vért denevéreken (14–31 nap), ezért lehet szinte kizárólag lárvákat gyűjteni. A jelen tanulmány filogenetikai elemzése azt is tükrözi, hogy az *A. vespertilionis* haplotípusai az Argasinae alcsaládon kívül csoportosulnak és közelebb áll az Ornithodorinae alcsalád tagjaihoz. Morfometriai paraméterek többsége esetén nem volt szignifikáns különbség az

Európából és Vietnamból származó *A. vesperilionis* lárvák között, bár ezek a lárvák két mitokondriális genetikai marker alapján elkülönülnek, ami azt sugallhatja, hogy legalább két kriptikus faj komplexét (csoport) képezik. A korlátozott genetikai áramlást valószínűleg a földrajzi korlátok (a Himalája és a Tibeti fennsík) jelenléte okozza, amelyek elválasztják ezeket a régiókat, és megakadályozzák az *A. vesperilionis* populációk keveredését a denevérek által. Ugyanebben az összefüggésben összehasonlítva a Kenyából és Európából származó *A. vesperilionis* szekvenciáinak eltérései kevésbé volt kifejezett, ami arra utal, hogy a genetikai áramlás ebbe az irányba jobban megvalósul. Denevérkullancsokhoz képest kisebb morfológiai és genetikai heterogenitás oka lehet az *A. vesperilionis* szélesebb gazdaköre.

Eredményeink molekuláris bizonyítékkal szolgálnak a denevéropoloskákra az Óvilág három területéről. Az összes *Ci. pipistrelli* és a *Ci. lectularius* faj többségét *Myotis* fajok szálláshelyeiről gyűjtöttük, ami a fő gazdafajnak tekinthető. Egy *Ci. lectularius* (*Myotis bechsteinii*-ről), egy *Cimex* sp. (Magyarországról és Vietnamból) és három *Cacodmus* spp. egyed gazdáról származik, melynek többsége „pipistrelloid” denevér (beleértve a *Hypsugo* (régén *Pipistrellus*) *pulveratus*-t). Irodalmi adatok szerint azok a denevérfajok, amelyek szűk helyeket (sziklás hasadékok vagy faodvak) preferálnak és ezeket a szálláshelyeket gyakran cserélik, nagyobb valószínűséggel hordoznak poloskát a szárnymembránjukon. Ezt megerősítik az itt bemutatott adatok. Ebben a tanulmányban két új *Cimex* genotípust azonosítottuk (amelyek a *Ci. lectularius* csoporthoz tartoznak, de genetikailag a többi tagtól nagyon eltérnek). Minkét egyed „pipistrelloid” denevérekről gyűjtöttük. A Magyarországon talált egyed morfológiailag eltér a *Ci. emarginatus* fajtól is. A második példány Vietnamból szintén hasonló volt a *Ci. lectularius*-hoz, kivéve a nőstények paragenitalis sinusa, amely eltért a többi egyedetől. A *Cacodmus* spp. esetében az azonos ITS2 szekvencia genetikai introgresszió vagy hibridizáció következménye lehet.

## Piroplasmák és szabadon élő Bodonidák kimutatása ektoparazitákban

*Ixodes ariadnae* és *I. vespertilionis* mintákban *Babesia vesperuginis* DNS-ének jelenlétét azonosítottuk. Ez a piroplasma patogén hatású a denevérek számára. Korábban már más közép és kelet európai országokban is kimutatták a babesiát denevérek szívének szöveteiben. *Ba. vesperuginis* mellett *Ba. canis* DNS-ét is izoláltuk *I. simplex* mintákban. Számításba véve azt, hogy kevés annak a valószínűsége, hogy az *I. simplex* (amelyből a pozitív minták származnak) egy korábbi stádiumában vagy generációjában más emlősök véréből fertőződhetett meg, így azt mondhatjuk, hogy a *Ba. canis* jelen lehetett a denevérek vérében. Ezt a lehetőséget támasztja alá a denevérszövetekben a *Ba. canis* DNS-ének közelmúltbeli felfedezése. Ezek mellett a denevérek képesek átjuttatni a *Babesia canis*-t ürülékeikbe is. Érdekes módon, *Ba. venatorum* egy rövid szekvenciáját is megtaláltuk ezekben a mintákban. Noha a szekvencia 100% -ban azonos volt a *Ba. venatorum*-mal, és különbözött a többi piroplasmától, rövidsége miatt nem lehet teljesen következtetni az előfordulására denevér kullancsokban. *Theileria* spp. DNS-ét is megtaláltuk *I. simplex* lárvákban.

