



SZENT ISTVÁN EGYETEM, ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR
PARAZITOLÓGIAI ÉS ÁLLATTANI TANSZÉK

A *Borrelia burgdorferi* sensu lato baktériumok ökológiai és járványtani vizsgálata a Margit-szigeten

Jablonszky Mónika, II. évfolyam
Biológia Msc

Témavezetők: Földvári Gábor, Ph.D.,
Rigó Krisztina
SZIE-ÁOTK

XXXI. OTDK Biológia szekció

2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés, célkitűzések	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A kullancsok, mint vektorok	4
2.2. <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	7
2.3. A keleti sün.....	10
3. Anyag és módszer.....	13
3.1. Helyszín.....	13
3.2. A sünök és paraziták gyűjtése	13
3.3. Határozás és DNS kivonás a kullancsokból és a szövetmintákból	16
3.4. PCR, elektroforézis és szekvenálás.....	16
3.5. Statisztikai elemzés	17
4. Eredmények.....	19
4.1. A sünökről és a növényzetről gyűjtött ektoparaziták	19
4.2. <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. a kullancsokban és a szövetmintákban	21
4.3. Statisztikai elemzés	24
5. Az eredmények értékelése	26
6. Összefoglalás.....	30
7. Summary.....	32
8. Köszönetnyilvánítás	33
9. Irodalomjegyzék.....	34

1. Bevezetés, célkitűzések

A Lyme-kór kullancsok által terjesztett emberi betegség, de az ezt okozó baktériumok, amelyek a *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.) fajcsoportba tartoznak, még számos gerinces és ízeltlábú gazdában képesek megélni. Bonyolult életciklusuk és sok lehetséges gazdájuk miatt még valószínűleg ma sem ismerjük ezeknek a kórokozónak az összes rezervoárját és azt, hogy ezek a gerinces gazdák pontosan melyik baktériumfajt tudják szervezetükön belül fenntartani és vektoroknak tovább adni.

A sünökről már régebben bebizonyosodott, hogy e kórokozók rezervoárjai, de Magyarországon még nem történt felmérés a fertőzöttségükkel kapcsolatban. Ezek az állatok gyakori gazdái mind az *Ixodes ricinus*-nak, mind az *Ixodes hexagonus*-nak, a *Borrelia burgdorferi* s. l. fajcsoport legfontosabb európai vektorainak. Mivel az *I. ricinus*, Magyarország leggyakoribb, generalista kullancsfaja emberből is szívhat vért, így az általa terjesztett baktériumok is megfertőzhetik az embert.

A Margit-sziget, mint helyszín, külön érdekességet ad a vizsgálatnak, hisz egy viszonylag zárt sünpopuláció él itt. Ugyanakkor egy emberek által gyakran látogatott, Budapest szívében elhelyezkedő parkos területen élő ektoparazitákról gyűjtöttünk információkat, így vizsgálatunk humán egészségügyi szempontból is fontos.

Céljaink a következők voltak:

- felmérni a margit-szigeti sünökön vért szívó kullancsok faji összetételét és prevalenciáját,
- megállapítani a sünökről és a növényzetről gyűjtött kullancsok *Borrelia burgdorferi* s. l. fertőzöttségét,
- illetve, hogy maguk a sünök fertőzöttek-e a baktériummal,
- kideríteni, hogy van-e humán egészségügyi jelentősége a helyi kullancspopuláció fertőzöttségének.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A kullancsok, mint vektorok

A kullancsok az Arthropoda törzsbe, a Chelicerata altörzsbe, az Arachnida osztályba, az Acari alosztályba tartoznak. Ez utóbbi igen változatos csoport: szaprofiták, ragadozók, növényi és állati paraziták egyaránt találhatók köztük. Jellemzőjük a leegyszerűsödött, legfeljebb másodlagosan szelvényezett test, a központosult idegrendszer és 0, 1 vagy 2 pár szem. Váltivarúak, sőt, egyes fajok parthenogenezisre is képesek lehetnek (Oliver, 1989). Fejlődésmenetükre jellemző a kifejlett állapotot megelőző lárva- és nimfastádium (Rózsa, 2005).

A kullancsok a Parasitiformes öregrenden és az Ixodida renden belül az Ixodidae családba tartoznak. Az ebbe a családba tartozó ízeltlábúak szájszerve az előtest csúcsán helyezkedik el, az első pár lábukon megtalálható a Haller-féle szerv, amelyben elhelyezkedő szenzoros árkok és szenzillák érzékelik a hőmérsékletet, a levegő pára-, szén-dioxid, ammónia- illetve vajsavtartalmát, bizonyos feromonokat és a levegő mozgását is. A legtöbb kullancsfaj háromgazdás, vagyis mindhárom stádium leválik a gazdáról táplálkozás után, de néhány *Hyalomma*- illetve *Rhipicephalus*-faj kétgazdás, a korábban *Boophilus* nembe sorolt *Rhipicephalus*-ok, az *Amblyomma nitens* és a *Dermacentor albipictus* pedig egygazdásak, azaz egész életüket egyetlen gazdaegyeden töltik (Barker & Murrell, 2008). Az Ixodidae család tagjai változatos élőhelyeket népesítenek be: egyaránt megtalálhatóak füves területeken, bozótokban és erdőkben. Viselkedésük alapján ezek az ektoparaziták két nagy csoportra oszthatók: az exofil kullancsok aktívan keresik a gazdát, egy fűszál végén első pár lábukat kinyújtva várakozva, míg az endofilek általában a gazda fészében vagy üregében élnek. Gazdaválasztásuk is igen eltérő, vannak egy fajra specializálódottak (főleg az endofilek között) például az *Ixodes lividus*, amely szinte kizárólag parti fecskéken (*Riparia riparia*) szív vért, míg például az exofil *Ixodes ricinus*-nak viszont több száz ismert gazdafaja van (Hillyard, 1996).

A vektorok olyan élőlények, melyek képesek felvenni, tárolni és átadni a fertőző organizmust gerinces gazdák között. A biológiai vektorokban a kórokozók szaporodnak, mielőtt másik gazdaszervezetbe jutnának, a mechanikai vektorok viszont úgy szállítják a patogént, hogy azokban közben nem megy végbe biológiai átalakulás. A kullancsok hatékony vektorok, mivel biztosan tapadnak a gazdán szájszervüknek és a nyálmirigyeikben termelt cementnek köszönhetően (ez különösen a rövid szájszervű fajoknál fontos) és sokáig

táplálkoznak (a lárvák 2-6, a nimfák 3-8, a nőtények 6-12 napig), amit az is elősegít, hogy fájdalom nélkül szúrnak. Emellett egyes kullancsfajok sokféle gazdafajon szívhatnak vért, ezekkel együtt terjedhetnek és jól adaptálódnak. Sok utódjuk van (az *Ixodes*-fajok néhány ezer, a *Hyalomma*-fajok akár tízezer petét is rakhatnak) és az éhezést hosszú ideig tűrik. Ezen felül képesek a gazda immunválaszának csökkentésére, a bennük élő kórokozók, jelenlegi ismereteink szerint, jelentősen nem károsítják őket. Képesek a patogének transzovariális, transzstadiális és co-feeding útján történő továbbadására is (Hillyard, 1996).

A transzovariális transzmisszió során a nőtény kullancsból a petékbe jutnak a kórokozók. Ez a jelenség a *Borrelia*-fajoknál előfordulhat, de nem jelentős, viszont számos vírusnál (Labuda & Nuttall, 2008), illetve egyes *Babesia*-fajoknál igen (Homer et al., 2000). Amikor pedig a mikroorganizmusok vedlés után, a következő stádiumban is megtalálhatók a vektorban, transzstadiális transzmisszióról beszélünk. Utóbbi egy fontos tényező a vadon élő gerincesekből felvett *Borrelia*-k emberbe juttatásában. A co-feeding terjedéskor egy fertőzött kullancs átadhatja a patogént az időben vagy térben közel táplálkozó nem fertőzött társának.

A patogének átadásában elsődleges szerepe van a kullancsok legnagyobb mirigyének, a nyálmirigyeknek, melyek az ozmoregulációban is részt vesznek. A nyálmirigyben háromféle acinus található meg a nőtények, illetve négy a hímek esetében. Az I. típusú acinus agranuláris, az ozmoregulációt végzi: táplálkozás előtt higroszkópos anyagot gyárt, ami segíti a levegő páratartalmának felvételét (Rudolph & Knülle, 1974), táplálkozaskor pedig visszajuttatja a gazdába a felesleges vizet és ionokat. A II. és III. típusú acinus granuláris és a vérszívást segítő anyagokat termel. Méretük a táplálkozás folyamán nő, utána viszont degenerálódnak, hisz nincs rájuk többet szükség (Harris & Kaufman, 1981). Ezek termelik a már említett cementet, illetve antikoagulánsokat, emésztő enzimeket és vazodilatátorokat, amelyek úgy könnyítik meg a vérszívást, hogy hatásukra elernyednek az erek és több vér áramlik beléjük. A különböző gyulladáscsökkentő és immunszuppresszor anyagok, melyek csökkentik a gazda immunválaszának erősségét, is a nyálmirigy termékei (Hillyard, 1996). A kizárólag hímekben megtalálható IV. típusú acinus is granuláris, azonban ez a táplálkozást megkönnyítő anyagok termelése mellett valószínűleg a szaporodásban is szerepet játszik (Furquim et al., 2010). A nyállal együtt juthatnak a gazdába a különböző kórokozók és, néhány kullancsfajnál, a bénító toxinok is (Hillyard, 1996).

A kullancsok valószínűleg minden más élőlénycsoportnál több kórokozót terjesztenek (Hillyard, 1996). Fajaik körülbelül 10%-a különböző vírusok vektora. A vírusok vektorok közti terjedésében fontos a transzovariális és a co-feeding transzmisszió (Labuda & Nuttall,

2008). Általában egy kullancsfaj kevés vírust képes terjeszteni, kivételek ez alól az *Ixodes uriae* és az *I. ricinus*, melyek legalább három víruscsalád különböző tagjainak lehetnek vektorai. Ezek a *Flaviviridae* (ide tartozik a kullancsencephalitisz (TBE, tick-borne encephalitis) vírus), a *Reoviridae* (pl.: Lipovnik vírus) és a *Bunyaviridae* (pl.: Uukuniemi vírus). Magyarországon a kullancsencephalitisz a legjelentősebb kullancsok által terjesztett vírusos betegség, amelynek régóta évi 100 alatt van a bejelentetett esetszáma (Zöldi et al., in press).

Baktériumok közül a *Borrelia burgdorferi* s. l.-n kívül a *Francisella tularensis*-nek, a tularémia okozójának is a terjesztői a kullancsok. Ennek a fajnak Közép-Európában a *Dermacentor reticulatus*, az *I. ricinus* és a *Haemaphysalis concinna* a vektorai (Vyrostekova et al., 2002).

A Rickettsiales rendbe tartozó *Anaplasma* és *Rickettsia* baktériumok között is többnek van kullancs vektora. Az *Anaplasma phagocytophilum* a humán granulocitás anaplasmosis (korábbi nevén humán granulocytás ehrlichiosis) okozója. Sok rezervoárja ismert (rágcsálók, húsevők, lovak, kérődzők), de még nem tudjuk Európában melyik a legjelentősebb. Leggyakrabban *Ixodes*-fajok közvetítik, Európában az *I. ricinus* a vektora. Sünben és sünből vért szívott kullancsban is kimutatták már (Skuballa et al., 2010). Az *Anaplasma marginale* szarvasmarhák vörösvérsejtjeiben szaporodik, életsiklusában fontos szerepet játszik a *D. reticulatus*, *Dermacentor marginatus* és az *I. ricinus* (Hornok et al., 2008).