A fenti piroplasmák eredeti vektorai a *D. reticulatus*, az *I. ricinus* és a *Haemaphysalis* fajok. Ezek ritkán szívnek vért denevéreken, akkor fertőződhetnek meg, amikor más kisemlősök fészkeit pl. faodvakat használják szálláshelyként, vagy amikor a növényzethez közel repülve keresik a táplálékot. Ezek mellett vérszívó legyek is lehetnek a *Babesia* és *Theileria* fajok potenciális vektorai, amelyeket a denevérek táplálékként elfogyaszthatnak. A denevérkullancsokról nem ismert, hogy kutyákat vagy más háziállatokat fertőzhetnek, ezért ezekben a kullancsokban kimutatott piroplasmák DNS-szekvenciái valószínűleg a denevérgazda véréből származnak. Ez jelentheti azt, hogy a denevérek a piroplasmák sokkal szélesebb körére fogékonyabbak lehetnek, mint azt eddig gondoltuk, vagy legalábbis a piroplasmák DNS-e felszívódhat a tápcsatornán keresztül a vérbe a potenciális rovar vektorok elfogyasztása során.

*Argas vespertilionis* lárvákban kizárólag *Ba. vesperuginis* DNS-ét detektáltuk. Az itt elvégzett 18S rRNS gén szekvenciaanalízis alapján a *B. vesperuginis* genetikailag megegyezik a magyar és kínai mintákban. A *Vespertilio murinus* denevérfaj (amelyekről a kínai minták származnak) elterjedési területe a palearktisi régió nagy részére kiterjed (Európától Szibériáig és a Csendes-óceán partjáig). Relatív genetikai egységességet mutat (ezen belül a *cox1* szekvencia eltérése 1% alatt van) ebben a térségben, és parapatikus elterjedésű a keleti rokonával a *V. sinensis* denevérfajjal. Ezen kívül a *V. murinus* gyakran megtalálható emberi településeken Ázsia területén. Ezek a háttér tényezők tehát lehetővé teszik a fokozatos génáramlást (keveredést) az *A. vespertilionis* távoli európai és közép-ázsiai populációi között.

Három mintában szabadon élő bodonidák DNS-ét mutattuk ki. A denevérek ivás közben vehetik fel, állati és emberi táplálkozási vizsgálatok kimutatták, hogy a táplálék DNS-ének egy része ellenállhat az emésztés folyamatának, és még a teljes gének is átjuthatnak a bél gáton. Ugyanakkor váratlan eredmény, hogy a denevér ektoparaziták egyikében sem találtunk denevér specifikus *Trypanosoma* DNS-ét.

### **Piroplasmák és vector-borne baktériumok kimutatása denevérürülékben**

*Babesia canis* DNS-ének jelenlétét igazoltuk denevérek ürülékében Magyarországon (prevalencia 2.7 %, CI: 0.9-6.2 %). Összességében ez lehet az első molekuláris bizonyíték arra, hogy a *Ba. canis* mindkét fő európai genotípusa (A, B csoport) előfordul Magyarországon. A *Ba. canis* vektoráról, a *D. reticulatus*-ról ismert, hogy ritkán denevérekből is táplálkozik. Ezek mellett vérszívó legyek (*Stomoxys* spp.) is lehetnek a *Babesia* fajok potenciális vektorai. A *Stomoxys calcitrans* gyakran csípnek meg kutyákat, amelyeket a denevérek elfogyaszthatnak.

Tudomásunk szerint, elsőként mutattunk ki *Besnoitia*-szerű szekvenciákat nem patás emlősökből Európából. Denevérek gyakran használhatnak istállókat szálláshelyként, ahol hozzáférhetnek a *Besnoitia besnoiti* vektorához, a vérszívó legyekhez (*S. calcitrans*, *Tabanus* spp.) és szúnyogokhoz. A *Tabanus* fajok és szúnyogok vizes területek közelében, nedves talajok fejlődnek ki, amely a tavi denevér (*Myotis dasycneme*) legfőbb táplálkozóhelye. Ezért a *B. besnoiti*-szerű szekvencia a jelen kutatásban származhat a korábban marhákból vért szívó legyekből vagy egy új *Besnoitia* genotípus/faj lehet, amely közeli rokona a *B. besnoitia* fajnak.