A *Rickettsia*-fajok obligát intracelluláris baktériumok, közülük számos idézhet elő emberi betegséget. Kiemelendő a *Rickettsia slovaca*, amely a TIBOLA (Tick-borne Lymphadenitis) nevű betegséget okozhatja (Lakos, 2002). Magyarországon is előfordul, vektorai a *Dermacentor*-fajok, emiatt a lovakkal való kontaktus összefüggésbe hozható a fetőződéssel (Lakos et al., 2012). A mediterrán foltos lázat a *Rickettsia conorii* subsp. *conorii* okozza, melynek a *Rhipicephalus sanguineus* a legfontosabb vektora (Parola et al., 2005).

A kullancsok terjesztik az orvosi, állatorvosi jelentőségű *Theileria*-kat és a *Babesia*-kat is (Hillyard, 1996). Mindkét protozoon nem az Apicomplexa törzsbe tartozik. A *Babesia bigemina* és a *Babesia bovis* az Afrikában, Ausztráliában és Amerikában komoly gazdasági veszteségeket okozó szarvasmarha babesiosis okozói, melyeknek fő vektorai a *Rhipicephalus*-fajok, de *Hyalomma*-k is terjeszthetik (Sahibi et al., 1998). A csak vörösvértetekben szaporodó *Babesia*-k számos más fajban okoznak betegséget, pl.: a *Babesia canis* és a *Babesia gibsoni* a kutyában. A kutyák esetében a *R. sanguineus* a legfontosabb vektor a *D. reticulatus* mellett. A *B. canis canis* alfaj hazai kutyáknak is

gyakori megbetegítője (Földvári et al., 2005b). A szintén szarvasmarhákat megbetegítő *B. divergens* vektora az *I. ricinus* is lehet, és Európában általában ez a faj okozza az emberi megbetegedéseket is (Homer et al., 2000). A *Babesia venatorum*, melyet többek között Lengyelországban is kimutattak *I. ricinus*-okból, szintén okozhat humán babesiosist (Cieniuch et al., 2009). Észak-Amerikában legtöbbször a *Babesia microti*-t mutatják ki a betegekben. E faj rezervoárjai kisméltosok és *I. ricinus*-ból már Magyarországon is kimutatták (Kálmán et al., 2003). Európában kevés autochton (itt fertőződött) *B. microti* okozta humán babesiosisról van esetleírás (Hildebrandt et al., 2007; Chmielewska-Badora et al., 2012).

A *Theileria*-k emlősök limfocitaiban, makrofágjaiban és monocitaiban élősöknek. A két legfontosabb ide tartozó faj a *Theileria parva*, amely az East Coast Fever nevű betegséget okozza, és elsősorban T-limfocitákat fertőz, és a B-limfocitákban élősök *Theileria annulata*, amely a trópusi theileriosist okozza (Homer et al., 2000).

2.2. *Borrelia burgdorferi* sensu lato

A *Borrelia burgdorferi* s. l. a Spirochaetales rendbe tartozó, spirális alakú, flexibilis sejtfalú, Gram-negatív baktériumok csoportja. Mai tudásunk szerint a fajkomplexben 18 faj tartozik, ezek közül már számosról bebizonyosodott, hogy a Lyme-kór okozója lehet (Margos et al., 2010; Rudenko et al., 2011). Már régóta ismert, hogy a *B. burgdorferi* sensu stricto (s. s.), a *B. afzelii* és a *B. garinii*, (Margos et al., 2008) képes betegséget okozni az emberben, és ez az utóbbi években bizonyossá vált a *B. spielmanii* (Wang et al., 1999; Földvári et al., 2005a), a *B. lusitaniae* (Collares-Pereira et al., 2004), a *B. valaisiana* (Diza et al., 2004; Saito et al., 2007) és a *B. bissettii* (Rudenko et al., 2008) esetében is. Európában számos faj, viszont Észak-Amerikában leginkább csak a *B. burgdorferi* s. s. okoz humán megbetegedéseket. Magyarországon először 1985-ben írták le ezt a betegséget, és 1991-ben mutatták ki először az ezt okozó baktériumokat kullancsból (Lakos et al., 1991), de eddig nem történt átfogó vizsgálat a kórokozók pontos azonosítására. A néhány kivizsgált páciens esetében általában a *B. afzelii* és a *B. garinii*, néha a *B. burgdorferi* s. s. állt a Lyme-kór hátterében, de a *B. spielmanii*-t is kimutatták már hazai betegekben (Földvári et al., 2005a). Hazánkban átlagosan 1000 esetet regisztrálnak évente (Lakos, 2009; Zöldi et al., in press), de ennek a tízszerese is lehet a tényleges esetszám (Lakos András, személyes közlés).

A Lyme-borreliosis napjainkra az északi félteke legelterjedtebb, vektorok által terjesztett betegségévé vált. Egyik tünetét, a krónikus bőrgyulladást már 1883-ban leírta Buchwald acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) néven. A svéd Afzelius pedig a

kullancs csípése nyomán keletkező piros foltot erythema chronicum migransnak nevezte el 1910-ben, de arra, hogy a tüneteket egy kullancs-terjesztette kórokozó okozza csak 1975-ben jöttek rá (Ackermann, 1975). 1977-ben Steere és munkatársai gyermekeknél előforduló járványos arthritist írtak le egy connecticut-i kisvárosban, Old Lyme-ban (Steere et al., 1977). Burgdorfer és munkatársai fedezték fel a Lyme-kórt okozó spirochaetákat először *Ixodes scapularis*-ban, majd *I. ricinus*-ban (Burgdorfer et al., 1982, 1983).

A Lyme-kór lefolyása három fázisú. Az első, a pirosas, kokárdaszerű bőrkiütés (erythema migrans), rendszerint a kullancscsípés után napokon belül jelentkezik (az esetek 50-70%-ában jelenik meg (Lakos András, személyes közlés)). Lehetnek emellett influenza-szerű tünetek, például izom- és ízületi fájdalom is, de ezek gyakran kezelés nélkül megszűnnek. A második fázis hetek vagy hónapok múlva alakul ki: izomfájdalom, arcizombénulás és meningitis a jellemzői. Ez is elmúlhat kezelés nélkül. A harmadik, krónikus fázisban évek múlva fáradékonyság, krónikus arthritis és acrodermatitis chronica atrophicans jelentkezhetnek (Asbrink et al., 1993).

A *Borrelia burgdorferi* s. l. fő vektorai az *Ixodes ricinus* / *Ixodes persulcatus* fajcsoportba tartozó kullancsok (Keirans et al., 1992). Ide sorolható Európában az *I. ricinus* és az *Ixodes gibbosus*, Északkelet-Európában és Ázsiában az *I. persulcatus*, illetve Észak-Amerikában az *Ixodes scapularis* és az *Ixodes pacificus*. Ezeken kívül Európában lehet vektor az *I. hexagonus*, az *Ixodes acuminatus*, az *Ixodes trianguliceps* és az *I. uriae*. Más kullancsokból, például a *Dermacentor reticulatus*-ból, *Haemaphysalis punctata*-ból és *Haemaphysalis concinna*-ból is kimutatták már a *B. burgdorferi*-t, de ezek vektor szerepe nem mondható fontosnak. Ezek a fajok ritkán szívnak vért az emberből, de szerepet játszhatnak a *Borrelia*-k életciklusában (Rigó et al., 2011; Hillyard, 1996).

E baktériumok a kullancs közepbelében szaporodnak és vérszíváskor a nyálmirigyen keresztül jutnak a gerinces gazdába (Hillyard, 1996). Gazdán belüli vándorlásukban fontos szerepet játszanak különböző felszíni fehérjék, például az OspA (Outer surface protein A) és az OspC (Outer surface protein C). A kullancs bélcsatornájában az OspA, a nyálmirigyében pedig az OspC expresszióját növelik meg a *Borrelia*-k. Ezek a fehérjék a baktériumokhoz kötődnek, így segítik azok bejutását a sejtekbe (Schwann & Piesman, 2002).

A *B. burgdorferi* s. l. fajkomplexről a baktériumok között először mutatták ki, hogy képes terjedni a gazda szisztémás fertőzése nélkül is (1. ábra). A vért szívó, nem fertőzött kullancsok felvehetik a baktériumokat akár több héttel azután is, hogy fertőzött társuk ott táplálkozott (Gern & Rais, 1996). Ezt a folyamatot nevezik co-feeding vagy együtt

táplálkozási fertőzésnek. Mindez többször is lejátszódhat a gerinces gazda életében, nem vált ki immunválaszt, sőt, ha szisztémás fertőzés után ellenanyagok termelődtek a baktériumok ellen, co-feeding során még akkor is terjedhetnek (Randolph et al., 1996). *B. afzelii*-vel végzett kutatások során azonban kimutatták, hogy a co-feeding transzmisszió esélye csökken, ha a fertőzött kullancs kevés ideig szív vért, ha a kullancsok messze vannak a fertőzött társuk szúrásának helyétől és ha kevesen vannak. Emiatt, természetes körülmények között, valószínűleg sokkal több kullancs fertőződik rezervoár gazdától, mint együtt-táplálkozással (Richter et al., 2002).



1. ábra: Kullancsok co-feeding közben

Fotó: Majoros Gábor

A *Borrelia burgdorferi* s. l. fajcsoport egyes tagjai gazdaspecifitást mutatnak. A *B. afzelii*-t leggyakrabban kisméltókban, egerekben, pockokban (Paulauskas et al., 2008), a *B. garinii*-t pedig tengeri és énekes madarakban találták meg (Kurtenbach et al., 2002b). A *B. garinii* emlősöket fertőző szerotípusát új fajként írták le, *B. bavariensis* néven (Margos et al., 2009). A *B. lusitaniae*-t legtöbbször gyíkokból mutatták ki (ez megmagyarázza főleg mediterrán elterjedését), a *B. valaisiana*-t pedig elsősorban madarokról leszedett kullancsokból írták le (Gylfe et al., 2000; Majláthová et al., 2006; Földvári et al., 2009). A különböző gazdákhoz való kötődést okozhatja a baktériumfajok eltérő érzékenysége a gazdák komplement rendszerével, azon belül is elsősorban a c5b-c9 molekulákkal szemben.

Mindezek alapján az egyes *Borrelia*-fajok előfordulása valószínűleg inkább a gerinces gazdafajoktól, és nem az egyes kullancsfajok elterjedésétől függ (Kurtenbach et al., 2002a).

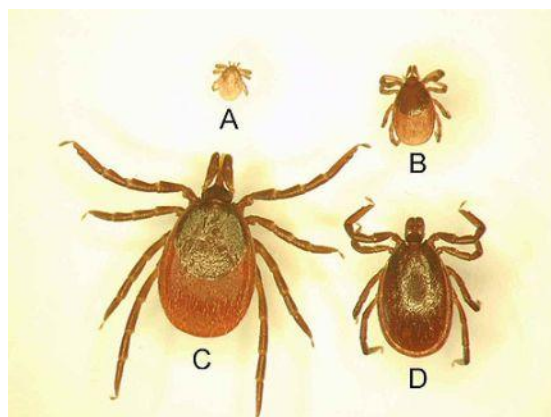
2.3. A keleti sün

A keleti sünt (*Erinaceus roumanicus*) sokáig a nyugati sün (*Erinaceus europaeus*), majd az *Erinaceus concolor* alfajának tekintették (Hutterer, 2005), de 2005-től külön fajként tartják nyilván (Wilson & Reader, 2005). A Mammalia osztályba, az Erinaceiformes rendbe, illetve az Erinaceidae családba tartozik. Elterjedési területe Közép-Európától Nyugat-Szibériáig húzódik. Sokféle élőhelyen megtalálható: erdőkben, bozótosokban, parkokban, sőt beépített területeken is találkozhatunk vele. Sötétedéskor indul tápláléka, különféle csigák, giliszták, rovarok után, de a madárfiókákat, kis hullóket is elfogyasztja. Valódi téli álmot alszik. Általában novemberben, ha a hőmérséklet tartósan 4-6°C alá csökken, levelekből álló vagy farakás alatti fészkébe vonul vissza, és csak márciusban jön elő (Bihari, 2008).

A sünök sokféle zoonotikus betegséget okozó baktériumot hordozhatnak pl.: *Yersinia pseudotuberculosis*-t, *Yersinia pestis*-t, *Mycobacterium*-okat és *Salmonella*-kat valamint számos gombát, vírust és protozoon fajt (Riley et al., 2004; Rigó et al., 2012). A kullancsencephalitis vírusát, a legtöbbet vizsgált *E. europaeus* mellett, *E. roumanicus*-ból is kimutatták már (Kozuch et al., 1967). Az utóbbi években egyre több kutatócsoport számol be a sünök jelentős parazitáltságáról (Beck, 2007). Egy *E. europaeus*-szal, azaz nyugati sünnel és egy *E. concolor*-ral végzett vizsgálat során is a parazitikus férgek 90% körüli prevalenciáját mutatták ki. Mindkét faj vizsgált egyedeinek tüdejében a *Crenosoma striatum* nevű fonálféreg volt jelen a legtöbbször és a legnagyobb számban (Gaglio et al., 2011; Cirak et al., 2010).

A sünökön általánosan előforduló két kullancsfaj, az *I. ricinus* (2. ábra) és az *I. hexagonus* (Thamm et al., 2009; Gray et al., 1994; Beichel et al., 1996) életmódjában és élőhely-preferencia tekintetében is jelentősen eltér. Az *I. ricinus*, azaz közönséges kullancs Európa leggyakoribb kullancsfaja, exofil életmódú, és általában dús aljnövényzetű erdőkben és bokros területeken fordul elő (Hillyard, 1996). Túléléséhez elengedhetetlenül fontos a magas páratartalom. Évszakonként eltérő aktivitást mutat (Randolph et al., 2000). Az *I. hexagonus* endofil, így nincs kitéve különösebben a külső környezet hatásainak, ezért gyakrabban találják meg a kullancsok számára alkalmatlanabb élőhelyeken, pl.: városokban is (Egli, 2004; Gern et al., 1997). Ennek a fajnak a sünön kívül jelentős gazdái a Mustelidae

családba tartozó fajok (nyest, nyuszt, menyét, borz stb.), illetve egyéb ragadozók, mint a kutya, a macska és a róka (Gern et al., 1991).



2. ábra: Az *Ixodes ricinus* különböző stádiumai. A: lárva, B: nimfa, C: nőstény, D: hím

Forrás: <http://kullancsok.parazitak.hu>

Más kullancsfajokat is megtaláltak már sünökön, pl.: *Haemaphysalis concinna*-t keleti sünön (Kozuch et al., 1967), illetve *Ixodes trianguliceps*-t, *H. concinna*-t, *H. inermis*-t, *H. punctata*-t, *Dermacentor reticulatus*-t, *D. marginatus*-t, *Hyalomma aegyptium*-ot valamint *Rhipicephalus sanguineus*-t nyugati sünön (Hillyard, 1996).

A sünökről, pontosabban az *E. europeus*-ról 1994-ben kimutatták, hogy a *Borrelia burgdorferi* s. l. rezervoárjai lehetnek. Ugyan csak egy állatot fogtak be, de az ezen vért szívott kullancsokban magas volt a *Borrelia burgdorferi* s. l. prevalenciája, és a sünre tett laboratóriumban nevelt kullancsok később képesek voltak átvinni a fertőzést gerbilekre (Gray et al., 1994). Svájcban egy hasonló vizsgálat során *B. burgdorferi* s. s.-t, *B. afzelii*-t és *B. garinii*-t mutattak ki *Erinaceus europeus*-okból. A kutatás során városi és elővárosi területek sünpopulációit hasonlították össze, és majdnem minden vizsgált sünön volt *B. burgdorferi* s. l.-val fertőzött kullancs. Érdekesség, hogy a városi sünökön nem találtak *Ixodes ricinus*-t, csak *I. hexagonus*-t (Gern et al., 1997). Egy későbbi, németországi kutatás folyamán ugyanezekben a baktériumfajokon kívül még *B. spielmanii*-t is kimutattak nyugati sünökből, melyet korábban csak pelefafajokban találtak meg (Skuballa et al., 2007).

Egy közép-európai országokat és Nagy-Britanniát érintő vizsgálatban nyugati sünök mintáiban *B. afzelii*-t, *B. bavariensis*-t és *B. spielmanii*-t, csehországi és ausztriai keleti sünökben pedig *B. afzelii*-t és *B. bavariensis*-t találtak (Skuballa et al., 2012).

Egy másik, a sünökön nagy számban előforduló ektoparazita csoport a bolhák rendje (Siphonaptera). E fajok oldalról lapított testű, szárnyatlan, szívó szájszervvel rendelkező rovarok. A renden belül a Pulicomorpha alrendbe, a Pulicoidea családsorozatba, a Pulicidae család Archeopsyllinae alcsaládjába tartozik a sünbolha (*Archaeopsylla erinacei*), amely a leggyakoribb bolhafaj sünön (Thamm et al., 2009; Visser et al., 2001), illetve a kutyabolha és a macskabolha (*Ctenocephalides canis* és *Ctenocephalides felis*) is, amelyeket már szintén megtaláltak sünön (Egli, 2004). Előbb macskabolhából, majd sünbolhából is kimutatták az emberben is betegséget okozó *Rickettsia felis*-t (Gilles et al., 2008), de utóbbinak a kórokozó terjesztésében betöltött szerepe még nem tisztázott.

3. Anyag és módszer

3.1. Helyszín

A vizsgálat helyszíne a Margit-sziget (é. sz. 47°31'35", k. h. 19°2'50") volt. A főváros szívében elterülő sziget 2800 m hosszú, legszélesebb pontján 500 m széles, területe 0,965 km², az évi átlaghőmérséklet 11,76°C. A terület nagy részét park borítja, a járműforgalom is csekély, ez ideális élőhelyé teszi a szigetet a sünök számára. A bokros területek alkalmasak arra, hogy ott vészeljék át az exofil kullancsok a két vérszívás közti időszakot. A Margit-sziget egyúttal a kikapcsolódni és sportolni vágyók kedvelt célpontja, akik könnyen kapcsolatba kerülhetnek az itt élő kullancsokkal, illetve az ezek által terjesztett, Lyme-kórt okozó *Borrelia*-kkal. Mivel a vizsgálat helyszíne egy sziget, az eredmények kevésbé általánosíthatóak, de a viszonylag kis mozgáskörzettel rendelkező sünök szempontjából egy átlagos városi park is viszonylag elszigetelt élőhely.

3.2. A sünök és paraziták gyűjtése

A sünöket csapatmunka keretében 2009-ben áprilistól októberig, 2010-ben és 2011-ben pedig márciustól novemberig gyűjtöttük, havonta egy alkalommal. A gyűjtést Ronkayné Tóth Mária tanárnő, az ELTE Urbanizációs Munkacsoport vezetője koordinálta.

Az állatokat a Margit-szigeten belül kijelölt tizenkét területre (3. ábra) beosztott önkéntesek keresték. A területek nagy számát az indokolta, hogy korábbi rádiótelemetriás vizsgálatok alapján a sünök csak néhány 100 m-t mozognak egy éjszaka. Sötétedéstől kezdve zseblámpák segítségével folyt a keresés. A megtalált sünöket munkavédelmi kesztyűvel vettük kézbe és óvatosan megfelelő méretű dobozba helyeztük. Feljegyeztük a fogás idejét és a terület kódját és a sün mellé tettük. Ezután az állatokat haladéktalanul a központba szállítottuk, ahol megtörtént az ektoparaziták eltávolítása.



3. ábra: Gyűjtési területek a Margit-szigeten

A sünöknek itt megmértük a tömegét, 2010-ben a hosszát is, jelöltük őket, illetve leolvastuk és feljegyeztük a már meglévő jelöléseket. Először különböző festékekkel jelöltük az állatokat, de mivel ezek a jelölések csak néhány hónapig tartottak ki, 2010-ben áttértünk a fülkrotáliák alkalmazására (4. ábra). 2009-ben nem volt lehetőség az egyedeken lévő összes

elősködő eltávolítására, viszont a másik két évben a központba, a szigeten lévő állatkertbe szállított sünöket elaltatták, így ezekben az években a kullancsok és bolhák legnagyobb részét leszedték róluk. Az altatást ketamin (5 mg/testtömeg kg) és dexmedetomidin (50 µg/testtömeg kg) kombinációjából álló intramuszkuláris injekcióval végezték és 30 perc múlva, ébredéskor az állatok atipamezolt (0.5 mg/testtömeg kg) kaptak a dexmedetomidin ellenszereként. A kullancsokat csipesszel távolítottuk el az állatokról és 70%-os alkoholban tároltuk őket. 2010-ben és 2011-ben az állatok füléből szövetmintát vettünk, melyet vagy 70%-os alkoholban vagy -20°C-on fagyasztva tároltunk további felhasználásig. A bolhákat szintén csipesszel vagy esetleg bolhaölő spray segítségével távolítottuk el. Ezután a sünöket visszaszállítottuk oda, ahol találtuk őket és szabadon engedték.



4. ábra: A sünökön alkalmazott különböző jelölési módszerek: tüskék festése (balra) és fülkrotália (jobbra)

Fotók: Majoros Gábor

A növényzetről a kullancsokat zászlózással, azaz egy rúdra erősített fehér vászon segítségével gyűjtöttük össze, először 2011 márciusában. 2011 szeptemberétől havonta két füves és két borostyános területen standard ideig, 15 percig végeztünk zászlózást a területek összehasonlításának céljából. A további munkákra a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Parazitológiai és Áltattani Tanszékén került sor.

Internetes kérdőívet is készítettünk, hogy felmérjük a Margit-szigetre látogatók milyen arányban találkoznak kullanccsal illetve fertőződnek *Borrelia*-val. Kérdések szerepeltek a kitöltő neméről, koráról, arról, hogy milyen gyakran, milyen célból mennyi időt tölt el a szigeten és hol, látott-e illetve fertőződött-e kullanccsal, mennyi kullancs van szerinte a szigeten és arról, hogy fertőződött-e itt ő vagy ismerőse valamilyen betegséggel.

3.3. Határozás és DNS kivonás a kullancsokból és a szövetmintákból

A kullancsokat később határozókulcs (Hillyard, 1996) segítségével meghatároztuk és feljegyeztük, hogy lárva, nimfa stádiumban vannak-e, vagy adultok, ez esetben a nemet is meg tudtuk állapítani. A szakirodalom alapján nem egyértelműen meghatározható példányok esetében Prof. Agustin Estrada-Pena specialista (Zaragozai Egyetem, Spanyolország) segítségét vettük igénybe.