Baktériumok mellett egysejtű élősködőket is kimutattunk a denevérek ürülékében. A jelen eredmények értelmezéséhez feltételezhető, hogy a denevér ürülékben lévő vektorok által terjesztett baktériumok DNS-e származhat akár a denevérek ízeltlábú táplálékából (amely áthaladt a teljes gyomor-bélrendszerben), akár a denevér endoparazitáiból (például mótelyek), vagy magukból a denevérekből. Kimutattuk, hogy a denevérek átjuttathatják a rickettsiák és haemoplasmák DNS-ét ürülékeikbe. Ezek mellett, *Neorickettsia risticii* DNS-e is megtalálható denevérek ürülékében Európában, ami jelentheti azt, hogy a denevér végső gazda szerepét töltheti be olyan mótelyek életciklusában, amely fertőzött lehet a kórokozóval.

## Új tudományos eredményeink

1. Denevércullancsok kifejezett genetikai különbségeket mutatnak és filogenetikailag hasonlóan csoportosulnak a denevérgazda fajokhoz. Az *I. vespertilionis* fajkomplexet képezhet. Először azonosítottuk az *I. ariadnae* fajt Németországban.
2. *Argas vespertilionis* esetében csak csekély morfológiai különbségeket figyeltünk meg Európából és Vietnamból származó minták között, ám a filogenetikai elemzések szerint legalább két feltételezett kriptikus faj komplexumát képviseli.
3. Molekuláris bizonyíték alapján a *Ci. lecturarius* fajkomplex korábban le nem írt fajokat is magában foglal. *Ca. ignotus* elsőként mutattuk ki Dél-Afrikában.
4. Denevérek a piroplasmák sokkal szélesebb körére fogékonyabbak, mint eddig gondoltuk, vagy átjut a DNS a tápcsatornán. *Babesia vesperuginis* *Argas vespertilionis*-ből 100%-ban megegyeznek a kínai és magyarországi mintákban, ez az első molekuláris bizonyíték Ázsiából. *Babesia vesperuginis* közelebb áll a *Theileria*, mintsem a *Babesia* fajokhoz.
5. Szabadon élő bodonidák DNS-e kimutatható ektoparazitákból (*Ixodes simplex*, *Argas vespertilionis* és *Cimex pipistrelli*). Mindegyik mintánk negatív lett *Trypanosoma* DNS-re.
6. Egysejtű élősködőket (*Babesia canis canis*, *Besnoitia besnoiti*-szerű) és részben zoonótikus baktériumokat (*R. helvetica*, *Neorickettsia risticii*, haemoplasma) mutattunk ki denevérek ürülékéből.



## Publikációk

### A kutatás témájával kapcsolatosan, lektorált folyóiratokban megjelent közlemények

1. Hornok, S., Estók, P., Kováts, D., Flaisz, B., Takács, N., Szőke, K., Krawczyk, A., Kontschán, J., Gyuranecz, M., Fedák, A., Farkas, R., Haarsma, A.-J., Sprong, H.: **Screening of bat faeces for arthropod-borne apicomplexan protozoa: *Babesia canis* and *Besnoitia besnoiti*-like sequences from Chiroptera.** Parasit. Vectors, 8. 441, 2015.
2. Hornok, S., Estrada-Peña, A., Kontschán, J., Plantard, O., Kunz, B., Mihalca, A.D., Thabah, A., Tomanović, S., Burazerović, J., Takács, N., Görföl, T., Estók, P., Tu, V.T., Szőke, K., Fernández de Mera, I.G., 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, 8. 457, 2015.
3. Hornok, S., Szőke, K., Boldogh, S.A., Sándor, A.D., Kontschán, J., Tu, V.T., Halajian, A., Takács, N., Görföl, T., Estók, P.: **Phylogenetic analyses of bat-associated bugs (Hemiptera: Cimicidae: Cimicinae and Cacoecinae) indicate two new species close to *Cimex lectularius*.** Parasit. Vectors, 10(1). 439, 2017.
4. Hornok, S., Szőke, K., Estók, P., Krawczyk, A., Haarsma, A.J., Kováts, D., Boldogh, S.A., Morandini, P., Szekeres, S., Takács, N., Kontschán, J., Meli, M.L., Fernández de Mera, I.G., de la Fuente, J., Gyuranecz, M., Sulyok, K.M., Weibel, B., Gönczi, E., de Bruin, A., Sprong, H., Hofmann-Lehmann, R.: **Assessing bat droppings and predatory bird pellets for vector-borne bacteria: molecular evidence of bat-associated *Neorickettsia* sp. in Europe.** Antonie Van Leeuwenhoek, 111(9). 1707-1717, 2018.
5. Hornok, S., Szőke, K., Görföl, T., Földvári, G., Tu, V.T., Takács, N., Kontschán, J., Sándor, A.D., 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., 72(1). 69-77, 2017.
6. Hornok, S., Szőke, K., Kováts, D., Estók, P., Görföl, T., Boldogh, S. A., Takács, N., Kontschán, J., Földvári, G., Barti, L., Corduneanu, A., Sándor, A. D.: **DNA of piroplasmids of ruminants and dogs in ixodid bat ticks.** PLoS ONE, 11. e0167735, 2016.
7. Hornok, S., Szőke, K., Tu, T.V., Kontschán, J., Takács, N., Sándor, D.A., 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 Palearctic.** Parasit. Vectors, 10. 109, 2017.
8. Hornok, S., Takács, N., Szőke, K., Kunz, B.: **First record of *Ixodes ariadnae* in Germany - Short communication.** Acta Vet. Hung., 63. 347-51, 2015.