A DNS kivonását a kullancsokból alkalikus hidrolízissel (Guy & Stanek, 1991) végeztük. Az állatokat először szűrőpapírra helyeztük, hogy az alkohol elpárologjon belőlük, majd a nagyobb nőstényeket steril ollóval vagy szikével kettévágtuk. A mintákat ezután 1,25%-os ammónium-hidroxid oldatot tartalmazó Eppendorf-csővekbe tettük, ahol steril ollóval legalább 2-3 darabra vágtuk őket. Majd lezárt fedelű csőben fél óráig forraltuk a mintákat, így a kullancsok DNS-e és egyéb molekulái részlegesen bomlottak, oldatba kerültek. Ezután fél óráig nyitott tetővel is forraltuk az oldatot, hogy elpárologjon az ammónium-hidroxid. Az Eppendorf-csővek tartalmát további felhasználásig lefagyasztottuk.

A szövetmintákból egy kereskedelmi forgalomban kapható DNS kivonó kit (QIAamp, QIAGEN, Hilden, Németország), illetve egy részükből módosított Miniprep Express Matrix protokoll (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) segítségével vontuk ki a DNS-t.

3.4. PCR, elektroforézis és szekvenálás

A minták nagy mennyisége miatt a DNS-oldatokból poolokat alakítottunk ki. Egy poolba maximum 30, azonos sünről leszedett, azonos fajú és stádiumú kullancsból kivont DNS került. A növényzetről gyűjtött kullancsok DNS-ét maximum hatos poolokban vizsgáltuk. A polimeráz láncreakcióhoz GoTaq (Promega, Madison, Wisconsin, USA) DNS-polimerázt használtunk (ld 1. táblázat). A szövetmintákat egyesével dolgoztuk fel. A baktériumok *OspA* génjének egy kb. 250 bázispár hosszúságú szakaszát erősítettük fel BSL primerekkel (59-AATAGGTCTAATAATAGCCTTAATAGC-39, 59-CTAGTGTTTTGCC-ATCTTCTTTGAAAA-39 (Demaerschack et al., 1995; Földvári et al., 2005a). A PCR-termékeket 1,5 %-os agarózzgelen futtattuk, aminek elkészítéséhez TBE puffert alkalmaztunk. A gélhez etídium-bromidot is adtunk, így az UV megvilágítás mellett készített fényképeken láthatóvá vált a reakció eredménye.

A minták egy véletlenszerűen kiválasztott részét megszekvenáltattuk, hogy kiderüljön, pontosan mely *Borrelia*-fajok voltak jelen a kullancsokban és a sünökben. A szekvenálás a jelölt didezoxi-nukleotidok használatán alapuló Sanger-módszerrel történt (MacroGen, Szöul, Dél-Korea).

1. táblázat: A használt PCR reakció összetétele

PCR víz	17,675 µl
5x Taq Puffer	5 µl
dNTP-oldat (10 mmol/l)	0,5 µl
Forward primer (BSL-F) (100 pmol/ml)	0,1 µl
Reverse primer (BSL-R) (100 pmol/ml)	0,1 µl
Taq-polimeráz (5 U/ µl)	0,125 µl
DNS-templát	1,5 µl

3.5. Statisztikai elemzés

A parazitáltság számszerűsítésére többféle érték is létezik. A prevalencia mutatja meg, hogy a vizsgált gazdaegyedek hány százaléka fertőzött a vizsgált parazitával. Az abundancia megadja az összes vizsgált gazdaegyeden a paraziták számát, az intenzitás pedig csak a parazitáltakon méri ugyanezt. Az átlagos zsúfoltság a paraziták átlagos csoportmértékét fejezi ki. Ezeknek a mérőszámoknak és konfidencia intervallumaiknak a kiszámításához a Quantitative Parasitology programcsomagot használtam (Rózsa et al., 2000).

Az adatok kiértékeléséhez az R programot (R Development Core Team, 2006) alkalmaztuk. A program segítségével Wilcoxon, Kruskal-Wallis-féle próbát illetve általánosított lineáris regressziót (Poisson és quasipoisson modell) végeztem a kullancs-abundancia adatokra. Azt vizsgáltuk, hogy a sünök ivarának, tömegének, hosszának, a visszafogásnak és a gyűjtési területnek illetve dátumnak van-e hatása az egy sünről gyűjtött ektoparaziták számára. A biometrikus változók közül inkább a tömeget (g) használtuk magyarázó változóként a hossz (mm) helyett, mivel a testtömeg viszonylag erősen korrelált a testhosszal (Pearson-féle korreláció, $r=0,5321872$), több sünről volt erre vonatkozó adat és, ismételt mérések alapján, jóval pontosabban lehetett mérni.

A sünökről gyűjtött kullancsok prevalenciáját befolyásoló hatások vizsgálatához logisztikus regressziót használtam, mivel a függő változó binomiális volt. Itt is a sünök nemének, tömegének, a gyűjtési területnek és időpontnak a hatását vizsgáltam. A sünökről és a növényzetről származó kullancsokból kialakított poolok *Borrelia* prevalenciájának vizsgálatához is logisztikus regressziót alkalmaztam, a függő változók a poolok mérete, a kullancsok faja, neme illetve stádiuma, a gyűjtés dátuma és, ahol rendelkezésre állt erről adat, ott a hőmérséklet és a páratartalom voltak.

A növényzetről meghatározott ideig gyűjtött kullancsokat, a minták kis száma miatt Fisher-féle egzakt próbával hasonlítottam össze. Khi-négyzet próbát használtam annak megállapítására, hogy a stádiumok aránya eltér-e a sünről illetve a növényzetről gyűjtött kullancsok között.

4. Eredmények

4.1. A sünökről és a növényzetről gyűjtött ektoparaziták

A három év során összesen 9371 kullancsot és 1380 bolhát szedtünk le 384 sünről. A legtöbb kullancs *I. ricinus* volt, a fajon belül nimfából, illetve nőtényből találtunk a legtöbbet (4509-et, illetve 2849-et). A 2009-ben gyűjtött ektoparaziták között nem volt *I. hexagonus*, viszont a két másik évben gyűjtöttek közül 144 egyed is ebbe a fajba tartozott. Az *I. hexagonus*-ok mind vagy nőténynek vagy nimfának bizonyultak. 2009-ben egy-egy *Hyalomma marginatum* illetve *Ixodes acuminatus* nimfát is azonosítottunk, 2011-ben pedig egy *Haemaphysalis punctata* nimfát is találtunk (2. táblázat).

2. táblázat: A sünökről gyűjtött kullancsok megoszlása fajonként, illetve stádiumonként

	<i>Ixodes ricinus</i>			<i>Ixodes hexagonus</i>		<i>Ixodes</i> lárva	<i>Hyalomma marginatum</i> nimfa	<i>Ixodes acuminatus</i> nimfa	<i>Haemaphysalis punctata</i> nimfa	Össze- sen
	nőtény	hím	nimfa	nőtény	nimfa					
2009	206	91	160	0	0	12	1	1	0	471
2010	1496	749	2044	4	53	246	0	0	0	4592
2011	1147	546	2305	4	83	222	0	0	1	4308
Össz	2849	1386	4509	8	136	480	1	1	1	9371

Az egy állatról gyűjtött legtöbb kullancs 83 db volt 2009-ben, 155 db 2010-ben és 238 db 2011-ben. A legtöbb azonos fajba tartozó és azonos stádiumú élősködő egy sünnön 175 *I. ricinus* nimfa volt, ezeket 2011 áprilisában gyűjtöttük. A kullancsok prevalenciája a sünökön a három évre viszonyítva 78,13%, a medián intenzitás pedig 18 volt (3. táblázat).

3. táblázat: A sünök fertőzöttsége kullancsokkal

	Sünök száma	Prevalencia (%) (95%-os konfidencia intervallum)	Átlagos intenzitás (95%-os konfidencia intervallum)	Medián intenzitás (95%-os konfidencia intervallum)	Átlagos zsúfoltság (95%-os konfidencia intervallum)
2009	118	63,60 (54,26-72,10)	6,28 (4,07-11,08)	2 (2-4)	36,61 (11,81-58,82)
2010	127	89,76 (83,17-94,26)	39,34 (33,15-46,11)	30,5 (24-35)	71,12 (61,05-83,54)
2011	139	79,86 (72,36-85,90)	38,81 (32,60-48,42)	25 (19-31)	85,73 (65,91-114,76)
Összesen	384	78,13 (73,72-82,05)	30,88 (26,85-35,26)	18 (14-21)	76,16 (64,76-91,37)

Bolhából mindhárom évben jóval kevesebbet találtunk a sünökön, mint kullancsból. 2009-ben 78, 2010-ben 707, 2011-ben 595 példányt gyűjtöttünk össze. A bolhák prevalenciája 54,70% volt a három évre viszonyítva. A medián intenzitás a három évet együtt tekintve 4 volt (4. táblázat).

A legtöbb egyed sünbolha (*Archaeopsylla erinacei*) volt, de azonosítottunk két nőtény és négy hím *Ctenocephalides canis*-t, azaz kutyabolhát is.

4. táblázat: A sünök fertőzöttsége bolhákkal

	Fertőzött sünök száma	Bolhák száma	Prevalencia (%) (95%-os konfidencia intervallum)	Átlagos intenzitás (95%-os konfidencia intervallum)	Medián intenzitás (95%-os konfidencia intervallum)	Átlagos zsúfoltság (95%-os konfidencia intervallum)
2009	31	78	26,70 (21,96-38,52)	2,49 (1,71-4,23)	2 (1-2)	7,05 (2,53-13,77)
2010	93	707	73,2 (64,62-80,39)	7,61 (6,02-10,55)	4 (4-5)	22,20 (13,68-41,78)
2011	82	595	58,99 (50,37-66,94)	7,26 (5,94-9,66)	5 (3-7)	16,58 (10,97-30,30)
Összesen	206	1380	54,70 (49,61-59,64)	6,62 (5,61-8,06)	4 (3-4)	18,85 (13,32-29,58)

A növényzetről összesen 1467 kullancsot gyűjtöttünk, 283 nőtényt, 373 hímét, 772 nimfát, illetve 39 lárvát, ezek mindegyike *I. ricinus*-nak bizonyult a határozás során. 2012 májusában gyűjtöttük a legtöbbet, 675-öt. A szisztematikus gyűjtés során, mely az összesnek csak kis részét tette ki, a füves területeken mindössze 4 lárvát és 1 nimfát találtunk, míg a borostyánosokban változó mennyiségben, de a leghidegebb hónapok és augusztus kivételével mindig találtunk kullancsokat (5. táblázat).

5. táblázat: 2011-12-ben szisztematikusan gyűjtött *Ixodes ricinus*-ok

	Borostyán	Fű
szeptember	2 (1 hím, 1 nimfa)	4 (4 lárva)
október	4 (1 nőstény, 1 hím, 1 nimfa)	0
november	0	0
december	0	0
január	0	0
február	0	0
március	2 (1 nőstény, 1 hím)	0
április	29 (3 nőstény, 5 hím, 21 nimfa)	0
május	76 (2 nőstény, 5 hím, 69 nimfa)	0
június	3 (3 nimfa)	0
július	30 (1 hím, 4 nimfa, 25 lárva)	1 (nimfa)
augusztus	0	0
Összesen	146	5

A kérdőívünket kitöltő 243 személy közül kettő jelezte, hogy a családtagja vagy ismerőse a szigeten fertőződött Lyme-kórral. 5 emberen szívott vért kullancs, 87% nem is találkozott kullancssal, 73% szerint nincs vagy kevés van belőlük a szigeten. A válaszadók 40%-a soha nem lép borostyános részre, 22%-uk pedig csak körülbelül 1 percet tartózkodik ott. Mindössze 18% tölt 4 vagy ennél több percet a borostyánosban. 8% évente egyszer vagy ritkábban, 32,5% hetente ját a Margit-szigeten. A látogatók 90% 1 órát vagy többet tölt itt.

4.2. *Borrelia burgdorferi* s. l. a kullancsokban és a szövetmintákban

A sünnökről eltávolított kullancsok közül, a minták igen nagy száma miatt, e dolgozat keretében csak a 2009-ben gyűjtött példányokban, illetve a 2010-es minták egy részében vizsgáltuk molekuláris módszerekkel a *Borrelia burgdorferi* s. l. jelenlétét. A 2009-es kullancsokból összesen 138 poolt alakítottunk ki, amelyekből 66 lett pozitív. Mindegyik fertőzöttnek bizonyuló kullancs az *I. ricinus* fajba tartozott. A pozitív poolok összesen 282 kullancs DNS-ét tartalmazták, amelyek 43 különböző sünnről származtak. A minimum prevalencia 15%-os volt minden stádiumot nézve, vagyis ennyi volt a prevalencia, ha feltételeztük, hogy minden poolban csak egy valóban fertőzött kullancs volt (6. táblázat). A 42 megszekvenáltatott mintából 40 *B. afzelii*-nek, 2 *B. garinii*-nek bizonyult.

A 2010-es megvizsgált 973 kullancsot 73 sünnről szedtük le (7. táblázat).

6. táblázat: A 2009-es sünökről gyűjtött kullancsok fertőzöttsége *Borrelia burgdorferi* s. l.-val

	<i>Ixodes ricinus</i> nőstény	<i>Ixodes ricinus</i> hím	<i>Ixodes ricinus</i> nimfa	<i>Ixodes</i> lárva	Összesen
Megvizsgált egyedek száma	195	86	159	8	448
Poolok száma	60	35	38	5	138
Pozitív poolok (minimum prevalencia (%))	27 (13,8)	21 (24,4)	18 (11,3)	0 (0)	66 (14,7)

7. táblázat: A 2010-es sünökről gyűjtött kullancsok fertőzöttsége *Borrelia burgdorferi* s. l.-val

	<i>Ixodes ricinus</i>			<i>Ixodes</i> lárva	<i>Ixodes hexagonus</i>		Összesen
	nőstény	hím	nimfa		nőstény	nimfa	
Megvizsgált egyedek száma	335	156	392	68	1	20	972
Poolok száma	47	38	43	27	1	10	166
Pozitív poolok (minimum prevalencia (%))	34 (10,1)	23 (14,7)	24 (6,1)	5 (7,4)	0 (0)	2 (10)	88 (9,1)

A növényzetről gyűjtött kullancsok közül az összeset feldolgoztuk molekuláris módszerekkel. Ezekből 301 poolt alakítottunk ki, amelyekből 190 lett pozitív *Borrelia burgdorferi* s. l.-ra. A minimum prevalencia 12,95% volt összesen (8. táblázat). A szekvenálás során valamennyi vizsgált pozitív poolban lévő baktérium *B. afzelii*-nek bizonyult.

8. táblázat: A növényzetről gyűjtött kullancsok fertőzöttsége *Borrelia burgdorferi* s. l.-val

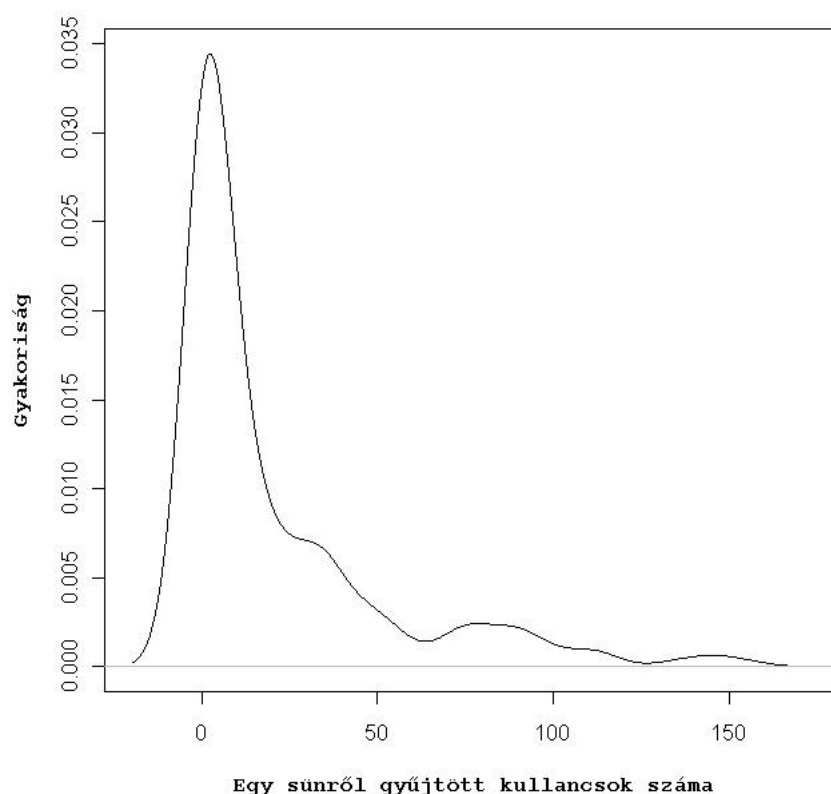
	<i>Ixodes ricinus</i> nőstény	<i>Ixodes ricinus</i> hím	<i>Ixodes ricinus</i> nimfa	<i>Ixodes ricinus</i> lárva	Összesen
Megvizsgált egyedek száma	283	373	772	39	1467
Poolok száma	55	74	163	9	301
Pozitív poolok (minimum prevalencia (%))	36 (12,72)	32 (8,58)	117 (15,16)	5(12,82)	190 (12,95)

A szisztematikusan gyűjtött kullancsok (adataik szerepelnek az előző táblázatban) minimum prevalenciája *Borrelia*-ra 15,3% volt. A viszonylag kicsi mintaelemszám miatt nagy különbség volt a stádiumok és a hónapok fertőzöttségi számaiban: a nőstényeknek 28,57%, a hímeknek 7,14%, a májusban gyűjtött kullancsoknak pedig 17,11% volt a minimum prevalenciája, míg júniusban és októberben nem találtunk fertőzött kullancsot.

A sünökből vett szövetminták közül 227-nek vizsgáltuk meg a fertőzöttségét és ezek 92,5%-a pozitívnak bizonyult. A szövetmintákban detektált *Borrelia* DNS-ekből 141-t szekvenáltattunk meg, 140-ben *B. afzelii*-t, egy mintában pedig *B. spielmanii*-t találtunk.

4.3. Statisztikai elemzés

A kullancsok abundanciájának vizsgálatánál lineáris modellekkel nem kaptunk megbízható eredményeket, mert az egy sünről gyűjtött kullancsok számának eloszlása erősen jobbra ferde volt (5. ábra). Nem paraméteres próbákkal kimutattuk, hogy eltérések vannak egyes területek között a kullancsok abundanciájában (Kruskal-Wallis próba, $p < 0,001$) és hogy az először fogott, illetve a visszafogott sünök között nincs szignifikáns különbség a rajtuk talált kullancsok számának tekintetében, ha a két évet külön nézzük (Wilcoxon-féle előjeles rangösszeg próba, $p = 0,9837$ a 2009-es, $p = 0,4279$ a 2010-es adatokra). Az első év összevonása a másik kettővel nem volt lehetséges, mert a mintaelemszámok, illetve a gyűjtési módszerek nagyon eltérőek voltak.



5. ábra: Egy sünről gyűjtött kullancsok számának eloszlása

A sünökön az ektoparaziták prevalenciájára a vizsgált magyarázó változók (sünök neme, tömege, megfogásuk helye, éve és évszaka) közül csak a gyűjtési évnak volt szignifikáns hatása logisztikus regresszióban ($p = 0,0412$). Itt csak a 2010-es és 2011-es adatokat tudtam használni. Az abundanciát befolyásoló tényezők vizsgálatánál negatív binomiális modellt alkalmaztunk a függő változó ferde eloszlása illetve a jelentős túlszóródás

(diszperziós paraméter: 26,25) miatt. A három évet együtt vizsgálva az évek (2009-hez képest a másik két évnél $p<0,001$) és az évszakok (a tavaszhoz képest a nyár $p<0,001$, az ősz $p=0,007$) hatása is szignifikánsnak bizonyult. Csak a 2010-es és 2011-es adatokat használva, csak az évszakoknak volt statisztikailag értékelhető hatása (a nyár és az ősz is $p<0,001$), tavasszal több kullancsot gyűjtöttünk a sünökről, mint nyáron vagy ősszel. Amikor hőmérsékletet és a csapadékot is bevettem a változók közé, a csapadék hatása is szignifikáns lett három és két évet vizsgálva is ($p=0,034$, illetve $p=0,007$).

A sünökről gyűjtött kullancsok *Borrelia* fertőzöttségének vizsgálatakor a poolok méretének ($p<0,001$) és a lárvá stádiumnak ($p=0,001$) a hatását találtam szignifikánsnak. A modell szerint az egységnyivel nagyobb pool fertőzöttségének esélye 1,13-szorosára nő (konfidencia intervallum (1,057934; 1,199041)), a lárvák fertőzöttsége pedig 0,14-szerese a hímekének (konfidencia intervallum (0,04258868; 0,4705405)).

A növényzetről begyűjtött kullancsok *Borrelia* fertőzöttségére illesztett modellben csak a poolok mérete és a stádiumok szerepeltek magyarázó változóként, mivel a hónapokat nem vehettük bele az eltérő ráfordítás miatt. Ebben a modellben a nimfák fertőzöttségének esélye 3,06-szorosára ($p<0,001$, konfidencia intervallum (1,69; 5,53)), a nőstényeké 2,43-szorosára ($p=0,02$, konfidencia intervallum (1,15; 5,14)) volt a hímekének, illetve a nagyobb poolok fertőzöttségének esélye 1,3-szorosára nőtt ($p=0,02$, konfidenci intervallum (1,05; 1,60)).

Fisher-féle egzakt teszttel a szisztematikusan gyűjtött kullancsok számában a füves és a borostyános területek között szignifikáns különbséget mutattunk ki ($p<0,001$). A sünökről és a növényzetről gyűjtött kullancsok stádiumainak aránya eltért ($p<0,001$).

5. Az eredmények értékelése

A sünökön talált külső élősködők kvantifikálása során mindkét ektoparazita csoport, a kullancsok és a bolhák számában is jelentős különbség mutatkozott az első és az utolsó két év között. 2010-ben és 2011-ben megközelítőleg tízszer annyi élősködőt távolítottunk el a sünökről, mint az első évben. Ennek oka az volt, hogy a sünöket elaltatták, így lehetőség nyílt azok gondosabb és hosszabb ideig tartó vizsgálatára. A 2009-ben parazitamentesnek talált sünök egy része valószínűleg fertőzött volt ektoparazitákkal, azonban a nem megfelelő gyűjtési módszer miatt nagy valószínűséggel csak az erősen fertőzött példányok parazitáltságát tudtuk kimutatni.