9. Szőke, K., Hornok, S.: **A denevérek (Chiroptera) járványtani jelentősége Európában, különös tekintettel vérszívó külső élősködőikre és az általuk terjeszthető (vector-borne) kórokozókra: Epidemiological significance of bats (Chiroptera) in Europe, with emphasis on their bloodsucking ectoparasites as potential transmitters of vector-borne pathogens.** Magyar Állatorvosok Lapja, 138. 15-29, 2016.
10. Szőke, K., Sándor, A.D., Boldogh, S.A., Görföl, T., Votýpka, J., Takács, N., Estók, P., Kováts, D., Corduneanu, A., Molnár, V., Kontschán, J., Hornok, S.: **DNA of free-living bodonids (Euglenozoa: Kinetoplastea) in bat ectoparasites: potential relevance to the evolution of parasitic trypanosomatids.** Acta Vet. Hung. 65(4). 531-540, 2017.
11. Hornok, S., Corduneanu, A., Kontschán, J., Bekő, K., Szőke, K., Görföl, T., Gyuranecz, M., Sándor, A.D.: **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., 66(1). 107-115, 2018.

#### **Egyéb, lektorált folyóiratokban megjelent tudományos közlemények**

1. Estók, P., Görföl, T., Szőke, K., Barti, L.: **Records of Greater Noctule Bat (*Nyctalus lasiopterus*) from Romania - with new additions.** North-Western J. Zool. 13. 375-376, 2017
2. Hornok, S., Corduneanu, A., Kontschán, J., Bekő, K., Szőke, K., Görföl, T., Gyuranecz, M., Sándor, A.D.: **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., 66(1). 107-115, 2018.
3. 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., 9(5). 1302-1309, 2018.
4. 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., 11(1). 235, 2018.
5. Hornok, S., Mulvihill, M., Szőke, K., Gönczi, E., Sulyok, K.M., 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. 65(2). 242-252, 2017.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Hornok Sándornak**, a témavezetőmnek türelmes útmutatásáért, elkötelezettségéért és a kutatási munka hasznos kritikájáért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Farkas Róbert** professzornak is, aki megadta nekem a lehetőséget a tanszéken, hogy elvégezzem ezt a munkát.

Ugyancsak köszönetet szeretnék mondani a denevérkutatóknak is, akik a mintagyűjtésekben vettek részt:

**Dr. Sándor Attila** és **Alexandra Cordunenanu** (Department of Parasitology and Parasitic Diseases, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca)

**Dr. Görföl Tamás** (Magyar Természettudományi Múzeum, Állattár)

**Dr. Kováts Dávid** (Debreceni Egyetem, Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék)

**Dr. Boldogh Sándor** (Aggtelek Nemzeti Park Igazgatóság)

**Dr. Estók Péter** (Állattani Tanszék, Eszterházy Károly Egyetem)

Különösen hálás vagyok **Dr. Kontsán Jenő** (Növényvédelmi Intézet, Mezőgazdasági Kutatóközpont, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest), **Takács Nóra** (Parazitológiai és Állattani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem), **Dr. Hein Sprong** (Centre for Infectious Disease Control, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)), **Dr. Regina Hofmann-Lehmann**, **Dr. Marina L. Meli** (Clinical Laboratory and Center for Clinical Studies, Vetsuisse Faculty, University of Zürich), **Dr. Görföl-Sulyok Kinga** és **Dr. Gyuranecz Miklós** (Állatorvos-tudományi Intézet, Magyar Tudományos Akadémia, Budapest) segítségéért a filogenetikai és laboratóriumi vizsgálatokban. Segítségük nélkülözhetetlen volt a tanulmány elkészítésében.

Végül szeretnék köszönetet mondani szüleimnek (**Szőke Csillának** és **Szőke Tibornak**) és páromnak **Matkovsky Péternek** a támogatásért és bátorításáért a kutatás során.

A jelen vizsgálatokat az OTKA (NKFIH) 115854 támogatta (Dr. Hornok Sándor).