A meghatározott kullancsok elsőpró többsége *I. ricinus* volt. Ez Magyarország leggyakoribb kullancsfaja, viszont más, sünökön végzett hasonló felmérések során elsősorban *I. hexagonus*-t találtak az állatokon. Egy németországi vizsgálat során a sünök 58,5%-a volt fertőzött *I. hexagonus*-szal és 11,1% *I. ricinus*-szal. Az *I. hexagonus* prevalenciája nőtt a vidékitől a városi területek felé (Egli, 2004). Egy másik, szintén németországi felmérésben pedig a sünökről eltávolított kullancsok 65%-a bizonyult *I. hexagonus*-nak és 35%-a *I. ricinus*-nak (Thamm et al., 2009). Viszont egy svájci kutatás keretében közel azonos arányban találták meg a két fajt (Gern et al., 1997). A viszonylag magas *I. ricinus* / *I. hexagonus* arány magyarázatát nem ismerjük. Feltehetőleg az *I. ricinus* nagyobb reprodukciós rátája és szélesebb gazdaspektruma ezen az élőhelyen adaptációs előnyt jelent a specialista *I. hexagonus*-szal szemben.

A további három megtalált faj jelenléte nem jellemző Magyarországon. A *Hyalomma marginatum*, mely főként melegebb éghajlatú területeken elterjedt és a krími-kongói haemorrhágiás láz (CCHF) vektora, hazánkban eddig még nem került elő, bár Európa más részeire már behurcolták. Egy németországi vizsgálatban vándormadarak által behozott *H. marginatum*-ból *Rickettsia aeschlimanni* fertőzést mutattak ki (Rumer et al., 2011). A szintén egyetlen példányban megtalált *I. acuminatus* Európában, illetve Afrika és Ázsia egyes részein fordul elő és emberen is képes táplálkozni (Hillyard, 1996). Magyarországon már megtalálták sünön (Babos, 1965), kutyán (Földvári et al., 2007) és hörcsögön (Gyuranecz et al., 2010) is. A *Haemaphysalis punctata* emberen és sünön is szívhat vért, *Babesia*-fajokat terjeszthet (Hillyard, 1996). A területen folytatott további vizsgálatokból kiderülhet, hogy ezen kullancsfajok stabil populációja él-e a szigeten vagy pedig csak behurcolt példányok kerültek elő vizsgálatunk során.

A vizsgált keleti sünök kullancsokkal való jelentős fertőzöttsége egybecseng más, európai sünön végzett kutatások eredményeivel. Egy német állatorvosi klinikákra került sünökön végzett vizsgálat során 100%-os prevalenciát is találtak kullancsokra (Beichel et al., 1996). Ennél valamivel alacsonyabb a jelen vizsgálatban talált 78,13%-os, illetve a 2010-ben és 2011-ben a hatásosabb mintavételnek köszönhető 84,59%-os prevalencia. Nyugat-Európai kutatásokban az *I. hexagonus*-szal kapcsolatban 9 illetve 24 medián intenzitás értékeket találtak (Egli, 2004. Gaglio, 2011). Mi szintén magas, 18, illetve a 2010-11-es adatokat nézve 20,5 medián intenzitást mutattunk ki. Ez a magas intenzitás akár regeneratív anaemiához is vezethet a sünökben (Pfäffle, 2009). Saját vizsgálatunkban a tényleges intenzitás azonban még ennél is magasabb lehet, mivel az apró lárvákat még hosszas vizsgálat után sem biztos, hogy mind eltávolítottuk. A sünök a magas prevalencia és intenzitás adatok alapján, vagyis mivel sok egyed volt fertőzött, és nagy számban voltak rajtuk paraziták, és mert jelentős számú sün él a szigeten, valószínűleg fontos szerepet játszanak az ektoparaziták fenntartásában a Margit-szigeten. Rezervoár szerepük relatív fontosságát azonban csak a területen élő többi gerinces parazitológiai vizsgálatával lehetne maradéktalanul igazolni.

Többféle statisztikai módszerrel is szignifikáns különbség mutatkozott az ektoparaziták számában az első és a másik két év között, nagy valószínűséggel a különböző munkamódszerek miatt. Feltehetőleg az egyes gyűjtési területekhez illetve időpontokhoz tartozó abundancia illetve intenzitásbeli különbségeket a gyűjtők és a begyűjtött sünök területenként és időpontonként igen különböző száma okozta, hiszen volt olyan terület, ahonnan 11, és volt, ahonnan 54 állatot gyűjtöttünk a két év folyamán. Az először megfogott, illetve a jelölten visszafogott sünök kullancsokkal való fertőzöttségében nem volt különbség, mivel az egyes mintavételezések között eltelt legalább egy, de akár több hónap valószínűleg elég volt az újrafertőződésükhöz. A sünökön a kullancsok prevalenciájára csak az évnek volt szignifikáns hatása (a 2010-es és 2011-es adatok között), míg az abundanciát az évszakok hatása befolyásolta. Valószínűleg a csapadék volt az évszakok hatásában a legfontosabb tényező. Tavasszal voltak a legfertőzöttebbek a sünök.

A növényzetről gyűjtött 1467 kullancs mind *I. ricinus* volt. Itt is nimfából gyűjtöttünk a legtöbbet, de a sünökről gyűjtött élősködőkkel ellentétben valamivel több hímeket találtunk, mint nőstényt. Bár a ráfordítás havonta különbözött mindkét gyűjtési évben kiemelkedő számú kullancsot gyűjtöttünk tavasszal (677-et illetve 713-at). Egy Magyarországon, három évig végzett felmérésben hasonló mintázatot találtak egy aktivitási csúccsal tavasszal-kora

nyáron és egy kisebbel ősszel (Egyed et al., 2012). Ez a tendencia látszik a szisztematikusan gyűjtött kullancsok között is. Ez utóbbiakat vizsgálva szignifikánsan több kullancsot találtunk a borostyános területen, mint a fűvön. A szigeten a fűvet rövidre nyírják, így a locsolás ellenére sem kedvező a páratartalom a gazdát kereső kullancsok számára.

Irodalmi adatok alapján sünöket leggyakrabban parazitáló bolhafaj az *A. erinacei*, így nem meglepő, hogy jelen vizsgálatban is ebből találtunk a legtöbbet. Ezt egy németországi kutatásban 43,7%-os prevalenciával és 6,5 átlagintenzitással találták meg sünökön (Egli, 2004), mi ehhez hasonló értékeket: 54,70%-os prevalenciát és 4 medián intenzitást kaptunk. Vélhetően az általunk összegyűjtött bolhák száma is kisebb a valósánál, hisz gyorsaságuk és rejtőzködő életmódjuk miatt ezeknek a rovaroknak nehézkes a sünökről való eltávolítása. Az *A. erinacei* sünön kívül kutyából, macskából és emberből is szívhat vért. A *C. canis*, amelyből ebben a vizsgálatban 6 példányt találtunk, elsősorban kutyákon élősök, de már korábban megtalálták sünön is (Visser, 2001).

Mind a sünökről, mind a növényzetről gyűjtött kullancsokban találtunk *Borrelia*-fertőzöttséget. A minták nagy száma miatt poolokat alakítottunk ki, így nagy valószínűséggel szisztematikusan alábecsültük a valós prevalenciát, de a 2009-ben sünökről leszedett *I. ricinus* nőtényekben és nimfákban a 10%, illetve a hímekben a 20% fölöttinek talált minimum prevalencia a sünöknek e baktériumok életciklusában betöltött fontos szerepére utal. Erre mutat az is, hogy a megvizsgált sün szövetminták 92,5%-a pozitív volt *Borrelia burgdorferi* s. l.-ra. 2010-ben, feltehetőleg a nagyobb poolok miatt, valamivel alacsonyabb minimum prevalenciákat kaptunk. Ezt bizonyítja az is, hogy a logisztikus modellben szignifikáns lett a pool méret változó, a nagyobb poolok nagyobb eséllyel lettek szignifikánsak. A lárva stádium hatása is szignifikáns lett, kevesebb lárva volt fertőzött, aminek oka lehet, hogy a *B. burgdorferi* s. l. kis hatékonysággal terjed transzovariálisan.

Egy vizsgálatban Litvániában 13,3%-os, Norvégiában 5,2%-os prevalenciát találtak *B. burgdorferi* s. l.-ra a növényzetről gyűjtött kullancsokban (Paulauskas et al., 2008), mi 12,95%-os minimum prevalenciát találtunk. Ez egy nagyságrenddel magasabb egy másik magyarországi vizsgálatban talált 2,5%-os minimum prevalenciánál (Egyed et al., 2012). Egy cseh vizsgálatban 1995 és 1998 között 9,2-2,8%-os prevalenciát találtak *Borrelia*-ra városi parkokban. A *B. garinii*/ *B. afzelii* arány 1,4:1 volt (Bašta et al., 1999). Németországban és Finnországban is végeztek felmérést a városi parkokban élő kullancsok *Borrelia burgdorferi* s. l.-val való fertőzöttségével kapcsolatban. Az előbbi országban 17,9%, az utóbbiban átlagosan 32%-os prevalenciát találtak. Mindkét vizsgálatban a *B. afzelii*-t mutattak ki a

legnagyobb arányban (Maetzel et al., 2005, Junttila et al., 1999). Ez a faj volt a domináns a sünökről gyűjtött kullancsokban és a szövetmintákban is, sőt a Margit-szigeten összegyűjtött kullancsokban csak ezt találtuk meg. A *B. afzelii* Európában az egyik legelterjedtebb *Borrelia*-faj, ez az emberi megbetegedések egyik leggyakoribb okozója is. A *B. garinii*-vel együtt már korábban kimutatták sünökből (Gern et al., 1997).

A növényzetről gyűjtött kullancsok *Borrelia* fertőzöttségére illesztett modellben is függött a poolok méretétől a fertőzöttség, csakúgy mint a sünökről gyűjtöttek között, de itt a nőstény és nimfa stádiumok szignifikánsan nagyobb eséllyel voltak fertőzöttek, mint a hímek. Ez az eredmény nem meglepő, mivel a nimfák és a nőstények hosszabb ideig szívnak vért (Hillyard, 1996).

A sünök 92,5%-a (210/227) bizonyult *Borrelia*-pozitívnak, amely nemzetközi összehasonlításban is igen magas arány. A genotipizálás során döntően *B. afzelii*-t, valamint egy *B. spielmanii*-t azonosítottunk. Mivel mindkét faj képes emberben Lyme-borreliosist okozni, további vizsgálatokat folytattunk a humán fertőződés esélyének megbecslésére.

243 személy töltötte ki a kérdőívünket, statisztikai próbákat nem végeztünk el rá az egyöntetű eredmények miatt. Általánosságban elmondható, hogy kevesen fertőződnek Lyme kórral és a kullancsal találkozók (13%) és fertőződők aránya (2%) is kicsi. Ennek lehet az a magyarázata, hogy az általunk megvizsgált kullancsok *Borrelia* fertőzöttsége elég magas volt, de ezek túlnyomó részét a borostyános helyeken gyűjtöttük, ahol az emberek nem vagy csak keveset tartózkodnak.

A Margit-szigeten szép idő esetén minden héten több ezer látogató fordul meg. Sokan magukkal viszik a kutyáikat is, melyek, ahogy feltehetően behurcolhatnak, úgy ki is vihetnek a szigetről *Borrelia*-kkal fertőzött kullancsokat, illetve akár a szigeten korábban nem jelenlévő kullancs- és *Borrelia*-fajokat is. Humánegészségügyi szempontból a legjelentősebbek a vizsgálatban nagy számban talált nimfák és lárvák. Ezek fertőződhetnek *Borrelia*-val, miközben a sünön táplálkoznak, majd a következő stádiumukban emberre is kerülhetnek, és betegséget okozhatnak.

Jelenleg nincs az Európai Unióban engedélyezett, szabadban használható irtószer és az emberre alkalmazható szerek hatása korlátozott. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy egy margit-szigeti látogatás után is érdemes a leghatékonyabb prevenciós módszert alkalmazni: testünk alapos átvizsgálását az esetlegesen rajtunk lévő kullancsok minél korábbi eltávolítása céljából.

6. Összefoglalás

A Lyme-borreliosis az északi félteke leggyakoribb kullancsok által terjesztett betegsége. Az ezt okozó baktériumok, a *Borrelia burgdorferi* sensu lato fajcsoport egyes tagjai sokféle gerinces gazdában fennmaradhatnak a természetben. Vizsgálatunk célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a margit-szigeti sünökben és az ezekről illetve a növényzetről gyűjtött különböző fajú kullancsokban is jelen van-e a fertőzés és felbecsüljük a fertőzés humán egészségügyi jelentőségét is.

2009-től 2011-ig gyűjtöttünk be sünöket havonta, a téli hónapok kivételével. Az állatokat lemértük és eltávolítottuk róluk a kullancsokat és a bolhákat, illetve 2010-ben és 2011-ben szövetmintát is vettünk a fülükéből. A növényzetről zászlózással gyűjtöttünk kullancsokat. Az etoparazitákat meghatároztuk, a kullancsokból alkalikus hidrolízissel, a szövetmintákból DNS kivonó kittel kivontuk a DNS-t és polimeráz láncreakció illetve gélelektroforézis segítségével megállapítottuk, hogy fertőzöttek-e *Borrelia*-val. A pozitív minták egy részét megszekvenáltattuk.

A három év folyamán 384 sünről 9371 kullancsot és 1380 bolhát gyűjtöttünk össze. A három évre viszonyítva a sünök kullancsfertőzöttségének prevalenciája 78,13%, a fertőzöttség medián intenzitása 18 volt. A meghatározott bolhákból 1374 az *Archaeopsylla erinacei*, 6 a *Ctenocephalides canis* fajba tartozott. A sünök bolhafertőzöttségének prevalenciája 54,70%, medián intenzitása 4 volt. A növényzetről 1467 az *I. ricinus* fajba tartozónak bizonyuló kullancsot szedtünk össze. A sünökről gyűjtött kullancsokban 10,85%-os volt a minimum prevalencia *B. burgdorferi* s. l.-ra, a zászlózással összegyűjtött kullancsokban pedig 12,95%. A növényzetről gyűjtött kullancsokban *Borrelia afzelii*-t, a szövetmintákban *B. afzelii*-t és *B. spielmanii*-t, a sünökről gyűjtött kullancsokban *B. afzelii*-t és *B. garinii*-t is azonosítottunk. A sünök 92,5%-a bizonyult *Borrelia*-pozitívnak, amely nemzetközi összehasonlításban is igen magas arány.

A Margit-sziget kedvelt városi parkja Budapestnek, amelyet hetente több ezer magyar és külföldi látogat. Az itt élő sünök vizsgálataink alapján fertőzhetik a rajtuk gyakran vért szívó kullancslárvákat és –nimfákat, melyek a következő stádiumukba jutva emberre is kerülhetnek, és betegséget okozhatnak. Kérdőíves felmérésünk szerint a Margit-szigeten a relatíve sok fertőzött kullancs ellenére Lyme-kórral fertőződők száma nem jelentős, mivel

azok nagy része a borostyános területeken van, ahol az emberek nem, vagy csak ritkán tartózkodnak.

7. Summary

Lyme borreliosis is the most common tick-borne disease on the Northern hemisphere. The causative agents, namely certain members of the group *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be maintained in nature by several vertebrate hosts. The aim of our study was to find out if the infection is present in the hedgehogs and in the different species of ticks collected from the hedgehogs and the vegetation on the Margaret Island and to assess the human health significance of the infection.

We collected hedgehogs from 2009 to 2010 monthly, except the winter months. The animals were measured, the ticks and fleas were removed and in 2010 and 2011 tissue samples were taken from the ears of the hedgehogs. Questing ticks were collected by flagging. The ectoparasites were identified, the DNA was extracted from the ticks by alkaline hydrolysis and from the tissue samples with a commercial DNA-extraction kit, and the *Borrelia* infection was investigated with the help of polymerase chain reaction and gel electrophoresis. Some of the positive samples were.

In the three-year study, we collected 9371 ticks and 1380 fleas from 384 hedgehogs. Prevalence of the hedgehogs' tick infestation was 78.13% and the median intensity was 18. Most (1374) of the identified fleas were *Archaeopsylla erinacei* and only six were *Ctenocephalides canis*. Prevalence of the hedgehogs' flea infestation was 54.70%, the median intensity was 4. We collected 1467 *I. ricinus* from the vegetation. In the ticks collected from hedgehogs the minimum prevalence was 10.85% for *B. burgdorferi* s. l. The minimum prevalence in questing ticks was 12.95%. The bacteria detected in questing ticks and tissue samples were *Borrelia afzelii*, in tissue samples there were *B. afzelii* and *Borrelia spielmanii* and in the ticks collected from hedgehogs we found *B. afzelii* and *Borrelia garinii*. 92.5% of the hedgehog samples were positive for *Borrelia*, which is a very high prevalence compared to data from other countries.

Margaret Island is a popular city park in Budapest with several thousands of visitors every week. We have shown that hedgehogs can infect nymphs and larvae feeding on them and in their next stage, ticks might infect people and cause disease. According to our questionnaire, few people get infected on the Margaret Island despite the relatively high proportion of infected ticks, because the ticks occur mainly in the bushes, where people do not or rarely go.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, dr. Földvári Gábornak és Rigó Krisztinának a rengeteg munkát, segítséget és türelmet.

Köszönöm Prof. Dr. Farkas Róbertnek, tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított a SZIE-ÁOTK, Parazitológiai és Állattani Tanszéken végzett munkák kivitelezéséhez.

Szeretnék köszönetet mondani Ronkayné Tóth Máriának és az Urbanizációs munkacsoportnak a sünök gyűjtésének és vizsgálatának megszervezéséért, az önkénteseknek az állatok összegyűjtését és dr. Molnár Viktornak a sünök altatásában nyújtott segítségét. Köszönöm Molnár Imolának és Kiss Tímeának a segítségüket a DNS kivonásban. Köszönet Igor Majlátnak a bolhák és Prof. Agustin Estrada-Pena specialistának a két nehezen besorolható nimfa meghatározásáért.

Munkámat a TÁMOP 4.2.2.B-10/1-2010-0011 „A tehetséggondozás és a kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen” és a SZIE-ÁOTK NKB pályázatok támogatták. Vizsgálatainkat a Közép- Duna- Völgyi Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Felügyelőség engedélyével végeztük.

A Margitszigeti Állatkertnek is szeretném megköszönni, hogy helyszínt biztosított a sünök alapos vizsgálatához.

9. Irodalomjegyzék

- Ackermann, R. (1975): Tick-borne meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux, Bannwarth). *Münchener Medizinische Wochenschrift*, vol. 118 (49), p.1621-2.
- Asbrink, E., Hovmark, A., Weber, K. (1993): Acrodermatitis Chronica Atrophicans. In: Weber, K., Burgdorfer, W. (Eds.) Aspects of Lyme Borreliosis. p. 193-204. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg.
- Babos, S. (1965): Fauna Hungariae, Vol. XVIII. Arachnoidea, No. 7. Ticks – Ixodidae. Budapest: Academic Press; pp. 38.
- Barker, S. C., Murrell, A. (2008): Systematics and evolution of ticks. In: Ticks Biology, Disease and controll. Ed. Bowman, A. S., Nuttall, P. A. New York: Cambridge University Press. p. 1-39.
- Bašta, J., Plch, J., Hulínská, D., Daniel, M. (1999): Incidence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in an urban environment, Prague, Czech Republic, between 1995 and 1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18, p. 515-517.
- Beck, W. (2007): Endoparasites of the hedgehog. *Wiener Klinische Wochenschrift*, Vol. 119 (19-20 Suppl 3), p. 40-4.
- Beichel, E., Petney, T. N., Hassler, D., Brückner, M., Maiwald, M. (1996): Tick infestation patterns and prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks collected at a veterinary clinic in Germany. *Veterinary parasitology*, 65, p. 147-155.
- Bihari Z. (2008): Keleti sün. in: Bihari Z., Csorba G. és Heltai, M. (szerk.): Magyarország emlőseinek atlasza. p. 50-51.
- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E., Davis, J. P. (1982): Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*. 216(4552), p.1317-9.
- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S.F., Péter, O., Aeschlimann, A. (1983): Erythema chronicum migrans--a tickborne spirochetosis. *Acta Tropica*, 40(1), p.79-83.

- Cieniuch, S., Stańczak, J., Ruzcaj, A. (2009): The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in Northern Poland. *Polish Journal of Microbiology*, vol. 58, no. 3, 231-236.
- Cirak, V. Y., Senlik, B., Aydogdu, A., Selver, M., Akyol, V. (2010): Helminth parasites found in hedgehogs (*Erinaceus concolor*) from Turkey. *Preventive Veterinary Medicine*, 97, p. 64-66
- Chmielewska-Badora, J., Moniaszko, A., Żukiewicz-Subczak, W., Zwoliński, J., Piątek, J., Pancewicz, S. (2012): Serological survey in persons occupationally exposed to tick-borne pathogens in cases of co-infections with *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp. and *Babesia microti*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol 19, 2, p. 271-274.
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schäfer, S.M., Vitorino, L., Gonçalves, L., Baptista, S., Vieira, M.L., Cunha, C. (2004): First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, p. 1316–1318.
- Dantas-Torres, F. (2008): The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152, p. 173-185.
- Demaerschallck, I., Benmessaoud, A., Dekesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoet, P., Bigaignon, G., Bollen, A., Godfroid, E. (1995): Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme-disease patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 602-8.
- Diza, E., Papa, A., Vezyri, E., Tsounis, S., Milonas, I., Antoniadis, A. (2004): *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerging Infectious Diseases*, 10, p. 1692–1693.
- Egli, R. (2004): Comparison of physical condition and parasite burdens in rural, suburban and urban hedgehogs *Erinaceus europaeus*: Implications for conservation, diplomamunka, Berni Egyetem.
- Egyed L., Élő P., Sréter-Lancz Zs., Széll Z., Balogh Zs., Sréter T. (2012): Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary. *Ticks and Tick-borne Diseases*, in press.

- Földvári, G., Farkas, R., Lakos, A. (2005a): *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerging Infectious Diseases*, 11, p. 1794–1795.
- Földvári, G., Hell, E., Farkas, R. (2005b): *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Veterinary Parasitology*, vol. 127 (3-4), p. 221-226.
- Földvári, G., Márialigeti, M., Solymosi, N., Lukács, Z., Majoros, G., Kósa, J.P., Farkas, R. (2007): Hard ticks infesting dogs in Hungary and their infection with *Babesia* and *Borrelia* species. *Parasitology Research* 101 (Supplement 1), p. 25-34.
- Földvári G, Rigó K, Majláthová V, Majláth I, Farkas R, Pet'ko B (2009) Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards and their ticks from Hungary. - *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9: 331-336.
- Gaglio, G., Allen, S., Bowden, L., Bryant, M., Morgan, E. R. (2011): Parasites of European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Britain: epidemiological study and coprological test evaluation. *European Journal of Wildlife Research*, in press
- Furquim, K. C. S., Bechara, G. H., Camargo Mathias, M. I. (2010): Morpho-histochemical characterization of the salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in different feeding stages: description of new cell types. *Experimental and Applied Acarology*, 50, p. 59-70.
- Gern, L., Toutoungi, L. N., Hu, C. M., Aeschlimann, A. (1991): Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Medical and Veterinary Entomology*, 5(4), p. 431-5.
- Gern, L., Rais, O. (1996): Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 33, p. 189-192.
- Gern L., Rouvinez E., Toutoungi L. N., Godfroid E. (1997): Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitologica (Praha)*, 44(4), p. 309-14.

- Gilles, J., Just, F.T., Silaghi, C., Pradel, I., Passos, L.M., Lengauer, H., Hellmann, K., Pfister, K. (2008): *Rickettsia felis* in fleas, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 14, p. 1294-1296.
- Gray, J. S., Kahl, O., Janetzki-Mittman, C., Stein, J., Guy, E. (1994): Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehogs, *Erinaceus europeus* L. *Experimental & Applied Acarology*, vol. 18, p. 485-491.
- Guy, E.C., Stanek, G. (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*, 44, 610–611.
- Gylfe, A., Bergström, S., Lundström, J., Olsen, B. (2000): Reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature*, 17; 403(6771), p. 724-5.
- Gyuranecz M., Dénes B., Dán Á., Rigó K., Földvári G., Szeredi L., Fodor L., Sallós A., Jánosi K., Erdélyi K., Krisztalovics K., Makrai L. (2010): Susceptibility of the common hamster (*Cricetus cricetus*) to *Francisella tularensis* and its effect on the epizootiology of tularemia in an area where both are endemic. *Journal of Wildlife Diseases*, 46 (4), p. 1316-1320
- Harris, R. A., Kaufman, W. R. (1981): Hormonal control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology*, Vol. 27, Issue 4, p. 241-245, 247-248.
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H. J., Straube, E. (2007): First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious disease*, vol. 26 (8), p. 595-601.
- Hillyard, P. D. (1996): Ticks of North-West Europe. Shrewsbury:Field Studies Council. P.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S. R., Krause, P. J., Persing, D. H. (2000): Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2000, p. 451-469.
- Hornok, S., Farkas, R. (2005): First autochthonous infestation of dogs with *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in Hungary: case report and review of current knowledge on this tick species. *Magyar Állatorvosok lapja*, 127, p. 623-629.

Hornok S., Földvári G., Elek V., Naranjo, V., Farkas R., de la Fuente, J. (2008): Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, vol. 154, July 2008, issues 3-4, p. 354-359.

Hutterer, R. (2005): Order Erinaceomorpha. In: *Mammal Species of the World* (eds. Wilson, D.E. and Reeder, D.M.), 3rd Edition, JHU Press, Baltimore, USA, p. 212-219.

Junttila, J., Peltomaa, M., Soini, H., Marjamäki, M., Viljanen, M. K. (1999): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, no. 5, p. 1361-1365.

Kálmán D., Sréter T., Széll Z., Egyed L. (2003): *Babesia microti* infection of antropophilic tick (*Ixodes ricinus*) in Hungary. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, vol. 97, no. 3, p. 317-319.

Keirans, J. E., Oliver, J. H., Needham, G. R. (1992): The *Ixodes ricinus/persulcatus* complex defined, p.302, In: Munderloch, U. G., Kurtii, T. J. (Eds.) Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface: An Agenda for Research. First International Conference, Saint Paul, Minnesota.

Kozuch, O., Gresikova, M., Nosek, J., Lichard, M., Sekeyova, M. (1967): The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bulletin Of The World Health Organization*, vol. 36 suppl, p.61-66.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S. M., Sewell, H. S., Brade, V., Kraiczy, P. (2002a): Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. *Trends in Microbiology*, 10(2), p. 74-9.

Kurtenbach, K., Schäfer, S. M., Sewell, H. S., Peacey, M., Hoodless, A., Nuttall, P.A., Randolph, S. E. (2002b): Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that feed on birds. *Infection and Immunity*, 70(10), p. 5893-5.

Labuda, M. & Nuttall, P. A. (2008): Viruses transmitted by ticks. In: *Ticks Biology, Disease and controll*. Ed. Bowman, A. S., Nuttall, P. A. New York: Cambridge University Press. p. 253-280.

Lakos, A. (2002): Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA). *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114 (13-14), p. 648-54.

Lakos A. (2009): Lyme-borreliosis – 25 év hazai tapasztalatai. *Orvosi Hetilap*, 150, p. 725–732.

Lakos A., Kőrösi Á., Földvári G. (2012): Contact with horses is a risk factor for tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA): a case control study. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 124(17-18) p. 611-617.

Lakos A., Nagy G., Jankovics I., Csík M. (1991): A *Borrelia burgdorferi* (Lyme spirochaeta) első hazai izolálása kullancsokból. *Orvosi hetilap*, vol. 132 (3), p. 129-130, 133-134.

Maetzel, D., Maier, W. A., Kampen, H. (2005): *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. *Parasitology Research*, 95:5-12

Majláthová, V., Majláth, I. et al. (2006): *Borrelia lusitaniae* and green lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. *Emerging Infectious Diseases*, 12, p. 1895–1901.

Margos, G., Gatewood, A.G., Aanensen, D.M., Hanincová, K., Terekhova, D., Vollmer, S.A., Cornet, M., Piesman, J., Donaghy, M., Bormane, A., Hurn, M.A., Feil, E.J., Fish, D., Casjens, S., Wormser, G.P., Schwartz, I., Kurtenbach, K. (2008): MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, p. 8730–8735.

Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R. S., Cornet, M., Fingerle, V., Rudenko, N., Ogden, N., Aanensen, D. M., Fish, D., Piesman, J. (2010): Multilocus sequence analysis of *Borrelia bisettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1 (4), p. 151-158.

Margos, G., Vollmer, S. A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., Kurtenbach, K. (2009): A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol.* Aug;75(16):5410-6.

Oliver, J. H. (1989): Biology and systematics of ticks (Acari:Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20, p. 397-430.

Parola, P., Paddock, C. D., Raoult, D. (2005): Tick-Borne Rickettsiosis around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 2005, p. 719-756

Paulauskas, A., Ambrasienė, D., Radzijeuskaja, J., Rosef, O., Turcinaviciene, J. (2008): Diversity in prevalence and genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in Lithuania and Norway. *International Journal of Medical Microbiology*, 298 (2008) S1, p. 180-187.

Pfäffle, M., Petney, T., Elgas, M., Skuballa, J., Taraschewski, H. (2009): Tick-induced blood loss leads to regenerative anaemia in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Parasitology*, 136, p. 443–452.

R Development Core Team (2006): R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.

Randolph, S.E., Gern, L., Nuttall, P.A. (1996): Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, 12, p. 472-479.

Randolph, S. E., Green, R. M., Peacey, M. F., Rogers, D. J. (2000): Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology*, 121 (Pt 1), p. 15-23.

Richter, D., Allgöwer, R., Matuschka, F-R. (2002): Co-feeding Transmission and Its Contribution to the Perpetuation of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 8, No. 12, p. 1421-1425.

Rigó K., Gyurencz M., Dán Á., Földvári G. (2011): Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ectoparasites in Hungary. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11 p. 1499-1501.

Rigó K., Majoros G., Jablonszky M., Molnár V., Tóth M., Földvári G. (2012): A sünök ektoparazitái és a sünökből kimutatott zoonotikus kórokozók. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2012/6, 134. 353-360.

Riley, P. Y., Bruno B. Chomel, B. B. (2004): Hedgehog Zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 11, No. 1, p. 1-5.

Rózsa L. (2005): Élősködés: az állati és emberi fejlődés motorja. Budapest: Medicina. p. 318.

Rózsa L., Reiczigel J., Majoros G. (2000): Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*, 86, p. 228-232.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J. H. Jr. (2011): *Borrelia carolinensis* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolated from rodents and a tick from the south-eastern USA. *Int J Syst Evol Microbiol*, Feb; 61(Pt 2), p. 381-3.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Mokracek, A., Piskunová, N., Ruzek, D., Mallatová, N., Grubhoffer, L. (2008): Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (10), p. 3540-3543

Rudolph, D., Knülle, W. (1974): Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. *Nature*, 3;249(452), p. 84-5.

Rumer, L., Graser, E., Hillebrandt, T., Talaska, T., Dautel, H., Mediannikov, O., Roy-Chowdhury, P., Sheshukova, O., Mantke, O.D., Niedrig, M. (2011): *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma marginatum* ticks, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 17, p. 325-326.

Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, .F, Dumler, J.S. (2004): Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10, p. 1643-1648.

Santos-Silva, M.M., Sousa, R., Santos, A.S., Melo, P., Encarnação, V., Bacellar, F. (2006): Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Experimental & Applied Acarology*, 39, p. 331-338.

Sahibi, H., Rhalem, A., Berrag, B., Goff ,W. L. (1998): Bovine babesiosis. Seroprevalence and ticks associated with cattle from two different regions of Morocco. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998 Jun 29; 849, p. 213-8.

- Saito, K., Ito, T., Asashima, N., Ohno, Mi., Nagai, R., Fujita, H., Koizumi, N., Takano, A., Watanabe, H., Kawabata, H. (2007): Case report: *Borrelia valaisiana* infection in a Japanese man associated with travelling to foreign countries *Am. Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 77, p. 1124-1127.
- Schwann, T. G., Piesman, J. (2002): Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 8(2), p. 115-21.
- Skuballa, J., Oehme, R., Hartelt, K., Petney, T., Bücher, T., Kimmig, P., Taraschewski, H. (2007): European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp., Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 13, p. 952-953.
- Skuballa, J. D., Petney, T., Pfäffle, M., Taraschewski, H. (2010): Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in the European Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its Ticks. *Vectore Borne Zoonotic Diseases*, 10 (10), p. 1055-1057 .
- Skuballa, J., Petney, T., Pfäffle, M., Oehme, R., Hartelt, K., Fingerle, V., Kimmig, P., Taraschewski, H. (2012): Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis* and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus* spp.) in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, febr, 3 (1), p. 8-13.
- Steere, A. C., Malawista, S. E., Snyderman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R., Steele, F. M. (1977): Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*, 20 (1), p. 7-17.
- Thamm, S., Kalko, E. K. V., Wells, K. (2009): Ectoparasite infestations of hedgehogs (*Erinaceus europeus*) are associated with small-scale landscape structures in an urban-suburban environment. *EcoHealth*, 6, p. 404-413.
- Visser, M., Rehbein, S., Wiedemann, C. (2001): Species of flea (siphonaptera) infesting pets and hedgehogs in Germany. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Disease and Veterinary Public Health*, 48, p. 197-202.
- Vyrostekova, V., Khanakah, G., Kocianova, E., Gurycova, D. & Stanek, G. (2002): Prevalence of coinfection with *Francisella tularensis* in reservoir animals of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wiener klinische Wochenschrift* 114, 482–488.

Wang, G, van Dam A. P., Dankert, J. (1999): Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. *Journal Of Clinical Microbiology*, vol. 37 (9), p. 3025-8.

Wilson, D.E. and Reeder, D.M. (eds.) (2005): Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA , 3rd ed., vols. 1 & 2, pp. 2142.

Yakimoff, V. L. (1909): Die Zecken und Piroplasmen des Igels. *Cntrlblb. Bakt. I. Orig.*, 52. 472–477.

Zöldi, V., Juhász, A., Nagy, Cs., Papp, Z., Egyed, L. (2012): Tick-borne encephalitis and Lyme disease in Hungary – The epidemiological situation between 1998 and 2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, In press